

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора кафедры госпитальной педиатрии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора медицинских наук, Волгиной Светланы Яковлевны на диссертационную работу Мазановой Натальи Николаевны «Оптимизация алгоритма молекулярной диагностики болезни Фабри в Российской Федерации», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Актуальность темы диссертационной работы Н.Н. Мазановой не вызывает сомнения и определяется важностью проведения ранней диагностики, возможностью мониторинга эффективности лечения болезни Фабри, которая является редким прогрессирующим X-сцепленным наследственным заболеванием, вызванным мутациями в гене α -галактозидазы, характеризующимся дефицитом или потерей функциональной активности лизосомального фермента α -галактозидазы А, приводящим к накоплению глоботриаозилцерамида, глоботриаозилсфингозина (Lyso-Gb3) и проявляющимся мультисистемными поражениями органов с неоднородными клиническими характеристиками, которые существенно влияют на качество и продолжительность жизни пациента.

Диссертация Н.Н. Мазановой написана по общему плану, логична построена, изложена на 135 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы, посвященной результатам и обсуждению собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы, содержащего 147 источников (13 публикаций отечественных и 134 публикаций иностранных авторов). Диссертационная работа аккуратно оформлена и хорошо иллюстрирована, содержит 20 таблиц и 30 рисунков.

Первая глава посвящена обзору литературы, включающему анализ существующих в мировой науке представлений об эпидемиологии, этиологии и патогенезе болезни Фабри. Уделяется внимание клиническим особенностям течения болезни. Представлена информация о диагностических критериях, включающих биохимические (определение активности фермента α -галактозидазы А и концентрации глоботриаозилсфингозина), молекулярно-генетические методы исследования. Автор останавливается на вопросах

пренатальной и преимплантационной диагностики, неонатального и селективного скрининга. Рассмотрены общие принципы лечения болезни Фабри, а также генотип-фенотипические связи. Обзор достаточно подробен, информативен, содержит заключение, где подчеркивается, что вопросы оптимизации диагностического алгоритма у мужчин и женщин при классической и атипичной формах болезни Фабри остаются открытыми и недостаточно изученными.

Вторая глава – материалы и методы, отражает дизайн исследования (6 основных этапов), включая описание групп для проведения селективного скрининга болезни Фабри и характеристику методов биохимического и молекулярно-генетического исследований, обработку данных с использованием современных методов статистического анализа. Селективный скрининг проводился на основании 12 256 образцов крови пациентов 8 федеральных округов Российской Федерации, из которых 10 300 образцов были направлены для исключения классической формы болезни Фабри, а биоматериал 1 956 пациентов поступал в рамках программы скрининга на атипичную форму болезни Фабри, проявляющуюся гипертрофической кардиомиопатией. Также в главе подробно описан метод тандемной масс-спектрометрии для определения активности фермента α -галактозидазы А и концентрации глоботриаозилсфингозина, методика выделения ДНК из сухих пятен крови и выявление патогенных вариантов гена *GLA* методом секвенирования по Сэнгеру.

В третьей главе представлены результаты собственных исследований. Автор дает характеристику групп пациентов с болезнью Фабри, выявленных в результате селективного скрининга, а также пациентов группы сравнения. В работе показано, что на основе селективного скрининга обобщенная оценка выявляемости заболевания составляла 0,29% (в том числе 0,27% среди неродственных пациентов с классической формой болезни Фабри и 0,41% – с атипичной формой). Также дана характеристика этого показателя по Федеральным округам России.

Исследовалась концентрация глоботриаозилсфингозина и активность фермента α -галактозидазы А в сухих пятнах крови в группе пациентов, как у мужчин, так и женщин с классической формой болезни с определением референсных значений. В работе показано, что оценка концентрации глоботриаозилсфингозина, чувствительность и специфичность которого составляла 100%, может являться тестом первого уровня для диагностики классической формы болезни Фабри у пробандов обоих полов из группы высокого риска.

