

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Фоновой Елизаветы Алексеевны

«Модифицирующий эффект инактивации X-хромосомы

на проявление несбалансированных хромосомных вариантов при нарушении репродукции у человека», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7 Генетика.

Актуальность темы исследования

Диссертационное исследование Е.А. Фоновой посвящено актуальной современной проблеме биологии, генетики и медицины – изучению эпигенетической инактивации X-хромосомы и его влияния на проявление вариаций числа копий при нарушении репродукции у человека». Актуальность темы исследования в значительной мере связана с высокой частотой нарушений фертильности (бесплодия и невынашивания беременности), в значительной части которых причина остается не установленной (неясного генеза).

Современные знания свидетельствуют о существенном вкладе генетических (хромосомных аномалий, патогенных вариаций числа копий (CNV) и вариантов нуклеотидной последовательности), а также ряда эпигенетических факторов в этиологию нарушений репродукции человека, гаметогенеза и эмбрионального развития, потерь беременности на ранних сроках развития. Одним из эпигенетических факторов является инактивация X-хромосомы или лайонизация, которая существенно влияет на экспрессию X-сцепленных генов и выраженность, определяемых ими признаков и заболеваний. Модифицирующее влияние лайонизации наглядно показано у женщин-носительниц X-аутосомных, X-Y транслокаций и других структурных аномалий X-хромосомы. Первичное нарушение лайонизации может быть обусловлено мутациями генов *XIST* и *XACT*, играющими ключевую роль в процессе X-инактивации. Выборочная (преимущественная, ассиметричная или пропущенная) инактивация X-хромосомы (sXCI) отмечается у части пациенток с нарушением фертильности, имеющих нормальный женский кариотип и у части абортусов (46,XX) при самопроизвольно прервавшихся беременностях и встречается чаще, чем у фертильных женщин и женщин из общей популяции. Это предполагает и связь лайонизации с структурными аномалиями и

генными вариантами X-хромосомы, и патогенными CNV, эпигенетическое влияние на проявление X-сцепленных заболеваний и фенотипических признаков. Однако причины и механизмы влияния многих генетических и эпигенетических факторов на фертильность, гаметогенез, эмбриогенез и развитие плода недостаточно изучены.

Степень обоснованности научных положений и выводов, достоверность полученных результатов

Результаты диссертационной работы Е.А. Фоновой основываются на адекватном методологическом подходе к планированию и проведению исследования. В своем исследовании автор поставил четкую конкретную цель и сформулировал соответствующие адекватные ей задачи, для решения которых был использован целый комплекс современных методов.

Диссертационное исследование проведено на репрезентативной выборке (448 женщин, 158 абортусов). Работа выполнена с помощью комплекса клинических, цитогенетических, молекулярно-цитогенетических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов, включая высокоразрешающие методы исследования генома (массовое параллельное секвенирование, бисульфитное секвенирование, хромосомный микроматричный анализ, ПЦР в реальном времени, MLPA и др.). Для обработки полученных данных использованы адекватные методы статистического анализа.

Результаты, полученные автором, достоверны и научно значимы. Положения и выводы диссертационного исследования основываются на оригинальных данных и подтверждаются статистическим анализом, объективно обоснованы, достоверны, базируются на полученных автором конкретных результатах и выявленных закономерностях, соответствуют поставленным задачам. Диссертационная работа иллюстрирована большим количеством рисунков и таблиц.

Научная новизна исследования

В диссертационной работе Е.А. Фоновой наглядно показано модифицирующее влияние характера инактивации X-хромосомы на проявление X-сцепленных вариаций числа копий на примере невынашивания беременности.

Показано, что преимущественная X-инактивация значительно чаще встречается у женщин с привычным невынашиванием беременности (6,7%), чем у фертильных женщин (2,2%), и обнаружена у 7,4% спонтанных абортусов и не выявлена в материале беременностей, прерванных по желанию.

У женщин с привычным невынашиванием беременности, имеющих выборочную инактивацию X-хромосомы, обнаружена высокая частота (30%) носительства X-сцепленных CNV. Выявлены вариаций числа копий в локусах Xp11.23, Xq24, Xq28, содержащих гены, связанные с нарушением интеллектуального развития, которые также могут быть связаны с нарушением фертильности. Установлено, что CNV, обнаруженные при невынашивании беременности обогащены генами, вовлеченными в контроль пролиферации и жизнеспособности клеток. Выявлен низкий уровень метилирования CpG-сайтов внутри региона микроделений X-хромосомы. Впервые проведено секвенирование генов *XIST* и *XACT* у женщин с преимущественной X-инактивацией, описан спектр их вариантов, не обнаружено их патогенных вариантов.

