

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук,
член-корреспондента РАН, профессора

Зинченко Рены Абульфазовны

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

Незавершенный (несовершенный) остеогенез (НО), является редким наследственным заболеванием соединительной ткани (6-7 на 100 тыс. чел.), в основе которого лежат изменения в нуклеотидной последовательности генов, участвующих в патогенезе заболевания. НО характеризуется выраженной клиническим полиморфизмом с преимущественной склонностью к низкотравматичным переломам костей, снижением плотности костной ткани, деформациям трубчатых костей и грудной клетки. Могут наблюдаться голубые склеры, аномалии дентина, прогрессирующее снижение слуха, низкий рост, гипермобильность суставов. Заболевание может манифестировать в любом возрасте, начиная с внутриутробного периода жизни, наследуется по аутосомно-доминантному, аутосомно-рецессивному и X- сцепленному типам наследования. НО относят к группе гетерогенных заболеваний, известно на настоящий момент 25 генов. Благодаря технологии массового параллельного секвенирования (NGS) расширились знания о генах, которые участвуют в развитии НО, однако поиск новых причинных генов заболевания продолжается, изучается генетическая архитектура НО. Описаны популяционные и этнические различия по частоте и спектру мутаций в генах, вовлеченных в патогенез заболевания, практически в каждом исследовании идентифицируются ранее неописанные патогенные изменения.

В РФ нет официальной статистики по распространенности НО и региональным фенотипическим и генетическим особенностям, имеются разрозненные данные по различным регионам России, поэтому настоящее исследование вносит существенный вклад в изучение не только молекулярного патогенеза заболевания, но и его распространенности. Также актуальна разработка

оптимальных алгоритмов ДНК-диагностики с учетом региональных и этнических особенностей частоты и спектра патогенных изменений, приводящих к развитию заболевания.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Научные положения, а также выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы и подкреплены результатами статистического анализа, выполненного на выборках большого объема. Диссертационная работа Зариповой А.Р. выполнена на большой выборке – 226 человек. Проведённое исследование выполнено на высоком и адекватном поставленным задачам методическом уровне.

Первоначально, исследование было разбито на 4 важных этапа исследования, по результатам которых была создана авторская NGS – панель. Обращает на себя внимание то, что поиск вариантов изменений нуклеотидной последовательности генов, ответственных за развитие НО, осуществлялся на каждом этапе с использованием разной приборной базы для проведения массового параллельного секвенирования. Все полученные результаты валидированы методом «секвенирование по Сэнгеру».

Для работы с полученными результатами молекулярно-генетической диагностики ДНК пациентов из Республики Башкортостан диссертантом использованы различные базы данных, программы для биоинформатического анализа (SIFT, Polyphen2, MutPred, VarSome, dbSNP, Osteogenesis Imperfecta Variant Database, VariFind, NGS Wizard). Все выводы и положения, выносимые на защиту, основаны на статистически достоверных результатах. Нет никаких сомнений в научной значимости и практической ценности проведённого исследования.

Обработка данных диссертационного исследования проводилась с применением широкого спектра генетико-статистических и биоинформатических методов, использующихся в современной генетике.

Научная новизна исследования и теоретическая значимость работы

Поиск патогенных изменений с применением массового параллельного секвенирования у пациентов с НО из Республики Башкортостан выявил 43 мутации в 14 генах (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*, *ERCC4*, *PTH1R*, *ALOX12B*, *ARSB*, *PLEKHM1*, *SGMS2*, *TGFBI*, *CLCN7*, *FGF23*, *LAMB3*), 11 из которых ранее не были

описаны в литературе в качестве генов, вовлеченных в патогенез НО. В результате исследования молекулярный дефект выявлен у 58,7% пациентов с НО. 31 патогенный вариант изменений нуклеотидной последовательности идентифицирован в двух генах коллагена I типа (*COL1A1*, *COL1A2*), из них 10 мутаций описаны впервые. В 93,9% случаев причиной НО выявлены мутации в генах *COL1A1* и *COL1A2*.

