

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Пчелиной Софьи Николаевны на диссертационную работу Яковлевой Александры Еремеевны «Молекулярно-генетический анализ множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7.– генетика

Актуальность темы исследования

Множественная экзостозная хондродисплазия (МЭХД) является достаточно распространенным аутосомно-доминантным заболеванием с частотой 1:50000. Характеризуется генерализованными формами поражения скелета с многочисленными прогрессирующими деформациями костей и суставов, укорочением и вторичными изменениями костей, которые существенно влияют на жизнь больного. Распространенность заболевания среди пациентов ортопедического профиля составляет 1 на 7000 больных.

Причиной развития заболевания являются мутации в генах *EXT1* и *EXT2*, кодирующих гликозилтрансферазы, участвующие в удлинении цепи гепарансульфатов, важной структуры внеклеточного матрикса.

Актуальность исследования обусловлена отсутствием работ по анализу спектра мутаций данных генов среди этнической группы якутов, а также повышенной распространенностью заболевания, а Якутии. Последнее может быть обусловлено этнической специфичностью населения Якутии, однако, подробные эпидемиологические исследования распространенности не проводились. Разработка алгоритма выявления мутаций в генах *EXT1* и *EXT2* необходима для оптимизации молекулярной диагностики данного заболевания в регионе. Описание гено-фенотипических особенностей при МЭХД также актуально для прогноза клинического течения данного заболевания.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Яковлевой А.Е. состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения и выводов, изложена на 206 страницах, содержит 33 таблицы, 36 иллюстраций и 9 приложений. Список литературы включает 227 источников, из них 81 отечественных и 128 зарубежных авторов, а также 18 интернет ресурсов.

Во введении автором обозначены актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Сформулированные автором задачи исследования адекватны и соответствуют поставленной цели,

а именно проведению клинико-эпидемиологического и молекулярно-генетического изучения МЭХД в Якутии.

Обзор литературы написан ясным научным языком. Включает описание этноспецифического генетического разнообразия Якутов. Приведен список наследственных заболеваний (Таблица 1), частота которых повышена у якутов в несколько раз. Например, болезни экспансии, спиноцеребральная атаксия I типа, миотоническая дистрофия, а также нейрональный липофусциноз 6 типа, наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия и др. Приводится описание патогенеза наследственных заболеваний скелета в целом, и более подробно МЭХД. Также достаточно подробно разбираются молекулярно-генетические основы развития МЭХД. Описан большой спектр мутаций в генах *EXT1* и *EXT2*. Украшает литературный обзор описание структуры и функции белков *EXT1* и *EXT2*. Отмечается, что данные трансмембранные белки работают в комплексе *EXT1/EXT2*, где белок *EXT1* выполняет главную каталитическую функцию, а белок *EXT2* играет структурную или вспомогательную роль. Обсуждается, что вероятно данный факт может объяснять более тяжелый фенотип МЭХД у носителей мутаций в гене *EXT1*.

В главе «Материалы и методы исследования» подробно описаны все экспериментальные методы исследования. В работе использованы современные молекулярно-генетические методы, такие как полноэкзомное секвенирование на основе метода массового параллельного секвенирования и секвенирование по Сэнгеру. Всего в исследование было включено 41 семья с МЭХД, включающая 85 пациентов с МЭХД и 11 здоровых членов их семей. Из данной выборки биоматериал для проведения молекулярно-генетических исследований был доступен от 57 пациентов с МЭХД из 31ой семьи.

В главе «Результаты» приводится подробное описание полученных результатов. Особенно хочется отметить логичность запланированных исследований и их тщательное выполнение. Так, в работе проведено как ретроспективное исследование, включающее изучение карт больных с МЭХД и отбор пациентов с клинически -верифицированным диагнозом, обширный клинико-генеалогический анализ, позволивший выделить семейные случаи МЭХД, молекулярно-генетическое исследование образцов ДНК пробандов и членов их семей, а также сопоставление фенотипических особенностей заболевания в группах сравнения (исследование по типу «случай-контроль», которое позволило выявить гено-фенотипические корреляции.

Хочется подчеркнуть, что работа в целом представляет грамотно спланированное классическое клинико-эпидемиологическое и молекулярно-генетическое обследование наследственной патологии. Тщательность проведения исследования позволила не только охарактеризовать спектр

мутаций в генах *EXT1* и *EXT2*, но также выявить гено-фенотипические корреляции.

В результате исследования выявлено 8 патогенных вариантов в гене *EXT1*, три из которых ранее не описанные, и 2 патогенных варианта в гене *EXT2*, которые оказались мажорными для якутских семей с МЭХД. Для подтверждения вновь выявленных мутаций в гене *EXT1* патогенность выявленных вариантов была проверена с использованием различных программ, также была проверена консервативность нуклеотидной последовательности данных сайтов в эволюционном ряду.

В результате примененного алгоритма мутации в гене *EXT1* выявлены в 9 семьях и мутации в гене *EXT2* – в 16, что в сумме составляет 80,6%.

В заключении автор подводит итог всех исследований и резюмирует ключевые положения диссертационной работы.

Выводы диссертационного исследования соответствуют поставленным целям и задачам.

Автореферат отражает основные результаты выполненной диссертационной работы.

Научная новизна исследования

Новизна исследования связана как с получением новых эпидемиологических данных по распространению МЭХД, так и в описании спектра мутаций при данном заболевании и разработке алгоритма обследования лиц с подозрением на МЭХД. Так, установлено, что заболевание в основном встречается среди якутского населения с частотой 15,0 на 100 тыс. якутов с существенным накоплением в отдельных улусах (Абыйский (1:1771), Кобяйский (1:1050), Виллойский (1:1775) и Сунтарский (1:1525)), что в 2 и более раза выше, чем в общеевропейской популяции и регионах России.

