

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Шевченко Сергея Петровича на диссертационную работу Писаревой Екатерины Евгеньевны «Анализ мутаций KRAS и BRAF в опухолях», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Актуальность темы. В настоящее время молекулярно-генетическая диагностика является важной составляющей персонализированного подхода при лечении онкологических пациентов. Анализ таких маркеров опухоли как мутации в генах KRAS и BRAF необходим пациентам с меланомой кожи и раком толстой и прямой кишки для определения чувствительности к препаратам таргетной терапии. Особый интерес представляет выбор наиболее чувствительного и специфичного метода диагностики мутаций, используемого для исследования соматических мутаций в опухолях. Поэтому поставленная цель диссертационной работы Писаревой Е.Е. посвящена актуальной проблеме – разработке методик анализа соматических мутаций в генах KRAS и BRAF, а также исследованию частот этих мутаций у российских пациентов с опухолями. Разработка методик диагностики мутаций, а также определение их частот среди российских пациентов необходимы для внедрения молекулярно-генетической диагностики в клиническую практику врачей-онкологов и использования эффективного персонализированного подхода в терапии опухолей.

Научная новизна и практическая значимость исследования и полученных результатов. Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнения. Автором впервые установлено, что применение недавно разработанных LNA-олигонуклеотидов позволяет с высокой чувствительностью проводить анализ мутаций как с помощью ПЦР, так и традиционным методом секвенирования по Сэнгеру. В результате выполнения данной работы впервые в РФ получены высокочувствительные методики диагностики мутаций, которые в настоящее время используются в

клинической лабораторной диагностике. Автором впервые получены данные о частотах мутаций KRAS и BRAF при карциноиде и немелкоклеточном раке легкого у российских пациентов и дополнены данные о частотах мутаций при меланоме кожи и раке толстой и прямой кишки. Полученные данные вносят вклад в поиск молекулярных мишеней для создания новых таргетных препаратов и лечение онкологических пациентов с меланомой кожи и колоректальным раком уже существующими таргетными препаратами.

Особенная практическая значимость работы состоит в создании высокочувствительных методик анализа мутаций в генах KRAS и BRAF в фиксированных образцах ткани опухоли. Эти методики используются при диагностике маркеров чувствительности к таргетной терапии у пациентов Новосибирска и других регионов РФ.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Достоверность полученных результатов обеспечена применением актуальной научно-методической базы, использованием современных методов (ПЦР в режиме реального времени, секвенирования по Сэнгеру, пиросеквенирования). Для оценки диагностической чувствительности и специфичности использовали реальные клинические образцы опухолей, что позволяет сделать вывод о достоверности измеренных диагностических параметров.

Выводы основаны на анализе достаточного количества образцов опухолей для анализа мутаций в генах KRAS и BRAF при меланоме кожи, раке толстой и прямой кишки, карциноиде ЖКТ и немелкоклеточном раке легкого. Все образцы опухолей были анализированы одновременно несколькими методами для получения достоверных данных о мутациях.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 5 международных и российских научно-практических конференциях и форумах.

Выводы, сделанные в диссертационной работе, соответствуют поставленным целям и задачам, обоснованы и логично вытекают из полученных результатов. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Результаты опубликованы в 9 печатных работах, из них 5 – тезисы докладов, 1 статья в международном англоязычном рецензируемом журнале и 3 статьи – в научных рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК для публикации результатов диссертационных исследований.

Соответствие содержания и оформления диссертации правилам ВАК. Диссертация Писаревой Е.Е. изложена на 138 страницах. Она имеет классическую структуру и состоит из четырех глав: в качестве литературного обзора выступает глава «Современное состояние исследования соматических мутаций генов KRAS и BRAF в опухолях», а также содержит главы «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов исследования», а также введение, заключение, выводы, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и список используемой литературы, включающего 164 источника преимущественно иностранных авторов.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранной темы исследования, на основании чего формулирует цель и задачи работы, показывает научную новизну и практическую значимость исследования, формулирует положения, выносимые на защиту. В первой главе, занимающей 26 стр., приведены литературные данные об имеющихся методах анализа мутаций, а также роли соматических мутаций KRAS и BRAF в различных типах опухолей и лечении с помощью персонализированной таргетной терапии. Отдельной главой представлена информация об имеющихся способах получения ДНК из такого сложного материала как фиксированная в формалине и заключенная в парафин ткань. В заключении к первой главе подчеркивается важность разработки высокочувствительных методов диагностики соматических мутаций в опухолях.

