

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора, академика РАН Янковского Николая Казимировича на диссертацию Шестака Анны Геннадьевны «Молекулярно-генетический полиморфизм аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка у российских больных», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика

Актуальность темы диссертационного исследования

Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АКПЖ) — заболевание миокарда, характеризующееся прогрессирующим замещением кардиомиоцитов правого желудочка жировой или фиброзно-жировой тканью, приводящим к атрофии и истончению стенки желудочка, его дилатации. Считается, что частота встречаемости АКПЖ варьирует в пределах от 1:2000 до 1:5000. Заболевание связано с риском внезапной сердечной смерти. В разных этнических группах аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка является причиной 10,4%-25% случаев внезапной сердечной смерти молодых людей в возрасте 17-40 лет.

Заболевание долгое время считалось казуистически редким, распространенность его мало изучена в связи с малосимптомным течением болезни и трудностями диагностики. Высокая доля семейных случаев заболевания влечет за собой запрос на разработку ДНК-диагностики для пациентов с АКПЖ.

В настоящее время лечение АКПЖ проводится с целью профилактики внезапной сердечной смерти и предотвращения жизнеугрожающих аритмий, а также снижения прогрессирования хронической сердечной недостаточности.

Роль мутаций в генах десмосом у большинства пациентов с АКПЖ подчеркивают критическую функцию этих структурных элементов в сердце, которые сохраняют целостность кардиомиоцитов в циклических процессах сокращения и расслабления.

Начиная с публикации в 2000 г. об открытии первой гомозиготной мутации в гене плакоглобина у жителей острова Наксос (Греция), молекулярно-генетические исследования этого заболевания привели к выявлению широкого спектра более чем 1400 генетических вариантов в 12 генах, ассоциированных с АКПЖ. Несмотря на это, молекулярная причина заболевания остается не выявленной примерно у 50% пробандов, а часть находок представляет собой генетические варианты с неустановленным значением, требующие дополнительных исследований.

Учитывая перекрывающиеся генетические спектры различных кардиомиопатий, поиск мутаций в генах десмосом и ассоциированных с ними белков с определением их значимости для клинического течения заболевания и прогноза является современной темой для медицинской генетики.

В связи с этим, актуальность темы диссертационной работы Шестак Анны Геннадьевны, посвященной анализу молекулярно-генетического полиморфизма аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка у российских больных, не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационном исследовании использован комплексный подход к решению поставленных задач с использованием современных, апробированных в научной практике методов исследования, включая высокопроизводительное секвенирование нового поколения (NGS) на платформе Ion Torrent с последующим анализом таргетных участков генов методом прямого двунаправленного секвенирования по Сенгеру, являющемуся «золотым стандартом» ДНК-диагностики.

Результаты исследования спектра выявленных генетических вариантов были сопоставлены автором с литературными данными: с результатами изучения спектров генетических вариантов при разных типах кардиомиопатий в пяти исследованиях. Проведен анализ клинических

проявлений аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка в группе российских больных.

Результаты исследования обоснованы автором расчетами и выявленными закономерностями, что позволяет оценить и принять сформулированные научные положения, полученные выводы и предложенные на их основе практические рекомендации, в том числе включающие алгоритмы медико-генетического консультирования для пациентов с АКПЖ. Сформулированные автором выводы соответствуют заявленной специальности, практические рекомендации при различных типах ремоделирования миокарда адекватны клиническим задачам, решаемым врачами генетиками и кардиологами для пациентов с АКПЖ и для их родственников.

Результаты диссертационной работы опубликованы в 76 научных работах, включая 23 статьи, из них 18 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных результатов диссертационных исследований, и 5 статей, индексируемых в базах данных Scopus и/или Web of Science, и 53 тезиса научной работы в материалах конференций. Материалы диссертации доложены на 10 российских и 12 международных конференциях.

Результаты исследования внедрены в практику медико-генетического консультирования, диагностический и лечебный процесс лаборатории медицинской генетики и отделения хирургического лечения сложных нарушений ритма сердца и электрокардиостимуляции, а также в программы непрерывного дополнительного профессионального образования ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского».

