

ОТЗЫВ

**официального оппонента,
доктора биологических наук Пчелиной Софьи Николаевны
на диссертационную работу Савельевой Ольги Николаевны на тему
«Исследование молекулярно-генетических основ индивидуальной
чувствительности к терапии бронхиальной астмы»,
представленную к защите на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика
(биологические науки)**

Актуальность темы исследования

В настоящее время остаются предметами дискуссий и требуют изучения патогенетические механизмы развития и неконтролируемого течения бронхиальной астмы (БА). Число больных БА в мире составляет около 300 миллионов человек, что делает крайне важным поиск новых диагностических маркеров риска развития и тяжелого течения заболевания. Особое внимание заслуживает проблема вариабельности ответа пациентов с БА к лечению даже на фоне адекватной базисной терапии, которая в значительной мере определяется влиянием наследственности. Следует отметить, что проведенные фармакогенетические исследования БА, в том числе с использованием метода полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) позволили выявить значительный ряд аллельных вариантов генов, ассоциированных с эффективностью лечения БА у пациентов. Полученные к настоящему моменту данные свидетельствуют о вовлечении в патогенез БА различных эпигенетических механизмов – метилирования ДНК, модификации гистонов, микроРНК. Вопрос о влиянии на данные эпигенетические механизмы применяемого лечения заболевания также остается открытым.

Многообещающим инструментом для современной персонализированной медицины также представляется применение прогностических моделей полигенного риска, или шкал генетического риска (ШГР), объединяющих полиморфные локусы с учетом силы связи каждого из них с заболеванием. ШГР модели могут оказаться более эффективными для прогноза индивидуального риска развития заболевания и формирования его отдельных клинических фенотипов, чем оценка вклада в риск заболевания отдельных локусов.

Таким образом, актуальность темы диссертационной работы Савельевой О.Н., посвященной исследованию молекулярно-генетических основ развития БА и в индивидуальной чувствительности пациентов к терапии БА не вызывает сомнений, подобного исследования в этнически разнородных группах из Республики Башкортостан ранее не проводилось.

Научная новизна исследования

Савельевой О.Н. впервые представлены результаты генетического и эпигенетического исследования генов, участвующих в метаболизме основных групп лекарственных препаратов, используемых для лечения БА, или ассоциированных с противоастматической терапией по данным GWAS у индивидов из РБ. В частности, установлены маркеры риска развития и особенностей клинического течения БА у индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности, при мета-анализе выявлены общие маркеры риска развития заболевания. При анализе вариабельности количественных показателей спирографии у пациентов с БА в зависимости от генотипов полиморфных локусов впервые выявлены значительные различия между группами больных БА татарской и башкирской этнической принадлежности из РБ по ряду исследованных полиморфных вариантов. Получены новые данные, свидетельствующие о значительном различии уровней метилирования промоторных областей генов *HRH1*, *AOC1* и *GLCC11* в периферической крови между больными БА и контрольной группой индивидов из РБ. Кроме этого, соискателем впервые сконструированы модели полигенного риска развития и тяжелого течения БА для индивидов различной этнической принадлежности (русской, татарской, башкирской и смешанной).

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования

Теоретическая и научно-практическая значимость работы заключается в том, что использование полученных результатов может быть перспективным при создании диагностических и прогностических панелей молекулярных маркеров развития и тяжелого течения БА, а также для использования в программах обучения специалистов биологического и медицинского направлений.

Хочется отметить, что в современный век геномных исследований оценка вклада генетической составляющей в развитие полигенных заболеваний возможна лишь при разработке методов, позволяющих оценить вклад сочетания аллелей, а не единичного варианта. К этим современным методам анализа относится конструирование шкалы генетического риска (ШГР) для полигенных заболеваний, которые также могут включать и традиционные факторы риска, такие как пол, возраст, наличие курения. Данная работа одна из первых в стране, использующая различные модели построения ШГР, что представляет однозначную ценность для комплексной оценки вклада генетической составляющей в риск развития полигенного заболевания, в данном случае БА. Хотя, следует отметить. Что максимальный

риск развития БА для сконструированных ШГР в основном не превысил значения 2 (риск развития БА, например, у татар равен 2.15), в настоящее время данный метод является единственным, позволяющим учесть сочетанное влияние аллелей различных локусов риска. Это сильная сторона работы.

