ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

комиссии Диссертационного Совета Д 001.016.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр» (ФГБНУ «МГНЦ») от 21.06.2017 года (протокол №03) по ознакомлению с диссертационной работой и принятии диссертации к защите Гундоровой Полины «Молекулярно-генетические особенности гиперфенилаланинемий в Карачаево-Черкесской Республике», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Председатель комиссии: Гинтер Евгений Константинович, Академик РАН, доктор биологических наук, профессор, научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр».

Члены комиссии:

Куцев Сергей Иванович, доктор медицинских наук, член-корр. РАН директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр»;

Ижевская Вера Леонидовна, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр».

Комиссия рассмотрела документы диссертационной работы о принятии диссертации к защите Гундоровой Полины «Молекулярно-генетические особенности гиперфенилаланинемий в Карачаево-Черкесской Республике», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Научный руководитель: Поляков Александр Владимирович, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией ДНК-

диагностики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр»;

Научный консультант: Зинченко Рена Абульфазовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией генетической эпидемиологии, заместитель директора по научно-клинической работе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр»;

Комиссия пришла к следующему заключению:

1. **Актуальность темы**

Фенилкетонурия (ФКУ) – распространенная в Европе и России врожденная ферментопатия, связанная с дефектом обмена фенилаланина (ФА). При дефекте фенилаланилгидроксилазы (ФАГ), расщепляющей ФА, активируются побочные пути его обмена, в результате чего образуются токсичные метаболиты. Их накопление приводит к поражению ЦНС и задержке умственного развития. Фенилкетонурия является одним из немногих наследственных заболеваний, клинические проявления которого можно свести к минимуму модификацией факторов среды. Соблюдение строгой безбелковой диеты с раннего возраста позволяет предотвратить развитие умственной отсталости у детей с диагнозом «ФКУ». Введение неонатального биохимического скрининга позволило выявлять больных детей в роддомах в течение первой недели с момента рождения и перенаправлять их для наблюдения у врачей-генетиков.

Гиперфенилаланинемиями (ГФА) называют группу нозологий, основным общим симптомом которых является повышение уровня ФА в крови (>2мг/дл) и при отсутствии специфического лечения задержка умственного и психомоторного развития. Основной причиной гиперфенилаланинемий является дефект гена *PAH*, кодирующего фермент ФАГ. Патология наследуется по аутосомно-рецессивному типу и обеспечивает 98% всех ГФА, ее называют фенилкетонурией или PAH-зависимой ГФА. Изучение патогенных вариантов гена *PAH* является актуальной задачей, так как

позволяет делать прогнозы относительно клинического течения заболевания, чувствительности к кофакторной терапии, и необходимо для планирования деторождения в отягощенных семьях. В процессе изучения фенилкетонурии были выявлены клинические формы тетрагидробиоптеринзависимой ГФА, которые ранее называли «атипичной ФКУ». Мутации в генах, кодирующих белки синтеза и обмена кофактора ФАГ тетрагидробиоптерина (BH4), приводят к схожей с ФКУ клинике. Такие больные не реагируют на введение диеты, им необходима кофакторная терапия.

Частота фенилкетонурии значительно варьирует между популяциями и этническими группами как России, так и мира. Самые высокие частоты зарегистрированы в Турции и Северной Ирландии (1:6500 новорожденных), самые низкие в Финляндии (менее 1:100000), Японии (1:70000) и Тайланде (1:200000). Частота заболевания в среднем по России 1:7000 новорожденных, наблюдается колебание частот от региона к региону. В большей части популяций с низкой миграционной активностью обнаруживается увеличение частот отдельных аутосомно-рецессивных заболеваний. В этих случаях необходима разработка профилактических программ и проведение специализированных мероприятий по выявлению носителей в популяции и обязательному медико-генетическому консультированию отягощенных семей.

Спектр мутаций в гене *PAH* характеризуется значительными межпопуляционными различиями. Выявление наиболее распространенных патогенных вариантов позволяет создавать эффективные и экономичные панели для ДНК-диагностики ФКУ, специфичные для исследуемой популяции или региона. В России наиболее распространены мутации PAH, характерные для популяций Европы: R408W, R261Q, P281L, IVS12+1G>A, R158Q, R252W, Y414C, I306V [Zschocke J., 2003; Гундорова П. et al., 2016a; Степанова А.А. et al., 2006]. Группа мутаций, распространенных в Европе и на Ближнем Востоке: IVS10-11G>A , L48S, E390G, A403V, E280K, IVS4+5G>T, A300S. Более редкие в России, но тем не менее повторяющиеся варианты R243*, R243Q, R111*, широко распространены в Азии.

В ходе генетико-эпидемиологических исследований на территории Карачаево-Черкесской Республики, выявлено большое количество больных с диагнозами «фенилкетонурия» и «мГФА». Остается неясным, вызваны ли эти клинические формы разными молекулярно-генетическая причинами. Причина и механизмы широкого распространения аутосомно-рецессивной патологии в исследуемом регионе также предстоит выяснить. Обеспечение эффективного генетического консультирования возможно только после изучения частоты заболевания и спектра мутаций у больных с клиническими проявлениями заболевания, определения распространенности патологии и создания диагностических панелей.

