

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения «Томский
национальный
исследовательский медицинский
центр Российской академии
наук» доктор медицинских
наук, профессор, академик РАН
Евгений Лхаматирович
Чойнзонов



« 6 » декабря 2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ) - о научно-практической значимости диссертации Писаревой Екатерины Евгеньевны на тему «Анализ мутаций KRAS и BRAF в опухолях», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.01.03 – молекулярная биология (биологические науки)

Актуальность темы. Современные подходы к лечению злокачественных новообразований основаны на персонализированном подходе воздействия на специфические мишени, что приводит к уничтожению опухолевых клеток либо ингибции их пролиферации. Наиболее эффективным является использование в качестве мишеней таргетной терапии соматических мутаций в ДНК опухолевых клеток, которые ответственны за выживание и прогрессию опухоли. Диссертационная работа 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. До начала этой работы отсутствовали доступные

высокочувствительные методики анализа мутаций KRAS и BRAF, а также не было данных о частотах этих мутаций у российских пациентов с раком толстой и прямой кишки, карциноидом желудочно-кишечного тракта, меланомой кожи и немелкоклеточным раком легкого. 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. Данные о мутациях при различных типах опухолей важны с фундаментальной точки зрения и необходимы для описания механизмов канцерогенеза и поиска новых молекулярных мишеней для разработки препаратов таргетной терапии.

Научная новизна исследования и полученных результатов. Исследование Писаревой Е.Е. направлено на получение новых знаний о частотах соматических мутаций в генах KRAS и BRAF у российских пациентов и на разработку оптимизированных, удобных в исполнении и финансово приемлемых для широкого клинического использования методик диагностики мутаций. Было показано, что метод аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени является высокочувствительным и высокоспецифичным методом диагностики, а также показано, что традиционный метод секвенирования по Сэнгеру и пиросеквенирование имеет недостаточную аналитическую чувствительность для анализа некоторых соматических мутаций. Автором 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. Автором впервые в РФ поставлены высокочувствительные методики детекции мутаций, которые в настоящее время используются в клинической лабораторной диагностике. Также в данной работе впервые получены данные о частотах мутаций KRAS и BRAF при карциноиде желудочно-кишечного тракта и немелкоклеточном

раке легкого у российских пациентов и дополнены данные о частотах мутаций при меланоме кожи и раке толстой и прямой кишки.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные о частотах мутаций вносят значимый вклад, во-первых, в представления о популяционных особенностях изучаемых мутаций, во-вторых, подтверждают актуальность применения соответствующих таргетных препаратов в популяции, в третьих, определяют молекулярные мишени для создания новых таргетных препаратов, в четвертых, обосновывают внедрение персонализированного лечения онкологических пациентов уже существующими таргетными препаратами для меланомы кожи и рака толстой и прямой кишки.

Практическая ценность работы состоит в том, что были разработаны высокочувствительные методики анализа мутаций в генах KRAS и BRAF в фиксированных в формалине и заключенных в парафин (ФФЗП) образцах ткани опухоли. Использование образцов, заключенных в парафиновые блоки, существенно расширяет возможности диагностики для назначения таргетных препаратов всей когорте онкологических больных, нуждающихся в таком лечении. На базе разработанных методик созданы коммерческие наборы реагентов, которые в настоящее время получили регистрационные удостоверения и применяются в нескольких клинических лабораториях РФ для диагностики мутаций у онкологических пациентов. Также в ходе работы была разработана усовершенствованная методика выделения ДНК из ФФЗП ткани опухоли, которая позволяет быстро и эффективно выделять достаточное для анализа количество ДНК с высокой степенью очистки. Данная методика также активно используется в клинических лабораториях для получения ДНК из ФФЗП материала.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов. Достоверность полученных результатов обеспечена применением современной научно-методической базы, использованием высокотехнологичных методов исследования (полимеразной цепной

реакции в режиме реального времени, секвенирования по Сэнгеру, пиросеквенирования, спектрофотометрии). При оценке аналитической чувствительности различных методов анализа мутаций использовали специально приготовленные ДНК-стандарты с известным содержанием мутантного аллеля, что позволяет корректно сравнивать чувствительность ПЦР и методов секвенирования ДНК. Для оценки диагностической чувствительности и специфичности использовали клинические образцы опухолей от онкологических пациентов, что обеспечивает достоверность полученных данных о диагностических характеристиках разработанных методик и подтверждает эффективность их использования в практике.

