

Отзыв официального оппонента

кандидата медицинских наук, доцента, ведущего научного сотрудника лаборатории эпигенетики, заведующего кафедрой онкогенетики Института высшего и дополнительного профессионального образования Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» Михайленко Дмитрия Сергеевича на диссертационную работу Кузнецовой Олеси Алексеевны «Применимость мультигенных панелей на основе секвенирования следующего поколения в персонализации лечения пациентов с распространенными злокачественными опухолями», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия и 1.5.7. Генетика

Актуальность

Персонализированная таргетная терапия онкологических заболеваний требует проведения анализа мутаций в опухолевом материале, в ходе которого необходимо исследовать десятки и даже сотни генов, определить мутации различных типов (точковые нарушения последовательности ДНК, перестройки и амплификации с участием онкогенов), учесть интегративные геномные характеристики опухоли (например, микросателлитную нестабильность или мутационную нагрузку) и соотнести это с важными иммуногистохимическими (PD-L1) и гистологическими характеристиками.

Для решения этой задачи разрабатываются комплексные тесты с мультигенными панелями: FMI (Roche), Solo (ОнкоАтлас) и другие, а само тестирование называют комплексным молекулярным или геномным профилированием опухоли. Однако до сих пор отсутствует общепринятый подход к тому, что именно должно входить в состав комплексного молекулярного профилирования (КМП). Остаются также дискуссионными вопросы о показаниях к проведению КМП, о клинической значимости результатов КМП у пациентов с различными стадиями онкозаболеваний и типами опухолей, особенно с учетом отсутствия единой системы оценки предиктивной (терапевтической) значимости соматических вариантов и ограниченной доступности для пациентов

специализированных онкологических молекулярных консилиумов (МТВ – molecular tumor board). Перечисленные факторы приводят к необходимости разработки рекомендаций об объеме профилирования в зависимости от клинической ситуации, нозологии, а также создание оптимального алгоритма принятия решений по результатам КМП врачами-онкологами на основе доказательной медицины. В мировой научной и медицинской литературе пока нет работ, которые решали бы поставленную задачу с учетом специфики частот мутаций у российских пациентов, статуса зарегистрированных таргетных препаратов у нас в стране и оптимальных методов выполнения КМП.

Таким образом, исследование эффективности проведения КМП в реальной отечественной онкологической практике с целью улучшения результатов лечения пациентов путем назначения молекулярно-направленной (таргетной) терапии определяет своевременность и актуальность работы Кузнецовой О.А. «Применимость мультигенных панелей на основе секвенирования следующего поколения в персонализации лечения пациентов с распространенными злокачественными опухолями».

Научная новизна

Научная новизна диссертационной работы Кузнецовой О.А. не вызывает сомнений. На достаточном клиническом материале автором получены оригинальные данные по исследованию профиля мутаций в зависимости от конкретного онкологического заболевания, определено влияние молекулярных характеристик опухоли на выбор противоопухолевой терапии, проанализирована эффективность таргетной терапии после проведения КМП.

Впервые в России охарактеризован профиль пациентов со злокачественными солидными новообразованиями, проведение КМП для которых будет иметь наибольшее значение в плане обнаружения клинически значимых генетических нарушений и достижения ответа на лечение, разработаны методологические подходы к проведению специализированного онкологического консилиума с учетом данных КМП.

Достоверность полученных результатов, обоснованность выводов и практических рекомендаций

Диссертационная работа Кузнецовой О.А. основана на достаточном по объему клиническом материале, включающем в себя результаты исследования 448 пациентов, которым было проведено КМП с применением панелей FoundationOne или Solo Комплекс. Сбор, систематизация и анализ полученной информации соответствовали современным требованиям, предъявляемым к подобного рода исследованиям. Математическая обработка данных осуществлялась с использованием современных программных пакетов.

Высокий научно-профессиональный уровень проведения исследования и изложения полученных данных дает основание считать результаты, представленные исследователем, достоверными. Выполненная работа дает ответы на многие важные практические вопросы современной молекулярно-генетической диагностики злокачественных новообразований, которые особенно актуальны для пациентов на 3 и 4 стадиях заболевания. Выводы и практические рекомендации логичны и полностью обоснованы полученными результатами.

Научно-практическая значимость и внедрение результатов исследования

Результаты, полученные в ходе исследования, позволили Кузнецовой О.А. сформулировать практические рекомендации по клиническому применению КМП у пациентов с немелкоклеточным раком легкого, колоректальным раком и более редкими типами опухолей.