2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Определение направления диссертационной работы, цели и задач исследования, а также оценка результатов проводились автором совместно с научным руководителем д.б.н. Поляковым А.В. и научным консультантом Зинченко Р.А. Автор работы непосредственно участвовал в разработке схемы и последовательности проведенных исследований, формулировании цели и задач, выборе методов исследования, статистической обработке полученных данных. Автором настоящей работы был проведен анализ ДНК 63 пациентов с различными формами гиперфенилаланинемий, а также 12 больных и 58 здоровых родственников. Автор принимал непосредственное участие в выборе частых вариантов для создания системы диагностики наиболее распространенных в республике мутаций, а также подборе условий и отладке метода. Автором проведено молекулярно-генетическое обследование 774 здоровых жителей республики. Автор провел молекулярный анализ гаплотипов хромосом с мутацией R261*, а также последующую обработку полученных данных. Автором изучена и проработана зарубежная и отечественная литература по теме диссертации, проведен анализ полученных данных, сформулированы результаты и выводы. Автор опубликованы результаты настоящего исследования в

рецензируемых журналах, а также представлены на российских и зарубежных научных конференциях.

3. Достоверность результатов проведенных исследований

Работа проведена на максимально возможно исчерпывающей выборке больных из Карачаево-Черкесской Республики (63 пациента), обследована репрезентативная группа здоровых представителей коренных этносов (691 здоровых индивида). В работе использованы современные точные молекулярно-генетические и статистические методы исследования, интерпретация проведена с использованием методов статистической обработки данных. Выводы, умозаключения и сравнения подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно и логично представлены в виде таблиц. Для теоретического обоснования и сравнительного анализа привлечено большое количество отечественных и зарубежных источников литературы. Выводы полно и точно отражают результаты проделанной работы.

4. Новизна и практическая значимость

Впервые проведено комплексное генетико-эпидемиологическое обследование пациентов с гиперфенилаланинемиями из Карачаево-Черкесской Республики. Выявлены больные с различными клиническими формами ГФА, установлена молекулярно-генетическая причина их заболевания, обследованы больные и здоровые родственники. Определен уникальный спектр мутаций гена РАН для жителей Карачаево-Черкесии, выявлены наиболее распространенные варианты. Создана экономичная эффективная диагностическая система детекции частых в Карачаево-Черкесской Республике мутаций гена РАН. Оценка гено-фенотипических корреляций подтверждает существующие теории о псевдодоминантном влиянии мягких мутаций РАН на фенотип.

На основании данных неонатального скрининга определена частота гиперфенилаланинемий в Карачаево-Черкесской Республике, которая в настоящее время является самой высокой зарегистрированной в мире. В результате исследования ДНК здоровых жителей республики на

носительство патогенных вариантов PAH определен наиболее отягощенный из проживающих на ее территории этнос, установлена популяционная частота носительства мутаций среди представителей различных национальностей. Определен механизм накопления мутации R261* среди карачаевцев, а также возраст начала ее распространения.

Выявленная общая молекулярно-генетическая причина заболевания у пациентов с диагнозом «ФКУ» и «мГФА» позволяет говорить об этих двух клинических формах как об одной нозологии; необходимо при консультировании учитывать клинический полиморфизм заболевания. Консультирование семей с пациентами мГФА приобретает иной характер: тогда как ранее они не состояли на учете у врача-генетика, так как им не назначается диета, теперь необходимо разъяснять им все аспекты планирования семьи и контроля уровня ФА при беременности. ДНК-диагностика больных ФКУ также предоставляет данные, необходимые для начала лечения пациентов кофакторной терапией. Аномально высокая частота носительства мутаций PAH среди карачаевцев показывает необходимость разработки региональных профилактических программ, позволяющей выявление детей не только с классической ФКУ, но и мГФА, а также здоровых гетерозиготных носителей в популяции и дальнейшее консультирование при планировании ими деторождения с целью снижения частоты ФКУ в Карачаево-Черкесии.

5. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Материалы диссертации представлены в 13 печатных работах соискателя, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ для соискателей ученой степени кандидата биологических наук. Результаты диссертационного исследования Гундоровой Полины «Молекулярно-генетические особенности гиперфенилаланинемий в Карачаево-Черкесской Республике» полностью отражены в изданиях и журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ, и неоднократно апробированы на российских и зарубежных конференциях.

