

УТВЕРЖДАЮ

Директор

Федерального государственного
бюджетного научного
учреждения

«Томский национальный
исследовательский
медицинский центр Российской
академии наук»,

доктор биологических наук,
профессор, член-корр. РАН
В.А. Степанов



«22» апреля 2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу соискателя Шестак Анны Геннадьевны
на тему: «Молекулярно-генетический полиморфизм аритмогенной
кардиомиопатии правого желудочка у российских больных», представленной
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.7. Генетика

Актуальность темы исследования

Изучение наследственных кардиологических заболеваний является чрезвычайно актуальным направлением современной медицинской генетики. Детальный анализ генов, мутации которых приводят к развитию наследственных заболеваний сердца, позволяет выявить механизмы, лежащие в основе развития этих патологий. Кардиомиопатии – это группа заболеваний с различающимся фенотипом, но с частично перекрывающимся спектром генов, мутации в которых ответственны за развитие заболевания. Фактором, затрудняющим проведение ДНК-диагностики, является феномен неполной пенетрантности, характерный для многих наследственных кардиологических заболеваний, и для решения этой проблемы необходимо тщательное описание и исследование спектра вариантов и оценка их патогенности.

Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АКПЖ) представляет собой генетически детерминированное заболевание миокарда с высоким риском внезапной сердечной смерти лиц молодого возраста,

которое характеризуется замещением кардиомиоцитов преимущественно правого желудочка фиброзной и/или жировой тканью, жизнеугрожающими нарушениями ритма сердца, ведущее к развитию сердечной недостаточности. В разных этнических группах аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка является причиной 10-25% случаев ВСС молодых людей в возрасте 17-40 лет. У значительной части больных диагноз устанавливается только после перенесенного эпизода остановки сердца или посмертно.

В последние годы накоплены данные о мутациях не только в генах десмосом, которые традиционно связывают с развитием АКПЖ, но и в недесмосомных генах. Имеющийся на сегодня список из 12 генов-кандидатов явно не исчерпывает генетического разнообразия заболевания, так как скрининг всех известных генов позволяет выявить потенциально патогенные генетические варианты примерно у 50% больных.

Представленное в настоящей работе исследование спектра генетических вариантов в изучаемых генах, подходов к ДНК-диагностике, изучение гено-фенотипических корреляций у российских больных проведено впервые. Учитывая серьезный прогноз заболевания, диссертационная работа Шестак А.Г. является актуальной не только с научной точки зрения, но и имеет практическую значимость для здравоохранения.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа Шестак А.Г. выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В.Петровского». Тематика исследования относится к приоритетному направлению научно-технологического развития Российской Федерации «переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения».

Новизна исследования и полученных результатов

В представленной диссертационной работе Шестак А.Г. впервые в России изучен спектр генетических вариантов в генах, кодирующих белки десмосом и ассоциированных с ними белков. Были идентифицированы мутации, в том числе новые, приводящие к развитию заболевания, продемонстрирован вклад генетических данных в диагностику заболевания.

В частности, автором тщательно изучены клинические проявления АКПЖ в репрезентативной выборке из 80 пробандов, а также у их 16 родственников первой степени родства.

Для проведения молекулярно-генетического исследования была использована технология высокопроизводительного полупроводникового секвенирования на платформе IonTorrent, разработана и внедрена таргетная панель из 16 генов «Гены, кодирующие десмосомные и связанные с ними белки», на основе анализа рекомендаций по генетическому тестированию кардиомиопатий. Для части больных с сочетанием АКПЖ и СНМЛЖ или повышенной трабекулярностью ЛЖ дополнительно проведено и показана целесообразность секвенирования таргетной панели «Гены, кодирующие саркомерные и связанные с ними белки».