Автором сформулирован минимальный объем профилирования для пациентов в России (в рамках представленных в работе нозологий), который включает различные типы мутаций в 25 генах (*BRAF*, *BRCA2*, *EGFR*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *FGFR2*, *PALB2*, *BRCA1*, *IDH1*, *KRAS*, *MET*, *POLE*, *AKT1*, *PTEN*, *NRAS*, *CDKN2A*, *FGFR3*, *CDK12*, *ALK*, *NTRK1/2/3*, *ROS1*, *RET*, *TP53*) и оценку биомаркеров MSI, PD-L1. В работе показано, что большие мультигенные панели во многом избыточны для КМП. В онкологической практике в России объем профилирования может быть снижен без потери в эффективности предлагаемого пациенту лечения. Автор показал, что применение таргетной терапии с учетом КМП позволило

улучшить показатели частоты объективных ответов (24% против 9,2%, $p < 0,01$), выживаемости без прогрессирования (45,0% против 16,2%, $p < 0,01$) и частоты длительных ответов на терапию (49,2% против 28,3%, $p = 0,02$).

Основные положения диссертационного исследования Кузнецовой О.А. были представлены в 2022 г. на IV Всероссийской конференции с международным участием «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты», в 2023 г. на конференции Российского общества клинической онкологии «XXVII Российский онкологический конгресс». По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, 3 из которых опубликованы в рецензируемых журналах, включённых ВАК Минобрнауки России в список изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата наук. Результаты, полученные соискателем, внедрены в учебную и практическую деятельность ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа оформлена в традиционном стиле на 173 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. В список литературы включены 215 источников, из них 8 отечественных и 207 зарубежных. Диссертация содержит 48 рисунков и 48 таблиц.

Во введении автор излагает общее состояние изучаемой темы, определяет научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, методы исследования и положения, выносимые на защиту, обосновывая необходимость своих исследований. Автор подчеркивает, что комплексное молекулярное профилирование (КМП) для выбора таргетной терапии требуется значительному количеству пациентов с распространенными онкологическими заболеваниями, тогда как единого подхода к КМП в России да и в мире до сих пор не существует. Это, в свою очередь, приводит к использованию для КМП молекулярно-генетических тестов, имеющих значительные различия по количеству анализируемых генов и

типов генетических нарушений, что не может не сказываться на информативности их результатов при рассмотрении на онкологическом консилиуме.

Первая глава - обзор литературы – основана на анализе современных публикаций и позволяет получить достаточно полное представление о текущем состоянии рассматриваемых аспектов диагностики и лечения больных злокачественными опухолями на основании результатов молекулярно-генетического тестирования. Автором охарактеризованы молекулярные механизмы канцерогенеза и отличительные свойства опухолевой клетки; показано, что развитие опухоли – это генетически детерминированный процесс. Далее автором описана роль NGS в секвенировании соматических мутаций в опухолях, преимущества и недостатки коротких и больших мультигенных панелей, которые используются в онкогенетике. Отдельное внимание автор уделила описанию предиктивных маркеров и прецизионного подхода в выборе таргетного препарата в онкологии. В разделе 1.4 Кузнецова О.А. рассматривает критерии патогенности (онкогенности) и предиктивной значимости, принятые в Европе (ESCAT), США (консенсус AMP), а также базы данных, которые наиболее часто используют специалисты для оценки предиктивной (терапевтической) значимости генетических вариантов в онкологии. Следующие два раздела посвящены применению КМП в клинической практике и роли специализированных онкологических консилиумов (МТВ – molecular tumor board). Затем автор переходит к описанию молекулярно-направленной (таргетной) терапии, прежде всего, для лечения пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), и к оценке экономической эффективности таргетной терапии с учетом результатов КМП в здравоохранении.

Обзор литературы изложен последовательно, доступным языком. Автору удалось в достаточной мере раскрыть современное состояние проблемы профилирования мутаций в опухоли, а также описать актуальность и обоснованность дальнейшего исследования клинической значимости результатов, полученных с использованием различных мультигенных онкопанелей.

Во второй главе (Материалы и методы) представлены дизайн исследования с конечными точками и описанием критериев эффективности, характеристика выборки больных, методы определения влияния проведения КМП

на тактику ведения пациентов с метастатическим онкозаболеванием, принципы статистической обработки полученных данных.

Третья глава отражает результаты диссертационного исследования.