Все найденные мутации являются уникальными, кроме трёх: с.3076C>T, с.1265G>C, с.579delT в гене *COL1A1*, каждая из которых идентифицирована в двух неродственных семьях. Выявлен ранее неописанный патогенный вариант изменения нуклеотидной последовательности гена пролил-3-гидроксилазы-1 (*P3H1*) с.1051G>T (p.Glu351*) у пациента башкирской этнической принадлежности. В гене *IFITM5* идентифицирована мутация с.-14C>T у трех неродственных пациентов с V типом НО из Республики Башкортостан. Определен выраженный клинический полиморфизм течения заболевания.

Выявлены 8 мутаций в других генах (*ERCC4*, *PTH1R*, *ALOX12B*, *ARSB*, *PLEKHM1*, *SGMS2*, *TGFBI*, *CLCN7*), ответственных за развитие остеопетроза, хондродисплазии, ихтиоза кожи, мукополисахаридоза, атеросклероза, остеопороза и пигментной ксеродермы.

Научно-практическая значимость работы

Проведенная работа имеет высокую научную и практическую значимость. Результаты исследования расширяют представление о молекулярно-генетических основах незавершенного остеогенеза и являются теоретической и методической основой для разработки регионального научно обоснованного алгоритма ДНК-диагностики, с учетом популяционных особенностей народов, проживающих в РБ. Полученные результаты позволили оптимизировать алгоритм подтверждающей диагностики незавершенного остеогенеза, создана таргетная NGS панель для анализа двух генов коллагена первого типа (*COL1A1* и *COL1A2*), что позволит проводить более эффективную ДНК диагностику заболевания.

С позиции практического здравоохранения полученные результаты позволят улучшить подтверждающую молекулярно-генетическую диагностику пациентам с НО и повысить эффективность медико-генетического консультирования отягощенных семей с НО.

Результаты диссертационного исследования имеют потенциал внедрения в учебно-образовательные программы по подготовке медицинских кадров по дисциплинам медицинская генетика, патофизиология, биохимия и другие дисциплины и могут также быть востребованными на курсах повышения квалификации врачей в рамках непрерывного медицинского образования по специальностям ортопедия, генетика и лабораторная генетика.

Структура работы

Диссертационная работа Зариповой А.Р. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 189 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 38 рисунками и 29 таблицами. Список литературы включает 209 источников, среди них 15 отечественных и 194 зарубежных.

Во **«Введении»** автор определяет актуальность темы исследования, рассматривает степень ее разработанности, ставит цель и формулирует задачи исследования, определяет научную новизну, теоретическую и практическую значимость выполненного исследования, описывает методологию и методы исследования, определяет положения, выносимые на защиту, обосновывает достоверность полученных результатов, представляет сведения об апробации и публикации результатов исследования, характеризует личный вклад в диссертационную работу, структуру и объем диссертации.

«Обзор литературы» составлен полно, логично и даёт представление о современных направлениях изучения незавершенного остеогенеза. Обзор литературы автором рассмотрены современные представления об этиологии и современной классификации НО; всесторонне проанализированы исследования в области генетики НО, в том числе распространенность в разных странах мира; охарактеризованы вопросы клинической вариабельности незавершенного остеогенеза и генетической гетерогенности заболевания. Важно отметить, что освещены современные представления об этиологии и патогенезе НО, использованы литературные источники последних лет.

В главе **«Материалы и методы исследования»** дана подробная характеристика исследуемых групп и критерии включения больных НО и здоровых

лиц. Исследование выполнено на образцах ДНК 226 человек, среди которых: 80 образцов принадлежат пациентам с НО, 98 – членам их семей (всего 68 семей), и 48 образцов ДНК здоровых индивидов без костной патологии и с нормальным уровнем МПКТ, соответствующих по полу, возрасту и национальности исследуемым группам пациентов. Этнический состав выборки: русские – 50% (34/68); татары – 41,1% (28/68); башкиры – 10,2% (7/68); марийцы – 2,9% (2/68); таджики – 4,4% (3/68); метисы – 8,8% (6/68). Описаны сведения о примененных в работе методов исследования, включая анкетирование, молекулярно-генетические методы, дизайн исследования, методы генетико-статистического и биоинформатического анализа.