Сконструированные ШГР можно использовать для оценки прогностического потенциала риска развития и тяжелого течения БА у индивидов из РБ различной этнической принадлежности.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Проведенное исследование выполнено на высоком и адекватном поставленным задачам методическом уровне с использованием современных молекулярно-генетических, статистических и биоинформатических методов и подходов. Высокая степень достоверности и обоснованности выводов, а также полученных научных результатов также обусловлена достаточным объемом выборки исследования, включающей 1065 больных БА и индивидов контрольной группы русской, татарской, башкирской и смешанной этнической принадлежности.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Савельевой О.Н. изложена на 320 страницах машинописного текста и построена по традиционному плану: состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения и выводов, иллюстрирована 71 рисунком и 61 таблицей. Список литературы содержит 345 источников, в том числе 277 работ зарубежных и 68 работ отечественных авторов. Количество работ последних 5 лет составляет более 50%.

Во введении автором обоснована актуальность и научная новизна проблемы, сформулированы цели, задачи, отражена научно-практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту. Поставленные задачи соответствуют основной цели диссертационного исследования.

Обзор литературы составлен достаточно подробно, логично и дает представление о современных направлениях генетических, фармакогенетических и эпигенетических исследований БА. Кроме того, данная глава содержит нескольких разделов, посвященных описанию эпидемиологии, патогенеза, классификации БА и особенностей современной терапии заболевания. Следует отметить достаточное количество иллюстративного материала, представленного в виде схем патогенеза заболевания, этапов метаболизма основных групп лекарственных препаратов, используемых для лечения БА и этапов проведения анализа полигенного

риска. В целом, содержание главы изложено последовательно, ясно и грамотно, приведено полное обоснование необходимости проведения исследования.

В главе «Материалы и методы» отмечается, что в качестве материала исследования использована репрезентативная выборка, включающая 561 больного БА и 504 индивидов контрольной группы русской, татарской, башкирской и смешанной этнической принадлежности из РБ. Автором применяются такие методы как выделение геномной ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции, полимеразная цепная реакция синтеза ДНК (ПЦР), анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), ПЦР в режиме реального времени, анализ метилчувствительных кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM), бисульфитное секвенирование. Обращает на себя внимание обширный набор методов статистической и биоинформатической обработки данных, в частности с использованием подхода полигенной оценки риска.

В главе «Результаты и обсуждение» приводится описание результатов анализа ассоциации исследованных полиморфных локусов с развитием и течением БА, возрастом манифестации БА, показателями функции внешнего дыхания, уровнем общего IgE; мета-анализа результатов исследования ассоциаций полиморфных локусов с развитием и течением БА. Представлены результаты анализа метилирования промоторных областей генов *HRH1*, *HRH2*, *GLCC11*, *ARG2*, *AOC1* в периферической крови у больных БА и индивидов контрольной группы. Сконструированы модели полигенного риска развития и начала БА в детском возрасте, тяжелого течения заболевания, построенные на основе 2-х наборов данных: результатов генотипирования, полученных в группе БА-контроль из РБ и данных суммарной мета-анализа GWAS исследований БА, что значительно увеличивает масштаб проведенной работы. Выявлен ряд моделей полигенного риска, обладающих «хорошей» и «средней» прогностической значимостью для индивидов, проживающих в РБ.

Полученные результаты исследования документированы таблицами, рисунками и кратко обобщены в заключении. Выводы следуют из полученных данных, вполне обоснованы, логичны и соответствуют поставленной цели и задачам исследования.

Основная ценность проведенного исследования в том, что оно учитывает этническую составляющую и демонстрирует актуальность проведения подобных исследований с учетом этнических данных. Так, автором обсуждается вопрос о том, что построенные модели полигенного риска на основе отобранных 26-полиморфных локусов обладают большей

предсказательной силой в отдельных этнических группах, чем в общей выборке пациентов и контроля, проживающих в республике Башкортостан.

Следует отметить, по структуре работы принципиальных замечаний нет, автор последовательно и логично подводит читателя к заключению и полученным выводам, которые строго соответствуют поставленным задачам

Содержание автореферата соответствует основному содержанию диссертационной работы. Автореферат оформлен в соответствии с п. 25 положения о присуждении ученых степеней.

Сведения о полноте о полноте опубликованных научных результатов

Материалы диссертации опубликованы в 9 печатных работах в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК, из них 4 статьи индексируются в международных базах данных. Основные результаты исследования представлены в виде устных и стендовых докладов (тезисов) на всероссийских и международных конференциях.

