

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук, заведующей лабораторией клеточных биотехнологий, Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы" Салиховой Дианы Ирековны на диссертационную работу Пылиной Светланы Викторовны на тему «Мутация в гене *MEN1* в патогенезе костных нарушений при наследственной форме первичного гиперпаратиреоза», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.19. Эндокринология (медицинские науки)

Актуальность темы диссертации

Первичный гиперпаратиреоз (ПГПТ) – это крайне важная медико-социальная проблема настоящего времени и наиболее частый компонент синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа (МЭН1), с которым в большинстве случаев ассоциирована манифестация синдрома. В отличие от спорадической формы первичного гиперпаратиреоза (сПГПТ) данные об особенностях костных нарушений при МЭН1-ассоциированном гиперпаратиреозе (мПГПТ) лимитированы и противоречивы ввиду орфанности заболевания. Среди этиологических факторов костных осложнений рассматриваются: опухолевая трансформация околощитовидных желез (ОЩЖ), комплексное влияние других компонентов МЭН1 на костный метаболизм, а также непосредственное влияние белка менина – продукта гена *MEN1* на минерализацию костного матрикса и остеобластогенез. При этом достоверно неизвестно, какой из множества факторов, влияющих на костную ткань при мПГПТ, обуславливает тяжесть костных нарушений, что обосновывает актуальность выбранной темы и необходимость проведения дальнейших клинических и фундаментальных исследований по проблеме.

Научная новизна исследования, полученных результатов и практических рекомендаций

Диссертационная работа Пылиной С.В. представляет собой квалификационное исследование, которое имеет научную новизну и практическую значимость, особенно для персонализации подходов в лечении костных нарушений при мПГПТ.

В рамках клинической части автором сформирована уникальная выборка молодых пациентов с мПГПТ на основании генетического критерия синдрома МЭН1 с исключением других гормонально активных компонентов синдрома, что позволило выявить значимые различия в костном фенотипе при мПГПТ по сравнению со спорадической формой заболевания. В работе впервые в мире для установления степени вовлеченности кортикальной и трабекулярной костной ткани в патологический процесс при мПГПТ применялось 3D-моделирование проксимального отдела бедренной кости.

В рамках решения задач фундаментального блока исследования получена *in vitro* модель остеобластов человека с мутацией в гене *MEN1*. Модель создана на основе пациент-специфичной линии индуцированных плюрипотентных клеток (ИПСК) с мутацией в гене *MEN1* путем поэтапной дифференцировки ИПСК в клетки подобные мезенхимальным (МСК-подобные клетки) и далее в остеобласты. В работе оптимизирован протокол получения МСК-подобных клеток из ИПСК, который может быть использован для дальнейшего изучения особенностей остеогенеза при синдроме МЭН1.

В исследовании выявлено 10 ранее не описанных вариантов мутаций в гене *MEN1*, 3 из которых имеют неизвестную клиническую значимость.

Теоретическая и практическая значимость

Диссертационная работа Пылиной С.В., безусловно, обладает научно-практической значимостью. На первом этапе исследования с использованием Базы данных клинико-эпидемиологического мониторинга первичного гиперпаратиреоза на территории Российской Федерации (далее – База

данных) проведен анализ фенотипических особенностей генетически верифицированного мПГПТ, включая костные нарушения. Автором оценена распространенность генетического скрининга на предмет наличия мутации в гене *MEN1* при подозрении на наследственную причину ПГПТ, гендерные различия при мПГПТ, описаны основные сочетания компонентов синдрома МЭН1 с мПГПТ. С использованием Базы данных проведен сравнительный анализ показателей кальцево-фосфорного обмена, наличия осложнений. В заключении обозначены основные ограничения использования крупных баз данных для изучения костной патологии при мПГПТ.

