

## УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБГ УФИЦ РАН доктор  
биологических наук, профессор,  
член-корреспондент РАО,  
академик Академии наук РБ  
Хуснутдинова Эльза Камилевна

11 февраля 2021 г.



## ОТЗЫВ

ведущей организации — Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН) — на диссертационную работу **Савостьянова Кирилла Викторовича** на тему **«Оптимизация молекулярной диагностики редких наследственных болезней у российских пациентов»**, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 — Генетика

### 1. Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Савостьянова К.В. посвящена актуальной проблеме современного здравоохранения — диагностике редких наследственных заболеваний. На настоящий момент, по данным ВОЗ, оценочное число наследственных болезней может достигать 10 тысяч, а количество больных — 10% всего населения земного шара. Поэтому первостепенная задача, стоящая перед врачом, состоит в подтверждении или исключении генетической природы заболевания, что позволяет дать прогноз течения болезни, определить тактику лечения. Постановка

клинического диагноза редкого заболевания часто бывает затруднена, особенно у детей раннего возраста. В таких случаях молекулярная диагностика имеет определяющее значение. Предложенная автором диссертации концепция и разработанные методы, алгоритмы и протоколы биохимической и молекулярно-генетической диагностики наиболее частых генетических болезней позволят повысить выявляемость редких генетических болезней у российских пациентов. Таким образом, актуальность темы диссертационной работы не вызывает сомнений.

## **2. Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства**

Диссертация Савостьянова К.В. выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 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.

## **3. Новизна исследования и полученных результатов**

Научную ценность и новизну диссертационной работы определяют следующие результаты исследования, полученные лично соискателем.

Автором впервые в России предложено и описано применение метода комплексного селективного скрининга для диагностики болезни Фабри, болезни Гоше, болезни Помпе, мукополисахаридоза (тип I, тип II), тирозинемии (тип I) в высушенных пятнах крови, в сухих пятнах крови, а также цистиноза – в лейкоцитах крови (база исследования составила 30893

пациентов, отобранных в соответствии с определенными клиническими признаками).

Установлены прогностическое значение некоторых маркеров (глоботриаозилс- и гликозилсфингозина у пациентов с болезнями Фабри и Гоше, сукцинилацетона и цистина у пациентов с тирозинемией, тип I и цистинозом) и их связь с течением и исходом заболевания. Исследованиями автора доказана и обоснована возможность мониторинга проводимой терапии у пациентов с использованием рассматриваемых биомаркеров.

Выявлена зависимость отдельных показателей (например, концентрации цистина, сукцинилацетона, глоботриаозилсфингозина и гликозилсфингозина у пациентов с цистинозом, тирозинемией, тип I, болезнями Фабри и Гоше соответственно) от времени начала и условий проведения патогенетической терапии.

Определены и охарактеризованы относительные частоты и спектр патогенных вариантов генома, ответственных за возникновение и развитие наследственных болезней обмена, несовершенного остеогенеза, нефротического синдрома, кардиомиопатий.

Разработаны алгоритмы верификации наиболее частых генетических болезней, выявляемых в ведущем педиатрическом многопрофильном медицинском центре России, на основе сочетания клинических, биохимических и молекулярных данных.

Исследованиями автора определен спектр мутаций, вызывающих гликогеновую болезнь (разные типы), нефротический синдром, несовершенный остеогенез и кардиомиопатии у детей, проведен анализ структуры наследственной патологии у пациентов детского возраста. Впервые в мире описан 321 новый нуклеотидный вариант генома человека, в том числе 212 патогенных вариантов, 73 вероятно патогенных вариантов и 36 вариантов с неизвестной патогенностью. Для большинства указанных вариантов дано описание вызываемых ими фенотипических проявлений

болезней. Выявлены и описаны генотип-фенотипические корреляции между мутациями разных классов патогенности и клиническими проявлениями исследуемых заболеваний на основе изучения распространенности и структуры мутаций.

Созданы оригинальные эффективные способы диагностики наследственных заболеваний у детей с использованием технологии секвенирования нового поколения (патенты РФ № 2621161, № 2621162), которые позволяют сделать вывод о наличии у пациента генетически обусловленного заболевания, что в свою очередь дает возможность скорректировать тактику терапии и сократить последствия возможной инвалидизации и значительно повысить качество жизни таких пациентов.