Кузнецова О.А. в разделе 3.1. проводит анализ характеристик 448 пациентов в зависимости от мультигенной панели, использованной для проведения КМП. Для дальнейшего анализа были выбраны 374 пациента, в отношении которых имелись необходимые клинические данные. Приведен анализ частоты и спектра мутаций, выявленных при проведении КМП. Самой широко представленной подгруппой являлись пациенты со злокачественными новообразованиями органов ЖКТ (242 пациента, 54% от всей когорты). Вторая изученная подгруппа – пациенты с немелкоклеточным раком легкого, в третью подгруппы были собраны остальные пациенты с более редкими типами опухолей. В ходе исследования автором показано, что для большинства генов наблюдали конкордантность результатов между панелями FMI и Solo, однако для генов *TP53*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *ATM*, *NF1* при некоторых нозологиях были выявлены различия в частоте обнаружения вариантных аллелей.

В разделе 3.2. автор проводит сравнение частоты рекомендации и назначения таргетной терапии после проведения КМП сначала по всей выборке пациентов, затем по отдельным заболеваниям. При помощи логистической регрессии установлено, что наличие в отчете мутаций ESCAT I-II уровня с большей долей вероятности отразится в наличии рекомендаций по таргетной терапии, а в первую четверку войдут немелкоклеточный рак легкого (N=20; 23,0%), колоректальный рак (N=16; 18,4%), рак яичников (N=8; 9,2%) и холангиокарцинома (N=8; 9,2%). Однако Кузнецова О.А. справедливо замечает, что наличие рекомендации по результатам КМП еще не тождественно получению пациентом препарата, и в разделе 3.4. анализирует иные факторы, оказывающих влияние на назначение таргетной терапии. Показано, что самая низкая вероятность назначения таргетной терапии была у пациентов с наличием мутаций гена семейства RAS без проведения специализированного молекулярного консилиума. В последующих разделах автор осуществляет оценку клинических исходов в зависимости от панели профилирования и максимального уровня выявленных известных мишеней в отчете о КМП.

Далее в разделе 3.7. автор проводит оценку эффективности молекулярно-направленной (таргетной) терапии в общей когорте исследованных пациентов и далее по нозологиям. Примечательно, что Кузнецова О.А. рассмотрела отдельно клинические исходы пациентов, у которых были выявлены мутации вне категории ESCAT I, что представляет несомненный интерес, так как варианты уровня I, как правило, уже не вызывают проблем в клинической интерпретации.

По результатам диссертационного исследования в разделе 3.9 автором была сформирована собственная универсальная панель для КМП, которая включает определение точковых мутаций в 19 генах, амплификаций 5 генов, химер с вовлечением 8 онкогенов и дополнительно: экспрессии PD-L1 и интегративной геномной характеристики – микросателлитной нестабильности. Панель основана на биомаркерах, при наличии которых в опухоли может быть назначена лекарственная терапия, доступная на территории Российской Федерации. Автором также проведена оценка роли специализированного молекулярного онкологического консилиума в лечении обследованных пациентов и использования широкого арсенала баз данных при необходимости уточнения клинической значимости редких генетических вариантов.

В четвертой главе – Обсуждение – автором проведено сравнение полученных частот генетических нарушений с данными других исследователей, высказано мнение о том, что в онкодиагностике предлагаемый объем секвенирования большой мультигенной панелью избыточен и может быть применим лишь для поисковых клинических исследований. Для рутинной практики панели могут быть сокращены до ряда наиболее часто мутированных генов, выявление которых может потенциально повлиять на тактику лечения пациента. Дана оценка применению шкалы ESCAT в практике специализированного онкоконсилиума, которая показала свои ограничения и не может далее рассматриваться как единственный классификатор при принятии клинических решений. Также авторы провели сравнение частот назначения таргетной терапии и показателей выживаемости пациентов в их работе с данными, опубликованными в других медицинских центрах.

В «Заключении» автор представляет ключевые моменты каждого из разделов диссертации и подводит итоги своему научному исследованию. Заключение

построено логично в соответствии с результатами исследований, изложенными в других главах.

Выводы и Практические рекомендации четко сформулированы, обоснованы, логично вытекают из результатов собственных исследований автора и полностью отражают суть поставленных задач.

