

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Мицик Наталії Йосипівни “Молекулярно-генетична характеристика спадкових орфанних хвороб обміну, які супроводжуються дефіцитом β -галактозидази”, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Актуальність теми. З бурхливим розвитком медицини частоти спадкових захворювань постійно зростають у виду *Homo sapiens sapiens*. А роботи, присвячені дослідженню таких вад набувають все більшої актуальності. Варто зазначити, що кожний конкретний спадковий синдром, або група захворювань ставлять перед дослідниками різні завдання, починаючи від конкретної діагностики та завершуючи фенокопіюванням норми. Зокрема питання діагностики гостро стоїть у випадку спадкових метаболічних орфанних хвороб, які характеризуються спільним метаболічним дефектом та мають схожі клінічні ознаки. До сьогодні в Україні не існувало чітких критеріїв селективного відбору пацієнтів з підозрою на GM1-гангліозидоз, синдромом Моркіо В та галактосіалідоз. Не проводилось молекулярно-генетичного скринінгу спектру та частот мутацій структурного гена β -галактозидази – *GLB1* у пацієнтів з GM1-гангліозидозом та синдромом Моркіо В. З літератури відомо, що вищезгадані мутації мають етнічні особливості, що вказує на необхідність дослідження генетичної обумовленості синдромів, які вони спричиняють, в конкретній групі особин. Дисертаційна робота Мицик Н.Й. полягала у дослідженні особливостей молекулярно-генетичної характеристики захворювань, які супроводжуються дефіцитом β -галактозидази, у пацієнтів з України та розробці алгоритму етапного лабораторного обстеження осіб з групи високого ризику для ранньої і точної діагностики дефіциту β -галактозидази.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Дисертаційну роботу виконано в Державній установі «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН» в рамках тематичного плану науково-дослідних робіт відділу генетичної діагностики: «Оцінка ролі

генетичних, епігенетичних та середовищних факторів у формуванні та перебігу деяких видів спадкової патології», (пошукова), термін виконання: 2014 р.; «Оцінка ролі генетичних факторів у формуванні та перебігу лізосомних хвороб накопичення для оптимізації клінічної і лабораторної діагностики цих захворювань» (№ державної реєстрації 0115U003006; 2015-2017 рр.), в яких автор була співвиконавцем.

Новизна дослідження та наукових результатів. Результатами даної дисертаційної роботи вперше встановлено межі біологічної варіації значень активності кислої β -галактозидази для населення України. Визначено спектр та частоти мутацій в гені β -галактозидази (*GLB1*) у хворих на GM1-гангліозидоз та синдром Моркіо В з України, в тому числі виявлено шість нових мутацій в цьому гені у пацієнтів з GM1-гангліозидозом. Показано, що частота місенс-заміни p.His281Tyr в гені *GLB1* серед пацієнтів з GM1-гангліозидозом з України значно вища у порівнянні з відповідними частотами в інших країнах світу. Продемонстровано переважне поширення мутацій p.His281Tyr та p.Gly255His в західних регіонах України. Запропоновано спосіб ідентифікації мутації p.His281Tyr з використанням методу ПДРФ аналізу.

Практичне значення отриманих результатів. Практичне значення проведеної роботи лежить в декількох площинах медико-біологічного консультування. Так, (1) описані в роботі межі біологічної варіації значень активності β -галактозидази для населення України можуть використовуватися, як референтні значення нормальної активності фермента для інтерпретації результатів ензимодіагностики в лабораторіях медико-генетичних центрів; (2) запропонований метод ідентифікації мажорної мутації p.His281Tyr в гені *GLB1* дозволяє оптимізувати проведення молекулярно-генетичних досліджень у пацієнтів з дефіцитом β -галактозидази; (3) відомості з приводу частот захворювання на GM1-гангліозидоз в Україні є важливими з огляду на планування діагностичних заходів у пацієнтів з дефіцитом β -галактозидази.

Розроблений алгоритм лабораторного обстеження пацієнтів з дефіцитом β -галактозидази впроваджено в практику Спеціалізованого медико-генетичного центру (СМГЦ), Центру орфанних захворювань (ЦОЗ) НДСЛ

«ОХМАТДИТ» МОЗ України та запропоновано для використання в інших медико-генетичних центрах країни. Матеріали досліджень використовуються в навчальному процесі на кафедрі медичної та лабораторної генетики НМАПО імені П.Л.Шупика.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Положення, сформульовані в роботі проілюстровані 34 рисунками та 17 таблицями. Результати, отримані автором, опрацьовані та обговорені з врахуванням даних сучасної літератури. **Бібліографічний список складається з 196 літературних джерел, переважна більшість з яких опублікована в останні десять років.** На достовірність отриманих результатів вказує використання **сучасних методів дослідження** (біохімічних (тонкошарова хроматографія, ензимодіагностика), молекулярно-генетичних (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)), метод оцінки конформаційного поліморфізму одноланцюгових фрагментів ДНК (SSCP), аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ), сиквенування гена *GLB1* за методом Сенгера, статистичних (критерій Шапіро–Уїлка, *U* Манна–Уїтні). Виклад матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертаційної роботи. Висновки, зроблені здобувачем, аргументовані та логічно узагальнюють отримані результати. Тому **достовірність положень та висновків, сформульованих у дисертації, не викликає сумніву.**