Представлены утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации клинические рекомендации (протоколы лечения) по пяти нозологиям: тирозинемии (тип I), мукополисахаридозу (тип I), мукополисахаридозу (тип II), болезни Гоше, болезни Фабри.

Выводы и результаты, полученные диссертантом, обоснованы и достоверны, так как опираются на результаты анализа и современные методы исследований, подкреплены достаточным количеством экспериментальных данных и репрезентативностью выборок, имеют высокую степень совпадения результатов расчета, полученных разными методами с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

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

Разработаны алгоритмы молекулярной диагностики болезни Фабри, болезни Гоше, болезни Помпе, тирозинемии (тип I), цистиноза, нефротического синдрома, несовершенного остеогенеза, болезней накопления гликогена и кардиомиопатий у российских пациентов, продемонстрировавшие высокую эффективность.

Установлена актуальность и исследована прогностическая ценность клинических, географических и молекулярно-генетических факторов прогноза наследственных заболеваний. Проведенные исследования дают более точное понимание механизмов, лежащих в основе формирования лекарственной устойчивости заболевания к проводимой терапии, а также характеризующих длительность ответа на лечение (например, в случае стероидрезистентного нефротического синдрома), позволяют подобрать наиболее рациональную терапевтическую концепцию для каждого конкретного пациента (например, в случае болезни Фабри, болезни Гоше, тирозинемии I, цистиноза), позволяют не только описать относительные частоты различных генетически обусловленных заболеваний у детей в Российской Федерации, но и связать найденные варианты генома, в том числе новые мутации, с географическим регионом и/или с популяционной принадлежностью. Проведенные автором исследования закладывают основу для создания регистров по редким болезням, которые будут содержать информацию о клинических, географических, возрастных и молекулярных особенностях российских пациентов.

Апробирована методика продолжительного диспансерно-динамического наблюдения (мониторинга) концентрации определенных биомаркеров в крови пациентов с редкими болезнями на фоне проведения терапии в целях ее дальнейшей коррекции.

Определены и скорректированы оптимальные пороговые точки, соответствующие максимальным показателям чувствительности и специфичности, что может быть использовано для диагностики болезней Фабри, Гоше, Помпе, МПС, тип I, тирозинемии, тип I и цистиноза у российских пациентов.

Разработана оптимальная схема диагностики детей с врожденным и инфантильным стероидрезистентным нефротическим синдромом на

основе проведения молекулярно-генетического обследования методом секвенирования нового поколения.

Созданы оригинальные, в том числе на уровне изобретения, способы диагностики наследственных заболеваний у детей с использованием технологии секвенирования нового поколения.

## **5. Личный вклад автора**

Автор выдвинул научную гипотезу, разработал дизайн и протокол исследования, провел анализ отечественной и зарубежной литературы. Савостьянов К.В. принимал непосредственное участие в разработке алгоритмов молекулярной диагностики наиболее частых генетических болезней, проведении молекулярно-генетического исследования, разработке панелей для исследования целевых областей генома методом массового параллельного секвенирования, проведении биоинформатического анализа выявленных генетических вариантов, а также в интерпретации полученных данных и статистической обработке результатов биохимических и молекулярно-генетических исследований, обобщении результатов работы. Кроме того, Савостьянов К.В. самостоятельно написал текст диссертации, а также подготовил публикации по теме диссертации и лично докладывал результаты работы на многочисленных российских и международных научных конференциях.

## **6. Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Результаты и выводы, полученные в настоящей диссертации, рекомендуется использовать в работе практикующих врачей при обследовании и лечении пациентов с мукополисахаридозами, гликогенозами, болезнями Фабри и Гоше, тирозинемии, тип I, цистинозе, несовершенном остеогенезе, нефротическом синдроме, кардиомиопатиях, что позволит оптимизировать усилия специалистов, направленные на выявление и подтверждение новых случаев редких (орфанных)

заболеваний в Российской Федерации, а также на профилактику и недопущение повторных случаев возникновения болезней в отягощенных семьях.