Замечания и вопросы:

Существенные недостатки у диссертационной работы Кузнецовой О.А. отсутствуют, однако на взгляд официального оппонента имеется несколько уточняющих вопросов и замечаний к представленной работе:

- 1) Замечание 1. В обзоре литературы автор описывает панели для КМП: FoundationOne® (Foundation Medicine), Solo Комплекс (ООО «ОнкоАтлас»), Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel (ThermoFisherScientific, которая сейчас практически не доступна в России). Однако нет упоминания о других доступных в нашей стране альтернативах: панели от ПарсекЛаб для рака легкого, панелях BGI для различных онкозаболеваний.
- 2) Замечание 2. Автор иногда избыточно использует неологизмы – транслитерации с английского, например, «альтерация» вместо «нарушение, мутация»; «таргетируемость» вместо «предиктивная/терапевтическая значимость» и т.п.
- 3) Замечание 3. На стр. 23 автор пишет: «Результатом интерпретации должно стать описание выявленных вариантов согласно HGVS (Human Genome Variation Society) номенклатуре». Скорее наоборот, сначала вариант обозначают в соответствии с номенклатурой HGVS, после чего проводят оценку его предиктивной значимости и клиническую интерпретацию.
- 4) Замечание 4. В табл. 5 в числе наиболее часто используемых баз данных по прецизионной онкологии явно не хватает находящихся в открытом доступе агрегаторов типа Franklin Genoox и Varsome (somatic).
- 5) Вопрос 1. На с. 29 автор пишет: «В большинстве описанных случаев в состав МТВ входили врач-онколог химиотерапевт, консультант-генетик,

патоморфолог, специалисты в области фундаментальных наук (молекулярные биологи), хирурги, радиологи, координаторы КИ». Далее на стр. 137 приводится состав собственного МТВ с участием биоинформатика, молекулярного биолога. Однако большинство перечисленных профессий не точно соответствуют наименованиям медицинских специальностей в нашей стране. Учитывая действующие и находящиеся на этапе подготовки профессиональные стандарты, какие врачи-специалисты должны входить в специализированный онкологический молекулярный консилиум (МТВ) в России по мнению автора?

- 6) Вопрос 2. В работе сравнивается информативность различных генных панелей для КМП и принятия клинического решения, делается вывод о возможном уменьшении количества тестируемых генов. Не является ли секвенирование опухолевого экзона тестом, который может оказаться информативнее секвенирования коротких панелей, к тому же позволив рассчитать мутационную нагрузку?
- 7) Вопрос 3. Изначально автор проводил классификацию генетических вариантов по европейской шкале ESCAT, в итоге придя к выводу о наличии связанных с ней ограничений и целесообразности применения других инструментов классификации для вариантов ниже уровня I. Почему сразу была выбрана ESCAT, а не, например, широко применяемая в мире и в России американская классификация AMP?
- 8) Вопрос 4. В табл. 43 генам присваиваются баллы за наличие в рекомендациях RUSSCO. Не было бы правильнее присваивать эти баллы за наличие в клинических рекомендациях, одобренных научно-практическим советом Минздрава России?
- 9) Вопрос 5. В разделе 3.10 про работу МТВ автор говорит о том, что «опыт проведения МТВ на территории РФ позволил рекомендовать МНТ (*таргетную терапию - оппонент*) в 51% случаев, что соответствует данным зарубежного опыта и опровергает нулевую гипотезу о частоте рекомендации МНТ в районе 20%». Касается ли это только работы

консилиумов одного ведущего федерального онкологического НМИЦ или характеризует работу в различных регионах в целом?

Перечисленные вопросы и замечания никак не влияют на общую высокую оценку работы и не снижают ее научной и практической ценности.

Соответствие диссертации паспорту научных специальностей

Научные положения диссертации соответствуют области науки 3. Медицинские науки, группе научных специальностей 3.1 Клиническая медицина, шифру научной специальности специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, направлениям исследований п.2. Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.), п.10. Оценка эффективности противоопухолевого лечения на основе анализа отдаленных результатов, шифру научной специальности 1.5.7 Генетика, направление исследований п. 19. Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни. Медико-генетическое консультирование. Болезни с наследственной предрасположенностью. Генетика старения. Иммуногенетика. Онкогенетика. Генетика поведения. Молекулярно-генетическая/биохимическая диагностика заболеваний человека. Фармакогенетика. Генотоксикология. Генетическая терапия.

Заключение

Диссертационная работа Кузнецовой Олеси Алексеевны «Применимость мультигенных панелей на основе секвенирования следующего поколения в персонализации лечения пациентов с распространенными злокачественными опухолями» представляет собой завершенное научно-квалификационное исследование, выполненное на высоком научном и методическом уровне с использованием современных методов, в котором на основании выполненных автором исследований осуществлено решение научной задачи повышения эффективности выявления и аннотации генетических вариантов для назначения персонализированной таргетной терапии при онкологических заболеваниях.