Второй этап исследования проводился на базе специализированного отделения – Отделения патологии околощитовидных желез и нарушений минерального обмена ФГБУ «НМИЦ Эндокринологии» Минздрава РФ. Сравнительный анализ костных нарушений между группами мПГПТ и спорадической формы заболевания проводился с учетом ограничений, выявленных на предыдущем этапе исследования. При формировании групп использовались строгие критерии включения и исключения, генетический скрининг на предмет наличия мутации в гене *MEN1* был проведен всем пациентам, включенным в исследование. Для оценки повреждения кортикальной и трабекулярной кости проводилось 3D-моделирование проксимального отдела бедренной кости. В результате автором подтверждены более низкие значения МПК при мПГПТ по сравнению с сПГПТ, а также значимое поражение кортикальной костной ткани: уменьшение ее толщины, поверхностной и объемной плотности. Используемая методика 3D-моделирования бедренной кости продемонстрировала высокую информативность для оценки кортикального и трабекулярного поражения в группе мПГПТ и была рекомендована в качестве дополнительного метода к рентгеновской денситометрии для уточнения характера и спектра костных нарушений. Во второй части исследования проводилась оценка восстановления костной ткани через 1 год после проведенной паратиреоидэктомии (ПТЭ). Результаты динамической оценки представляют

собой принципиально новые данные о схожем положительном влиянии ПТЭ на восстановление МПК, кортикального и трабекулярного компонента проксимального отдела бедренной кости в обеих группах. Так, при достижении ремиссии заболевания через 1 год после ПТЭ различий по основным показателям МПК, кортикальной и трабекулярной костной ткани проксимального отдела бедренной кости между группами не выявлено. Однако в как в группе мПГПТ, так и сПГПТ был выявлен прирост МПК в поясничном отделе позвоночника и бедренной кости; также положительная динамика была зафиксирована по основным поверхностным и объемным показателям кортикальной и трабекулярной костной ткани. Отмечено, что увеличение толщины кортикальной кости было характерно только для пациентов с мПГПТ. Полученные данные могут свидетельствовать о достаточном «восстановительном» резерве организма у пациентов молодого возраста . при достижении ремиссии ПГПТ независимо от этиологии заболевания.

На третьем этапе исследования фундаментальный блок работ выполнен с использованием пациент-специфического клеточного материала, что повышает репрезентативность полученных результатов, в сравнении с ранее использованными животными моделями. В работе применены современные методы молекулярно-генетической диагностики: представлено полное описание результатов секвенирования гена *MEN1*, для оценки экспрессии генов в полученных клеточных культурах применен транскриптомный анализ типа Bulk-RNA-sequencing, что позволило получить новые данные о влиянии варианта *MEN1*: 1230dupC на остеобластогенез и минерализацию костного матрикса.

Научная обоснованность и достоверность основных положений, выводов и заключений, сформулированных в диссертации

В представленной работе четко сформулированы цель и задачи, которые были решены в итоге выполнения исследования. Достоверность

полученных результатов подтверждается достаточной выборкой пациентов с учётом орфанности изучаемого заболевания. Дизайн каждого этапа исследования, включая определенные критерии включения и исключения, описан детально и обосновано, что повышает репрезентативность полученных результатов.

Обоснованность полученных результатов подтверждается корректностью проведенных исследований и экспериментов. Для нивелирования проблемы множественных сравнений в клинической части исследования применялась поправка Бенджамини-Хохберга (p_0 -value), что позволило исключить ложно положительные результаты. Для повышения статистической значимости результатов, полученных в фундаментальной части исследования, эксперимент выполнялся в трех повторностях. Для корректного анализа результатов транскриптомного анализа и отбора образцов, валидных для дальнейшего анализа, был построен график MDS (Multidimensional scaling plot, график многомерного масштабирования). Анализировались только те образцы, которые кластеризовались в группы и имели сходных профиль экспрессии генов.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа Пылиной С.В. «Мутация в гене *MEN1* в патогенезе костных нарушений при наследственной форме первичного гиперпаратиреоза» является законченной научно-квалификационной работой. Оформлена по классическому образцу в соответствии с требованиями ВАК Российской Федерации и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, результатов и обсуждения результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и приложения. Работа изложена на 133 страницах машинописного текста. Список использованной литературы включает 186 источников.

Цели и задачи диссертационной работы сформулированы четко. В литературном обзоре дано последовательное описание клинических аспектов

синдрома МЭН1, включая известные молекулярно-генетические основы патогенеза заболевания. Проведена оценка состояния проблемы по изучению костных нарушений при мПГПТ. Описаны современные фундаментальные методы исследования, позволяющие изучать редкие генетические заболевания. Обзор литературы заканчивается заключением, в котором подытожены главные нерешенные вопросы тематики, на решение которых направлено диссертационное исследование.

Материалы и методы исследования, включая фундаментальные и статистические методы экспериментальной части работы, описаны подробно, что позволяет сделать вывод о достоверности и воспроизводимости полученных результатов.

