

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Сломинского Петра Андреевича 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

В настоящее время у человека описано около 10000 генетически обусловленных заболеваний, подавляющее число которых является редкими, с частотой встречаемости менее 1 случая на 2000 новорожденных. Это затрудняет диагностику таких заболеваний и снижает вероятность быстрого начала их лечения. В связи с этим изучение генетических основ редких орфанных заболеваний позволит улучшить состояние здоровья населения, в первую очередь детей. Исходя из этого, диссертационная работа Кирилла Викторовича Савостьянова, посвященная диагностике редких наследственных болезней, представляется высоко актуальной. Развиваемые в этом исследовании методы ранней диагностики редких наследственных заболеваний направлены на решение одной из важнейших задач здравоохранения - снижение ранней инвалидизация и ранней смертности населения. Бурное развитие генетических и биохимических технологий в последние годы открывает новые возможности для проведения ранней диагностики и крайне актуальным является быстрое включение новых методических подходов в программы исследований, направленных на разработку и оптимизацию алгоритмов диагностики редких наследственных болезней. В диссертационной работе К.В. Савостьянова именно новейшие методы молекулярно-биологических исследований имплементированы в изучение генетических основ орфанных заболеваний, что делает

данное исследование крайне важным для дальнейшего развития и внедрения в медицинскую практику современных методов ранней диагностики орфанных заболеваний.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений,  
выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертационной  
работе**

Все научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных автором рисунках и таблицах. Цель, сформулированная в работе, в полной мере согласуется с названием диссертации. Задачи исследования развернуты, структурированы и отражают все этапы работы. Методы исследования, использованные в работе, также соответствуют целям и задачам диссертации. Полученные результаты детально проанализированы, систематизированы и представлены в работе. Выводы сформулированы в соответствии с полученными результатами, которые в полной мере соответствуют сведениям по рассматриваемой проблеме, опубликованным в независимых российских и зарубежных литературных источниках. Положения, выносимые на защиту, обоснованы, доказательны, аргументированы и обладают достаточной научной новизной. Достоверность положений и выводов диссертации обеспечена достаточным количеством проведенных лабораторных исследований, репрезентативностью выборок, а также современными высокотехнологичными методами биохимической и молекулярно-генетической диагностики, которые выстроены согласно четкой методологии. Подготовка, анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

Полученные Савостьяновым К.В. результаты к настоящему времени уже внедрены в практическую работу целого ряда ведущих медицинских и



образовательных учреждений, что, безусловно, подтверждает практическую ценность и достоверность результатов выполненного диссертационного исследования.

Результаты исследования опубликованы в 27 статьях в отечественных журналах, рекомендуемых ВАК РФ, изложены в двух монографиях и 4 клинических рекомендациях по редким болезням обмена. Тем не менее необходимо отметить, что крайне желательным было бы представление полученных результатов в международных научных журналах, специализирующихся в области генетики орфанных заболеваний. Полученные в рамках диссертационной работы результаты были бы интересны широкому кругу исследователей за пределами Российской Федерации и дополнили общие представления по генетическим причинам широкого круга редких наследственных заболеваний.

По своему содержанию автореферат диссертации полностью соответствует основным положениям диссертационной работы.

### **Научная новизна исследования**

Высокая степень новизны диссертационной работы Савостьянова К.В. очевидна.

Проведенный автором комплексный селективный скрининг более чем 30000 пациентов на несколько нозологий является знаковым для российской медицинской науки, а новизна исследования заключается не только в применении новой методологии решения поставленной задачи, но и в полученных результатах, подкрепленных обоснованной доказательной базой. Так, автором доказано, что в качестве биомаркеров для первичного скрининга российских пациентов с болезнями Фабри и Гоше успешно могут быть использованы глоботриаозилсфингозин (лизо-Гб3) и гликозилсфингозин (лизо-Гл1). Также автором описаны методики определения биомаркеров, которые максимально эффективно могут быть использованы для скрининга и мониторинга терапии цистиноза и