В результате проведения молекулярно-генетического исследования было идентифицировано 33 различных каузальных вариантов гена *GLA* у 28 пробандов с классической и 8 - с атипичной формой болезни Фабри, 70% из которых оказались локализованными в 5, 6 и 7 экзонах гена. Установлено, что 12 нуклеотидных вариантов ранее не были аннотированы в международной базе HGMD (6 вариантов представлены различными уникальными миссенс мутациями, 1 – нонсенс мутацией, 4 – небольшими делециями и 1 вариант – дупликацией, приводящей к потере стоп-кодона).

Следует отметить, что автором проводился селективный скрининг 1956 пациентов, имеющих гипертрофическую кардиомиопатию, с подозрением на атипичную форму болезни Фабри. Для этого с участием Н.Н. Мазановой, была разработана специальная диагностическая панель, включающая ген *GLA*. По данным биоинформатического анализа были выявлены 12 (0,6%) пациентов в возрасте $60,4 \pm 9,2$ лет с каузальными генетическими вариантами в гене *GLA*, в том числе 5 случаев, не описанных в базе HGMD. В группе представленных пациентов были пересмотрены референсные значения концентрации глоботриаозилсфингозина – 2,02 нг/мл.

В результате проведенного селективного скрининга 10 300 пациентов с подозрением на классическую форму болезни Фабри выявлено 28 человек 10 (35,7%) из которых оказались единственными заболевшими в родословной. Доля семейных случаев болезни Фабри в настоящем исследовании составляла 64,3% (52 человека). Были представлены молекулярные характеристики патогенных вариантов гена *GLA* и количество больных в каждой из 18 родословных. В диссертационном исследовании автор подробно описал клинические проявления болезни у лиц мужского (с дебютом в первом десятилетии жизни) и женского пола, а также клинические проявления болезни у пациентов, чьи мутации ранее не установлены и не отражены в базе HGMD. Было показано, что биомаркер глоботриаозилсфингозин может быть использован в качестве критерия контроля эффективности проведения ферментозаместительной терапии у пациентов с болезнью Фабри.

В результате анализа взаимосвязей специфичности генотипа с тяжестью клинических проявлений, различий между уровнем биомаркера глоботриаозилсфингозина, типом патогенных вариантов гена *GLA* и наличием у пациентов хронической почечной недостаточности, а также ее сочетание с инсультом не выявлено.

В работе блестяще описан семейный случай с предоставлением родословной и подробным описанием помимо пробанда еще 6 родственников, имеющих клинические проявления болезни. Следует подчеркнуть, что в заключении исследования Н.Н. Мазанова

усовершенствовала алгоритм комплексной лабораторной диагностики классической и атипичной формы болезни Фабри с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования.

Глава хорошо иллюстрирована графиками и таблицами. Статистическая обработка результатов проведена на высоком современном уровне, подтверждая достоверность сделанных выводов.

В конце диссертационной работы представлено заключение. Обозначенная цель работы сформулирована четко, из которой логично вытекает круг поставленных задач. Представленные выводы отражают общую концепцию работы, соответствуют сути проведенных исследований и не расходятся с содержанием глав диссертации. Практические рекомендации указаны адресно для врачей генетиков и клиницистов.

Достоверность и новизна результатов диссертации

Высокая степень достоверности результатов диссертации подтверждается значительным числом проведенных исследований на репрезентативной выборке российских пациентов с подозрением на болезнь Фабри, определением дизайна исследования, соответствующего поставленной цели и сформулированным задачам. Результаты, полученные в работе, основаны на применении современных высокотехнологичных методов исследования и доказаны проведением статистической обработки и получением достоверных данных. Сформулированные выводы подкреплены полученными и рассчитанными экспериментальными данными, которые наглядно представлены в виде рисунков и таблиц.

В диссертационном исследовании впервые осуществлен комплексный подход к диагностике болезни Фабри с использованием новейших высокотехнологичных скрининговых методов исследования. На основании полученных результатов доказано и научно обосновано использование биомаркера первого порядка диагностики глоботриаозилсфингозина как у мужчин, так и у женщин с подозрением на классическую форму болезни Фабри. Критерием контроля эффективности применения ферментозаместительной терапии препаратами агалсидаза альфа и агалсидаза бета может служить снижение концентрации глоботриаозолсфингозина у пациентов с болезнью Фабри. В работе скорректирован алгоритм диагностики болезни Фабри с классической формой. Впервые предложен алгоритм диагностики атипичной формы болезни Фабри.

