

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Ольхович Наталії Вікторівни “Молекулярно-генетичні основи формування біохімічного фенотипу лізосомних хвороб накопичення”, подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Актуальність теми. Завдяки сучасним досягненням медицини можна дуже рано, зокрема в періоді новонародженості, встановлювати діагноз лізосомних хвороб накопичення і, в більшості випадків, проводити ефективне лікування. Вирішення проблеми надання своєчасної ефективної допомоги хворим зі спадковою патологією, яка довгий час визнавалась невиліковною, дозволить вивести Україну у число країн з гуманістичними принципами життя, де цінність кожного члена суспільства незаперечна. Саме тому, з метою удосконалення медичної допомоги хворим з цими захворюваннями, вкрай необхідним є впровадження єдиних підходів до діагностики, лікування і моніторингу його ефективності, що неможливо без створення теоретичного і практичного підґрунтя з урахуванням особливостей біохімічних та молекулярно-генетичних характеристик пацієнтів з України.

Належність лізосомних хвороб накопичення до рідкісної орфанної патології та необхідність застосування для їх дослідження складних високотехнологічних методів призвели до того, що в Україні такі дослідження були поодинокі і неповні, не було встановлено обтяженість населення України генетичними факторами виникнення аномального біохімічного фенотипу, не було проведено комплексного аналізу взаємозв'язку генетичних та біохімічних характеристик при різних захворюваннях з групи ЛХН.

Дисертаційна робота Ольхович Н.В. полягала у дослідженні ролі та взаємозв'язку генетичних та біохімічних факторів у формуванні особливостей фенотипу ЛХН та розробці алгоритму етапного лабораторного обстеження осіб з групи високого ризику з України для ранньої і точної діагностики ЛХН та оцінки індивідуальних особливостей біохімічного фенотипу. **Таким чином актуальність роботи Ольхович Н.В. не викликає сумніву.**

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 відповідальним виконавцем.

Новизна дослідження та наукових результатів. За результатами дисертаційної роботи Ольхович Н.В. вперше показана висока частота у населення України варіантів послідовності етіологічних генів, асоційованих з аномальним біохімічним фенотипом ЛХН. Проведено аналіз частоти та спектру перебудов в гені глюкоцереброзидази (*GBA*) у хворих на хворобу Гоше з України, в тому числі виявлено шість нових мутацій в цьому гені. Проаналізовано характерні для цих пацієнтів генотип-фенотипові кореляції. Показано, що поєднання алельних варіантів гена *IL8* (-781C→T) та делеційного алелю *GSTM1* можуть використовуватись як критерії ризику більш тяжкого перебігу захворювання у пацієнтів з хворобою Гоше I типу. На підставі аналізу отриманих автором результатів розроблено концепцію комплексного впливу первинних етіологічних і вторинних модифікуючих факторів на формування фенотипу лізосомних хвороб накопичення.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані автором результати власних досліджень і сформульована на їх підставі концепція впливу різних факторів на формування фенотипу лізосомних хвороб накопичення має дуже велике значення для підвищення ефективності медичної допомоги пацієнтам з ЛХН в Україні. Дані щодо високої частоти у населення України поліморфних алелів, асоційованих з псевдодефіцитом лізосомних ферментів, та особливостей частоти і спектру мутацій в генах-детермінаторах в ході діагностики відповідних ЛХН дозволять підвищити ефективність

ранньої та точної діагностики цієї групи захворювань. Комплексне дослідження поліморфних варіантів генів *GSTM1* та *IL8* у пацієнтів з хворобою Гоше І типу може застосовуватись для визначення індивідуальної спадкової схильності до розвитку більш тяжкого патологічного стану. Представлена автором концепція комплексної взаємодії первинних і вторинних факторів формування фенотипу ЛХН може бути покладена в основу формування персоналізованої діагностичної та лікувальної стратегії для цієї групи захворювань не тільки в Україні.

Матеріали роботи Ольхович Н.В. впроваджені в практичну діяльність Центру орфанних захворювань та Спеціалізованого медико-генетичного центру НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України, використовуються в педагогічному процесі кафедри медичної та лабораторної генетики НМАПО імені П.Л.Шупика. За матеріалами роботи опубліковано три методичні рекомендації та один інформаційний лист про впровадження у систему охорони здоров'я.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Положення, сформульовані в роботі проілюстровані 78 рисунками та 54 таблицями. Результати, отримані автором, опрацьовані та обговорені з врахуванням даних сучасної літератури. **Бібліографічний список складається з 434 літературних джерел, переважна більшість з яких опублікована в останні десять років.** На достовірність отриманих результатів вказує використання **сучасних методів дослідження** (біохімічних (ензимодіагностика, вискоефективна рідинна хроматографія), молекулярно-генетичних (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ), алель-специфічна ампліфікація, секвенування за методом Сенгера), статистичних (критерій Колмогорова-Смірнова, Шапіро-Уїлка, *t* критерію Стюдента, *U* Манна-Уїтні, χ^2 Пірсона, χ^2 з поправкою Йетса, точний критерій Фішера, поправку Бонфероні, відношення шансів Odds Ratio (OR) з 95% довірчим інтервалом та ROC-аналіз). подача 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 науковою українською мовою, хоча є і дрібні недоліки:

- наводячи перший раз в авторефераті генетичні символи генів варто приводити їх назви (стр. 3), а також уніфіковано застосовувати написання генетичних символів (так, в авторефераті застосовується курсив, а в дисертації (стр. 10-15) – ні).
- зустрічаються помилки друку (стр. 20 дисертації «нелизосомальні»; стр. 27 дисертації «шванновські»; стр. 39 дисертації «аденоасоційованного»; стр. 48 дисертації «субстрат-редкційна терапія» та ін.)
- в розділі 3.1.1.1. вказується, що частоти гаплотипів гена ARSA в Україні відповідають таким в Турції та Польщі, хоча рис. 3.2. свідчить про те, що ще і у Італії та Іспанії;
- підпис до рис. 1.4. дисертації не містить назви білка, який на ньому схематично зображений;
- зустрічаються не коректні вирази: «...до підвищеної регуляції проапоптичних церамидів» (стр. 28); «...для лікування хвороби CLN3 у Cln3 knock-in мишей» (стр. 29 дисертації); «...нейрони, які навантажені, щоб померти через апоптоз» (стр. 32 дисертації); «поперечних зв'язків» (стр. 45); «фрагменти кодуючої частини екзонів» (стр. 79 дисертації) та ін.;
- таблицю 1.1. дисертації, враховуючи її розміри (три сторінки), варто було винести у додатки;
- у більшості випадків залишається не зрозумілим, автори самі підбирали праймери, чи використані послідовності, наведені в літературі;
- кількість фрагментів, позначених на рис. 3.10. не відповідає тій, яка наводиться у підписі до цього рисунку.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. За темою роботи опубліковано 56 наукових праць, включаючи 19 – статті у фахових журналах згідно зі списком МОН України, 5 – статті в журналах, включених у міжнародні наукометричні бази, 4 – статті у інших фахових виданнях, які достатньо повно висвітлюють основні положення дисертаційної роботи. Матеріал, наведений в авторефераті, відповідає такому у рукописі дисертації.

Робота Ольхович Н.В. є новим важливим внеском у вивчення особливостей формування фенотипу лізосомних хвороб накопичення. У першій частині розділу «Результати досліджень та їх обговорення» (розділ 3) представлено дані по визначенню впливу перебудов в генах-детермінаторах на біохімічний фенотип кількох захворювань з цієї групи, показано, що у населення України спостерігається висока частота певних поліморфних варіантів, які спричиняють явище псевдодефіциту лізосомних ферментів. Це впливає на біохімічний *in vitro* фенотип пацієнтів з підозрою на лізосомні хвороби накопичення і загрожує хибнопозитивною діагностикою відповідних захворювань, тому повинно обов'язково враховуватись при плануванні діагностичного протоколу. У другій частині розділу викладено результати молекулярно-генетичного аналізу мутацій в гені *GBA* у 63 неспоріднених пацієнтів з хворобою Гоше з України. Встановлення первинного генетичного дефекту та аналіз його впливу на біохімічний фенотип і клінічну картину захворювання дозволив визначити особливості генотип-фенотипової кореляції у пацієнтів з України, порівняти їх з даними інших популяцій і визначити асоціативний зв'язок між типом перебудов в гені *GBA* та ризиком розвитку неврологічної симптоматики у цих пацієнтів. Результати аналізу взаємозв'язку рівня вторинних біохімічних маркерів та поліморфних варіантів генів-модифікаторів на клінічний поліморфізм хвороби Гоше у пацієнтів з однаковим генотипом наведено в третій частині розділу. На підставі цих даних сформульовано критерії оцінки тяжкості перебігу хвороби Гоше I типу і встановлено генетичні маркери індивідуального ризику більш тяжкого перебігу

захворювання. Аналізу та узагальненню результатів дослідження присвячено розділ 4. Систематизація теоретичних даних та отриманих автором результатів власних досліджень дозволила сформулювати концепцію комплексного впливу первинних етіологічних і вторинних модифікуючих факторів на формування фенотипу лізосомних хвороб накопичення. Суть концепції полягає в тому, що фенотип ЛХН формується під комплексним впливом первинних етіологічних і вторинних модифікуючих факторів. Етіологічні спричинюють патогенетично обумовлене формування картини захворювання, тоді як модифікуючі детермінують індивідуальні особливості каскаду патологічних процесів, що розвиваються в клітині у відповідь на накопичення, посилюючи або послаблюючи їх інтенсивність. Тому, і це показали проведені Ольхович Н.В. дослідження, персоналізована оцінка патогенезу та поліморфізму захворювання у конкретної особи з ЛХН можлива лише за умови визначення і аналізу взаємодії всіх складових *in vitro* характеристики певного захворювання. Сформульована автором концепція має не тільки теоретичне, а і прикладне значення для оцінки клінічного і біохімічного фенотипу певної особи та формування оптимальної персоніфікованої діагностичної і лікувальної стратегії для кожного хворого.

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

- Один з найважливіших розділів огляду, зважаючи на тему роботи (розділ літогляду 1.3.2. Молекулярна генетика і ензимологія), невдало структурований, йому не вистачає узагальненої схеми генів та ферментів, порушення яких залучені у розвиток хвороби Гоше.
- В процесі ознайомлення з оглядом літератури подекуди залишається не проакцентованим, що саме вже робиться у світі з теми роботи, але не в Україні, і що ще взагалі потребує подальших досліджень.
- У розділі (2.1. Матеріал досліджень) не наводяться дані з приводу загальної кількості проаналізованих осіб. Так, висновок 7 містить інформацію з приводу частот дуплікації c.1049-1072dup24 в гені *CHIT1*

у населення України склала 25,9% (323/1244). Однак, вказаний розділ не містить згаданих у висновку груп пацієнтів.

- Як вказує автор за лізосомних хвороб накопичення трапляються випадки, коли за наявності мутацій в певних генах фенотип майже нормальний. У цьому випадку виникає запитання, а що відомо з приводу мутацій та поліморфізму в регуляторних ділянках таких генів?

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 Ольхович Н.В. заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15-генетика.

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



С.В. Демидов

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



Л.В. Сокур