

ОТЗЫВ

официального оппонента – доктора биологических наук, профессора РАН, член-корреспондента РАН, заведующего лабораторией ДНК-диагностики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» **Полякова Александра Владимировича** на диссертацию Чернецкой Дарьи Михайловны по теме: «**Молекулярно-генетическая диагностика болезни Виллебранда**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови.

Актуальность темы диссертации

Изучение наследственных заболеваний крови актуально для оптимизации диагностики, совершенствовании знаний о пути наследования заболевания. Одной из наследственных коагулопатий является болезнь Виллебранда (БВ).

БВ наследуется аутосомно и проявляется у обоих полов. Ген *VWF* кодирует фактор Виллебранда (vWF), нарушения структуры или концентрации в крови которого обуславливают кровотечения при БВ.

Снижение концентрации фактора Виллебранда относят к БВ типа 1, полное отсутствие фактора, то есть наиболее тяжелую форму заболевания – к типу 3 БВ. Выделяют 4 качественных нарушения vWF, из которых наиболее актуально выявление типов 2В, вызывающего повышенное сродство vWF к тромбоцитам, и, как следствие, не свойственную другим типам БВ склонность к тромбозам, а также типа 2N БВ, приводящего к снижению способности vWF связываться с фактором VIII, а, следовательно, снижению способности vWF защищать фактор VIII от распада, что приводит к симптомам, схожим с проявлениями гемофилии А.

Типы 2В и 2N отличаются от других типов тем, что могут быть приняты за другую коагулопатию. Для правильного выбора терапии важно установить дифференциальный диагноз с точностью до типа заболевания. Однозначно установить тип БВ позволяет анализ гена *VWF* в случае, если найденные

нарушения описаны в литературе как ассоциированные с конкретным типом БВ. Ген *VWF* хорошо изучен и его мутации широко представлены в международных базах данных. Тем не менее уже описанные нарушения часто требуют дополнительного изучения, равно как и новые варианты гена продолжают описываться в мировой популяции.

Таким образом, данная работа актуальна тем, что на основании полученных данных, разработан алгоритм анализа гена *VWF*, позволяющий верифицировать диагнозы пациентов, от которых зависит выбор терапии. На основании полученных для пациентов результатов провести исследование для родственников пациентов, а также пренатальное консультирование и при необходимости пренатальную диагностику.

Научная новизна

В работе Чернецкой Дарьи Михайловны впервые проведена оценка распределения патогенных вариантов гена *VWF*, характерного для российской популяции. Показана высокая гетерогенность полученного мутационного спектра. Выявлено 37 разных вариантов гена *VWF*, 11 из которых ранее в мировой популяции не встречались. Показано, что микроделеция с.2435delC, являющаяся мажорной для ряда европейских популяций, преобладает и в отечественной популяции (25%).

Новые варианты гена *VWF* вместе с оценкой их патогенности с использованием предсказательных пополнили мировые данные.

Полученные в ходе анализа гена *VWF* патогенные варианты сопоставлены с коагулологическими данными по каждому пациенту, что позволило расширить и уточнить клинический диагноз и понимание клинической картины для каждого пациента в отдельности.

Ценность для науки и практики

Результаты, полученные автором в ходе исследований, дают представление о спектре мутаций в российской выборке пациентов с БВ или подозрением на

БВ. Новые варианты гена *VWF* и интерпретация их патогенности пополнили мировые представления об изменчивости гена *VWF*. Полученные в результате работы данные расширяют знания о соотношении генотипа и фенотипа при БВ. Практическая значимость исследования состоит в разработке и внедрении алгоритма молекулярно-генетической диагностики БВ и ее типов в рутинную практику. Данная работа позволяет скорректировать планирование экспериментов и клинических исследований БВ. Уточнены диагнозы пациентов, вошедших в эту работу. Проверено наличие патогенных вариантов гена *VWF* у родственников пациентов.

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

Степень обоснованности полученных результатов, сделанных на их основе выводов и практических рекомендаций не вызывает сомнений. В частности, в работе показана важность молекулярно-генетической диагностика БВ и типов БВ как для выбора терапии, так и для планирования семьи пациентами. Кроме того, в работе показано, что для БВ тип заболевания зачастую устанавливается не по клиническим, а по молекулярным данным.

Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 2 статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией Российской Федерации, 1 статья зарубежной печати, журнал индексируется в реферативных базах Scopus и Web of Science.

Структура и оценка содержания диссертационной работы

Диссертация изложена на 111 страницах, содержит 12 рисунков и 20 таблиц, включает главы «введение», «обзор литературы», «материалы и методы»,

«Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации», «Список сокращений», «Приложения А-Г». Библиографический указатель содержит 189 литературных источников, среди которых 11 на русском языке.

