ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, доцента кафедры молекулярной генетики и биоинформатики, заведующая лаборатории молекулярно-генетической диагностики №3 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» Рыжковой Оксаны Петровны на диссертационную работу Комаровой Алины Дмитриевны «Клинико-диагностическое значение молекулярно-генетического исследования и маркеров фиброзирования у детей с болезнью Вильсона-Коновалова», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.21. Педиатрия и 1.5.7. Генетика

Актуальность темы диссертации

Болезнь Вильсона–Коновалова (БВК) – тяжёлое наследственное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, обусловленное мутациями гена *ATP7B*, приводящими к нарушению экскреции меди и её токсическому накоплению в печени, головном мозге и других органах. Без своевременной диагностики и терапии заболевание прогрессирует, формируя цирроз печени и необратимые неврологические нарушения, что становится причиной ранней инвалидизации и летальности.

Это классический пример наследственного заболевания, при котором исход определяется не столько тяжестью самого патологического процесса, сколько своевременностью его выявления. В педиатрической практике это утверждение приобретает особую значимость, поскольку манифестация БВК у детей, как правило, характеризуется отсутствием патогномоничных симптомов и ограничивается неспецифическими признаками поражения печени, а традиционные диагностические шкалы (например, Лейпцигская) разработаны преимущественно для взрослых и обладают низкой чувствительностью у детей. Кроме того, в Российской Федерации, при наличии достаточного числа работ по исследованию когорт пациентов с БВК, в том числе молекулярных, недостаточно изучены спектр мутаций гена *ATP7B*, генотип-фенотипические корреляции и возможности неинвазивного мониторинга фиброза печени с помощью цитокинов именно в группе педиатрических больных. Это диктует необходимость пересмотра подходов для ранней верификации заболевания, в связи с чем молекулярно-генетическое исследование выступает не просто как метод подтверждения диагноза, а как ключевой инструмент, способный обеспечить выявление заболевания на доклинической стадии.

Использование стандартных таргетных ПЦР-панелей для исследования частых вариантов гена *ATP7B*, хотя и является широкодоступным методом, но его информативность ограничивается значительным аллельным разнообразием (более 1000 описанных вариантов), высокой частотой компаунд-гетерозиготных состояний и этногеографической вариабельностью мутационного спектра. Наиболее высокую диагностическую точность обеспечивает высокопроизводительное секвенирование, однако оно остается труднодоступными в рутинной практике из-за высокой стоимости и методических ограничений. В Российской Федерации систематизированные данные о спектре и частотах вариантов гена *ATP7B* именно у детей отсутствуют, что не позволяет обоснованно подходить к выбору

диагностической стратегии. В связи с этим разработка экономически обоснованного и клинически эффективного алгоритма молекулярно-генетической диагностики, является актуальной задачей, решение которой позволит сократить время диагностики, своевременно начать патогенетическую терапию и улучшить прогноз заболевания у детей.

Изучение генотип-фенотипических взаимосвязей при БВК остаётся одной из наиболее дискуссионных областей. Исследования, проведенные в этой области, демонстрируют противоречивые данные: в одних работах выявлены связи между типом мутации и клиническими проявлениями, в других — подтвердить их не удалось. Большинство исследований в данном направлении проводились среди взрослых пациентов или в смешанных возрастных группах, что существенно ограничивает возможность экстраполяции полученных результатов на пациентов детского возраста.

Таким образом, диссертационное исследование Комаровой А.Д., направленное на определение спектра и частот вариантов гена *ATP7B* в педиатрической выборке, анализ генотип-фенотипических взаимосвязей и совершенствование диагностических алгоритмов у детей с болезнью Вильсона–Коновалова, является безусловно актуальным и имеет существенное значение для медицинской генетики и педиатрической практики.