Глава «Материалы и методы» подробно описывает используемые методики. Приведены подробные клинико-морфологические характеристики используемых в исследовании образцов опухолей. Для решения поставленных задач автор использует разнообразные современные методы анализа мутаций: ПЦР в режиме реального времени, секвенирование по Сэнгеру, пиросеквенирование. Для получения ДНК из образцов опухолей использован метод лизиса горячей щелочью с последующей очисткой нуклеиновых кислот на магнитных частицах, что позволило получать данные высокого качества. В целом, диссертационная работа Писаревой Е.Е. выполнена на высоком научно-методическом уровне.

В разделе «Результаты исследования» приведены полученные данные, включающие кривые амплификации для ПЦР в режиме реального времени, фореграммы для секвенирования по Сэнгеру и другие. В этом исследовании эксперименты выполнены лично автором. В главе «Обсуждение результатов исследования» автор проводит сравнительный анализ российских и зарубежных публикаций и собственных результатов, логично подводя рассуждение к сформулированным выводам.

Общие замечания по диссертационной работе:

1. Возможно, стоит учитывать этническую принадлежность пациентов при анализе частот мутаций.

2. При описании результатов эксперимента по количественному выделению ДНК не обсуждаются возможные причины низкого выхода при использовании набора «MagneSil Genomic, Fixed Tissue Sysytem».

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Результаты, полученные при выполнении диссертационной работы Писаревой Е.Е., без сомнения, представляют интерес как для научно-исследовательских учреждений, занимающихся изучением молекулярно-генетических особенностей опухолей, так и для медицинских учреждений,

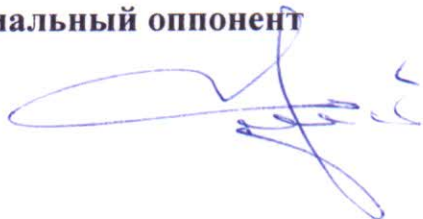
использующих генетические маркеры опухолей для выбора наиболее эффективного лечения для пациента.

Предложенный соискателем высокочувствительный метод анализа мутаций KRAS и BRAF, может быть использован в научно-исследовательских целях для изучения механизмов канцерогенеза в опухолях. Использование результатов исследования, полученных Писаревой Е.Е., представляется также целесообразным для онкологов, генетиков и молекулярных биологов.

Заключение. Кандидатская диссертация Писаревой Екатерины Евгеньевны «Анализ мутаций KRAS и BRAF в опухолях», выполненная под руководством к.б.н. Шаманина В.А. является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для биологии и медицины – разработаны способы анализа соматических мутаций KRAS и BRAF в ФФЗП ткани опухоли, определены частоты этих мутаций у российских пациентов с меланомой кожи, раком толстой и прямой кишки, карциноидом ЖКТ и немелкоклеточным раком легкого.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте изложения материалов в рецензируемых печатных научных изданиях работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автору Писаревой Екатерине Евгеньевне следует присудить ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент



доктор медицинских наук,
профессор, заведующий VI
онкологическим отделением

Государственного бюджетного
учреждения здравоохранения
Новосибирской области «Городская
клиническая больница №1»

630047, Новосибирск, ул.
Залесского д. 6

gkb1@ngs.ru

gkb1nsk.ru

Подпись профессора

Шевченко С.П. заверяю:

ФИО, должность

(дата)

(печать организации)

Шевченко С.П. /ФИО/
17.02.17г. *А.И. Шевченко* *г/н*
