

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Данильченко Валерии Юрьевны

«Анализ генетического контроля наследственной потери слуха в популяциях ряда регионов Сибири», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика

Актуальной медико-социальной проблемой является потеря слуха, вызываемая как средовыми, так и генетическими факторами, которыми обусловлено около половины всех случаев врожденной (или раннего проявления) глухоты. Несиндромальная (изолированная) наследственная глухота, является моногенным заболеванием, характеризуется уникальной генетической гетерогенностью: уже картировано около 160 локусов и идентифицировано не менее 120 генов, ассоциированных с потерей слуха. На долю мутаций в генах *GJB2* и *SLC26A4* приходится наиболее значимый вклад в этиологическую структуру потери слуха во многих популяциях мира. Актуальной и важной задачей медицинской генетики является молекулярно-генетический анализ случаев наследственной глухоты, этиология которой после тестирования наиболее значимых «генов глухоты» остается неясной. В последнее время для решения этой проблемы применяются новейшие методы геномных исследований (NGS), в частности, полноэкзомное секвенирование (WES).

Актуальность темы диссертации, новизна

Диссертационная работа Данильченко Валерии Юрьевны посвящена изучению молекулярно-генетических причин наследственной потери слуха и её распространённости у коренных жителей Республик Тыва и Алтай.

Получен ряд важных новых результатов о генетическом контроле нарушений слуха. Впервые получена оценка вклада мутаций гена *SLC26A4* в этиологию потери слуха у пациентов с потерей слуха из Республик Тыва и Алтай. Выявлен ряд уже известных патогенных вариантов, новый вариант с.1545T>G, для которого получены свидетельства его патогенности, а также как известные, так и новые полиморфные варианты этого гена. При помощи полноэкзомного секвенирования у алтайских пациентов были обнаружены новые неописанные ранее патогенные варианты с.1111G>C в гене *OTOF* и с.5254G>A в гене *RAI1*, ассоциация которого с потерей слуха установлена впервые.

Автором была выявлена доля генетических форм потери слуха в исследуемых выборках тувинцев (28.2% – мутации гена *SLC26A4*) и алтайцев (19.4% – мутации гены *SLC26A4*, *RAI1*, *OTOF*). Суммарно, с учетом полученных ранее данных (ген *GJB2*), молекулярно-генетический диагноз может быть установлен для значительной части обследованных пациентов (50.5% – у

тувинцев и 34.5% – у алтайцев). Кроме того, полученная автором информация может быть использована для разработки регион-специфичной ДНК-диагностики потери слуха в изучаемых регионах.

Структура диссертации

Диссертация построена по классическому типу, изложена на 145 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, который включает 284 источника, и приложений. В работе 15 таблиц, 21 рисунок и 4 приложения.

В разделе «Введение» обосновывается актуальность исследования, отражены цель и задачи работы, излагаются научная новизна, теоретическая и практическая значимость диссертации, четко сформулированы основные положения, выносимые на защиту, показана степень достоверности и приведена информация об апробации результатов работы. Отражены сведения о структуре диссертации, личный вклад и список работ автора, опубликованных по теме данного исследования.

Глава «Обзор литературы» охватывает различные аспекты изучаемой проблемы и состоит из нескольких разделов. В первой части автор описывает генетическую гетерогенность наследственной потери слуха, что, в свою очередь, отражает актуальную медико-генетическую проблему диагностики - «много генов - один фенотип». Далее приведен один из современных методов молекулярной диагностики - полноэкзомное секвенирование и кратко описаны основные стратегии идентификации генов при использовании этого метода. Вторая часть обзора посвящена описанию спектра генов, ассоциированных с потерей слуха, приведена информация об основных мутациях и их роли в распространенности наследственной потери слуха. В заключительной части обзора приведены данные об исследованиях наследственной потери слуха в различных популяциях Сибири.

В главе «Материалы и методы» дана информация об исследуемых выборках пациентов с потерей слуха и о контрольных выборках коренного населения Тувы и Алтая (тувинцы и алтайцы), описаны экспериментальные молекулярно-генетические методы (ПЦР, ПЦР-ПДРФ, секвенирование по Сэнгеру, полноэкзомное секвенирование, фрагментный анализ), используемые биоинформатические и статистические методы.

Глава «Результаты и обсуждение» содержит четыре части, в которых представлены результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, и их обсуждение. Изложение результатов выстроено логично, соответствует поставленным цели и задачам.

Первый раздел посвящен результатам, полученным при исследовании гена *SLC26A4*. Автором проведен биоинформатический анализ данных о

вариабельности этого гена из базы Deafness Variation Database и разработана оптимальная стратегия поиска патогенных вариантов в этом гене; представлены результаты молекулярно-генетического анализа гена *SLC26A4* у тувинских и алтайских пациентов; оценена частота гетерозиготного носительства наиболее часто встречающихся рецессивных патогенетических *SLC26A4*-вариантов у коренных жителей исследуемых регионов. Были выявлены значительные различия, как во вкладе гена *SLC26A4* в этиологию потери слуха (у тувинцев - 28.2%, у алтайцев - 4.3%), так и в спектре обнаруженных патогенетических вариантов, сегрегация которых с патологией слуха хорошо проиллюстрирована в родословных пациентов (Приложение 1). Проведен анализ распространения мутантных аллелей с.919-2A>G, с.2027T>A и с.1545T>G по территории Республики Тыва на основе мест рождения их носителей.