Теоретические положения основаны на результатах исследования репрезентативных выборок и достаточного количества образцов опухолей для анализа мутаций в генах KRAS и BRAF при меланоме кожи, раке толстой и прямой кишки, карциноиде желудочно-кишечного тракта и немелкоклеточном раке легкого. Все образцы опухолей были проанализированы несколькими методами, в результате получены достоверные данные о наличии и генотипе мутаций.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом. Диссертация имеет классическую структуру и состоит из четырех глав: глава 1 «Современное состояние исследования соматических мутаций генов KRAS и BRAF в опухолях», глава 2 «Материалы и методы», глава 3 «Результаты исследования», глава 4 «Обсуждение результатов исследования», а также введения, заключения, выводов, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка используемой литературы, включающего 164 источника. Во введении автор обосновывает актуальность выбранной темы исследования, формулирует цель и задачи работы, показывает научную новизну и практическую значимость исследования, формулирует положения, выносимые на защиту. В первой главе, проанализированы и обобщены литературные данные, отражающие современные достижения и теоретические положения об имеющихся методах анализа патогенетически-

значимых мутаций, о роли соматических мутаций KRAS и BRAF в опухолевой прогрессии и клиническом течении различных типов опухолей. Представлены сведения об использовании указанных опухолеспецифических генетических изменений в лечении онкологических больных с помощью молекулярно-направленной персонализированной таргетной терапии. Дана характеристика существующих в этой области проблем, на устранение которых направлена работа. В заключении к обзору литературы подчеркивается необходимость разработки высокочувствительных методов диагностики соматических мутаций в опухолях для повышения эффективности таргетной терапии.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны методики выделения ДНК из ФФЗП ткани опухоли, методики выполнения ПЦР в режиме реального времени и секвенирования. Также имеется подробное описание способа оценки результатов анализа мутаций с помощью аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени. Приведены подробные клинико-морфологические характеристики используемых в исследовании образцов опухолей. Обращает на себя внимание разнообразие сложных современных методических подходов, используемых в работе. Дизайн исследования, объем клинического материала, методы анализа свидетельствуют о научной значимости и достоверности полученных результатов.

В разделе «Результаты исследования» последовательно описаны полученные автором собственные данные. В первой части приводятся результаты усовершенствования методов выделения ДНК и валидация протокола на клиническом материале. Во втором и третьем параграфе автор представила результаты разработки методик детекции мутаций в гене KRAS и BRAF с использованием аллель-специфичной ПЦР, оценки их аналитической чувствительности, сравнительного анализа с используемыми методами секвенирования, в результате показано преимущество разработанных методик в чувствительности. Проведена валидация методик и

даны характеристики диагностической чувствительности и специфичности, превышающие возможности других методов анализа. Получены новые данные о частоте изучаемых мутаций у больных с меланомой, немелкоклеточным раком легкого, при карциноиде желудочно-кишечного тракта в российской популяции. Эти данные подтверждают, что более половины пациентов нуждаются в таргетной терапии.

Настоящая глава иллюстрирована 14 многокомпонентными рисунками, включающими кривые амплификации для ПЦР в режиме реального времени, фореграммы для секвенирования по Сэнгеру и графиков изменения люминисценции для пиросеквенирования, а также диаграммы. Все эти иллюстрации наглядно подтверждают описанные результаты.