тирозинемии, тип I, причем метод определения концентрации цистина в полиморфноядерных лейкоцитах крови, полученных двойным градиентным методом у пациентов с подозрением на цистиноз вообще является уникальной мировой практикой. Результатом широкомасштабного скрининга пациентов с подозрением на моногенные формы нефротического синдрома (НС), гликогеновой болезни (ГБ), несовершенного остеогенеза (НО) и кардиомиопатий (КМП) стало не только описание 321 нового нуклеотидного варианта генома человека, но и определение характерных для российских детей мутаций в целом ряде генов, а также описание мажорных мутаций в генах *CTNS* и *FAH*, характерных для отдельных этнических групп. Кроме того, результатом диссертационной работы стало описание частот и спектра мутаций отдельных генов по исследуемым нозологиям, что является ценной информацией для фундаментальной генетики.

#### **Значимость полученных результатов для науки и практики.**

Результаты, выводы и практические рекомендации диссертационной работы Савостьянова К.В. имеют несомненную значимость не только для фундаментальной, но и для прикладной медицинской науки.

Подходы, примененные для селективного скрининга, а также новые алгоритмы молекулярно-генетической диагностики уже сейчас внедрены в практику некоторых медицинских учреждений, круг которых может вполне быть расширен в ближайшем будущем, что, несомненно, должно привести к увеличению выявляемости описанных автором в работе нозологий (в том числе и в отдаленных регионах РФ), назначению своевременной патогенетической терапии и приводить, в свою очередь, к снижению ранней инвалидности и смертности среди детского населения России.

Ценнейшую информацию для популяционной и медицинской генетики представляют не только выявленные автором генотип-фенотипические корреляции, описанные в работе, но представленные в работе мутации, характерные для российских больных. Полученная



информация о новых нуклеотидных вариантах пополнит уже имеющиеся международные базы данных по мутациям генома человека, такие как HGMD professional, способствуя интеграции с международным научным сообществом в области медицинской и популяционной генетики.

Совокупность полученных и представленных данных полностью соответствует задачам Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы в части медицины, утвержденной Постановлением Правительства РФ от 22 апреля 2019 года №479.

### **Структура и содержание диссертационной работы**

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

В главе «Введение» автор описывает и обосновывает актуальность темы исследования, формулирует цели и задачи исследования, также в разделе описано актуальное состояние мировой науки по проблеме исследования, кратко изложена методология исследования, а также приведены положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы структурирован, состоит из четырех разделов, каждый из которых дает представление об отдельной группе исследуемых нозологий. Дана подробная информация о классификации, патогенезе и молекулярно-генетических особенностях и диагностике наследственных болезней обмена, несовершенного остеогенеза, нефротического синдрома и кардиомиопатий.

В главе «Материалы и методы исследования» автор описывает и характеризует используемые в работе выборки пациентов, структурирует и

описывает все примененные в работе экспериментальные методы, включая тандемную масс-спектрометрию, молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические исследования. Также в этой главе дано описание биоинформатических методов анализа, используемых автором в работе, и приведена краткая характеристика статистических методов обработки результатов. Необходимо отметить при этом краткость всех глав в этом разделе - все в основном основано на ссылках, но не всегда они позволяют точно понять методические подходы, использованные при решении тех или иных задач. Например, в описании биоинформатического анализа дана ссылка на использование пакета программ «Alamut» - но без указания на использованные автором в этой программе алгоритмы предсказания патогенности мутаций.

Глава «Результаты и обсуждение» хорошо структурирована и выдержана в едином стиле. В главе дано подробное изложение результатов с их последующим анализом для 31954 обследованных пациентов. При этом данная выборка состоит из двух выборок с разным характером формирования - выборки, в которой проходил массовый биохимический скрининг (31447 пациентов, скринированных на разные метаболиты в зависимости от изучаемого заболевания) и выборки, сформированной на основании клинического фенотипа (несовершенный остеогенез, кардиомиопатии и т.д.). В связи с этим не удивителен первый вывод диссертационной работы о частоте выявления редких моногенных болезней - если в первом случае велся широко масштабный скрининг, то во втором случае фактически шел поиск конкретных мутаций в рамках одного фенотипа (пусть и достаточно широко определенного - как это было в случае кардиомиопатий).

