

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Ольхович Н. В.

«Молекулярно-генетичні основи формування біохімічного фенотипу лізосомних хвороб накопичення», представленої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Актуальність. Науковий напрямок, обраний дисертантом охоплює два важливих аспекти медичної генетики як дисципліни: **фундаментальний**, оскільки присвячений дослідженню молекулярно-генетичних механізмів формування і перебігу Лізосомних хвороб накопичення і **прикладний** – оскільки великий обсяг напрацювань автора направлений на розширення можливостей ранньої диференційної діагностики цієї групи захворювань, а також на підвищення ступеню коректної інтерпретації результатів генетичного аналізу, що в кінцевому результаті сприяє індивідуалізації терапевтичних програм лікування і підвищенню ефективності лікувальних заходів.

Насьогодні, в галузі дослідження генетичних основ формування лізосомних хвороб накопичення досить повно описано первинний біохімічний та генетичний дефект, встановлено взаємозв'язок природи структурних і функціональних змін детермінуючого гена з характером метаболічних порушень, описані певні механізми класичного впливу нуль-мутацій на біохімічний фенотип, розроблені терапевтичні підходи для корегування метаболічних порушень застосуванням ферменто-замісної шаперонної, або субстрат-редукційної терапії. Але не зважаючи на певні успіхи в дослідженні біологічних механізмів формування і перебігу даної патології, ціла низка питань лишається невирішеною, зокрема недостатньо зосереджена увага на вивченні механізмів і шляхів впливу функціональних змін детермінуючого гена на характер метаболічних порушень з урахуванням факторів генетичної схильності до патологічного процесу і характеру біохімічної та клітинної

відповіді на накопичення недеградованих метаболітів, в контексті оцінки впливу генетичних первинних (детермінуючих) та вторинних (модифікуючих) факторів на реалізацію фенотипу захворювання.

Саме цим питанням і присвячений науковий напрямок, обраний дисертантом для дослідження, який безумовно є актуальним і перспективним не тільки в контексті отримання нових наукових надбань, але і з позицій підвищення рівня генетичної діагностики даної патології в Україні.

Хочу зазначити, що методологічно дисертаційна робота побудована досконало як за дизайном і за методами досліджень, так і за спектром генетичних і біохімічних показників.

Наукова новизна. На підставі дослідження частоти та спектру первинних і вторинних генетичних дефектів, а також визначення частоти поліморфних варіантів генів, які впливають на індивідуальний біохімічний фенотип особи при різних ЛХН, визначена роль поліморфізму генів, асоційованих з псевдодефіцитом лізосомних ферментів і запропонована концепція патогенетичних механізмів біохімічної та клітинної відповіді на внутрішньолізосомне накопичення недеградованих метаболітів.

Запропонована автором концепція первинних та вторинних факторів патогенезу хвороби Гоше дає уяву про внесок генетичної і біохімічної компоненти в формування і прогресію захворювання.

Враховуючі, що більшість факторів генетичної діагностики корелюють один з одним, перспективним є розробка алгоритму мультिवаріантного аналізу, який дозволяє окреслити оптимальний спектр генетико-діагностичного дослідження хворого при довгостроковому моніторингу і сприяє корекції рішень щодо призначення або зміни підходів до лікування на підставі ранньої та точної комплексної діагностики первинних етіологічних факторів захворювання та чинників розвитку вторинних патологічних процесів у конкретного пацієнта, що і складає **практичну значимість** даної роботи. Окремо слід зазначити перспективність цих досліджень для популяції в цілому, оскільки

поширеність генетичних варіантів, пов'язаних з псевдодефіцитом та псевдонормальною активністю лізосомних ферментів в Україні не проводились, а це має велике значення з позицій можливості визначення генетичного тягара в популяції відносно цих захворювань, а також визначення обтяженості популяції генетичними факторами ризику хибнонегативної або хибнопозитивної діагностики ЛХН.

Матеріали 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.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дослідження виконані в рамках тематичного плану НДР відділу генетичної діагностики ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України" «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 роботи.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, проаналізовано літературу за обраною темою, розроблено основні теоретичні і практичні положення, визначено мету і завдання дослідження, розроблені методичні підходи до виконання завдань. Збір первинних даних та проведення лабораторних досліджень проведені особисто автором або за його безпосередньої участі, обробка, аналіз і узагальнення отриманих результатів при написанні і оформленні рукописи виконані особисто автором. Автором сформульовані висновки і практичні рекомендації. У спільних публікаціях з іншими авторами дисертанту належать частини, що стосуються теми дисертації. За допомоги у проведенні частини біохімічних і молекулярно-генетичних досліджень, а

також за надання клінічної характеристики хворих автор висловлює глибоку подяку всім колективам спеціалістів.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій.