В главе «Обсуждение результатов исследования» автор проводит анализ собственных результатов с привлечением сведений по изучаемому вопросу, представленных в мировых публикациях, обосновывает их достоверность, что дает основание для формирования полноценных выводов.

В Заключение автор кратко и емко обобщает полученные результаты

Работа написана грамотным научным языком, материал изложен последовательно, логично и не вызывает затруднения при прочтении.

Сформулированные автором выводы соответствуют поставленным целям и задачам, обоснованы, грамотно изложены и логично вытекают из полученных результатов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Результаты представлены и обсуждены на 5 российских и международных конференциях и опубликованы в 9 печатных работах, из них – 1 статья в международном англоязычном рецензируемом журнале и 3 статьи – в научных рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК для публикации результатов диссертационных исследований.

Внедрение результатов исследований

Созданы коммерческие наборы реагентов, которые внедрены в производство (ООО «БиоЛинк». г.Новосибирск), зарегистрированы для

клинической диагностики в РФ и применяются в ряде клинических диагностических лабораторий РФ для анализа 26 мутаций в генах KRAS и BRAF у пациентов с раком толстой и прямой кишки и меланомой кожи для анализа маркеров чувствительности опухоли к препаратам таргетной терапии. Наборы реагентов для анализа мутаций BRAF также получили CE сертификацию для использования в европейских странах.

Рекомендации по дальнейшему внедрению

Результаты данного диссертационного исследования могут быть рекомендованы для внедрения в клиническую работу научно-исследовательских и лечебно-профилактических учреждений здравоохранения, занимающихся персонализированной терапией онкологических больных, а также могут быть использованы при чтении курсов по молекулярной биологии и онкологии студентам профильных образовательных учреждений.

Вышеизложенное дает основание для общей положительной оценки диссертации и автореферата.

Принципиальных замечаний по диссертации нет.

В процессе прочтения диссертационной работы возник вопрос:

Сформулируйте, пожалуйста, теоретическую значимость Ваших исследований для молекулярной биологии и молекулярной онкологии, в частности.

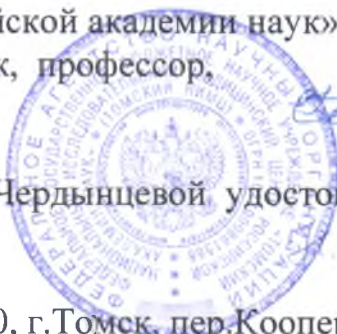
Заключение. Кандидатская диссертация Писаревой Екатерины Евгеньевны «Анализ мутаций KRAS и BRAF в опухолях», выполненная под руководством к.б.н. Шаманина Владимира Александровича, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для молекулярной биологии и медицины – разработаны методики анализа соматических мутаций KRAS и BRAF в фиксированных в формалине и заключенных в парафин образцах ткани опухоли, определены частоты этих мутаций у российских пациентов с меланомой кожи, раком толстой и прямой кишки,

карциноидом ЖКТ и немелкоклеточным раком легкого. Полученные данные имеют важное значение для разработки и внедрения персонализированной таргетной терапии для лечения онкологических пациентов.

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 автор Писарева Екатерина Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв о научно-практической значимости диссертационного исследования Е.Е. Писаревой обсужден на заседании межлабораторного семинара отдела экспериментальной онкологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (протокол № 2 от 03 февраля 2017 г.).

Заместитель директора по научной работе
федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Томский
национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»
доктор биологических наук, профессор,
член-корр. РАН



Чердынцева Н.В.

Подпись профессора Н.В. Чердынцевой удостоверяю:
ученый секретарь к.м.н.

Киселева Н.Д.

Адрес учреждения: 634050, г.Томск, пер.Кооперативный, 5
Тел. +7 (3822) 51-10-39
onco@tnimc.ru
адрес сайта: <http://www.tnimc.ru>

06.02.2016