

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Рябцевой Аллы Алексеевны на диссертационную работу Винер Марианны Евгеньевны на тему: «Патофизиологическое обоснование применения таргетных методов лечения моногенных заболеваний сетчатки», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 14.01.07 – глазные болезни

Актуальность темы исследования

Представленная диссертационная работа посвящена изучению таких редко встречающихся и тяжелых заболеваний, как моногенные заболевания сетчатки, связанных с проблемой наследственности и имеющих схожие механизмы развития – повреждением одного из звеньев фототрансдукции, целостности клеток фоторецепторов или вспомогательных клеток. В основе моногенных заболеваний лежат мутации в одном гене. При отсутствии патогенетически направленного эффективного лечения прогрессирование заболеваний приводит к полной слепоте и тяжёлой инвалидности.

Моногенные заболевания сетчатки представляют собой группу порядка 300 разнородных по клиническим проявлениям изолированных или синдромальных заболеваний. Точных эпидемиологических данных встречаемости данной группы заболеваний в России нет. Частота встречаемости моногенных заболеваний сетчатки колеблется от 1:5000 (болезнь Штаргардта) до 1:100 000 (синдром Ашера, ахроматопсия). На сегодняшний день в широкой клинической практике частота встречаемости моногенных заболеваний сетчатки представлена в среднем 1:4000 человек.

Своевременная диагностика моногенных заболеваний сетчатки затруднена не только редкостью этой группы заболеваний, но и высокой стоимостью необходимого лабораторного молекулярно-генетического

анализа. Однако в последние годы наблюдается положительная тенденция в сторону более раннего выявления заболеваний.

Пигментный ретинит (ПР) является наиболее частой и разнородной формой моногенных заболеваний сетчатки и приводит к необратимому нарушению зрения и неизлечимой слепоте. Получение четкой картины относительно фенотипов, связанных с генетическими подтипами пигментного ретинита (ПР), является сложной задачей

Существующие в настоящее время методы лечения мало эффективны, направлены в основном на сохранение оставшихся зрительных функций, замедление прогрессирования, не имеют четкой нацеленности на устранение причины. Терапия нацелена в основном на сохранение оставшихся зрительных функций, замедление прогрессирования и включает в себя витаминотерапию, биодобавки, антиоксиданты и пигменты (микроэлементы, лютеин/зеаксантин), солнцезащитные очки и светофильтры. Важно своевременно лечить сопутствующие заболевания: макулярный отек, заднекапсулярную катаракту, применять сосудистые препараты (трентал, мексидол), ноотропные препараты и процедуры, повышающие кровоснабжение заднего отрезка глаза – реваскуляризирующую хирургию височных артерий. Среди патогенетически направленных эффективных методов лечения данной группы заболеваний на текущий момент одобрен один препарат, возмещающий функцию гена RPE65 при амаврозе Лебера.

Своевременная диагностика, в том числе дифференциальная диагностика моногенных заболеваний сетчатки затруднена редкостью этой группы заболеваний и высокой стоимостью необходимого лабораторного молекулярно-генетического анализа, однако в последние годы наблюдается положительная тенденция в сторону более раннего выявления заболеваний.

Таким образом, актуальность избранной диссертантом темы определяется важностью проведения эпидемиологических исследований тяжелой трудной диагностируемой и практически неподдающейся лечению

патологии сетчатки, перспективностью изучения спектра мутаций при моногенных заболеваниях сетчатки с описанием их отличий и особенностей для раннего выявления заболеваний, определения эффективности различных подходов к лечению на разных этапах развития моногенных заболеваний сетчатки.

Эти нерешенные вопросы и определили цель работы диссертанта Винаер М.Е. - исследовать корреляцию фенотипических проявлений и выявленного генотипа моногенных заболеваний сетчатки у российских пациентов для обоснования применения патогенетически ориентированной таргетной терапии и сравнения эффективности методов таргетного, стандартного лечения и лечения стволовыми клетками.