Значимость для науки и практики

Диссертационная работа Е.А. Фоновой несомненно имеет как фундаментально-теоретическую и практическую значимость. Полученные сведения о частоте преимущественной X-инактивации и носительстве X-сцепленных CNV у женщин и абортусов, модифицирующем влиянии лайонизации на X-сцепленные мутации и генетические варианты. Полученные в работе сведения будут использованы для медико-генетического обследования и консультирования, в частности в диагностике некоторых форм нарушений репродукции (бесплодия, невынашивания беременности, повторных неудач программ экстракорпорального оплодотворения), при планировании беременности у супружеских пар и пациенток с нарушением фертильности, носительстве X-сцепленных мутаций, а также в профилактике наследственных заболеваний – в пренатальной диагностике и преимплантационном генетическом тестировании. Несомненным достоинством является разработанный алгоритм детекции X-сцепленных CNV у женщин с привычным невынашиванием. Наглядным примером является его успешное применение на практике в двух случаях преимплантационного генетического тестирования эмбрионов у женщин-носительниц микроделений в локусе Xq24, связанных с синдромом Насименто.

Результаты, полученные в работе, также могут быть использованы в образовательном процессе при подготовке врачей, студентов, клинических ординаторов, аспирантов медицинских и биологических вузов и слушателей курсов повышения квалификации по специальности «генетика» и «лабораторная генетика», специалистов в области репродуктивной медицины и вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа объемом 137 машинописных листов построена по традиционному плану и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение собственных результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы и приложение. Работа иллюстрирована 22 рисунками, содержит 12 таблиц в основной части и 1 таблицы в приложении. Список использованной литературы содержит 177 источников, из них 18 – отечественных и 159 – зарубежных. Автореферат диссертации отражает основное содержание диссертационной работы.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

Результаты диссертационного исследования представлены в 13 печатных работах, в том числе в 6 статьях в журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний по содержанию диссертационной работы Е.А. Фоновой нет, но есть несущественные недочеты, некоторые неточности:

В тексте диссертации присутствует большое количество опечаток, ошибок согласования и стилистически неудачных выражений.

«...процесс инактивации X-хромосомы не импринтируется ...», «окрашивание преимплантационных эмбрионов», «дистальная трисомия 8q», «транслокация «X-аутосома»», «общий интеллект», «вариабельная экспрессия фенотипа», «плейотропизм клинической картины X-сцепленных вариантов», «переменная экспрессивность», «традиционный цитогенетический анализ», «дистальное короткое плечо X-хромосомы», «пораженные люди», «верификация клинического

полиморфизма», «полиморфизм отдельных нуклеотидов», «семейный анализ характера sXCI», «реципрокная делеция», «...женщины носительницы всегда были здоровы...», «общий метаболизм клетки», «бессмысленная мРНК», «повсеместное расстройство развития»? «семейный материал» и др.

Страницы 22-28 повторены в тексте диссертации 2 раза (между страницами 28 и 29).

В списке литературы повторно приведена одна зарубежная статьи (91 – 92), таким образом использованы не 177, а 176.

Не все аббревиатуры приведены в сокращениях и/или не расшифрованы в тексте по месту цитирования (например, CII, XLMR, GWAS).

При прочтении диссертационной работы возникает вопрос, чем обусловлен выбор в качестве критического значения X-инактивации $\geq 90\%$. Имеет ли смысл использовать менее строгий критерий в отборе пациенток с привычным невынашиванием, например, уровень выборочной инактивации одной из X-хромосом в 80% или 85% клетках?

Существенная часть выявленных вариаций числа копий обнаружены в дистальных участках короткого и длинного плеча X-хромосомы. Так, у пациенток с невынашиванием и фертильных женщин обнаружены микродупликации в регионах Xp23.33 и Xq28 (в области нормальной X-Y рекомбинации – псевдоаутосомных регионах. При этом гены региона PAR1 не подвержены X-инактивации, а гены в регионе PAR2 – подвержены инактивации как на X-хромосоме, так и на Y-хромосоме. Это требует пояснения.

Может ли собственно избирательная X-инактивация у женщин без наличия CNV, мутаций в генах, контролирующих инактивацию или эмбриолетальных X-сцепленных вариантов у эмбриона/плода, влиять на женскую фертильность и вынашивание беременности?

Однако высказанные замечания в основном касаются оформления работы и не снижают общую высокую оценку работы, а вопросы носят дискуссионный характер и подчеркивают интерес к ней.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Е.А. Фоновой содержит решение актуальной научной задачи – определение влияния инактивации X-хромосомы на

проявление несбалансированных хромосомных вариантов при нарушениях репродукции человека. По своей актуальности, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности и новизне полученных результатов, их значимости для науки и практики, полноте опубликованных материалов диссертационное исследование Е.А. Фоновой «Модифицирующий эффект инактивации X-хромосомы на проявление несбалансированных хромосомных вариантов при нарушении репродукции у человека», является законченной научно-квалификационной работой и соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 25 января 2024 г), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Фонова Елизавета Алексеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7 Генетика (Медицинские науки).

08.05.2024

Заведующий лабораторией

генетики нарушений репродукции

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр

имени академика Н.П. Бочкова»

доктор медицинских наук

по специальности 1.5.7 – Генетика

Москва, ул. Москворечье, дом 1,

mgnc@med-gen.ru

Тел. +7 (499) 612-86-07

Подпись В.Б. Черных

Ученый секретарь ФГБНУ «МГНЦ» к.м.н.



В.Б. Черных



Е.С. Воронина