Результаты и выводы исследования имеют междисциплинарный характер и представляют практический интерес для специалистов, занимающихся проблемами персонализированного подхода к лечению пациентов с генетическими заболеваниями. Полученные данные могут быть использованы в разработке диагностических панелей, для оценки динамики и эффективности лечения больных, для создания генетических карт и геногеографических атласов, регистров по изученным редким болезням, которые будут содержать информацию о клинических, географических, возрастных и молекулярных особенностях российских пациентов. Возможно их использование в научно-образовательном процессе вузов при создании курсов лекций для студентов биологических и медицинских специальностей, а также в качестве учебного материала при проведении занятий со студентами указанных направлений подготовки. Полученная база данных по фенотипам-генотипам может быть использована в качестве референтной базы в медико-генетической экспертизе. Коллекция образцов, собранная в целях выполнения работы, может быть использована в дальнейшем для проведения медико-генетических исследований.

Перспективным представляется развитие тематики настоящей диссертационной работы, поскольку современные молекулярно-генетические подходы дают в руки исследователю множество инструментов для работы в области лабораторной генетики, популяционной генетики, филогенетических реконструкций, филогеографии и ряда других направлений.

Полученные результаты работы рекомендуются для использования научными, медицинскими и исследовательскими организациями, а также учреждениями высшего образования.

## **7. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Обоснованность научных положений, выводов, практических рекомендаций и достоверность результатов диссертационной работы Савостьянова К.В. не вызывают сомнений и подтверждаются достаточным числом обследованных пациентов (31954 чел.), тщательно спланированным многоэтапным селективным скринингом участников исследования, включая корректно разработанные критерии включения/невключения, лабораторные методы исследования. В работе применены современные и отвечающие задачам методы обследования, которые широко распространены и имеют высокую воспроизводимость. Проведенный автором статистический анализ результатов, а также биоинформатический анализ данных соответствуют поставленным задачам, использованные методы (сравнительный и корреляционный анализ, многомерный линейный регрессионный анализ, одно- и многофакторный логистический регрессионный анализ) являются современными и корректными. Полученные выводы и практические рекомендации концептуальны, полностью основаны на результатах обследования и соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

## **8. Общая оценка работы**

Диссертационная работа Савостьянова Кирилла Викторовича на тему «Оптимизация молекулярной диагностики редких наследственных болезней у российских пациентов» оформлена в традиционном для научных работ стиле в соответствии с требованиями Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации и ГОСТ, изложена на 593 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов обследования, собственных результатов, обсуждения, списка литературы из



1037 источников, иллюстрирована рисунками, схемами, диаграммами и таблицами. Выводы и практические рекомендации хорошо сформулированы, научно обоснованы, соответствуют цели и задачам исследования. Предложены перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования.

Представленная работа является завершенным научным исследованием, в котором изложены теоретические решения и предложены практические пути усовершенствования диагностики наследственных болезней в Российской Федерации на основе данных о спектре и частотах мутаций, характерных для определенных популяционных групп, при условии подтвержденной патогенности на биоинформатическом уровне новых, не описанных ранее генетических вариантов.

Работа базируется на результатах исследований, проведенных в лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации с 2014 по 2019 годы. В диссертации сформирована и научно обоснована автором концептуальная модель молекулярной диагностики гомо- и гетерогенных болезней у российских пациентов, предполагающая оптимизацию существующих и разработку новых алгоритмов диагностики наследственной патологии; определены частоты встречаемости и спектр мутаций, характерных для российских пациентов; выявлены новые мутации и описаны генотип-фенотипические корреляции.

Внедрение разработок автора вносит значительный вклад в развитие медицины и здравоохранения нашей страны, существенно расширит спектр выявляемых наследственных заболеваний и позволит свести к минимуму вероятность диагностических ошибок в реальной клинической практике.

В работе имеется ряд дискуссионных моментов, которые требуют обсуждения в ходе защиты диссертации.

### **Вопросы по работе**

1. Автором разработан и внедрен в практику ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России алгоритм диагностики и лечения детей с наследственными патологиями, позволяющий персонифицированно подойти к ведению таких пациентов на разных этапах оказания медицинской помощи, представлена репрезентативная выборка пациентов значительного объема, описано большое число новых мутаций, тем не менее из работы не вполне понятно ведется ли в настоящее время база(ы) данных пациентов детского возраста с какой-либо из исследуемых патологий.