Научная новизна результатов исследования

Впервые на репрезентативной выборке российских детей (104 пациента) охарактеризованы возрастные особенности манифестации и клинического течения БВК, показано, что цирроз печени и неврологические симптомы развиваются преимущественно во второй декаде жизни и являются следствием длительного естественного течения заболевания. Проведена сравнительная оценка диагностической информативности двухбалльных шкал (Лейпцигской и модифицированной шкалы Nagral A.) у детей без учёта молекулярно-генетических данных, установлены их возрастные ограничения и предложены пути повышения эффективности. Определён спектр мутаций гена *ATP7B* в российской педиатрической популяции (51 вариант), из которых 14 ранее не описаны в мире. Выявлены наиболее частые варианты и доказана недостаточность стандартных ПЦР-панелей «частых мутаций» (расчётная выявляемость – лишь 39–46%). Установлено, что мутации, приводящие к укорочению белка (нонсенс, сдвиг рамки, сплайсинг), ассоциированы с более ранним дебютом и значимо более низким уровнем церулоплазмина. Впервые у детей с БВК изучены сывороточные уровни профиброгенных цитокинов (TGF-β, PDGF-BB, CTGF, VEGF) в зависимости от стадии фиброза печени, выявлено их парадоксальное снижение при циррозе, а также показана возможность использования TGF-β в качестве динамического маркера эффективности терапии. Предложен обоснованный алгоритм молекулярно-генетической диагностики, позволяющий оптимизировать экономические и временные затраты.

Достоверность, степень обоснованности научных положений и результатов работы

Достоверность результатов диссертационного исследования Комаровой А.Д. обусловлена репрезентативностью выборки, корректным дизайном и использованием

современных высокоинформативных методов диагностики и статистической обработки данных.

Исследование включало как ретроспективный анализ медицинской документации (54 пациента), так и проспективную часть (50 детей), которым для окончательной верификации диагноза было проведено молекулярно-генетическое исследование с применением современных методов, включая высокопроизводительное секвенирование (ВПС) и секвенирование по Сэнгеру. Выделение геномной ДНК, приготовление геномных библиотек и их обогащение, биоинформатический анализ данных и предсказание патогенности осуществлялись в соответствии с международными стандартами и рекомендациями по интерпретации данных последовательности нуклеотидов ДНК человека. Все выявленные варианты были подтверждены методом двунаправленного секвенирования по Сэнгеру.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием параметрических и непараметрических методов, включая U-критерий Манна-Уитни, критерий Краскела-Уоллиса, ROC-анализ, корреляционный анализ Спирмена.

Выводы и положения, выносимые на защиту, логически вытекают из полученных результатов и подкреплены статистически значимыми различиями.

Практическая и теоретическая значимость

Теоретическая значимость работы состоит в расширении представлений о молекулярно-генетических причинах БВК в группе детей, идентификации новых мутаций и уточнении механизмов влияния генотипа на клинический фенотип. Полученные данные о динамике цитокинов при различных стадиях фиброза дополняют современные концепции патогенеза гепатофиброза при наследственных гепатопатиях.

Практическая значимость проявляется в разработке конкретных алгоритмов, которые могут быть непосредственно внедрены в работу педиатрических и медико-генетических учреждений:

- предложены оптимальные пороговые значения для скрининговых тестов (церулоплазмин – 16,9 мг/дл, суточная экскреция меди – 50,8 мкг/сут) с учётом их чувствительности и специфичности,
- рекомендованы возраст-ориентированные диагностические шкалы: у детей до 5 лет – шкала Nagral A., у пациентов старше 15 лет – Лейпцигская шкала,
- обоснован поэтапный молекулярно-генетический подход: сначала секвенирование по Сэнгеру «горячих» экзонов (8, 13–16), при отрицательном результате – полное секвенирование всего гена,
- предложен мониторинг TGF-β в динамике для оценки эффективности терапии, что может служить дополнительным неинвазивным критерием.

Результаты диссертационной работы Комаровой А.Д. позволяют по-новому взглянуть на организацию диагностического процесса при БВК у детей и предлагают конкретные инструменты для повышения его эффективности.

Оценка содержания и оформления работы

Диссертация Комаровой А.Д. изложена на 139 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, 3 глав собственных наблюдений, заключения, выводов и практических рекомендаций.

Работа иллюстрирована 25 таблицами, 26 рисунками и 2 клиническими примерами. Список использованной литературы включает 144 источника.

Во введении обоснована актуальность работы, ее цель и задачи, положения, выносимые на защиту, научная новизна, практическая и теоретическая значимость, а также личный вклад автора в исследование.

