

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, доцента Хусаиновой Риты Игоревны на диссертацию Савостьянова Кирилла Викторовича «Оптимизация молекулярной диагностики редких наследственных болезней у российских пациентов», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Актуальность темы исследования. Редкие наследственные болезни являются одной из актуальных и сложных проблем современной медицины, так как являются клинически и генетически гетерогенными заболеваниями, что затрудняет их диагностику и лечение. Несмотря на то, что каждое орфанное заболевание является редким по частоте встречаемости, существует множество таких заболеваний, что в сумме не является редким событием и требует значительных ресурсов здравоохранения в связи с длительными госпитализациями и ранней инвалидизацией пациентов. Считается, что у каждого двухсотого новорожденного может выявляться редкое наследственное заболевание. Выявление молекулярной причины таких заболеваний крайне необходимо для установления точного диагноза и своевременного начала таргетной или патогенетической терапии, которые в большинстве случаев способны остановить развитие изменений в различных тканях и органах орфанных пациентов до развития необратимых процессов, что позволит социализировать самого пациента и членов его семьи. Учитывая сложность диагностики гетерогенных заболеваний, необходимо разработать алгоритмы их диагностики с использованием современных методов, таких как тандемная масс-спектрометрия, позволяющая в течение нескольких часов определить концентрации десятков различных аналитов в крови, и высокопроизводительные технологии параллельного секвенирования ДНК, позволяющая одновременно анализировать множество генов. В связи с этим, рассматриваемая диссертационная

работа, посвященная оптимизации диагностики редких болезней у российских пациентов с использованием комплексного подхода по оценке эффективности существующих методов диагностики и внедрению новых технологий, представляет актуальное исследование, имеющее высокую научно-практическую значимость. Особая ценность работы заключается в оценке региональных особенностей молекулярно-генетической структуры 11 наследственных заболеваний человека, что позволяет повысить эффективность ДНК-диагностики в отдельных регионах России.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе. Научные положения диссертации в полной мере соответствуют цели и задачам исследования. Степень обоснованности и достоверности научных положений, а также выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационном исследовании Савостьяновым К.В., подтверждаются значительным объемом и репрезентативностью выборок, включающих пациентов почти из всех субъектов Российской Федерации, современными технологиями биохимической и молекулярно-генетической диагностики, использованием корректных биоинформатических ресурсов и статистических методов обработки и анализа данных.

Особая редкость описываемых нозологий далеко не всегда позволяет изучить необходимое число пациентов для того, чтобы выявленные особенности считать закономерными. В настоящей научной работе описываются десятки, а для некоторых нозологических единиц сотни пациентов, страдающих редкими болезнями, что дополнительно подчеркивает обоснованность и достоверность полученных данных. Алгоритмы двухступенчатой диагностики наследственных болезней обмена, разработанные автором, в полной мере соответствуют алгоритмам диагностики редких болезней, применяемых ведущими научными коллективами международного уровня. Использование технологии тандемной масс-спектрометрии для селективного скрининга с

последующей подтверждающей диагностикой с помощью секвенирования по Сэнгеру – «золотой стандарт» подавляющего большинства скрининговых программ, направленных на выявление наследственных болезней обмена. Применение технологии высокопроизводительного секвенирования в тех случаях, когда фенотип пациента может быть обусловлен мутациями в нескольких десятках генов, также является наилучшей стратегией обнаружения этиологических причин редких наследственных болезней. Использование базы данных gnomAD для определения популяционных частот и базы данных HGMD для выявления аннотированных ранее вариантов указывает на корректный биоинформатический анализ выявленных мутаций, а использование Российского руководства по интерпретации данных последовательности ДНК, полученных методом массового параллельного секвенирования, для каждого нового генетического варианта, не описанного ранее – на корректное определение патогенности мутаций. Статистические методы обработки полученных данных, примененные автором для обобщения бинарных признаков и количественных данных, с последующей интерпретацией результатов также подчеркивают высокий уровень достоверности и обоснованности полученных выводов и рекомендаций.