Среди всех идентифицированных каузальных вариантов в гене *GLA* были выявлены 12 новых мутаций, не представленных ранее в базе данных Human Genome

Mutation Database, с описанием клинических особенностей течения болезни у этих пациентов.

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

Положения, сформулированные в диссертации Натальи Николаевны Мазановой, обоснованы представленным дизайном исследования с использованием современных биохимических, молекулярно-генетических методов, а также статистических методов анализа полученных данных. Положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации, обоснованы и полностью подтверждаются полученными результатами исследования.

Ценность для науки и практики результатов работы

В результате исследования получены новые данные. Разработанные алгоритмы комплексной лабораторной диагностики классической и атипичной формы болезни Фабри показали высокую эффективность при проведении селективного скрининга пациентов из группы высокого риска, что позволило оптимизировать диагностику пациентов с подозрением на болезнь Фабри. Проведенное исследование представило возможность использования глоботриаозилсфингозина в качестве первичного биомаркера для ранней диагностики классической формы болезни Фабри у пробандов обоих полов. Выявлены и описаны типы каузальных вариантов у российских пациентов с классической и атипичной формой болезни, включая новые патогенные варианты гена *GLA*, ранее не описанные в международной базе HGMD.

Полученные данные применяются в клинической практике при оказании медицинской помощи пациентам с подозрением на болезнь Фабри. Предложенные методы исследования внедрены в лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии, а также в работе Консультативно-диагностического центра ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Результаты научной работы используются в учебном процессе кафедры медицинской генетики ФГБОУ ДПО РМАНПО Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Подтверждения опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты диссертации изложены в научной печати. По теме и материалам диссертации представлено 6 научных работ, в том числе 2 статьи опубликованы в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК Министерства

науки и высшего образования Российской Федерации, 3 статьи напечатаны в иностранных журналах для соискателей ученой степени кандидата или доктора медицинских наук, входящих в базу данных Scopus и Web of Science.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат соответствует содержанию диссертации, полностью отображает её основные положения. Диссертация и автореферат написана хорошим литературным языком.

Замечания по работе

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Хотя в научной работе встречаются досадные грамматические ошибки и опечатки. Диссертационное исследование соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней.

В ходе оппонирования диссертации возникли следующие вопросы.

1. У ряда пациентов с гипертрофической кардиомиопатией с нормальными уровнями биомаркера глоботриаозилсфингозина и нормальной активностью фермента α -галактозидазы А в ходе Вашего исследования были выявлены различные изменения референсной последовательности гена *GLA*. Может ли у них манифестировать заболевание в будущем?

2. Чем объяснить, что при применении ферментозаместительной терапии уровень глоботриаозилсфингозина у пациентов с классической формой болезни Фабри остается выше нормы?

Заключение

Диссертационное работа Н.Н. Мазановой «Оптимизация алгоритма молекулярной диагностики болезни Фабри в Российской Федерации», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, выполненная под руководством научного руководителя доктора медицинских наук, профессора Алия Юрьевича Асанова и научного консультанта доктора биологических наук Кирилла Викторовича Савостьянова, является законченной научно-квалифицированной работой, совокупность положений которой содержит решение одной из актуальных проблем генетики – усовершенствование

эффективности проведения ферментозаместительной терапии у пациентов с болезнью Фабри, имеющей важное значение для науки и практики. По актуальности темы, новизне, практической значимости, достоверности полученных результатов и полноте изложения материалов в работе и научных публикациях диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, согласно п.2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», утвержденного Ученым советом РУДН протокол № УС-1 от 22.01.2024г., а её автор, Мазанова Наталья Николаевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки).

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук, профессор кафедры
госпитальной педиатрии Федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Казанский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
20.01.2025



С.Я. Волгина

Учреждение: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России)

Адрес: 420012, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Булдерова 49;
Тел. +7(843) 236-69-02, e-адрес: science.sec@kazanpmi.ru



Подпись Волгиной Светланы Яковлевны (ЗАВЕРЯЮ)
Ученый секретарь Ученого Совета
ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ»
Минздрава России, профессор Мустафин Ильшат Ганиевич