Показано, что мутации в гене *EXT2* *c.310delA* (*p.Ile104fs*8*) и *c.751C>T* (*p.Gln251**) являются мажорными среди популяции якутов. Мутация *c.310delA* выявлена в 12 семьях и мутация *c.751C>T* выявлена в 4х семьях. Показано также более тяжелое течение заболевания (с учетом места локализации экзостозов, а также ограниченности подвижности нижних и верхних конечностей, частоты хирургических вмешательств) у пациентов с мутацией *c.310delA*. Описание трех новых мутаций в гене *EXT1* (*c.970delT* (*p.Tyr324Phefs*35*), *c.1003delC* (*p.Leu335Trpfs*24*), *c.1703_1713delCGGTGCTTTCA* (*p.Thr568Asnfs*16*)) расширило представление о спектре мутаций в данном гене при МЭХД.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования

Результаты диссертационного исследования Яковлевой А.Е. существенно расширяют представления как о распространенности МЭХД в Якутии, так и о молекулярно-генетических основах развития МЭХД в данном регионе. Предложенный алгоритм молекулярной диагностики МЭХД, а также выявленные особенности клинического течения заболевания у носителей патогенного варианта в гене следует использовать в клинической практике при проведении обследования пациентов с подозрением на МЭХД.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Диссертационная работа Яковлевой А.Е. выполнена на высоком методическом уровне. Высокая степень достоверности и обоснованности выводов, а также основных результатов диссертационной работы обусловлена разнообразием и адекватностью использованных подходов и логичностью построения данного исследования. Все выявленные варианты в генах *EXT1* и *EXT2* были выявлены или подтверждены методом Сэнгера. Тщательно описаны клинические варианты МЭХД с учетом количества экзостозов, частоты ограниченности подвижности нижних и верхних конечностей.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

По материалам диссертационного исследования опубликовано 13 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации. Александра Еремеевна является первым автором в данных публикациях.

Вопросы и замечания

1. Положение 4 выносимое на защиту «Разработан и внедрен в практику медико-генетического консультирования алгоритм подтверждающей молекулярно-генетической диагностики частых мутаций с.310delA (p.Ile104fs*8) и с.751C>T (p.Gln251*) в гене *EXT2*, позволяющий определить генетическую причину заболевания у 64,0% пробандов» - верно в первой части. Во второй, очевидна неточность формулировки. Мажорные мутации в гене *EXT2* выявлены в 16 семьях из 31ой, то есть примерно, в половине, включенных в исследование семей (51,6%). Автор, видимо, имел в виду, что данные мажорные мутации в гене *EXT2* составляют 64,0% среди всех выявленных мутаций. Следует

- также отметить, что поскольку обе мутации были выявлены только у якутов, интересно узнать какой процент в спектре мутаций, выявленных в якутских семьях, они составляют. К сожалению, не удалось найти в тексте диссертации данные о том, сколько из 31 семей, включенных в исследование было якутских. Вопрос – какой процент мутантных аллелей приходится на данные мутации в якутских семьях?
2. Неверно используется в тексте слово «верификация» (Рис. 14), что затрудняет восприятие текста. Верификация результатов МПС методом секвенирования по Сэнгеру синонимична подтверждению варианта, обнаруженного в данном образце. Если был один образец на МПС, то верификация возможна именно этого образца. В остальных образцах ДНК от других пробандов проводили скрининг выявленного варианта методом Сэнгера. В данном контексте это не верификация варианта, а идентификация.
 3. В обзоре литературы приведены данные о более выраженном проявлении МЭХД при наличии мутаций в гене *EXT1* по сравнению с пациентами с мутациями в гене *EXT2*. Как объяснить отсутствие разницы в клиническом проявлении заболевания при наличии мутаций в гене *EXT1* и *EXT2* в настоящем исследовании. И были ли выявлены отличия в клинической картине МЭХД при сопоставлении отдельно клинических характеристик с мутацией с.310delA (более выраженный клинический фенотип по сравнению со всеми остальными пробандами) и отдельно группой пациентов с мутациями в гене *EXT1*?
 4. Существуют неточности формулировок. Например, стр. 141 «Хирургическое лечение проведено больше у больных с мутацией в гене *EXT2*. Можно предположить, что имеется статистически значимое увеличение количества хирургических вмешательств в группе носителей мутацией в гене *EXT2*, по сравнению с носителями мутаций в гене *EXT1*.

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

Заключение

Диссертационная работа Яковлевой Александры Еремеевны «Молекулярно-генетический анализ множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии» по специальности 1.5.7. – генетика, является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей важное значение для биологической науки в целом, и для медико-генетического консультирования

в частности, а именно, выявление молекулярно-генетических основ развития множественной экзостозной хондродисплазии в Якутии. Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-14, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. № 842 (в редакции с изменениями и дополнениями от 30 июля 2014 г., 21 апреля, 2 августа 2016 г., 29 мая, 28 августа 2017 г., 1 октября 2018 г., 20 марта, 11 сентября 2021 г.), а ее автор – Яковлева Александра Еремеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика.

Официальный оппонент:

Руководитель отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий НИЦ Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, доктор биологических наук (специальность 03.02.07 – генетика).



Пчелина Софья Николаевна

« 08 » мая 2024 г.

Подпись Пчелиной Софьи Николаевны заверяю: _____

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор Беженарь Виталий Федорович



Беженарь Виталий Федорович

« 08 » 05 2024 г.