Результаты диссертационной работы опубликованы в 70 научных работах в рецензируемых изданиях, 27 из которых в журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ, в двух монографиях, пяти клинических рекомендациях, утвержденных Министерством здравоохранения РФ, апробированы на многочисленных российских и зарубежных конференциях, а также разработаны и зарегистрированы два патента на изобретения, что подтверждает достоверность и обоснованность положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Научная новизна основных результатов диссертационного исследования. Большинство результатов исследований диссертационной работы, выполненной Савостьяновым К.В., обладают высокой научной

новизной. В частности, впервые в России установлен спектр различных типов гликогеновой болезни, моногенных форм стероидрезистентного нефротического синдрома, несовершенного остеогенеза и наследственно обусловленных кардиомиопатий у детей, а также определен молекулярный дефект при данных заболеваниях. Впервые обнаружена ассоциация мутаций, укорачивающих кодируемый белок GLA, с тяжестью фенотипических проявлений болезни Фабри, в частности с развитием инсульта. Впервые в мире обнаружены и описаны клинические проявления редких болезней, вызываемые новыми нуклеотидными вариантами генома, не аннотированными в базе данных HGMD до проведения настоящего исследования. Впервые показано наличие мутаций, характерных для российских пациентов, и определены их частоты.

Следует отметить обнаружение специфичных для определенных популяций России патогенных вариантов нуклеотидной последовательности ДНК. В частности, впервые выявлены и описаны мутации *c.518A>G* и *c.1015G>A* гена *CTNS*, характерные для больных цистинозом из чеченской и карачаевской этнических групп соответственно, а также достоверное преимущественное распределение мутации *p.E87** гена *NPHS2*, вызывающей стероидрезистентный нефротический синдром, среди жителей Приволжского федерального округа и юга Уральского федерального округа.

Значимость полученных результатов для науки и практики.

Полученные автором результаты имеют несомненную научно-практическую значимость, представляют ценную информацию о генетической архитектуре 11 наследственных заболеваний и позволяют оптимизировать скрининговые и подтверждающие методы диагностики редких болезней, что позволит совершенствовать медико-генетическое консультирование отягощенных семей. Для выявления мужчин с болезнью Фабри и пациентов обоих полов с болезнью Гоше, нуждающихся в ферментозаместительной терапии, было предложено исследовать

концентрацию биомаркеров лизо-Гб3 и лизо-Гл1 соответственно, в качестве аналитов для первичного биохимического скрининга этих болезней, что поможет выявлять эти болезни с большей эффективностью. Коррекция отрезной точки для ферментативной диагностики болезни Помпе повышает эффективность исследования за счет исключения ложноположительных пациентов с псевдодефицитными значениями активности альфа-1,4-глюкозидазы. Несомненной практической ценностью обладают и разработанные автором панели генов, дефекты которых вызывают такие редкие болезни как нефротический синдром и кардиомиопатии, в связи с высоким процентом подтвержденных случаев. При их формировании автор учел тот факт, что клинические проявления нефротического синдрома могут быть вызваны такими фенокопиями, как синдром Альпорта или болезнь Дента, тогда как гипертрофическая кардиомиопатия может развиваться на фоне синдрома Нунан или синдрома Данон, а дилатационная кардиомиопатия может быть обусловлена синдромом Альстрема или синдромом Барта.

Связь мутаций, приводящих к укороченным белковым продуктам, с тяжелым клиническим течением большинства изученных болезней, обладает наглядными прогностическими возможностями, особенно, если рассматривать раннюю диагностику пациентов, к примеру, в рамках массового скрининга новорожденных. Более того, достоверные различия были найдены и внутри одного класса мутаций. Так, одни миссенс мутации гена *GLA* вызывают классическую форму болезни Фабри, коррелируя с высокими значениями лизо-Гб3, а другие приводят к атипичному течению, ассоциированному с низкими концентрациями накапливаемого в крови субстрата, что помогает лечащим врачам выбирать оптимальную схему лечения.

Определение спектра и относительных частот мутаций, вызывающих редкие болезни, изученные в настоящей диссертационной работе, а также характеристика клинических, возрастных и географических аспектов

исследованной патологии представляют очевидный научный и практический интерес. Эти результаты могут объяснять межпопуляционные различия в закономерностях развития и темпах прогрессирования заболеваний, а также полиморфизм клинической симптоматики у пациентов, проживающих в различных регионах России.

Структура и содержание диссертационной работы.

Диссертационная работа Савостьянова К.В. представлена на 593 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 11 разделов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы исследования. Диссертация иллюстрирована 115 рисунками и 77 таблицами. Список литературы включает 1037 пунктов.

В главе Введение автор достаточно полно описывает актуальность выбранной темы научного исследования, формулирует цель и задачи исследования, обозначает новизну и значимость работы, излагает положения и оценивает свой личный вклад.