Цель сформулирована четко, полностью соответствует выбранной теме и 4 требованиям, предъявляемым к целям научного исследования – она конкретна, достижима, контролируема и входит в систему исследований ФГБОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а сформулированные 7 задач, обеспечивших реализацию цели по изучению спектра и патогенетической значимости мутаций в развитии моногенных заболеваний сетчатки, обоснованности и эффективности применения патогенетически направленного лечения заболевания, разработки критериев современной клинической дифференциальной диагностики моногенных заболеваний сетчатки.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Степень достоверности полученных результатов исследования определяется достаточным и репрезентативным объемом клинического материала (3514 пациентов, направленных на клиническое и генетическое обследование с 2012 до 2019 г.), постановкой корректной цели и задач

исследования, использованием современного сертифицированного офтальмологического оборудования. Все научные положения, выводы и практические рекомендации, представленные в диссертации, четко аргументированы и обоснованы, закономерно вытекают из основных научных положений, защищаемых автором. Научные положения диссертационной работы базируются на детальном анализе материала собственного исследования.

Достоверность методологической основы исследования подтверждается использованием современных офтальмологических клинико-инструментальных, молекулярно-генетических, электрофизиологических, лабораторных, биоинформатических подходов и технологий в оценке результатов. Степень обоснованности и достоверности научных выводов и положений не вызывают сомнений. Проведенный статистический анализ подтверждает достоверность полученных результатов. Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ SPSS Statistica 10.0. Непараметрические данные были проанализированы с помощью одно- и двухфакторного анализа ANOVA, критериев Мана Уитни, с повторными измерениями, где необходимо, и дальнейшим ретроспективным (post-hoc) анализом (LSD критерий Фишера). Морфометрические данные анализировали с помощью t-критерия Стьюдента.

Новизна исследования и полученных результатов диссертации.

Автором впервые собрана и унифицированно обследована по единому протоколу репрезентативная выборка российских пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки. Впервые применены адаптированные методы статистической обработки результатов динамического наблюдения пациентов при проведении лечения. Впервые изучен спектр мутаций, характерный для пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки, имеющими различные патофизиологические механизмы, описаны отличия и особенности. Выявлены 54 новые патогенные мутации, ранее не

описанные в мире, которые являются причинными в развитии моногенных заболеваний сетчатки. Моногенная патология сетчатки характеризуется генетическими дефектами, которые приводят к тяжелым прогрессирующим угасаниям зрительных функций, с неизбежной инвалидностью. Изменения затрагивают поля зрения, остроту зрения и цветоощущение.

Стандартная поддерживающая терапия не позволяет остановить прогрессирующее снижение зрения у этих пациентов. В группе таргетного лечения наблюдается стабильное повышение удовлетворенности пациентов качеством своего зрения и жизни в целом на 33% по результатам субъективных методов обследования по сравнению с группой стандартного лечения (снизилось на 15%). В группе лечения мезенхимальными стволовыми клетками субъективное состояние пациентов не меняется. Эффективность применяемого лечения в возрастной группе 0 – 18 лет в 5,8 раз выше, чем в возрастной группе 40 – 65 лет.

Впервые проведен компьютерный анализ взаимодействия звеньев интерактома сетчатки, проведена аналитическая подготовительная работа для создания и внедрения методов лечения при мутациях в генах факторов транскрипции (EYS, CRB1) и в структурных белках (RPE65, RPGR, NR2E3).

Значимость для науки и практики полученных результатов

Теоретическая значимость работы заключается в изучении клинического эффекта таргетных методов лечения с описанием механизма воздействия используемых препаратов и молекул у пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки, в сравнении с контрольной группой традиционного лечения и лечения стволовыми клетками. Впервые в России показано, что применение таргетного лечения кратно повышает эффективность сохранения и восстановления зрительных функций у пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки. Успешность таргетного метода лечения зависит от ранней правильной диагностики моногенных заболеваний сетчатки

Практическую значимость представляют данные о рациональных критериях дифференциальной диагностики для определения тактики лечения группы моногенных заболеваний сетчатки. При проведении молекулярно-генетического подтверждения диагноза важно детальное описание манифестации, течения заболевания, семейного анамнеза, а также описание наличия или отсутствия синдромальных проявлений в совокупности с назначаемым методом обследования

Представлены сведения об особенностях взаимосвязей между показателями объективных и субъективных методов оценки зрения, ориентации в пространстве и как следствия качества жизни пациентов.

Впервые в России реализован системный подход в наблюдении и лечении пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки. Собран и обработан большой объем аналитической информации, который лег в основу развития этой области в России.

