

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук

**Глотова Андрея Сергеевича**

на диссертационную работу **Зариповой Алии Рамилевны** на тему «**Генетическая архитектура незавершенного остеогенеза**», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

### **Актуальность темы выполненной работы**

Исследование молекулярно-генетической природы незавершенного (несовершенного) остеогенеза (НО) представляет большую ценность для развития научных знаний и методических подходов в области медицинской генетики человека и профилактической медицины. Данная патология является орфанным наследственным заболеванием соединительной ткани с широкой клинической и генетической гетерогенностью. Основными симптомами НО являются голубые склеры, множественные низкотравматичные переломы, скелетные деформации, в некоторых случаях нарушение слуха и аномалии дентина. Частота его распространенности варьирует в зависимости от страны и региона, составляя в среднем 6-7 случаев на 100 тыс. человек. В России болезнь встречается реже.

Согласно современной классификации НО делят на 5 групп, в которые включены 22 основных фенотипа заболевания: 1 тип НО - легкий тип НО с голубыми склерами; 2 тип НО - перинатально-летальный НО; 3 тип НО - прогрессивно-деформирующий тип с нормальным цветом склер; 4 тип НО - средней степени тяжести с нормальным цветом склер; 5 тип НО - среднетяжелый НО с оссификацией межкостной мембраны предплечья.

В патогенез заболевания вовлечено от 22 до 25 генов. Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному, аутосомно-рецессивному типам, встречаются случаи с X-сцепленным наследованием и варианты *de novo*, болезнь может манифестировать в любом возрасте, начиная с внутриутробного периода жизни.

В 90% случаев причиной НО являются молекулярные дефекты в генах коллагена I типа, кодирующих его  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  цепи (*COL1A1*, *COL1A2*). От 1 до 5% случаев НО обусловлены мутациями в гене интерферон-индуцированного трансмембранного белка 5 (*IFITM5*), который отвечает за развитие V типа НО. Оставшийся процент поделили между собой другие 22 гена. Все гены условно делят на 5 групп: группу А - первичные дефекты структуры или переработки коллагена (*COL1A1*, *COL1A2* и *BMP1*), группу В - дефекты модификации коллагена (*CRTAP*, *P3H1/LEPRE1*, *PP1B* и *TMEM38B*); группу С - дефекты

сворачивания и/или сшивания коллагена (*SERPINH1, FKBP10 и PLOD2*); группа D - дефекты костеобразования или минерализации (*IFITM5*); и группа E - дефекты развития остеобластов при недостаточности коллагена (*WNT1, CREB3L1 и SP7*)

Клиническая картина несовершенного остеогенеза может варьировать в широких пределах не только в зависимости от типа, но и в пределах него, и даже внутри одной семьи у разных пациентов. Тем не менее, существуют определенные фенотипические признаки, более характерные для разных типов заболевания.

Сегодня активно продолжают изучать генетическую архитектуру НО по всему миру. Были предприняты попытки разделить гены, ассоциированные с развитием НО, на группы в контексте клинической классификации.

Опубликованные данные доказывают наличие различий по частоте и спектру мутаций в причинных генах НО в разных популяциях и этносах и практически в каждом исследовании идентифицируются ранее неописанные патогенные изменения. Генетический и фенотипический спектр заболевания ещё не до конца изучен, и современная классификация имеет место для включения новых генов и клинических симптомов.

У пациентов с НО имеется высокий риск переломов с дальнейшей инвалидизацией, поэтому постановка точного диагноза в кратчайшие сроки и назначение правильного лечения является важной задачей. Известно, что для любого наследственного заболевания постановка окончательного клинического диагноза возможна только после ДНК-диагностики пациента. Поэтому определение первичного генетического дефекта является необходимым условием для разработки оптимальных подходов к ДНК-диагностике НО, повышения эффективности медико-генетического консультирования отягощенных семей с незавершенным остеогенезом, учитывая этнические особенности региона.

Таким образом, изучение генетической архитектуры незавершенного остеогенеза является, актуальной целью исследования, а диссертационная работа Зариповой А.Р. является востребованным научным исследованием, представляющей высокую научно-практическую ценность.