Идентифицированы патогенные и вероятно патогенные варианты, в том числе новые, приводящие к развитию заболевания. Выявляемость генетических вариантов IV-V классов патогенности составила 45,83% от всех выявленных редких вариантов. Проанализирована эффективность проведенной ДНК-диагностики для общей когорты больных с АКПЖ, а также отдельно в когортах больных с достоверным, вероятным или возможным диагнозами АКПЖ, сопоставимая с опубликованной ранее в зарубежных источниках

На основании полученных результатов, предложен дифференциальный алгоритм ДНК-диагностики для пациента с направляющим диагнозом «Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка» АКПЖ, учитывающий вариант ремоделирования миокарда и наличие «перекрывающихся» признаков с другими типами кардиомиопатий. В результате совместного анализа клинических и генетических особенностей показано, что пациенты с выявленными патогенными и вероятно патогенными генетическими вариантами в исследованных генов имели более ранний возраст манифестации заболевания, более частую регистрацию эpsilon-волны на ЭКГ, отягощенный семейный анамнез по ВСС и заболеваниям сердца.

Особое внимание уделено анализу ограничений существующих методов секвенирования как при диагностике кардиомиопатий, так и в целом моногенных заболеваний. Исследован вклад явления «выпадения» аллеля в снижение точности ПЦР-опосредованных методов секвенирования (прямого секвенирования по Сенгеру, NGS). Показано, что основной причиной «выпадения» аллеля является локализация SNV(s) в области праймер-связывающего сайта, а снижение эффективности амплификации может затрагивать до 0,77% ампликонов в мультипраймерных панелях генов.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Полученные результаты, выводы и практические рекомендации, изложенные в диссертации, обладают новизной и имеют практическое значение для медицинской генетики, кардиологии и медико-генетического консультирования. Полученные результаты указывают на целесообразность

медико-генетического консультирования для семей пациентов с аритмогенной кардиомиопатией правого желудочка и необходимость организации дифференциального подхода к ДНК-диагностике у этих пациентов. В диссертации также изложены перспективы дальнейшей разработки данной темы. Кроме того, результаты работы являются важным вкладом в развитие фундаментальных представлений о патогенезе наследственных заболеваний сердца.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в его непосредственном участии в разработке и выполнении молекулярно-генетических исследований, биоинформатическом анализе результатов секвенирования, статистической обработке, ведении регистра биологических образцов пациентов, анализе и обобщении полученных данных, включая клинические данные, предоставленные профильными клиническими учреждениями, а также в подготовке статей, тезисов и докладов по теме исследования, личном представлении и обсуждении результатов работы на конференциях.

Конкретные рекомендации по использованию результатов работы и выводов диссертации

Результаты и выводы, полученные в ходе исследования, должны быть использованы при медико-генетическом консультировании семей с аритмогенной кардиомиопатией правого желудочка, при планировании и проведении ДНК-диагностики и интерпретации ее результатов у пациентов с этой патологией. Разработанные рекомендации могут быть внедрены в организациях и учреждениях, деятельность которых связана с генодиагностикой и медико-генетическим консультированием, особенно в области кардиогенетики, а также в научных учреждениях, занимающихся вопросами генетики заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Печатные работы, опубликованные по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы 76 научных работ, включая 23 статьи, из них 18 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, и 5 статей, индексируемых в базах данных Scopus и/или Web of Science, и 53 тезиса научной работы в материалах конференций.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

В целом, положения диссертации, выводы и практические рекомендации логично вытекают из полученных результатов и обоснованы достаточным количеством экспериментальных данных. Примененные методы статистической обработки данных и интерпретации результатов являются современными и корректными.

Оценка содержания диссертации, её завершённость в целом, замечания по оформлению

Диссертация изложена на 149 страницах печатного текста, состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материал и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов, практических рекомендаций, описания перспектив дальнейшей разработки темы, списка использованной литературы из 217 источников, 2 приложений. Структура диссертации логична и соответствует поставленным задачам. Диссертационная работа иллюстрирована 25 таблицами и 31 рисунком.

Обзор литературы дает представление об изучаемом наследственном заболевании, его этиологии, патогенезе, генетической гетерогенности, истории изучения, а также о применяемых подходах к диагностике и терапии. Интересным является раздел, посвященный генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний, хотя он не имеет прямого отношения к теме работы. Глава «Материал и методы» подробно описывает использованный материал и методы исследования. В главе «Результаты и обсуждение» приведены результаты анализа спектра выявленных редких генетических вариантов в десмосомных и не-десмосомных генах, идентифицированных мутаций, связанные с развитием заболевания. Оценена диагностическая эффективность проведенной ДНК-диагностики у пациентов с различными вариантами манифестации АКПЖ, и предложен оптимизированный протокол ДНК-диагностики заболевания для пациентов, учитывающий вариант ремоделирования миокарда.

