

ВІДГУК
офіційного опонента

на дисертаційну роботу **ДМИТРУК Ірини Михайлівни** ”**Алельний поліморфізм генів задіяних в процесах метилування ДНК в осіб підвищеного ризику виникнення мутацій *de novo***”,

представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Актуальність теми дисертації.

Відомо, що поява мутацій *de novo* є причиною розвитку деяких спадкових захворювань, зокрема ахондроплазії та гіпохондроплазії, а також окремих форм онкологічних захворювань. У зв'язку з цим доцільно визначити механізми розвитку таких мутацій та факторів, що сприяють їх появі. В своїй роботі дисертант виходив з положення, що мутації в геномі людини найчастіше розвиваються в генах, що містять в своїй структурі значний відсоток CpG основ, причому у 60-70% цитозінові залишки у складі цих CpG-острівків є метильованими. Зважаючи, що ключовими ферментами, які здійснюють метилування ДНК людини, є ДНК-метилтрансферази, а джерелом S-аденозилметіоніну в організмі є фолатний обмін, висловлено припущення, що наявність певних алелів генів фолатного обміну та метилтрансфераз, через зміну ензиматичної активності їх ферментів, можуть впливати на профіль метилування, синтез та репарацію ДНК та ризик розвитку мутацій *de novo*.

Це обумовило **мету** дисертаційної роботи - охарактеризувати алельний поліморфізм генів, задіяних в системі метилування ДНК, та визначити генетичні чинники підвищеного ризику виникнення мутацій *de novo* в статевих та соматичних клітинах на прикладі ахондроплазії та онкологічних захворювань.

Отже, пошук та дослідження генів, які пов'язані з розвитком мутацій *de novo*, будуть сприяти встановленню молекулярних основ спадкових та онкологічних захворювань людини. Тому тема дисертаційної роботи Дмитрук І.М. є **актуальною**.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій з їх критичною оцінкою порівняно з відомими рішеннями

Використання сучасних експериментальних методів, достатня кількість проведених експериментів, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і висновками інших авторів дозволяють зробити висновок про **достовірність теоретичних та експериментальних результатів і обґрунтованість наукових висновків**.

Достовірність і новизна отриманих результатів

Вперше проаналізовано спектр та поширеність мутацій гена рецептора 3 фактору роста фібробластів (*FGFR3*) у хворих на гіпо- та ахондродисплазію, мешканців західних регіонів України, та підтверджена необхідність їх визначення для підтвердження діагнозу цієї спадкової патології.

Вперше проаналізовані генотипи хворих за поліморфізмом rs183205964 гена тимідилатсинтази, який призводить до G>C заміни у ділянці промотора/енхансера, та встановлено, що наявність високофункціональної алелі 3RG є генетичним чинником підвищеного ризику виникнення *de novo* мутацій у статевих клітинах, зумовлюючи спадкові захворювання ахондро-/гіпохондроплазії у нащадків, тоді як низькофункціональні алелі 3RC та 2R, навпаки, виступають як протективний фактор.

Доведено асоціацію генотипу AA за поліморфізмом rs1805087 (A2756G) метіонінсинтази з підвищеним ризиком розвитку раку грудної залози в Україні, що співпадає з даними по Західній Європі.

Вперше в Україні встановлено комбінації генотипів досліджуваних поліморфних варіантів генів, які є генетичними чинниками підвищеного ризику або протективними щодо виникнення мутацій в гаметах та розвитку онкологічних захворювань.

Висновки та наукові положення, наведені в дисертаційній роботі, обґрунтовані результатами експериментів.

Методи, обрані для виконання завдань дисертаційної роботи – адекватні та сучасні, завдяки чому результати досліджень є достовірними.

Якість використаних для дослідження методів, репрезентативність отриманих результатів.

В роботі проведено обстеження значної кількості пацієнтів, хворих на ахондро-/гіпохондроплазію (75 хворих та 109 членів їх родин); 60 хворих на онкогематологічні захворювання; 90 жінок, хворих на рак молочної залози. Критерієм виключення було виявлення в зразку ДНК мутацій генів *BRCA1*, *BRCA2* та *NBN*, тобто випадків захворювання, які мають спадковий характер. Крім того, обстежено 100 практично здорових осіб.

Для досягнення мети і реалізації поставлених завдань дослідження були використані сучасні методи молекулярної генетики та статистичного аналізу, клініко-генеалогічний метод.

Комбінація достатньої кількості обстежених осіб та методів роботи, що відповідають меті дослідження, є основою репрезентативності отриманих результатів.

Рекомендації з подальшого використання результатів роботи та доцільність продовження і розвитку відповідних досліджень.

Результати роботи мають велике значення для удосконалення медико-генетичного консультування з метою диференційної та пренатальної діагностики ахондроплазії та гіпохондроплазії (визначення мутацій с.1138G>A, с.1138G>C, с.1620C>A та с.1620C>G гена *FGFR3*), прогнозування ризику розвитку раку молочної залози, лейкемій та лімфом (детекція поліморфних варіантів генів фолатного обміну та системи метилювання/де метилювання ДНК). Отримані нові дані щодо вірогідних механізмів розвитку мутацій. Дослідження в цьому напрямку доцільно продовжувати.

Оцінка наукової та літературної якості складу матеріалу і стилю дисертації та автореферату

Дисертаційна робота побудована за стандартною схемою, викладена на 163 сторінках, містить 12 рисунків, 25 таблиць, 5 додатків. Список використаної літератури охоплює 277 найменувань, з яких 262 іноземних.