Результаты ДНК-диагностики включены в клиническую классификацию АКПЖ, которая была внедрена в лечебный и учебный процесс Факультетской терапевтической клиники имени В.Н. Виноградова и кафедры факультетской терапии № 1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Научная новизна и теоретическая значимость работы

В диссертационной работе Шестак А.Г. исследован спектр генетических вариантов в генах, кодирующих белки десмосом и ассоциированных с ними белков. Исторически АКПЖ рассматривали как «болезнь десмосом», т.к. в большинстве случаев заболевание ассоциировано с потенциально патогенными вариантами в генах, кодирующих десмосомные белки: трансмембранные десмосомные кадгеринины (десмоколлин, десмоглеин) и адаптерные белки (десмоплакин, плакофилин, плакоглобин). Однако, в настоящее время накапливаются данные о потенциально патогенных вариантах в генах, кодирующих белки клеточной адгезии, также ассоциированные с десмосомами. Автором идентифицированы мутации, в том числе новые, приводящие к развитию заболевания, как в десмосомных, так и в не-десмосомных генах, с преобладанием типа генетических вариантов, приводящих к прекращению синтеза белка.

Автором проанализированы клинические особенности пациентов с АКПЖ и оценена диагностическая эффективность ДНК-диагностики как в общей выборке больных с учетом различных вариантов ремоделирования миокарда, так и отдельно в группах больных с достоверным, вероятным или возможным диагнозами АКПЖ, поставленными до проведения генетического исследования. Ранее такой подход не применялся. Показано, что диагностическая эффективность исследования зависела от уровня достоверности диагноза.

Автором впервые исследован феномен «выпадения» аллеля на обоих платформах для секвенирования ДНК (прямое секвенирование по Сэнгеру и секвенирования нового поколения (NGS)). Было продемонстрировано, что явление «выпадения» аллеля может затрагивать до 0,77% ампликонов в таргетных панелях генов, что может приводить к снижению точности ДНК-диагностики.

Автором проведен анализ потенциальных корреляций «генотип-фенотип» при оценке значимости различий между двумя группами количественных показателей с применением t-критерия Стьюдента. Показано, что выявление генетического варианта IV-V классов патогенности является фактором, указывающим на более выраженные фенотипические проявления АКПЖ и серьезный прогноз заболевания.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Результаты, выводы и практические рекомендации, изложенные в диссертации, несомненно, имеют кумулятивное значение для медицинской науки, формулируют ряд практических решений в области генетики, в сфере кардиологической помощи пациентам. Сегодня алгоритмы обследования с использованием таргетных панелей генов для определения генетических вариантов и классов патогенности, установленных в Руководстве по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MP_S) 2018-2019 гг., а также в рекомендациях Американского колледжа медицинской генетики 2015 г., внедрены в клиническую практику. В диссертационной работе продемонстрированы результаты ре-интерпретации генетических вариантов с течением времени по мере появления новых данных об их патогенности или ее отсутствии, затрагивающие важный аспект повторного контакта врача генетика и пациента.

Полученные автором результаты позволяют рекомендовать персонафицировать медико-генетическое консультирование семьям пациентов с аритмогенной кардиомиопатией правого желудочка при организации дифференциального подхода к ДНК-диагностике и оценке риска жизнеугрожающих событий и тактики лечения больных.

Тема диссертации является перспективной для дальнейшей научной разработки. Автором представлены основные направления в развитии данного направления: описание новых генетических вариантов наряду с детальным фенотипированием, что позволит выявлять новые корреляции

«генотип-фенотип» и данные о взаимосвязи различных кардиомиопатий; анализ «частых» мутаций в выборках АКПЖ, общего происхождения аллелей, частот редких генетических вариантов в разных этнических группах.

Перспективным представляется дальнейшее изучение вклада феномена «выпадения» аллеля в снижение точности ДНК-диагностики: детекции новых случаев ADO, описание причин и типов ADO, а также разработки эффективных алгоритмов для избегания ADO при дизайне праймеров для ПЦР-опосредованных методов секвенирования.

Структура и оценка содержания диссертационной работы

Диссертация А.Г. Шестак изложена на 149 страницах печатного текста, состоит из традиционных разделов (введение; 3 глав – обзор литературы, материал и методы, результаты и обсуждение; заключения; выводов; практических рекомендаций и библиографического списка) и проиллюстрирована 25 таблицами и 31 рисунком. В библиографическом списке 217 литературных источников, из них 210 зарубежных и 7 отечественных. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Диссертационная работа написана хорошим научным языком, материал изложен в логической последовательности. Рисунки и таблицы, представленные в работе, достаточно информативны, хорошо дополняют и иллюстрируют основной текст диссертации.