Данные, полученные в диссертационном исследовании, представляют интерес для широкого круга специалистов: физиологов, патофизиологов, офтальмологов, генетиков и могут быть рекомендованы для использования в работе научно-исследовательских центров и лабораторий, занимающихся проблемой офтальмогенетики. Полученные автором результаты существенно расширяют представления о патогенезе моногенных заболеваний сетчатки, могут использоваться в педагогической деятельности теоретических и клинических кафедр медицинских ВУЗов.

Структура и объем работы

Диссертационная работа Винер М.Е. построена традиционно, изложена на 277 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, семи глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы,

содержащего 370 источников (27 отечественных и 342 иностранных). Работа иллюстрирована 44 таблицами, 78 рисунками.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цель и задачи исследования, излагает данные, свидетельствующие о научной новизне и практической значимости работы, приводит положения, выносимые на защиту, а также данные об апробации работы.

В литературном обзоре представлены современные данные о видах, распространенности и осложнениях моногенных заболеваний сетчатки, а также подходы к их диагностике и дифференциальной диагностике, наряду с систематизированным описанием методов существующего лечения и направлений исследования в этой области. Сделан акцент на роли своевременного диагностирования и начала лечения как залого успеха в сохранении зрения и избегании инвалидности. Подробно описаны многочисленные методы оценки зрительных функций, когда отслеживаемые изменения зрения требуют более точных критериев. Представлены интересные сведения о развитии области индуцированных плюрипотентных стволовых клеток как возможной альтернативе животным моделям с кратным повышением точности проводимых исследований. Проведенный анализ отечественных и зарубежных литературных источников явился логической базой для проведения собственного исследования и критической интерпретации его результатов.

В главе «Объекты и методы исследования» автором обоснован выбор объектов и методов исследования для изучения изменений зрительных функций до и после таргетного и стандартного лечения моногенных заболеваний сетчатки, подробно описаны методические подходы *in vivo* и *in vitro* и методы статистического анализа, использованные в работе.

В главе «Диагностика и разделение на группы» обоснована стратификация пациентов для сравнения результатов лечения.

В главе «Результаты стандартного лечения пациентов» представлены результаты сравнительной оценки функционального состояния сетчатки,

анатомической структуры сетчатки, субъективных результаты лечения по оценке самих пациентов и системные эффекты от лечения. С использованием корреляционного анализа продемонстрирована важная роль многофакторного анализа полученных результатов лечения вследствие генной терапии. Проведено статистическое сравнение частоты кистозного макулярного отека у пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки как одного из наиболее частых и неприятных осложнений и методы его лечения в сравнении в разных группах пациентов. Также уделено должное внимание анализу побочных эффектов и осложнений лечения и обсуждению в отдельной главе возможного плейотропного эффекта генотерапевтических препаратов, когда воздействие таргетным геном на одно из звеньев фототрансдукции можно добиться активации или ингибирования другого звена, что может иметь положительный эффект у пациентов с другими формами дистрофий сетчатки. Сделан акцент на то, что разные типы заболевания характеризуются разными типами наследования и требуют особых методов лечения. Это применение антисмысловых олигонуклеотидов и системы CRISPR-Cas при доминантных формах, а также заместительной генной терапии с применением аденоассоциированных вирусных векторов в качестве метода доставки необходимой последовательности ДНК в клетки при рецессивных формах заболеваний. Кроме того, важную роль автор уделяет подробному анализу группы пациентов с моногенными дистрофиями сетчатки, причиной которых является патология в сигнальных белках или транскрипционных факторах в отличие от патологии структурных белков, так как требуются различные подходы к лечению этих типов заболеваний.

В заключительном разделе диссертационной работы автором проведено обобщение результатов исследования, их обсуждение с дополнительной дискуссией некоторых положений, подчеркивающих обоснованность сформулированных выводов. Этот раздел написан лаконично, с привлечением литературных данных при обсуждении собственных результатов и свидетельствует о высокой профессиональной эрудиции диссертанта.

Результаты диссертационного исследования сформулированы в 7 выводах, которые полностью соответствуют цели и задачам исследования и в полной мере соответствуют полученным результатам.

Автореферат полностью отражает все разделы и положения диссертации, резюмирует полученные результаты.