Интересным клиническим наблюдением является обнаружение (с помощью компьютерной томографии височной области) расширенного водопровода преддверия (EVA, Enlarged vestibular aqueduct) у большинства тувинских пациентов, гомозиготных или компаунд-гетерозиготных по мутациям гена *SLC26A4*, что соответствует литературным данным о наличии аномалий структур органа слуха у пациентов с патогенетическими вариантами этого гена.

Помимо уже известных мутаций в гене *SLC26A4*, был обнаружен новый вариант с.1545T>G и получен ряд доказательств в пользу его патогенности. В результате исследования была выявлена высокая частота варианта с.919-2A>G у тувинских пациентов (69.3%) и высокая частота гетерозиготного носительства этого варианта (5.1%) у слышащих индивидуумов в контрольной группе коренных жителей Республики Тыва. Автор сопоставила полученные данные с уже имеющейся информацией о распространенности варианта с.919-2A>G у индивидуумов с потерей слуха в различных регионах мира, для чего было проанализировано 1883 научные публикации и выбрано из них 57 ключевых статей, где имелась необходимая для анализа информация. Оказалось, что частота варианта с.919-2A>G у тувинских пациентов - одна из самых высоких в мире. Автором была выдвинута гипотеза о ведущей роли эффекта основателя в распространенности с.919-2A>G у тувинцев. Для проверки этой гипотезы было проведено генотипирование STR- и SNP-маркёров, фланкирующих с.919-2A>G, и получены данные о схожести гаплотипов, включающих с.919-2A>G, у носителей этой мутации в Республике Тыва. Полученные данные подтверждают гипотезу о ведущей роли эффекта основателя в широкой распространенности с.919-2A>G в изучаемом регионе.

Второй раздел посвящен результатам поиска генов, проведенного методом полноэкзомного секвенирования у пациентов из Республики Алтай (три большие алтайские семьи с рецессивным типом наследования потери слуха). В итоге

были обнаружены два новых варианта, сегрегирующих в гомозиготном состоянии с потерей слуха в этих семьях: с.1111G>C в гене *OTOF* и с.5254G>A в гене *RAI1*. Интересным является находка варианта в гене *RAI1*, который кодирует транскрипционный фактор. Ассоциация этого гена с изолированной потерей слуха в диссертационной работе Данильченко В.Ю. показана впервые. В исследовании удалось показать вклад мутации с.5254G>A в гене *RAI1* в этиологию потери слуха у алтайцев (10.8%), а в популяционной выборке алтайцев - оценить частоту гетерозиготного носительства мутации с.5254G>A (3.3%). Помимо этого, в исследовании Данильченко В.Ю. было проведено секвенирование всей кодирующей области гена *RAI1* у носителей варианта с.5254G>A и было обнаружено, что они являются носителями одного и того же гаплотипа. Новый вариант с.1111G>C в гене *OTOF*, который уже был известен в ассоциации с потерей слуха, обнаружен только у алтайских пациентов, и его вклад в этиологию потери слуха у алтайцев составил 4.3%. У тувинских пациентов варианты с.1111G>C (*OTOF*) и с.5254G>A (*RAI1*) не были обнаружены. Проанализировав места рождения индивидуумов с вариантами с.1111G>C (*OTOF*) и с.5254G>A (*RAI1*), автор графически показала распространение этих вариантов по территории Республики Алтай и установила их локальное распределение в отдельных районах республики.

Третий раздел посвящен скринингу варианта m.1555A>G митохондриальной ДНК у тувинских и алтайских больных, но этот вариант не был обнаружен.

Четвертый раздел является заключительным и включает в себя все полученные результаты о спектре патогенных вариантов исследуемых генов, обнаруженных у обследованных пациентов, и их вклад в этиологию наследственной потери слуха. Автор заключает, что, с учетом ранее полученных данных (ген *GJB2*), молекулярно-генетический диагноз может быть установлен для значительной части обследованных пациентов, а именно: для 50.5% тувинцев и для 34.5% алтайцев. На основе своих данных автором сформулированы рекомендации для создания регион-специфичной ДНК-диагностики потери слуха в изучаемых регионах.

Все полученные результаты резюмированы в «Заключении». Выводы обоснованы, хорошо аргументированы и соответствуют поставленным задачам.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями и соответствует тексту диссертации. Результаты исследования опубликованы в 7 статьях в рецензируемых научных журналах, в 1-ой главе в монографии и представлены на международных конференциях.

Принципиальных замечаний нет. Одно замечание семантического свойства. Автор употребляет термины «патогенный» и «патогенетический» как синонимы, что представляется не вполне корректным с медицинской точки

зрения. В контексте этой диссертационной работы более оправданным было бы употребление термина «патогенный» в отношении вариантов нуклеотидной последовательности. И один уточняющий вопрос: как проверяли принадлежность мутаций разным аллелям при компаунд-гетерозиготном состоянии?

Заключение

Диссертация Данильченко В.Ю. «Анализ генетического контроля наследственной потери слуха в популяциях ряда регионов Сибири», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельным, законченным научным исследованием, обладающим высоким уровнем научной новизны. Таким образом, диссертационная работа Данильченко В.Ю. полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции Постановлений Правительства РФ 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, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ от 26.05.2020 № 751), предъявленным к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Данильченко В.Ю., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика.

Официальный оппонент

Максимова Юлия Владимировна
доктор медицинских наук,
профессор, заведующая
кафедрой медицинской генетики и
биологии, Новосибирский
государственный медицинский
университет, ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России
тел.: +7 (383) 226 55 10
e-mail: 164706@mail.ru