Общие вопросы и замечания о работе

Имеется ряд замечаний и вопросов:

Имеющееся название исследования существенно уже достигнутых результатов исследования, которые относятся не только к выявлению генетических предикторов ответа на терапию, но и риска развития БА и тяжести течения заболевания. Название «Исследование молекулярно-генетических основ предрасположенности к развитию БА и ответу на лекарственную терапию» более полно отражало бы суть проведенного исследования.

Следует также отметить некоторую сложность восприятия текста. Так, сложно для восприятия положение, выносимое на защиту, которое звучит как «Модели полигенного риска ассоциированы с развитием БА, с манифестацией БА в детском возрасте, с неконтролируемым течением и тяжелой формой заболевания у индивидов различной этнической принадлежности». С точки зрения достоверности модели это верно, но логичнее звучало бы утверждение о том, что «Разработанная шкала полигенного риска позволяет оценить риск...».

Особый интерес представляет часть исследованию по оценке профиля метилирования промоторных областей генов, участвующих в метаболизме

глюкокортикостероидов, бета-2-агонистов, антитриеновых и антигистаминных препаратов. Совершенно справедливо предположить также участие данной группы генов в развитии заболевания, так как воспаление играет существенную роль в патогенезе БА. Данный раздел работы читать непросто, поскольку даже в самой главе результаты не указано паттерн метилирования ДНК в какой ткани был изучен. Не указано это ни в положениях, выносимых на защиту, ни в выводах. Тем не менее, когда речь идет о профиле метилирования – данный вопрос имеет первостепенное значение, поскольку профиль метилирование генов человека различается в разных типах ткани. Далее, в разделе «Научная новизна» автор указывает на то, что «Уровень метилирования промоторных регионов генов HRH1, HRH2, GLCC11, ARG2, AOC1 у больных БА и в контроле проанализирован впервые». Во-первых, невозможно оценить данное положение, не указав в каких клетках был изучен паттерн метилирования. Во-вторых, в главе Результаты и обсуждение автор проводит данные о профиле метилирования данных генов в клетках буккального эпителия, а также эпителиальных клеток дыхательных путей. А что известно о паттерне метилирование данных генов в периферической крови?

И наконец, сам автор справедливо указывает на то, что применение различных препаратов, в том числе ГКС ассоциировано с дифференциальным метилированием ДНК в периферической крови. Также, в частности, ранее было показано, что ГКС модулируют экспрессию изоформ глюкокортикостероидного рецептора. То есть сегодня очевидно, что сама терапия может влиять на эпигенетические изменения. В настоящее исследование, посвященное молекулярно-генетическим основам чувствительности к терапии, включены две группы пациентов с частично и хорошо-контролируемым течением заболевания. Почему не был сопоставлен паттерн метилирования генов между этими группами, что, очевидно, представляет научный интерес об ассоциации эффективности терапии и ее влиянии на эпигенетическую регуляцию.

Данные вопросы и замечания в целом не противоречат положительной оценке работы и не снижают ее общей научно-практической ценности.

Заключение

Диссертационная работа Савельевой Ольги Николаевны «Исследование молекулярно-генетических основ индивидуальной чувствительности к

терапии бронхиальной астмы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки), представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение актуальных задач, имеющих важное фундаментальное значение для биологической науки в целом и медицинской генетики в частности. Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-11, 13-14, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор Савельева Ольга Николаевна заслуживает присуждения ученой степени по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Официальный оппонент:

Руководитель отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий НИЦ Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, доктор биологических наук (специальность 03.02.07 – генетика).



Пчелина Софья Николаевна

«31» марта 2022 г.

Подпись Пчелиной Софьи Николаевны заверяю: _____

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор ~~Беженарь~~ Виталий Федорович




Беженарь Виталий Федорович

«31» 03 2022 г.

Согласна на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета 24.1.218.01 по диссертационной работе Савельевой Ольги Николаевны «Исследование молекулярно-генетических основ индивидуальной чувствительности к терапии бронхиальной астмы», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).



Пчелина Софья Николаевна

Сведения об официальном оппоненте:

Место работы: ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»

Адрес места работы: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8.

Должность: руководитель отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий

E-mail: sopchelina@hotmail.com

Тел: +7 (812) 347-55-46

Сайт организации: <https://www.1spbgmu.ru/ru/>