### **Научная новизна исследования и теоретическая значимость работы**

Научная новизна исследования НО представляет собой впервые проведенный поиск и идентификацию патогенных вариантов генов, приводящих к развитию незавершенного остеогенеза, и установке молекулярной причины заболевания у 58,7% исследованных пациентов из Республики Башкортостан. В результате исследования было найдено всего 43 мутации в 14 генах (*COL1A1, COL1A2, IFITM5, P3H1, ERCC4, PTH1R, ALOX12B, ARSB, PLEKHM1, SGMS2, TGFB1, CLCN7, FGF23, LAMB3*): 31 – в генах коллагена I типа (*COL1A1*

и *COL1A2*), что составило 93,9% от всех выявленных патогенных мутаций, 1 – в гене пролил-3-гидроксилазы-1 (*P3H1*), 1 – в гене интерферон индуцированного трансмембранного белка 5 (*IFITM5*) и по одной мутации в генах, не участвующих в патогенезе НО (*ERCC4*, *PTH1R*, *ALOX12B*, *ARSB*, *PLEKHM1*, *SGMS2*, *TGFBI*, *CLCN7*, *FGF23*, *LAMB3*).

8 типов мутаций были идентифицированы в генах *ERCC4*, *PTH1R*, *ALOX12B*, *ARSB*, *PLEKHM1*, *SGMS2*, *TGFBI*, *CLCN7*, которые ранее были описаны в качестве причинных генов таких заболеваний как: остеопетроз, хондродисплазии, ихтиоз кожи, мукаполисахаридоз, атеросклероз, остеопороз и пигментная ксеродерма.

Впервые обнаружена ранее неописанная мутация с.1051G>T (p.Glu351\*) в гене пролил-3-гидроксилазы-1 (*P3H1*) у пациента башкирской этнической принадлежности. В гене *IFITM5* впервые идентифицирована мутация с.-14C>T у трех неродственных пациентов с V типом НО из Республики Башкортостан.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что на сегодняшний день нет точных данных о распространенности заболевания в РФ, есть только отдельные опубликованные статьи, в которых авторы делятся своими расчетами. НО одним из наиболее распространенных скелетных наследственных заболеваний с выраженной клинической вариабельностью и генетической гетерогенностью, молекулярные аспекты которого все еще до конца не раскрыты. Поэтому проведение ДНК-диагностики пациентов с НО необходимо для подтверждения диагноза, установки типа наследования и прогноза течения заболевания у пораженных пациентов, а также для эффективного медико-генетического консультированияотягощенных семей.

### **Научно-практическая значимость работы**

Получены новые данные об уже известных вариантах генов, найдены новые причинные мутации, и авторами была проведена гено-фенотипическая корреляция у пациентов из Республики Башкортостан. Полученные результаты являются актуальными и раскрывают генетическую архитектуру НО, а также вносят вклад в общее представление о молекулярно-генетических основах незавершенного остеогенеза. На основе полученных результатов, создана таргетная NGS панель двух генов коллагена первого типа для диагностики НО, что позволяет проводить более эффективную ДНК диагностику заболевания. Результаты имеют важное практическое значение для повышения эффективности медико-генетического консультированияотягощенных семей с НО в Республике Башкортостан.

## **Обоснованность и достоверность результатов исследования**

Диссертационная работа Зариповой А.Р. выполнена на выборке, которая состояла из 226 человек, среди которых 80 образцов ДНК пациентов с незавершенным остеогенезом из 68 семей и 98 членов их семей, а также 48 образцов ДНК здоровых индивидов без костной патологии. В контрольную выборку включены ДНК 48 человек с нормальным уровнем МПКТ без костной патологии, в основном соответствующие по полу, возрасту и национальности исследуемым пациентам.

Диссертационное исследование Зариповой А.Р. выполнено на высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов молекулярно-генетического исследования (выделение ДНК фенол-хлороформным методом, ПЦР-анализ, массовое параллельное секвенирование (NGS), секвенирование по Сэнгеру), биоинформатических методов анализа с использованием разных предсказательных программ (SIFT, Polyphen2, MutPred, VarSome, EIGEN, FATHMM, PROVEAN, LRT и т.д.) и программ для анализа результатов NGS – секвенирования («VariFind», «NGS Wizard»).

Основные положения и выводы диссертации подтверждаются результатами анализа литературных данных, а также собственных эмпирических данных, полученных диссертантом на репрезентативной выборке пациентов, включающей 226 человек, среди которых 80 образцов ДНК пациентов с незавершенным остеогенезом из 68 семей и 98 членов их семей, а также 48 образцов ДНК здоровых индивидов без костной патологии различной этнической принадлежности (татарской, башкирской, русской и смешанной).

Объём фактического материала проведенного исследования достаточен для обоснования основных научных положений. Все выводы и положения, выносимые на защиту, соответствуют поставленным задачам.

