



мутациями (точковыми, делециями), гиперметилованием или низкой экспрессией генов BRCA к препаратам платины и PARP-ингибиторам. В связи с этим, **актуальность** разработки методов определения герминальных и соматических мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 темы не вызывает сомнений.

**Научная новизна** работы определяется тем, что в результате исследования решено несколько как прикладных, так и фундаментальных задач. Были разработаны первый отечественный метод приготовления библиотеки для секвенирования генов BRCA1/2 и новые программы, позволяющие проводить обработку и анализ прочтений массового параллельного секвенирования генов BRCA1/2. Впервые проведено сравнение крупных перестроек (CNV) в генах BRCA1/2, выявляемых в ДНК из опухолевой или нормальной ткани. Выявлено, что основным механизмом потери гетерозиготности генов BRCA является генная конверсия, а не CNV.

### **Общая характеристика**

Диссертационная работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Также диссертация включает приложение, в котором приведен список нуклеотидных последовательностей праймеров и адаптеров.

В первой главе диссертации представлен обзор литературы, в котором автор приводит сведения о раке молочной железы и раке яичников, строении и функции белков, кодируемых генами BRCA1 и BRCA2, методах выявления и статистике мутаций в этих генах. Кроме того, автор включил в обзор литературы краткое описание самой технологии массового параллельного секвенирования и методов анализа получаемых после секвенирования прочтений. В целом, обзор литературы включает в себя информацию из 164 источников, большая часть которых относится к работам последних лет, и позволяет сделать вывод об актуальности, новизне и практической значимости рецензируемой диссертационной работы.

Во второй главе приведена подробная информация об использованных материалах и методах, в том числе описание выборки пациентов. Возможно, для лучшего понимания структуры выборки автору стоило дополнительно привести таблицу.

### **Основные результаты и их достоверность**

В третьей главе изложены результаты и их обсуждение. Раздел включает в себя три подраздела: «Методы приготовления библиотеки», «Анализ данных» и «Исследование CNV и потери гетерозиготности в генах BRCA1/2». В первом подразделе автор приводит полученную статистику значений покрытия исследуемых участков генов BRCA1 и BRCA2, а также сравнивает разработанный мультиплексный метод с коммерчески



доступным по основным показателям: проценту целевых прочтений и равномерности покрытия. Автору удалось достичь необходимых значений покрытия, а также сократить число процедур при приготовлении библиотеки по сравнению с коммерческим набором реагентов Qiagen.

Второй подраздел описывает процесс оптимизации автором алгоритма анализа данных NGS генов BRCA1 и BRCA2. Так, проведенные первые запуски NGS выявили проблемы с ложноположительными и ложноотрицательными мутациями, вызванных прочтениями последовательностей праймеров, что привело к созданию автором диссертации новой программы для их удаления. В диссертации приведено сравнение разработанной программы с уже существовавшими на тот момент и показано ее преимущество перед аналогами. Также автором разработана программа по выявлению вариаций в генах BRCA1/2 с автоматическим выбором клинически значимых. Для этой программы автор привел сравнение с коммерчески доступным сервисом Qiagen и показал преимущество собственной программы. Для третьей разработанной программы – по выявлению крупных перестроек в генах BRCA1/2, автором приведены значения чувствительности и специфичности при сравнении с альтернативным методом их выявления – MLPA. Кроме того, в этом же подразделе приведены и выявленные автором мутации при раке молочной железы и раке яичников.

Третий подраздел главы «Результаты и обсуждение» показал применимость всех разработанных автором методов и программ для комплексного исследования генов BRCA1 и BRCA2, в частности для исследования феномена потери гетерозиготности. Автором было показано, что потеря гетерозиготности встречается в большинстве случаев рака яичников и чаще – среди пациентов с клинически значимой мутацией. Однако автором было показано, что этого недостаточно для того, чтобы классифицировать вариации по их клиническому значению. В этом же подразделе автор приводит данные о том, что большинство случаев потери гетерозиготности, по-видимому, появляются в результате геной конверсии.

