

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Кечина Андрея Андреевича

«Разработка и применение метода определения мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы и раком яичников»

представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация Кечина А.А. посвящена разработке и опыту применения разработанного метода выявления генеративных (герминальных) и соматических в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы и раком яичников.

Создание надёжных, менее дорогих, клинически значимых методов выявления групп риска для таких заболеваний как наиболее распространённый рак молочной железы (РМЖ) (в России 20% всех случаев рака у женщин – это РМЖ) и наиболее опасный, хотя и менее распространённый рак яичников (РЯ), несомненно, **актуально**. Наличие мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, означает также возможность более эффективного лечения пациентов препаратами ингибирующими систему репарации.

Связь генов *BRCA1* и *BRCA2* с онкологическими заболеваниями интенсивно исследуется с 1994 года. Оба гена *BRCA1* и *BRCA2*, хотя и располагаются на разных хромосомах (17q21 *BRCA1* и 13q 12.3 *BRCA2*) кодируют белки, участвующие в механизмах ДНК-репарации двуцепочечных разрывов. Показана связь мутаций в этих генах с онкологией женской половой сферы, в том числе с РМЖ и РЯ в настоящее время считается доказанной и существуют лекарственные препараты ингибирующие поли(АДФ-рибоза)-полимеразу (PARP), которые эффективны при у пациентов наличии мутаций в исследуемых генах.

Но выявление мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* осложнено их величиной (только в зрелом белке *BRCA1* - 1863 аминокислоты, а у *BRCA2* – 3418, а размеры кодирующей области -5592 п.о. и 10257 п.о., соответственно), сложностью структуры (большое количество экзонов (24 и 27), причём есть и некодирующие), невысокой частотой встречаемости (3-9% у онкобольных), большим количеством повторов, отсутствием гомозигот почти по всем мутациям. Всё это делает слишком дорогим секвенирование по Сэнгеру.

Работа имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, собственных результатов и обсуждения, выводов, списка литературы и 2 приложений.

Во введении достаточно подробно охарактеризована актуальность проблемы, сформулированы цель работы и задачи исследования, научная новизна и практическая ценность работы. Положения, выносимые на защиту, сформулированы лишь в автореферате общим текстом без разбиения на отдельные положения, что несколько затрудняет чтение работы.

Литературный обзор изложен на 24 страницах, содержит 6 рисунков и 2 таблицы. Написан обзор хорошим языком, ясно, и даёт представление как о связи рака яичников и рака молочной железы с мутациями в генах *BRCA1/2*, так и об истории открытия этих генов, строения и функции кодируемых ими белков. Автор рассказал и об истории исследования ассоциаций мутаций в этих генах с РМЖ и РЯ в мире и в России. Достаточно подробно и критично рассмотрены способы выявления мутаций в этих генах, методы приготовления библиотек для таргетного секвенирования исследуемых генов, технологии секвенирования и методы анализа получаемых после прочтения ридов. Таким образом, функция литературного обзора: дать представление об объекте исследования и почему автор занялся разработкой собственного метода по выявлению мутаций, и что сделано предшественниками, выполнена.

Глава 2 «**Материалы и методы**» изложена на 19 страницах, иллюстрирована 1 таблицей и 4 рисунками. В этой главе достаточно детально

описаны использованные образцы ДНК (выделенных из крови, буккального эпителия или парафинированных гистологических блоков), методы исследования, как классические, так и разработанные автором (выделение ДНК, разработка праймеров для скринингирования хотспот-мутаций методом ассиметричной ПЦР, проведение собственно ПЦР, приготовление библиотек для образцов ДНК как из крови, так и из гистологических блоков, секвенирование библиотек и методы анализа данных с помощью различных программ). Разнообразие методов и программ, которые использованы в работе впечатляют.

Самая большая глава 4 «**Результаты и их обсуждение**» изложена на 35 страницах, в теле диссертации, кроме того ещё имеются и приложения в которых также представлены структуры праймеров для амплификации экзонов исследуемых генов, праймеров-адапторов, последовательности баркодов, праймеров для мультиплексного метода приготовления библиотеки (12с.).

Андрей Андреевич экспериментально доказал необходимость оптимизации программ обработки результатов секвенирования (сравнение результатов секвенирования образцов по методу Сэнглера и анализ этих же образцов, секвенированных NGS при помощи инструмента GenomeAnalysisToolKit, где при использовании параметров обработки по умолчанию 32,9% полиморфных вариантов являлись ложноположительными). Результаты использования фильтров, предложенных автором значительно уменьшают число ложноположительных результатов. Вся эта глава убеждает в том, что автор действительно добился поставленных целей. Все результаты достаточно обсуждены.

Степень обоснованности положений, выводов и рекомендаций:

Широкий спектр применённых экспериментальных и биоинформатических методов и программ позволяют не сомневаться в обоснованности вынесенных на защиту положений.

Диссертационная работа выполнена на очень хорошем методическом уровне, выводы обоснованы, результаты данной работы могут служить основанием для создания применимого в клинической практике инструмента обнаружения клинически значимых патогенных мутаций в генах *BRCA1/2*.

Результаты диссертации полно опубликованы, доложены на международных конференциях.

Заключение:

Кечин Андрей Андреевич решил задачу разработки недорогого, удобного для использования в клинической практике метода, нацеленного на анализ экзонов генов *BRCA1/2* у конкретного пациента и основанного на технологии Illumina. Эта разработка будет иметь существенное значение для развития здравоохранения в России.

Таким образом, диссертационная работа Кечина Андрея Андреевича «Разработка и применение метода определения мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы и раком яичников» (соискание ученой степени кандидата биологических наук, специальность 03.01.03 - молекулярная биология), является законченным научным трудом, содержит технологическое решение, имеющее существенное значение для развития молекулярной диагностики онкологических заболеваний. Представленная работа по своей актуальности, научной новизне, практической значимости результатов полностью отвечает требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, а автор, Кечин Андрей Андреевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Старший научный сотрудник

лаборатории метаболизма лекарств

и фармакокинетики НИИМББ ФИЦ «ФТМ»

Доктор биологических наук

8-913-789-07-64, мака

Макарова Светлана Ивановна