## **Структура работы.**

Диссертационная работа представлена на 189 страницах машинописного текста построена по традиционной схеме и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и выводы, список литературы и приложение. Иллюстративный материал содержит 38 рисунков и 29 таблиц. Список литературы содержит 209 источников, среди них 15 отечественных и 194 зарубежных.

Во «**Введении**» Зарипова А.Р. обозначена актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Сформулированные автором задачи исследования адекватны и соответствуют поставленной цели.

**Обзор литературы** достаточно широко отражает состояние изучаемой проблемы. Материал литературного обзора написан подробно, изложен ясно, хорошо структурирован.

Однако в нем стоит отметить отсутствие информации об алгоритмах и методах генетической диагностики патогенных вариантов, ассоциированных с заболеванием.

**Вторая глава** посвящена материалам и методам, использованным при выполнении диссертационной работы. Автором представлен дизайн исследования, отражающий основные направления работы, хотя из него не ясно в какой степени и зачем проводили обследование членов семей пробандов. В главе присутствует излишнее рекламное описание используемых биоинформатических программ. Скорее следовало бы привести определенные настройки этих программ, которые использовали в работе. Несмотря на это описание методов является вполне достаточным для понимания их сущности с точки зрения обоснованности их дальнейшего применения в соответствии с выполняемыми задачами.

**В третьей главе** изложены полученные результаты, которые обсуждаются в сравнении с данными международных и российских исследований. Результаты изложены четко и ясно. Их обсуждение является достаточным.

В заключении кратко изложены итоги всей проведенной работы, новизна и практическая ценность полученных результатов. Выводы диссертации научно обоснованы, имеют научную и практическую значимость, соответствуют поставленным целям и задачам.

Диссертация изложена хорошим литературным языком, легко читается. Принципиальных замечаний по написанной работе нет.

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

Общие вопросы и замечания о работе:

Существенных недостатков в работе не обнаружено, но имеются отдельные вопросы и замечания:

**Вопросы:**

1. Что Вы думаете о введении генетической классификации несовершенного остеогенеза? Есть ли для этого предпосылки, исходя из результатов Вашей работы?
2. Что Вам известно о протективных вариантах в изученных генах? Если такие варианты есть, то связаны ли они с повышенной твердостью костной ткани?

3. В работе следовало бы отдельно осветить логику использования разных методических подходов для анализа вариантов (Сенгера, различных NGS панелей). Почему от этапа 3 (больших панелей) пришли к таргетному секвенированию двух генов?
4. Что такое «мутации гаплонедостаточности»?

#### **Замечания:**

1. В работе отсутствует информация о решении Этического комитета на данный проект.
2. Есть неудачные фразы (в основном в Главе Материалы и методы), например «Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) необходимо приготовить ПЦР-смесь» (стр. 50), «Необходимый для исследования образец ДНК добавляем в каждую ячейку стрипа отдельно по 1 мкл», «анализировались», «проводилось» и другие
3. В разделе «2.2.8 Критерии оценки клинической значимости изменений нуклеотидной последовательности» следовало бы более кратко привести основные критерии оценки этой значимости, сославшись на методические документы, статьи и рекомендации, при этом отдельно выделить те пункты, которые отличны от этих критериев и предлагаются авторами впервые (если таковые есть).
4. В работе подчеркнуто, что разработанная в завершении исследования панель компанией ООО «Парсек» показала свою высокую чувствительность и специфичность при анализе контрольных образцов с идентифицированными мутациями. Однако информация об этом не приведена.

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

#### **Заключение**

Диссертация Зариповой Алии Рамилевны на тему «Генетическая архитектура незавершенного остеогенеза», представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей 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 её автор Зарипова Алия Рамилевна заслуживает присуждения ученой степени по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

**Официальный оппонент:**

Заведующий отделом геномной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», доктор биологических наук, Глотов Андрей Сергеевич

\_\_\_\_\_ Глотов А.С.  
« 10 » марта 2023 г.

Подпись Глотова Андрея Сергеевича «заверяю»

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»



\_\_\_\_\_ к.м.н. Пачулия Ольга Владимировна

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета 24.1.218.01 по диссертационной работе Зариповой Алии Рамилевны «Генетическая архитектура незавершенного остеогенеза», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

\_\_\_\_\_ Глотов Андрей Сергеевич  
« 10 » марта 2023 г.

**Сведения об официальном оппоненте:**

Место работы: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»;

Адрес места работы: 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3;

Должность: Руководитель отдела геномной медицины;

e-mail: [anglotov@mail.ru](mailto:anglotov@mail.ru);

Телефон: +7 (812) 325-32-20;

Сайт организации: <https://ott.ru/>