В целом диссертация производит очень хорошее впечатление – автором проделан огромный объем работы, применены самые современные технологии, обсуждение результатов проведено с использованием последних данных литературы, автором сформулированы интересные гипотезы, найдены новые факты и ассоциации.

По диссертационному исследованию имеются некоторые вопросы и замечания:

– в тексте диссертации отсутствуют положения, выносимые на защиту. В автореферате положения приведены, однако не структурированы и представляют собой

выводы из диссертации. Согласно ГОСТ Р 7.0.11—2011, положения выносимые на защиту являются неотъемлемой частью диссертации, а именно введения;

– в разделе материалы и методы следует представлять только тех пациентов и биологический материал, который представлен в результатах исследования. Не следует вводить в заблуждение большим количеством обследованных лиц, которые представлены на стр 35 и результаты по которым не упоминаются в работе. Большое количество различных выборок запутывает, и реальное количество обследованных больных, представленных в работе, понять сложно;

– на странице 79 указано, что программу для выявления CNV тестировали на образцах, которые были заранее проанализированы с помощью метода MLPA. При этом дополнительно найденные 32 CNV указываются как ложноположительные, не понятна категоричность такого вывода. Возможно использование на этих образцах дополнительного анализа с помощью альтернативных методов оценки количества ДНК (количественная ПЦР, цифровая ПЦР, aCGH, SNP-микрочипы) позволило бы идентифицировать небольшие структурные перестройки, выражающиеся в изменении количества копий ДНК;

– по данным некоторых авторов в опухоли молочной железы часто встречаются крупные аллельные делеции всего гена BRCA1, и они имеют важное значение в плане чувствительности пациентов с делецией к химиотерапии препаратами платины. Такие делеции легко определяются при помощи SNP-мкрочипов или метода ddPCR. Позволяет ли разработанные диссертантом методы идентифицировать аллельные делеции всего гена BRCA1 в опухоли?.

Перечисленные недочеты и замечания не носят принципиального характера и не снижают научной и практической значимости работы. Не вызывает сомнений, что результаты исследования достоверны, выполнены на достаточном материале, хорошо аргументированы и подтверждены экспериментальными данными, полученными с использованием современных методов проведения исследований. Результаты опубликованы в трех научных статьях и доложены на конференциях. Кроме того, по результатам работы был получен один патент.

### **Заключение**

Диссертация Кечина А.А. является завершенным научным исследованием, выполненным автором самостоятельно на высоком научном уровне и посвященным разработке метода выявления мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 с помощью массового параллельного секвенирования. Выводы к работе соответствуют поставленным цели и задачам.



Результаты работы имеют безусловную научную и практическую ценность. Результаты работы могут представлять интерес для Российского онкологического центра им. Н.Н. Блохина (г. Москва), Института онкологии им. Н.Н. Петрова (г. Санкт-Петербург), НИИ онкологии Томского НИМЦ и других организаций, занимающихся исследованиями в области молекулярной онкологии.

Рассматриваемая диссертационная работа по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне полученных результатов полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемых к кандидатским диссертациям, так как в работе решена научная задача, имеющая существенное значение для разработки и применения методов исследования генов, ассоциированных с развитием опухоли, а её автор, Кечин Андрей Андреевич, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв на диссертационную работу Кечина А.А. подготовлен в лаборатории онковирусологии НИИ онкологии Томского НИМЦ и в лаборатории молекулярной диагностики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, обсужден и утвержден на совместном заседании лабораторий 26 февраля 2018 года.

Зав. лабораторией онковирусологии  
НИИ онкологии Томского НИМЦ д.б.н.

Литвяков Н.В.

Почтовый адрес: 634050 г. Томск, пер. Кооперативный 5,  
E-mail: [nvlitv72@yandex.ru](mailto:nvlitv72@yandex.ru)

Руководитель лаборатории  
молекулярной диагностики  
НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ к.м.н.

Скрябин Н.А.

Почтовый адрес: 634050 г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10,  
E-mail: [nukulay@gmail.com](mailto:nukulay@gmail.com)

Подписи Н.В. Литвякова и Н.А. Скрябина заверяю  
Ученый секретарь Томского НИМЦ, к.б.н.



Хитринская И.Ю.