В разделе «Результаты и обсуждение» автор аргументирует полученные данные, сопоставляет собственные результаты с исследованиями, описанными в мировой литературе. Выводы и практические рекомендации диссертации четко отражают полученные результаты, соответствуют поставленным задачам. В разделе «Приложение» представлено детальное описание всех выявленных типов мутаций в гене *MEN1* в рамках проведенного исследования, в том числе ранее не описанных по данным мировой литературы.

Сведения о публикациях и выступлениях по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 3 полнотекстовые оригинальные рукописи (2 из которых включены в перечень ВАК для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, и 1 статья, входящая в Q1, индексируемая в международных базах данных Scopus и Web of Science) и 4 тезиса международных и российских конференций.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации Пылиной С.В. соответствует основным положениям диссертации, в нем отражены актуальность изучаемой темы,

цель и задачи исследования, научная новизна, основные результаты, выводы и практические рекомендации. Принципиальных замечаний к содержанию и оформлению автореферата не имеется.

Содержание диссертационной работы и автореферата соответствует специальности 3.1.19. Эндокринология (медицинские науки).

В рамках дискуссии хотелось бы обсудить следующие вопросы:

1. Какой процент сыворотки содержит базовая среда для культивирования МСК, полученных из ИПСК?
2. С чем связана низкая эффективность дифференцировки ИПСК с мутацией в гене *MEN1* в МСК-подобные клетки? Возможно ли было подобрать протокол дифференцировки ИПСК с мутацией в гене *MEN1* в МСК-подобные клетки с более высокой эффективностью?
3. Были ли различия в эффективности дифференцировки МСК-подобных клеток с мутацией в гене *MEN1* и контрольной культуры в остеобласты?
4. Чем обусловлен выбор типа мутации для фундаментального блока исследования? Учитывая отсутствие корреляции между генотипом и генотипом заболевания при МЭН1, допускаете ли Вы, что при другом типе мутации Вы бы получили иной паттерн экспрессии генов?

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Пылиной Светланы Викторовны, выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора, член-корреспондента РАН Мокрышевой Натальи Георгиевны, на тему «Мутация в гене *MEN1* в патогенезе костных нарушений при наследственной форме первичного гиперпаратиреоза», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.19. Эндокринология (медицинские науки), является законченной научной квалификационной работой, в которой решается научная задача комплексной

оценки особенностей костных нарушений при мПГПТ. В работе предложены новые методы оценки костных нарушений при данной форме заболевания, а также получены новые фундаментальные данные об особенностях остеогенеза при мутации в гене *MEN1*. Полученные результаты имеют существенное значение для персонализации диагностики и лечения костных нарушений при мПГПТ. Также в работе обозначены направления дальнейших научных исследований.

Отдельно необходимо отметить значимое личное участие автора в экспериментальном этапе работы. Автором проводился основной пул работ фундаментального блока исследования: культивирование, пассирование и криоконсервация различных клеточных культур (фибробластов, ИПСК, МСК-подобных клеток, остеобластов); пробоподготовка для кариотипирования образцов ИПСК, проточной цитометрии и сортировки клеток, а также иммуноцитохимическое окрашивание. Автором проведена оптимизация протокола дифференцировки ИПСК в МСК-подобные клетки. Автор также проводил базовые молекулярно-генетические работы: полимеразную цепную реакцию, выделение ДНК и РНК.

По своей новизне, научно-практической значимости и достоверности полученных результатов диссертация Пылиной Светланы Викторовны на тему «Мутация в гене *MEN1* в патогенезе костных нарушений при наследственной форме первичного гиперпаратиреоза», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.19. Эндокринология (медицинские науки) соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023

№ 1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 г № 1382, а ее автор Пылина Светлана Викторовна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.19. Эндокринология (медицинские науки)

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук, заведующая лабораторией клеточных биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования

"Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы"

Салихова Д.И.

Даю согласие на обработку персональных данных

«13» апреля 2025 г.

Салихова Д.И.

Подпись кандидата биологических наук Салиховой Д.И. заверяю

Ученый секретарь ученого совета Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы"

к.фарм.н., доцент

Максимова Т.В.

Контактная информация: Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы". Адрес организации: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, дом 6. Тел: +7 (499) 936-87-87, e-mail: rudn@rudn.ru, web-сайт: <https://www.rudn.ru/>.