

## 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"** представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология

В последнее десятилетие молекулярная биология достигла огромного прогресса, связанного с развитием новых методов высокопроизводительного анализа геномов. Наличие подобных методов в совокупности с огромным массивом данных о нуклеотидных полиморфизмах, приводящим к развитию тех или иных заболеваний, дает возможность вывести диагностическую медицину на принципиально новый уровень. Особую роль такие методы играют в ранней диагностике онкологических заболеваний. В частности, это касается столь распространенных видов рака, как рак молочной железы и рак яичников. Поскольку гены, отвечающие за развитие этих типов онкологии, очень велики по размерам и количеству экзонов, а также имеют очень мало ярко выраженных «hotspot»-мутаций, полноценный анализ нуклеотидных замен в них наиболее целесообразно проводить высокопроизводительным секвенированием их кодирующей области. Однако, несмотря на столь высокую актуальность этой задачи, в России до сих пор не разработаны соответствующие тест-системы, и большинство анализов сводится к проверке единичных часто встречающихся мутаций в этих генах.

Диссертационная работа Андрея Андреевича посвящена разработке и применению на практике метода выявления мутаций в генах BRCA1/2 с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования. Учитывая вышеизложенное совершенно ясно, что тема работы является **актуальной**.

Научная **новизна** работы в первую очередь состоит в том, что разработанный метод дал возможность выявлять вариацию числа копий генов BRCA1/2 как из образцов крови, так и из ДНК, выделенной из парафинизированных гистологических блоков. Кроме того, работа позволила значительно приблизиться к разгадке феномена возникновения потери гетерозиготности, который, по-видимому, вызывается генной конверсией.

**Практическая** ценность диссертации неоспорима и в первую очередь состоит в том, что разработанный метод делает возможным проведение относительно недорогого, при этом полноценного, анализа генов BRCA1/2 на наличие полиморфизмов, способных влиять на развитие и выбор методики лечения рака молочной железы и рака яичников. Важно отметить, что, по сравнению с зарубежными коммерческими аналогами, в предложенном методе значительно снижено число стадий пробоподготовки образцов



перед высокопроизводительным секвенированием. Кроме того, в рамках работы удалось добиться возможности одновременно анализировать максимально возможное число образцов (96) в одном запуске прибора с минимальной стоимостью самого запуска (Illumina MiSeq). Все вышеописанные факторы значительно снижают стоимость исследования для одного пациента и увеличивают потенциальный круг лабораторий, способных его провести.

Отдельного внимания заслуживает общедоступное программное обеспечение, разработанное в рамках диссертационной работы. Благодаря полученному пакету программ, стало возможным быстро и качественно проводить анализ «сырых» данных секвенирования исследуемых генов на присутствие значимых нуклеотидных замен в рамках одной программной среды.

Обзор литературы в диссертации является достаточно полным – содержит все необходимые литературные данные, на которые опирается автор. Имеется и часть, описывающая исследуемые онкологические заболевания и их распространенность в России. Достаточно полно описаны существующие методы анализа генов BRCA1/2 на наличие полиморфизмов. Присутствует краткое описание выбранной методики высокопроизводительного секвенирования. Рассмотрено существующее программное обеспечение для анализа мутаций в этих генах. Кроме того, приведена краткая статистика влияния тех или иных генетических факторов, влияющих на пенетрантность мутаций в генах BRCA1/2 на развитие онкологических заболеваний.

В разделе Материалы и Методы содержится исчерпывающее описание всех использованных материалов и экспериментальных методик. Следует отметить, что этот раздел, вместе с приложениями, дает возможность повторения полученной методики в любой молекулярно-биологической лаборатории. Кроме того, подробно описан принцип работы программы «BRCA-analyzer», разработанной в рамках работы. Однако структура работы программы для анализа вариаций копий генов описана очень поверхностно. Кроме того, возникает вопрос в работоспособности приведенного протокола для ПЦР в режиме реального времени с использованием TaqMan-зонда, поскольку он значительно отличается от общепринятого.

Раздел «Результаты» объединен с разделом «Обсуждение» и логически разделен на два подраздела, посвященных разработанным методам пробоподготовки биоматериала и последующему анализу получаемых после секвенирования данных. В ходе работы автору удалось подобрать условия для получения библиотек ДНК с высоким значением покрытия всех ампликонов исследуемых генов, что отражено в выводе 1. Очень подробно в разделе описан анализ полученных ДНК-библиотек как сторонними биоинформатическими



приложениями, так и оригинально разработанными программами. Результаты этого анализа полностью отражены в выводах 2-5. Подробно описаны результаты анализа феномена «потери гетерозиготности» в анализируемых образцах. На основании этих результатов сделаны корректные выводы (6,7).

В целом, выводы диссертационной работы четкие, полностью соответствуют полученным результатам и не вызывают сомнений как в плане новизны, так и достоверности. Представленная работа является завершённым исследованием, имеющим значительную практическую значимость, полно отвечающим на поставленные перед диссертантом вопросы. Результаты работы были апробированы на трех научных конференциях и опубликованы в трех статьях из списка ВАК, из которых две в зарубежных изданиях.

В целом диссертация Кечина А.А. является научно-квалификационной работой и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, в том числе пункту 9 «Положения о присуждении ученых степеней», т.к. в ней решена важная научная проблема ранней диагностики двух распространенных онкологических заболеваний, что несет важный вклад в развитие страны. Кечин Андрей Андреевич несомненно, заслуживает присуждения ему учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

01 марта 2018 г.

н.с. лаборатории геномики  
Института Молекулярной и  
Клеточной Биологии СО РАН,  
кандидат биологических наук  
тел.: 8-913-3760345

e-mail: vift@mcb.nsc.ru

Максимов Даниил Александрович