Во введении автор представляет актуальность проблемы, а также четко обосновывает цель и задачи работы, научную новизну и положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы включает зарубежные и отечественные публикации, посвященные механизму развития болезни Виллебранда (БВ) и ее типов, а также роль молекулярно-генетических методов в диагностике БВ. Обзор литературы полностью отражает современное представление изучаемой проблемы, глава написана грамотно, интересно и свидетельствует о серьезном анализе и знании диссертантом самой современной научной литературы по данной тематике. Подробно описаны различные типы БВ, их типы наследования и механизмы развития каждого типа с указанием характерных для него мутаций. Считаю, что данный подраздел заслуживает публикации в виде отдельного методического пособия.

В главе «Материалы и методы» подробно представлен дизайн исследования, критерии включения пациентов в исследование. Отдельного внимания заслуживает детальное описание этапности лабораторной части исследования.

В главе «Результаты и обсуждение» автор представляет результаты собственного исследования и обсуждение в контексте мировых данных. Глава содержит 14 подглав, в которых описывается полученный спектр мутаций, новые не описанные ранее в литературе варианты гена *VWF*, результаты и их интерпретация по каждому типу БВ, результаты анализа родственников пациентов, разработанный алгоритм анализа гена *VWF* методом Сэнгера, сопоставление клинического диагноза и результатов молекулярно-генетического анализа, случаи генной конверсии, ограничения методов.

Раздел «Результаты и обсуждение» диссертационной работы следует отметить особо. Не только полнота изложения, но его корректность выше всяких похвал. Так в работе для каждой из вновь выявленных мутаций проведена корректная оценка их патогенности с приведением соответствующих критериев. Для каждого пациента проведена оценка соответствия его клинической картины установленному генотипу.

В заключении автор приводит наиболее важные результаты научной работы. Заключение и выводы, представленные в работе, соответствуют целям и задачам диссертации, полностью отражают ключевые результаты проведенного исследования.

Практические рекомендации отражают роль анализа гена *VWF* методом Сэнгера в алгоритме анализа БВ и ее типах.

Обоснованность положений диссертации

Результаты работы воспроизводимы благодаря подробно изложенной методике. Оценка результатов проведена в сравнении с данными из зарубежных источников. Достоверность и обоснованность выводов, представленных в диссертационной работе Чернецкой Дарьи Михайловны, не вызывает сомнений. Содержание автореферата отражает основные положения диссертации.

Недостатки по содержанию и оформлению работы

Работа написана и изложена очень аккуратно. Рисунки и таблицы информативны и понятны. Работу приятно читать. Однако, имеются и незначительные замечания и вопросы по содержанию работы. Так, в тексте не раз указывается, что ген *VWF* состоит из 52 экзонов, однако на рис. 1 отражены только экзоны со 2-го по 50-й.

На стр. 30 имеется странное утверждение о том, что поскольку тип 2N наследуется рецессивно, нет смысла отбирать эмбрионы по гену *VWF*. А если

речь идет о последующих рождениях в данной семье, то есть о сестрах и братьях больного? Данное положение требует объяснения.

В работе не раз показано и повторено, что наиболее часто мутации встречаются в экзонах 18 – 28 гена *VWF*, однако нигде в тексте не определена информативность исследования этих экзонов, или доля мутантных аллелей в них.

Остается непонятным, почему автор в алгоритме предлагает использовать секвенирование по Сенгеру, а не NGS панель, в которую можно было бы включить и гены других коагулопатий, их не так много, что позволило бы сразу закрыть вопрос с дифференциальной диагностикой заболевания. А на цену панельного исследования включение дополнительных генов практически не повлияло бы.

Вместе с тем, стоит отметить, что автор очень хорошо понимает ограничения проведенного исследования, связанные с размером выборки и не использованием метода поиска делеций и дупликаций на основе количественного MLPA анализа.

Сделанные замечания не являются принципиальными и не влияют на актуальность, практическую значимость и выводы, сделанные в ходе работы.

Заключение

Вышеизложенное позволяет сделать вывод о том, что диссертационная работа Чернецкой Дарьи Михайловны на тему: «Молекулярно-генетическая диагностика болезни Виллебранда», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельным, законченным научно-квалификационным трудом, в котором проанализирован ген *VWF* молекулярно-генетическими методами у пациентов с подозрением на болезнь Виллебранда, получен спектр мутаций для российской выборки пациентов, предложен алгоритм анализа гена *VWF* в зависимости от направляющего диагноза и доступных коагулологических данных пациента.

По своей актуальности, уровню и объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости представленная диссертационная работа Чернецкой Д.М., выполненная под научным руководством Надежды Ивановны Зозули, полностью соответствует требованиям п.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842 (с изменениями и дополнениями в редакции от 18 марта 2023 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.28. – Гематология и переливание крови.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией ДНК-диагностики
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Медико-генетический научный центр
имени академика Н.П. Бочкова»,
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН,

Поляков Александр Владимирович

29 ноября 2023 г.

Подпись члена-корреспондента РАН, доктора биологических наук Полякова Александра Владимировича заверяю.

Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Медико-генетический
научный центр имени академика Н.П. Бочкова»,
кандидат медицинских наук,



Воронина Екатерина Сергеевна

29 ноября 2023 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1

Телефон: +7(499)612-86-07

Факс: +7 (499)324-07-02

Адрес сайта: med-gen.ru