В главе «**Результаты и обсуждения**» представлены полученные результаты, проведенного соискателем исследования, анализ и обсуждение выявленных вариантов изменений нуклеотидной последовательности целевых генов. Глава написана очень подробно, разделена на несколько подглав. В результате проведенных исследований идентифицированы 43 патогенных изменения в 14 генах у пациентов с НО из Республики Башкортостан. Из них 19 типов мутаций выявлены в гене *COL1A1*, 12 мутаций - в гене *COL1A2*, по одному патогенному изменению в генах *IFITM5*, *P3H1*, вовлеченных в патогенез НО, и по одному - в генах *ERCC4*, *PTH1R*, *ALOX12B*, *ARSB*, *PLEKHM1*, *SGMS2*, *TGFB1*, *CLCN7*, *FGF23*, *LAMB3*, ранее неописанных в качестве причинных генов НО.

Определен спектр мутаций, определена их частота, результаты валидированы с использованием секвенирования по Сэнгеру, проведен поиск выявленных изменений у членов семей пациентов с НО. Проведен гено-фенотипический анализ и определены типы наследования в каждой семье.

У пациентов с НО из Республики Башкортостан обнаружен уникальный спектр мутаций, идентифицированы 11 ранее неописанных патогенных изменений в генах, ответственных за развитие заболевания. Обнаружены сочетанные варианты мутаций, влияющие на клиническое проявление НО, что осложняет определение типа заболевания, а большое количество мутаций *de novo* – медико-генетическое консультированиеотягощенных семей.

В разделе «**Заключение**» соискатель обобщает основные результаты проведенного исследования, ключевые положения диссертационной работы изложены в полном объеме.

«**Выводы**» следуют из полученных результатов, вполне обоснованы, логичны, четко сформулированы и соответствуют поставленной цели и задачам исследования.

Автореферат диссертации полностью соответствует тексту диссертации и отражает все основные разделы работы, результаты и выводы.

Результаты работы докладывались на международных и всероссийских научных конференциях. Основные результаты диссертационного исследования полностью опубликованы в 17 печатных работах, в том числе в 7 статьях в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ для защиты диссертаций, 3 из которых индексируются в международных базах Scopus и Web of Science.

Общие вопросы и замечания о работе:

Существенных недостатков в работе не обнаружено, но имеются отдельные вопросы и замечания. К замечаниям я бы отнесла:

Я не увидела отдельно выделенного раздела «Применение научных результатов и выводов» в конце диссертации, который рекомендуется ВАК МОН РФ для диссертаций на соискание степени биологических наук, хотя в разделе «Введение» есть данный подраздел «Научно-практическая значимость работы». В автореферате не представлен этнический состав рассматриваемой выборки. В диссертации этот раздел подробно описан.

Вопросы

1. У 7 пациентов также выявлены мутации в гетерозиготном состоянии в 8 генах *CLCN7*, *ALOX12B*, *PLEKHM1*, *ERCC4*, *ARSB*, *PTH1R*, *TGFB1*, *SGMS2*, которые вовлечены в патогенез других заболеваний. Какие это заболевания, и были ли клинические проявления этих болезней.

Высказанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общую оценку проделанной диссертантом работы и научной ценности диссертации.

Заключение

Диссертационное исследование Зариповой Алии Рамилевны «Генетическая архитектура незавершенного остеогенеза», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки), является законченной, самостоятельной научно-классификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи и ценные научно-практические сведения, имеющие важное значение для медицинской генетики.

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 (в редакции с изменениями от 11.09.2021 №1539), а её автор Зарипова Алия Рамилевна заслуживает присуждения ученой степени по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Официальный оппонент:

Заместитель директора по научно-клинической работе,
заведующая лабораторией генетической эпидемиологии,
заведующая кафедрой Организации здравоохранения,
общественного здоровья и медико-генетического
мониторинга ФГБНУ «Медико-генетический научный
центр имени академика Н.П. Бочкова»,
Заслуженный деятель науки Российской Федерации,
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук (1.5.7. Генетика)

профессор Зинченко Рена Абульфазовна

« 06 » марта 2023 г.

Личную подпись Р.А. Зинченко
ЗАВЕРЯЮ
Ученый секретарь ФГБНУ «МГНЦ»
Воронина Е.С. Е.С. Воронина



Согласна 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).

Зинченко Рена Абульфазовна