Наиболее значимыми являются следующие работы:

1. Гундорова П., Степанова А.А., Макаов А.Х., Зинченко Р.А., Абайханова З.М., Поляков А.В. Особенности спектра мутаций в гене РАН в Карачаево-Черкесской Республике // Генетика. - 2016. - Т. 52. - № 12. - с.1448-1457.
2. Гундорова П., Зинченко Р.А., Макаов А.Х., Поляков А.В. Спектр мутаций гена РАН у больных с входящим диагнозом «гиперфенилаланинемия» из Карачаево-Черкесской Республики // Генетика. – 2017. - Т. 53. - № 7. - с.849-853.
3. Гундорова П., Степанова А.А., Бушуева Т.В., Беляшова Е.Ю., Зинченко Р.А., Амелина С.С., Куцев С.И., Поляков А.В. Генотипирование больных фенилкетонурией из различных регионов РФ с целью определения чувствительности к препаратам ВН4 // Генетика. – 2017. - Т. 53. - № 6. - с.732-739
4. Гундорова П., Степанова А.А., Щагина О.А., Поляков А.В. Результаты использования новых медицинских технологий «Детекция основных точковых мутаций гена РАН методом мультиплексной лигазной реакции» и «Детекция десяти дополнительных точковых мутаций гена РАН методом мультиплексной лигазной реакции» в ДНК-диагностике фенилкетонурии // Медицинская генетика. - 2016. - Т. 15. - № 2 (164). - с. 29-36.
5. Макаов А.Х., Зинченко Р.А., Хлебникова О.В., Михайлова Л.К., Петрова Н.В., Гундорова П., Петрина Н.Е., Васильева Т.А., Марахонов А.В., Адян Т.А., Поляков А.В., Гинтер Е.К. Молекулярная эпидемиология наследственной патологии в десяти популяциях Карачаево-Черкесской Республики // Медицинская генетика. - 2016. - Т. 15. - № 8 (170). - с. 6-9.

6. Ценность научных работ соискателя

В результате проведенного исследования диагноз «фенилкетонурия» или «ГФА, вызванная мутациями гена *РАН*» был подтвержден молекулярно-генетическими методами для 80 из 84 обследованных пациентов из

Карачаево-Черкесии. Выявлен полный спектр мутаций гена *PAH* у больных из Карачаево-Черкесской Республики. Сопоставление полученных данных о генотипе пациентов с клиническими данными дает возможность говорить о выраженном псевдодоминантном эффекте мягких мутаций, что подтверждает данные литературы. Удалось также сделать предположения о тяжести некоторых мутаций, для которых на данный момент не известна остаточная активность ФАГ.

Определена частота *PAH*-зависимых гиперфенилаланинемий в КЧР, которая является самой высокой в мире. Исследование ДНК здоровых коренных представителей различных этносов республики на наличие частых мутаций *PAH* показало, что высокая частота ГФА обусловлена значительной распространенностью мажорного варианта R261* гена *PAH* среди карачаевцев, распространившегося в результате эффекта основателя.

7. Специальность, которой соответствует диссертация

В соответствии с областями исследования специальности 03.02.07 – Генетика (биологические науки) – «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни. Молекулярные основы наследственности. Мутационная изменчивость. Популяционная генетика». Работа включает в себя обсуждение проблем популяционной генетики, генетической структуры популяций, генетики человека, медицинской генетики, наследственных болезней.

8. Научная зрелость соискателя

Гундорова П. в ходе выполнения диссертационной работы проявила себя грамотным и дисциплинированным сотрудником, способным самостоятельно ставить задачи исследования и эффективно их решать. Гундорова П. освоила большое количество методов современной молекулярной генетики, проявила себя в качестве квалифицированного научного сотрудника, активно участвующего в работе лаборатории.

9. Проверка диссертации на заимствование материала без ссылки на авторов.

Итоговая оценка оригинальности по системе проверки использования заимствованного материала без ссылки на автора составила 94,82%.

Заключение:

Диссертационная работа Гундоровой Полины «Молекулярно-генетические особенности гиперфенилаланинемий в Карачаево-Черкесской Республике», является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющее значение для развития медицинской генетики. Работа посвящена исследованию особенностей *PAH*-зависимых гиперфенилаланинемий в Карачаево-Черкесской Республике.

Диссертация соответствует требованиям п. 9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Экспертная комиссия диссертационного совета Д 001.016.01 единогласно решила:

рекомендовать представляемую диссертацию Гундоровой П. к официальной защите на Диссертационном совете Д 001.016.01 по специальности 03.02.07 – генетика (биологические науки)

утвердить официальными оппонентами:

Акуленко Лариса Вениаминовна – доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой медицинской генетики.

Голубенко Мария Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории популяционной генетики Научно-

исследовательского института медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук.

Утвердить ведущую организацию:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Председатель комиссии Диссертационного Совета Д 001.016.01
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Медико-генетический научный центр»
академик РАН, д.б.н., проф. Гинтер Е.К.

Члены комиссии:
д.м.н., член-корр. РАН Куцев С.И.
д.м.н. Ижевская В.Л.

Подписи председателя академика РАН, д.б.н., проф. Гинтера Е.К. и членов комиссии Диссертационного Совета Д 001.016.01 д.м.н., член-корр. РАН Куцева С.И., д.м.н. Ижевской В.Л.

Ученый Секретарь
Диссертационного Совета Д 001.016.01
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Медико-генетический научный центр»
Д.м.н., проф. Зинченко Р.А.