2. По исследованным заболеваниям в соответствующих разделах работы представлено распределение обследованных автором пациентов в различных субъектах РФ, где приводится число обследованных семей, число пациентов, а также численность населения в субъектах страны, и, как результат – оценка частоты (встречаемости пациентов?) в этих субъектах. Не очень понятно, о чем говорит эта оценка, означает ли это, что в исследование вошли все пациенты (или хотя бы большинство) из этих регионов, когда можно было бы рассчитывать частоту заболевания? К сожалению, в диссертации не указано, каким образом собирался материал из регионов.

3. Большое внимание в работе уделяется исследованию относительных частот и спектра патогенных вариантов генома. Однако не ясно, какой метод применяется в диссертации для отыскания относительных частот обнаруженных мутаций и с какой точностью они вычисляются.

4. В одних протоколах диагностики наследственных болезней обмена, изученных в настоящей работе, автор предлагает использовать секвенирование по Сэнгеру в качестве последнего этапа диагностики, тогда

как для других заболеваний предлагается продолжать поиск патогенных вариантов генома методом мультиплексной лигазозависимой амплификации проб. С чем связано данное различие?

## **9. Печатные работы, отражающие основное содержание диссертации**

Материалы, вошедшие в диссертацию, опубликованы в 79 научных трудах, в том числе в 2 монографиях и 27 научных статьях в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации. Автором получены 2 патента на изобретения Российской Федерации (№ 2621161, № 2621162), разработаны клинические рекомендации по пяти нозологиям.

Автореферат диссертации полностью отражает наиболее важные положения диссертации, дает представление о проделанной работе, содержит в кратком виде всю информацию, характеризующую полученные результаты, основные положения и выводы диссертации.

## **10. Заключение**

Диссертационная работа Савостьянова Кирилла Викторовича на тему «Оптимизация молекулярной диагностики редких наследственных болезней у российских пациентов», выполненная при научном консультировании академика РАН, доктора биологических наук, профессора Гинтера Евгения Константиновича, является законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, осуществлено решение научной проблемы совершенствования ранней диагностики и прогнозирования редких наследственных заболеваний, имеющих патогенетическое лечение, своевременное получение которого позволяет приостановить необратимые, а в большинстве случаев фатальные

изменения органов и тканей пациентов, имеющих в своем геноме патогенные генетические дефекты, а также изложены научно-обоснованные решения, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие медицины и системы здравоохранения Российской Федерации.

Работа Савостьянова К. В. отвечает паспорту заявленной специальности 03.02.07 — Генетика.

По актуальности выбранной темы, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Савостьянова К. В. соответствует требованиям пунктов 9–11, 13–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (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 докторским диссертациям.

Автор диссертационной работы Савостьянов Кирилл Викторович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 — Генетика.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании Ученого совета Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (протокол № 2 от 10 февраля 2020 года).

Заведующая лабораторией  
молекулярной генетики человека  
ИБГ УФИЦ РАН, доктор  
биологических наук (03.00.15),  
профессор



Хидиятова Ирина Михайловна

Подпись проф. Хидиятовой И. М. заверяю.

Ученый секретарь ИБГ УФИЦ РАН  
доктор биологических наук (03.01.04)




Гималов Фуат Рамазанович

10 февраля 2021 года

**Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН)**

Адрес: 450054, Российская Федерация, Республика Башкортостан, г. Уфа, проспект Октября, 71

Телефон/факс: 8 (347) 235-60-88

Эл. почта: molgen@anrb.ru

Сайт: <http://ufaras.ru/>, <http://ibg.anrb.ru>

**Хуснутдинова Эльза Камилевна**, доктор биологических наук по специальности 03.00.15 – Генетика, профессор, член-корреспондент РАО, академик Академии наук Республики Башкортостан, директор ИБГ УФИЦ РАН

Тел: 8 (347) 235-60-88

Эл. почта: elzakh@mail.ru

**Хидиятова Ирина Михайловна**, доктор биологических наук по специальности 03.00.15 – Генетика, профессор, заведующая лабораторией молекулярной генетики человека ИБГ УФИЦ РАН

Тел: 8 (937) 309-15-31

Эл. почта: imkhid@mail.ru

Сведения о ведущей организации, о лице, утверждающем отзыв ведущей организации, о составе отзыва из ведущей организации заверяю.

Ученый секретарь ИБГ УФИЦ РАН

доктор биологических наук (03.01.04)



Гималов Фуат Рамазанович

10 февраля 2021 года