Автор имеет 27 опубликованных работ по теме диссертации, из которых 13 – в научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации основных результатов диссертации, 9 в зарубежных журналах. Основные положения диссертации представлены на международных научно-практических конференциях, конгрессах ARVO (США, 2020), ESHG (Берлин, 2020), на семинаре по офтальмогенетике в лаборатории F. Cremers в Nijmegen (Нидерланды, декабрь 2019), на конференции «Пожилой больной качество жизни» (Москва, 2019 г.), в докладе на Федоровских чтениях (Москва, 2018 г.), на конференции на съезде генетиков MGNGS (Суздаль, 2018, 2019), на съезде Британского общества генной и клеточной терапии (BSGCT, Лондон, 2018), на встрече CRISPR (США, CSHL 2018 г), на конференции по молекулярной офтальмологии (Москва, октябрь 2018 г.).

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат написан в классическом стиле на 50 страницах машинописного текста, содержит 15 рисунков и 2 таблицы. В нем отражены основные направления научного изыскания, методы исследования, научная новизна и практическая значимость работы, приведены основные научные положения, выводы и практические рекомендации. Представленное в автореферате описание результатов проведенного исследования отражают суть диссертационной работы. Автореферат полностью соответствует требованиям к оформлению, предъявляемых ВАК.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний по выполненной диссертационной работе нет. Работа включила уникальные результаты комплексного обследования с использованием современных диагностических методик, лечения, мониторинга и сравнительного анализа результатов у пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки. При ознакомлении с диссертационной работой возникли следующие замечания: результаты, представленные М.Е. Винер в диссертации, разнородны и с трудом поддаются сравнению, в связи с этим количество уточняющих методик оценки зрительных функций и статистическая их обработка занимают значительный объем диссертации. Не во всех таблицах представлены такие характеристики как численность групп наблюдения, количество гистологических исследований. Под рубрикой методов оценки зрительных функций объединены методы исследования стереометрических характеристик. Описания методик повторяются.

Это можно отчасти оправдать масштабом поднимаемой проблемы и попыткой систематизировать разнородные полученные результаты, что позволяет принять подход, примененный автором в связи с отсутствием на данный момент более оптимального варианта изложения материала.

Прошу автора ответить на вопросы:

1. Какой подход к дифференциальной диагностике заболеваний сетчатки Вы использовали в качестве основы для разработки своего алгоритма? Каким образом представлен Ваш алгоритм диагностики для практикующих врачей-офтальмологов и в чем его ценность?
2. Вы пишете, что повышение внутриглазного давления было зафиксировано у 32 пациентов. Можете подробнее рассказать, какие действия были выполнены, какова терапевтическая тактика и каково состояние зрительных функций и показателей ВГД у этих пациентов сейчас (в конце срока наблюдения)?
3. Каков будет стандартный клинический алгоритм оценки состояния зрительных функций у пациентов после генотерапевтического лечения

заболеваний сетчатки в будущем? Как практикующий врач-офтальмолог в рутинной практике сможет оценивать эффективность терапии, а также необходимость повторного курса лечения или поддерживающей терапии (медицинского вмешательства)?

4. Животрепещущий вопрос: плеiotропный эффект. Как вы прогнозируете перекрестную эффективность препаратов? В Вашем рис. 76 диссертации проведен теоретический анализ плеiotропного эффекта. Насколько возможно будет согласовать с регулятором в нашей стране перекрестное применение препаратов с учётом того, что регуляторные документы допускают применение препаратов, прошедших только все фазы клинических исследований, проверку токсичности, биораспределения и эффективности, а размеры групп пациентов в ближайшие годы не хватит на проведение таких исследований и подготовка требуемого регулятором объема документов может занять десятилетия и быть очень дорогостоящей?

Следует отметить, что указанные вопросы не снижают научной и практической значимости рецензируемой работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Винер Марианны Евгеньевны на тему: «Патофизиологическое обоснование применения таргетных методов лечения моногенных заболеваний сетчатки» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение научной проблемы – оптимизация диагностики и лечения моногенных заболеваний сетчатки, что имеет важное научно-практическое значение для патологической физиологии и офтальмологии. По своей актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация Винер Марианны Евгеньевны на