Далее автором проведен подробный анализ большого числа заболеваний - от болезни Фабри и болезни Гоше до нефротического синдрома и кардиомиопатий. В каждом из подразделов автор проводит



подробный анализ данных, с учетом имеющихся результатов передовых зарубежных исследований в этой области, формулирует выводы, опираясь на полученные экспериментальные данные и имеющуюся доказательную базу, а также предлагает варианты оптимизации биохимической и/или молекулярно-генетической диагностики. При этом необходимо отметить очень большой объем полученных данных по каждому заболеванию - от точного описания мутаций до анализа их географического распределения и выявления корреляций генотипа и фенотипа. Эти данные крайне интересны и важны, но в некоторых случаях их интерпретация вызывает вопросы. Например, в таблице 9 приведены данные по распределению пациентов с мутациями в гене GLA при болезни Фабри в разных регионах Российской Федерации. При этом в таблице приведены данные по численности населения региона и не представлена информация о лицах из этого региона, участвовавших в программе биохимического скрининга. Это будет влиять на оценку частоты в регионе страны. Кроме того, частота рассчитывается относительно всех пациентов - а не пробанда. В итоге в Тамбовской области частота оказывается максимальной (1 на примерно 200000) - но все пять пациентов в этой области относятся к одной семье и при расчета по пробанду она будет около 1:100000. Такая неопределенность с оценкой частот по числу семей или пациентов с той или иной мутацией наблюдается и дальше. Например, рисунок 86 - мутации в гене COL1A1 при несовершенном остеогенезе. Как сказано на стр. 364, мутация p.R415\* найдена у трех детей из двух семей, а мутация p.G560S - у двух детей из двух не родственных семей. В итоге частота первой мутации оценена в 6%, а второй - в 4% на рисунке 86. Что верно при оценке частот по пациентам - но смазывает картину реального распределения независимых мутаций в семьях.

Очень важно, что раздел по каждому из заболеваний заканчивается небольшими выводами с краткой суммацией всех полученных результатов.

Необходимо также отметить, что в некоторых случаях автором используются не совсем удачные термины - например, фреймшифтинг. Понятно, что речь идет о сдвиге рамки считывания - и все-таки лучше в данном случае три слова, оставив фреймшифтинг для внутри лабораторного употребления. Другой пример - «количественные» (причем в кавычках) мутации. Опять же из контекста понятно, что имеет в виду автор - уменьшение числа копий гена, не несущих мутации с сдвигом рамки считывания. Но само наличие кавычек в данном случае говорит о том, что автор осознает всю условность этого термина.

В разделе «Заключение» суммированы основные результаты проделанной работы, рассмотрены ключевые перспективы внедрения полученных разработок и дана оценка их потенциальной эффективности. Акцент сделан на особой важности ранней диагностики генетически обусловленных заболеваний, для которых существует эффективное патогенетическое лечение. Большие надежды возлагает автор на возможность создания российских баз данных по изученным им заболеваниям, что позволит не только использовать эту информацию для прогнозирования развития определенных клинических проявлений и персонализации терапии, но и упростит проведение пренатальной и преимплантационной диагностики в отягощенных семьях. Кроме того, создание таких российских баз данных значительно позволит эскалировать вхождение России в мировые научные сообщества в области генетики редких болезней.

#### **Сведения о полноте публикаций.**

Основные результаты диссертационного исследования представлены в 79 работах в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в



российских и международных реферативных базах данных и системах цитирования, из них 27 научных статей в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации. Кроме того, Савостьянов К.В. является автором двух монографий, двух патентов на изобретения, а также клинических рекомендаций, утвержденных Министерством здравоохранения Российской Федерации. Результаты диссертационной работы также представлены на многочисленных российских и зарубежных конференциях.

### **Заключение**

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.

На основании комплексных исследований, выполненных автором, разработаны и оптимизированы алгоритмы биохимической и молекулярно-генетической диагностики редких болезней у российских пациентов.

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 научной работе ФГБУ Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», заведующий лабораторией молекулярной генетики наследственных болезней, доктор биологических наук по специальности 03.00.26– «Молекулярная генетика», профессор

Сломинский Петр Андреевич

Подлинность подписи д.б.н. Сломинского П.А. заверяю

Ученый секретарь, кандидат  
биологических наук



Л.Е. Андреева