В работе показано подробное обоснование отнесения выявленных генетических вариантов к тому или иному классу патогенности, что очень важно, поскольку алгоритмы оценки патогенности постоянно совершенствуются по мере разработки новых методов и накопления данных. Кроме того, представляет интерес указание индивидуальных сочетаний патогенных вариантов с вариантами неопределенного значения у пациентов с АКПЖ. Для нескольких вариантов было проанализировано возможное модифицирующее влияние на развитие фенотипа АКПЖ, что также нашло отражение в диссертации.

Интересные результаты получены при сравнении изменчивости «десмосомных» генов при двух формах кардиомиопатии: аритмогенной и дилатационной. Автором наглядно показаны различия в локализации патогенных и вероятно патогенных вариантов между этими двумя заболеваниями. К сожалению, этот сравнительный анализ не нашел отражения в поставленных задачах и сделанных выводах. Кроме того, было бы интересно привести данные о том, в каких именно генах были найдены варианты IV-V классов патогенности у тех 23% пробандов, которые в дополнение к АКПЖ имели картину «синдрома ДКМП» (8 человек).

Отдельно хочется отметить демонстрацию вклада явления «выпадения» аллеля при проведении ДНК-диагностики АКПЖ и оценку потенциального риска «выпадения» аллеля в мультипраймерных панелях генов. Показано, что этот фактор может заметно повлиять на эффективность генодиагностики, и его необходимо учитывать при разработке генных панелей и новых подходов к поиску генных вариантов при наследственных заболеваниях.

Выводы по полученным результатам (6 выводов) сформулированы четко, содержат констатацию выявленных фактов и формулировку общих закономерностей. С другой стороны, формулировка положений, выносимых на защиту, является не совсем аккуратной, так как в некоторых положениях опущены названия заболеваний, и это делает их не совсем понятными для стороннего читателя. На основе результатов исследования предложены возможные направления дальнейших исследований по этой тематике, а также даны практические рекомендации. Представленная работа является завершённым научным исследованием.

***Заключение о соответствии диссертации критериям,
установленным Положением о порядке присуждения учёных степеней***

Диссертационная работа Шестак А.Г. является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук Е.В. Заклязьминской, содержащей новые научные и практические данные по решению задач изучения полиморфизма генов, кодирующих основные десмосомные и не-десмосомные белки, и клинко-генетического полиморфизма аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка у российских пациентов, что имеет существенное значение для медицинской генетики и 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 №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., №650 от 29.05.2017г., № 1024 от 28.08.2011г., №1168 от 01.10.2018г.), предъявляемых к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук по

специальности 1.5.7. Генетика, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени.

Отзыв на диссертационную работу соискателя Шестак Анны Геннадьевны на тему: «Молекулярно-генетический полиморфизм аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка у российских больных» заслушан, обсужден и одобрен на заседании лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, протокол № 12 от 22.04.2022 г.

Руководитель лаборатории популяционной генетики
Научно-исследовательского института медицинской генетики
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»
д-р мед. наук (1.5.7. – генетика)
Назаренко Мария Сергеевна



Старший научный сотрудник лаборатории популяционной генетики
Научно-исследовательского института медицинской генетики
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»
канд. биол. наук (1.5.7. – генетика)
Голубенко Мария Владимировна



Подпись д-ра мед. наук М.С. Назаренко и
канд. биол. наук М.В. Голубенко удостоверяю
Ученый секретарь Федерального
государственного бюджетного научного учреждения
«Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»
кандидат биологических наук
Хитринская Ирина Юрьевна



634009, г. Томск, пер. Кооперативный, д.5.
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской
академии наук» (Томский НИМЦ).
Сайт организации: <http://www.tnimc.ru/>
e-mail: center@tnimc.ru
телефон: +7 (3822) 51-10-39