Глава 1 (обзор литературы) представляет собой глубокий аналитический обзор современных данных об этиологии (с детальным описанием генетических аспектов, включая спектр и этно-географические особенности распределения вариантов гена *ATP7B*), патогенезе, клинических проявлениях, диагностике БВК у детей. Особое внимание уделено молекулярно-генетическим методам диагностики и взаимосвязям генотипа и фенотипа заболевания.

В главе 2 (материалы и методы) подробно описана методологическая база исследования, включая дизайн исследования, характеристику пациентов, критерии включения и невключения, методы лабораторного, инструментального и молекулярно-генетического обследования, включая детальное описание методов выделения ДНК, приготовления геномных библиотек, секвенирования и биоинформатического анализа. Отдельно представлены методы статистической обработки данных.

Главы 3–5 содержат результаты собственных исследований. В главе 3 представлена клинико-лабораторная характеристика БВК у детей, проведена сравнительная оценка диагностической ценности лабораторных и инструментальных методов, а также оценена информативность диагностических балльных шкал. Глава 4 является центральной и наиболее ценной с точки зрения медицинской генетики. В ней представлен спектр и частоты вариантов гена *ATP7B* у российских детей с БВК, выявлены ранее не описанные варианты, проведен анализ генотип-фенотипических взаимосвязей, предложен алгоритм молекулярно-генетической диагностики. Глава 5 посвящена изучению содержания маркеров фиброзирования в сыворотке крови при различных стадиях фиброза и их диагностическому значению, включая динамику на фоне терапии. Заключительная часть работы содержит обобщение полученных данных с сопоставлением результатов с литературными данными, выводы и практические рекомендации сформулированы четко, соответствуют поставленным задачам и обоснованы представленным материалом.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе Комаровой А.Д. по оформлению и содержанию нет. В результате ознакомления с диссертацией возникли следующие вопросы для дискуссии:

1. Вами предложен двухэтапный молекулярно-генетический алгоритм (секвенирование по Сэнгеру экзонов 8, 13–16, а при отрицательном результате – полное высокопроизводительное секвенирование всего гена). Однако в представленном алгоритме не описаны дальнейшие действия в зависимости от результатов NGS. Не могли бы Вы уточнить, какие практические рекомендации следует дать клиницисту в следующих ситуациях: а) при NGS не выявлено ни одного патогенного варианта (при этом клиническая картина сохраняется); б) выявлен только один гетерозиготный патогенный вариант (т.е. не удалось подтвердить биаллельное поражение)?
2. В диссертации проведён сравнительный анализ расчётной выявляемости четырёх диагностических подходов: панели «12 частых мутаций», ARMS-ПЦР (14

мутаций), секвенирования по Сэнгеру «горячих» экзонов и NGS. На чём основывался выбор именно этих наборов мутаций (12 и 14) для сравнения? Можно ли на основании полученных вами данных по спектру вариантов в детской когорте больных БВК предложить оптимальный состав новой, более информативной панели «частых мутаций», которая обеспечила бы выявляемость, приближающуюся к секвенированию по Сэнгеру (67% и выше)?

Заключение

Диссертационная работа Комаровой Алины Дмитриевны «Клинико-диагностическое значение молекулярно-генетического исследования и маркеров фиброзирования у детей с болезнью Вильсона-Коновалова», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи – определение значения молекулярно-генетического исследования в диагностике БВК у детей и влиянии генотипа на формирование фенотипа заболевания, что является важным для педиатрии и генетики.

Диссертационная работа Комаровой А.Д. полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Комарова Алина Дмитриевна достойна присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.21. Педиатрия (медицинские науки) и 1.5.7. Генетика (медицинские науки).

Официальный оппонент

Доктор медицинских наук (1.5.7.),
заведующая лабораторией молекулярно-генетической диагностики 3
ФГБНУ «МГНЦ»

Рыжкова О.П.

«13» 08 2026г.

Подписи доктора медицинских наук, Рыжковой Оксаны Петровны заверяю

И.о. ученого секретаря ФГБНУ «МГНЦ», к.б.н. Абелева Елена Сергеевна

Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1 Телефон: +7 (495) 111-03-03
Электронная почта: registratura@med-gen.ru