Обзор литературы изложен на 150 страницах, подробно рассматриваются все аспекты становления современной лабораторной диагностики изучаемых патологий, как на биохимическом, так и на генетическом уровнях, а также основ патогенеза каждой нозологии с учетом современных веяний и межпопуляционных особенностей и фенотипических корреляций, выявленных в различных регионах мира. Окончание отдельных глав литературного обзора, посвященное описанию высокоспецифичного патогенетического лечения, в том числе, одобренного в Российской Федерации, раскрывает несомненную значимость любых диагностических методик, позволяющих поставить точный диагноз в сжатые сроки. Более половины процитированных литературных источников, насчитывающих более одной тысячи, представляют собой источники последних десяти лет.

Описание материалов и методов исследования содержит основную информацию для воспроизведения методик, разработанных и оптимизированных в рамках рассматриваемой диссертационной работы.

В главе Результаты исследования автор приводит собственные данные, проводит их анализ, представляет результаты биоинформатической и статистической обработки, а также сравнивает их с данными других отечественных и зарубежных ученых.

Выводы и практические рекомендации соответствуют содержанию диссертации, следуют из полученных результатов, научно аргументированы, соответствуют задачам исследования и основным положениям, выносимым на защиту. Автореферат отражает основные положения диссертационного исследования, оформлен по определенному стандарту, соответствуя требованиям ВАК.

В целом работа выполнена на современном уровне, носит комплексный характер и вносит большой вклад в решение крупной научной проблемы по диагностике наследственных заболеваний человека.

Вместе с тем, хотелось бы обратить внимание, что литературный обзор по теме диссертации иллюстрирован 17 рисунками без указания авторства и разрешения на их использование в рамках данной работы. Если это собственная разработка автора, также следовало указать это в описании рисунков. Можно было сократить объем литературного обзора за счет исключения информации о разработанных методах в рамках данной работы и подробного описания лечения. При описании несовершенного остеогенеза использована предыдущая классификация заболевания и не описана последняя версия классификации. Сделанные замечания в основном носят технический характер и не влияют на результаты и научно-практическую значимость диссертационной работы.

Учитывая высокую практическую ценность полученных результатов, возникли вопросы о перспективах их использования в клинической медицине:

1. Каким образом можно внедрить результаты диссертационной работы по оптимизации диагностики редких наследственных заболеваний в практическое здравоохранение РФ в целом и отдельных регионов?

2. Какие перспективы вы видите для улучшения доступности ДНК-диагностики для различных слоев населения, включая дорогостоящую технологию массового параллельного секвенирования?

Указанные вопросы и замечания не затрагивают основного содержания диссертационной работы, не влияют на общую положительную оценку.

Заключение. Разработанные и оптимизированные методы диагностики 11 редких болезней, изученных в представленной работе, включающие тандемную масс-спектрометрию, секвенирование по Сэнгеру, массовое параллельное секвенирование, ПЦР в режиме реального времени, хромосомный микроматричный анализ и мультиплексная лигазозависимая амплификация, позволяют осуществлять раннее выявление генетической патологии у российских пациентов, что имеет решающее значение для быстрой и точной верификации диагноза, своевременного назначения адекватной терапии, а также для проведения профилактических мероприятий в отягощенных семьях, что создает предпосылки к уменьшению инвалидности и смертности, увеличению средней продолжительности жизни пациентов с орфанными заболеваниями.

Таким образом, диссертационная работа Савостьянова Кирилла Викторовича «Оптимизация молекулярной диагностики редких наследственных болезней у российских пациентов», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика, является завершенным научно-квалификационным трудом, выполненным на высоком методическом


уровне, и соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к докторским диссертациям.

По актуальности, научной новизне, достоверности полученных результатов и их практической значимости диссертационная работа Савостьянова К.В. полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, 29.05.2017 № 650, 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Савостьянов Кирилл Викторович заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Официальный оппонент

заместитель директора по лабораторно-диагностической работе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Республиканский медико-генетический центр, профессор кафедры медицинской генетики и фундаментальной медицины Башкирского государственного медицинского университета

доктор биологических наук 03.02.07 – Генетика, доцент

 Хусаинова Рита Игоревна

Подлинность подписи д.б.н. Хусаиновой Р.И. «заверяю»



08 февраля 2021 года

Адрес организации: 450076, г. Уфа, ул. Гафури, д.74

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения

Республиканский медико-генетический центр

Тел.: +7(347) 246-83-22, e-mail: rmgcufa@yandex.ru