Загалом, робота добре оформлена, написана хорошою науковою українською мовою, хоча є і дрібні недоліки:

- наводячи перший раз в роботі генетичні символи генів *GLB1* та *CTSA*, автор не вказує їх назв (*Galactosidase beta 1* та *Cathepsin A*) (стр. 1 автореферату, стр 5 дисертації).
- на стр. 7 автореферату автор вказує, що «аномальні фракції ..., які відповідають важким довголанцюговим гепта- та октасахаридам ... присутні у зразках пацієнтів всіх груп, але найбільш інтенсивно візуалізувались у пацієнтів I та II груп». В той же час саме такі показники зазначені для пацієнта групи IV.

- зустрічаються помилки друку (стр. 6 дисертації «полімеразно ланцюгова реакція»; стр. 13 автореферату «розподілення», стр. 24 дисертації «MIM#» та ін.)
- дещо не співзвучні об'єкт та предмет дослідження;
- якість рис. 1.3.3.3, 1.6.1 та 3.3.1 бажає кращого;
- зустрічаються не коректні вирази: «GM1 – гангліозид приймає участь у взаємозв'язку клітин між собою» (стр. 16 дисертації); «в гені *GLB1* існує альтернативний сплайсинг» (стр. 28); «поперечних зв'язків» (стр. 45) та ін.;
- у тексті та на рис. 1.6.1. використано різну номенклатуру позначення мутацій;
- після літогляду бажано було би навести коротке узагальнення.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. За темою роботи опубліковано 11 наукових праць, включаючи 4 – у наукових фахових виданнях рекомендованих МОН України та 1 – в зарубіжному наукометричному виданні, які достатньо повно висвітлюють основні положення дисертаційної роботи. Матеріал, наведений в авторефераті, відповідає такому у рукописі дисертації.

Робота Мицик Н.Й. є новим важливим внеском у вивчення особливостей молекулярно-генетичної характеристики захворювань, які супроводжуються дефіцитом β -галактозидази, у пацієнтів з України. У першій частині розділу «Результати досліджень та їх обговорення» (розділ 3) представлено дані по визначенню екскреції олігосахаридів та кератансульфату з сечею у пацієнтів з підозрою на лізосомні хвороби накопичення. У наступному розділі викладено результати визначення активності β -галактозидази у пацієнтів, їх батьків та контрольній групі осіб. Результати молекулярно-генетичного аналізу мутацій в гені *GLB1* у пацієнтів з дефіцитом β -галактозидази наведено в розділі 5. Алгоритм лабораторного обстеження осіб з підозрою наявності дефіциту β -галактозидази наведено в розділі 6. Аналізу та узагальненню результатів дослідження присвячено розділ 7.

Високо позитивно оцінюючи дану дисертаційну роботу слід зазначити деякі зауваження та побажання, які не впливають на достовірність положень та висновків, сформульованих у даній роботі:

- 1) Виходячи з мажорності мутації р.His281Tyr гена *GLB1* та поширення її в західних регіонах України варто було би розглянути можливість віднесення цієї мутації до «founder mutation». Першим кроком до цього могло бути з'ясування етнічної приналежності пацієнтів з цією мутацією з Німеччини, Італії та Португалії, де проживає значна українська діаспора.
- 2) В роботі ідентифіковано лише одного хворого на синдром Моркіо В, тому говорити про його частоту в Україні (стр. 13 автореферату та стр. 87 дисертації) вважаю передчасним.
- 3) В світі загалом та в Україні зокрема гостро стоїть питання авторських прав. З огляду на цю проблему бажаю авторам якомога швидше запатентувати запропонований ними метод ідентифікації мутації р.His281Tyr гена *GLB1* за допомогою ПДРФ аналізу.
- 4) Вважаю, що у назві роботи було б бажано все ж вказувати, що дослідження проведено саме в Україні;
- 5) Не зайвим було би вказати етноси, в рамках яких були проведені літературні дослідження, цитовані в табл 7.1. Референтні значення нормальної активності β -галактозидази в гомогенаті лейкоцитів крові, представлені різними авторами.
- 6) Залишилось не зрозумілим, чи внесено в міжнародні бази даних ідентифіковані автором вперше мутації?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які висуваються для отримання наукового ступеня кандидата біологічних наук. На основі проведеного аналізу дисертаційної роботи, опублікованих праць, із врахуванням актуальності, новизни, наукової та практичної цінності розв'язуваної проблеми, обґрунтованості сформульованих наукових висновків

та достовірності отриманих результатів, вважаю, що рецензована дисертаційна робота цілком відповідає вимогам **«Порядку присудження наукових ступенів»**, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її автор Мицик Н. Й. заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15-генетика.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук,
доцент кафедри загальної та медичної генетики
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

І.А. Козерецька

Підпис Козерецької І.А. засвідчую
Заступник директора з наукової роботи
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка, д.б.н



Л.В. Сокур