В огляді літератури проаналізовані причини, механізм виникнення та наслідки появи мутації *de novo*; ахондроплазія та гіпохондроплазія як приклад захворювань, що розвинулись внаслідок мутацій *de novo* у статевих клітинах; функція рецептора 3 фактора росту фібробластів та найбільш важливі мутації гена цього білка; патогенез лімфом, лейкемій, пухлин молочної залози та значення мутацій у субстратних клітинах для розвитку і перебігу зазначених захворювань; механізм та ключові ферменти метилювання, роль фолатного обміну для метилювання ДНК, поліморфізми ключових генів процесу метилювання та фолатного обміну (ДНК-метилтрансферази 3В, метилен тетрагідро фолатредуктази, метіонін синтази, тимідилат синтази). доволі повно проаналізована новітня наукова література в галузі нейродегенеративних досліджень. Загалом, робота добре написана та оформлена, хоча і є дрібні недоліки переважно стилістичного характеру.

Розділ «Матеріал і методи дослідження» написаний ґрунтовно, стиль написання відображає повне володіння дисертантом методами, що використовувались у роботі.

У власних дослідженнях перш за все надана характеристика особливостей фенотипу та результати молекулярно-генетичного обстеження пацієнтів з ахондроплазією та гіпохондроплазією. Мутації гена рецептора 3 фактора росту фібробластів виявлені у 44% хворих. Зроблено висновок, що даний метод важливий для верифікації діагнозу ахондроплазія та гіпохондроплазія і може бути використовуватися для диференційної та пренатальної діагностики нанізму у людини.

При дослідженні алельного поліморфізму генів, задіяних в системі метилювання ДНК і фолатному обміні, у батьків дітей, хворих на ахондроплазію/гіпохондроплазію з *de novo* мутаціями, було встановлено, що наявність у батьків високо функціональних алелей тимідилат синтази (генотипи 3RG/3RG, 2R/3RG та 3RC/3RG), підвищує ризик виникнення *de novo* мутацій. Крім того, виявлені окремі комбінації генотипів, які підвищують (MTHFR 677 CC/ MTR 2756 AA/ TYMS HL та MTR 2756 AA/ TYMS HL) або зменшують (MTHFR 677CT/ MTR 2756 AA/ TYMS LL та MTR 2756 AA/ TYMS LL) ризик народження хворої дитини.

Аналогічні дослідження, проведені серед онкогематологічних і онкологічних хворих, дозволили встановити, що за наявності гомозиготного генотипу 2756 AA гена метіонін синтази ризик захворіти на рак грудної залози зростає в 2 рази, а за наявності одної 2756 A алелі - у 1,75 рази. Також виявлені асоційовані з ризиком розвитку захворювання комбінації генотипів за поліморфізмами генів метилентетрагідро фолатредуктази, метіонін синтази, тимідилат синтази, що свідчить про їх модулюючу роль в патогенезі раку молочної залози та лейкозів/лімфом.

Відповідність автореферату змісту дисертації та повнота опублікування результатів досліджень по темі

Автореферат повністю відображає зміст дисертаційної роботи. За темою дисертації опубліковано 12 друкованих праць, зокрема 5 статей у фахових наукових виданнях та тези 7 доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях і з'їздах.

Окремі дискусійні питання і зауваження

Дисертаційна робота отримала загалом позитивну оцінку, проте є деякі **зауваження стосовно змісту роботи:**

1. Тільки 76 джерел із 277 процитованих відносяться до робіт 2011-2016 років.
2. На погляд опонента, в огляді літератури цитування не завжди є коректним. Як приклад, при описі поліморфізмів генів фолатного обміну, які, як зазначає дисертант, «впливають на широкий 39 спектр біохімічних перетворень в ході фолатного циклу і можуть бути причетні до розвитку ... патології репродукції» робиться посилання на роботи: Баймурадової С.М. (Акушерство и гинекология, 2004), Джанджгави Ж.Г. (Проблемы репродукции, 2005), Зайнуліної М.С. («К вопросу о механизмах развития тромбофилии при преждевременной отслойке нормально расположенной плаценты и гестозе», 2005).
3. При аналізі комбінацій генотипів доцільно використовувати більш сучасні статистичні програми (наприклад, SNPstat).

4. На погляд опонента, висновок №2 «На основі результатів генеалогічного та молекулярно-генетичного аналізу встановлено, що 93% випадків ахондро-/гіпохондроплазії зумовлено виникненням *de novo* мутацій в гені *FGFR3*» має бути написаний більш коректно, враховуючи, що мутації цього гена виявлені тільки у 44% пацієнтів.

5. Є окремі стилістичні помилки та модифікації оформлення окремих посилань у списку літератури.

Запитання до дисертанта:

1. Чому частота виявлення мутацій гена *FGFR3* у хворих на хондродисплазії в Україні нижча, ніж в країнах Європи?

2. Чому високо функціональні алелі гена тимідилат синтази є фактором ризику розвитку мутацій *de novo*?

Зазначені зауваження не зменшують цінності роботи і не впливають на загальну позитивну оцінку.

Висновок.

1. Дисертація ДМИТРУК Ірини Михайлівни "Алельний поліморфізм генів задіяних в процесах метилування ДНК в осіб підвищеного ризику виникнення мутацій *de novo*" є завершеною роботою в актуальній області пошуку нових генетичних чинників підвищеного ризику онкологічних і спадкових захворювань.

2. Дисертаційна робота за своєю актуальністю, об'ємом, науково-практичною значимістю, новизною отриманих результатів та всебічним аналізом відповідає вимогам постанови Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор ДМИТРУК Ірина Михайлівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент,
доктор медичних наук, професор
головний науковий співробітник лабораторії
молекулярної біології відділу клінічної
імунології Національного наукового центру
радіаційної медицини НАМН України

I.B. Абраменко