В главе 1 «Обзор литературы» представлено современное состояние проблемы изучения генетического разнообразия причин аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка с подробной презентацией основных генов, мутации в которых ответственны за развитие заболевания, а также новых генов-кандидатов. Подробно описаны современные подходы и определены ограничения в эффективности ДНК-диагностики АКПЖ, имеющиеся на сегодняшний день, что отражает актуальность работы.

Продемонстрированы клинико-инструментальные методы диагностики заболевания, а также вклад результатов генетических исследований в постановку диагноза АКПЖ. Приведены опубликованные научные работы о дальнейшем изучении отдельных мутаций и их функционального значения, которые напрямую зависят от таких генетических исследований, как представленные в данной диссертационной работе. Литературный обзор свидетельствует о высоком теоретическом уровне подготовки диссертанта. Содержание обзора хорошо соотносится с дальнейшими собственными исследованиями.

В главе 2 «Материалы и методы» охарактеризована структура выборки пациентов с диагнозом АКПЖ, применяемые молекулярно-генетические и статистические методы. Количество пациентов, включенных в исследование (80 пробандов и 16 их кровных родственников), достаточно для выполнения работы согласно поставленным цели и задачам. Подробно освещены биоинформатическая обработка полученных результатов, включая интерпретацию генетических вариантов согласно современным руководствам, и протокол выявления «выпадения» аллеля как в результатах высокопроизводительного секвенирования на платформе Ion Torrent, так и прямого секвенирования по Сенгеру.

В главе 3 «Результаты и обсуждение» представлена подробная характеристика каждого выявленного патогенного и вероятно патогенного генетического варианта, спектра вариантов неустановленного значения. Приведена разносторонняя оценка эффективности проведенной ДНК-диагностики пациентов с АКПЖ с разной степенью достоверности диагноза, а также с учетом сравнения спектров генетических вариантов с группой пациентов с дилатационной кардиомиопатией.

Шестак А.Г. проявила себя самостоятельным исследователем, детально изучив явление «выпадения» аллеля как проблему ДНК-диагностики с применением современных методов секвенирования. В работе показано, что кросс-валидация генетических результатов, выявленных одной

платформой для секвенирования, с помощью альтернативной платформы является эффективной стратегией ДНК-диагностики для снижения количества ложных результатов.

На основании полученных данных автором проведены клинико-генетические сопоставления и обсуждены гено-фенотипические корреляции в группе больных с АКПЖ. Приведены примеры ре-интерпретации генетических вариантов с течением времени, в результате чего 18 выявленных генетических вариантов поменяли свой «статус». В заключительной части главы, на основе проведенных исследований и анализа, автором предложен оригинальный алгоритм молекулярно-генетической диагностики больных с направляющим диагнозом "Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка".

В «Заключении» работы не только обобщены полученные в работе данные, но и приводятся перспективные подходы к ДНК-диагностике пациентов с кардиомиопатиями.

Выводы по полученным результатам сформулированы кратко и ясно. Предложены возможные направления дальнейших исследований по этой тематике, а также даны практические рекомендации. Представленная работа является завершенным научным исследованием.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Шестак Анны Геннадьевны на тему «Молекулярно-генетический полиморфизм аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка у российских больных», выполненная под руководством доктора медицинских наук Заклязьминской Елены Валерьевны и представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика, выполнена на достаточном методическом уровне и является завершенной научно-квалификационной работой, содержащей обоснованное научным поиском решение актуальной научной задачи – изучение полиморфизма генов, кодирующих основные десмосомные и не-десмосомные белки, и клинико-

генетического полиморфизма аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка у российских пациентов, имеющей существенное значение для соответствующей отрасли науки и практики.

Диссертационная работа соответствует критериям, установленным 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 № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2011 г., № 1168 от 01.10.2018 г.), предъявляемых к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.7. Генетика.

«12» апреля 2022 г.

Научный руководитель Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН), доктор биологических наук, профессор, академик РАН
Специальность «Генетика»

Николай Казимирович Янковский

Подпись Н.К. Янковского

«Заверяю»

Ученый секретарь ИОГен РАН,
доктор биологических наук, профессор
м. п.

Серикбай Каримович Абилев

Адрес организации:

ул. Губкина, д. 3, г. Москва, ГСП-1, 119991

тел.: +7 (499) 135-62-13; +7 (499) 135-41-95

E-mail: yankovsky@vigg.ru