Робота привертає до себе увагу значним об'ємом дослідженого і проаналізованого матеріалу – 287 хворих яким за результатами комплексу клінічних, морфологічних та біохімічних даних в період з 1995 по 2016 рік було встановлено діагноз однієї з лізосомних хвороб накопичення. Клінічна характеристика хворих була надана лікарями Спеціалізованого медико-генетичного центру та Центру орфанних захворювань НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України. В зв'язку з тим, що лабораторія медичної генетики СМГЦ НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України є єдиним закладом в Україні, де проводиться біохімічне та молекулярно-генетичне тестування пацієнтів з лізосомними хворобами накопичення, група обстежених пацієнтів може бути визнана як репрезентативна для української популяції. Всі пацієнти (батьки пацієнтів) надали інформовану згоду на використання їх біоматеріалу для дослідження. Робота була погоджена етичним комітетом ДУ «ІГРМ НАМН України» (протокол засідання КЕ № 2 від 28.04.2015 р.).

Група контролю склали 622 практично здорові особи з різних регіонів України, які добровільно брали участь у обстеженні та не були кровними родичами пацієнтів з ЛХН. Робота характеризується адекватним сучасним методичним рівнем виконання.

Автором надана характеристика первинних і вторинних генетичних дефектів відносно до кожної з досліджених нозологічних форм захворювання, визначені частоти поліморфних варіантів генів, які впливають на індивідуальний біохімічний фенотип особи при різних ЛХН, визначена роль поліморфізму генів, асоційованих з псевдодефіцитом лізосомних ферментів і запропонована концепція патогенетичних механізмів біохімічної та клітинної відповіді на внутрішньолізосомне накопичення недеградованих метаболітів.

Отже, вибір напрямку дослідження, використані методики і обсяг фактичного матеріалу цілком достатні для аналізу, обґрунтування наукових положень дисертаційної роботи і вирішення поставленої мети. Наведені результати дозволяють вважати, що структура роботи, стан і глибина аналізу забезпечують достовірність висновків. Використання сучасних адекватних лабораторних і статистичних методів роблять висновки і наукові положення дисертації обґрунтованими.

Апробація результатів роботи. Основні положення роботи разом з висновками доповідались на Науково-практичній конференції «Пренатальний і постнатальний скринінг природженої та спадкової патології» (Львів, 2000), III З'їзді медичних генетиків України (Львів, 2002), VIII Українського біохімічного з'їзду (Чернівці, 2002), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні лабораторні методи дослідження спадкової патології» (Київ, 2004), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Молекулярная и прикладная генетика» (Минск, 2005), 3rd International Workshop on “Application of Advanced Molecular Methods for Diagnosis of Human Genetic Disease” (Tehran, 2005), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання медичної генетики» (Київ, 2007), Науково-практичній конференції «Нове в трансплантації стовбурових гемо поетичних клітин у дітей. Трансфузіологія в педіатрії» (Київ, 2008), Науково-практичній конференції «Пріоритетні наукові напрями у медицині: від теорії до практики» (Одеса, 2008), VI Конгресі педіатрів України (Київ, 2009), Міжнародний та IX Український конгрес дитячих неврологів «Діагностика, лікування, реабілітація та профілактика хвороб нервової системи у дітей» (Київ, 2009), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Генетична і регенеративна медицина: проблеми і перспективи» (Київ, 2010), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Новітні технології в педіатричній науці, практиці та освіті» (Одеса, 2009; Одеса, 2011), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Проблеми спадкової та

мультифакторної патології» (Київ, 2012), Російський конгрес з міжнародною участю «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Санкт-Петербург, 2012), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Проблеми мультифакторної патології та порушень метаболізму» (Київ, 2013), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Проблеми мультифакторної патології та порушень метаболізму» (Київ, 2013), Науково-практичній конференції «Медичні науки: напрямки та тенденції розвитку в Україні та світі» (Одеса, 2014), XIII International Conference on Rare Diseases (Bialobrzegi, 2015), IV Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Розбудова системи забезпечення якості клінічних лабораторних досліджень в Україні» (Київ, 2016), XIV International Conference on Rare Diseases (Bialobrzegi, 2016), IV З'їзді медичних генетиків України (Львів, 2008), European Human Genetics Conference (Amsterdam, 2006), Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (Istanbul, 2010; Geneva, 2011; Birmingham, 2012; Barselona, 2013; Innsbruck, 2014; Leon, 2015; Rome, 2016).

Публікації. Основні положення роботи викладені в 60 друкованих працях, у тому числі в 21 статті у фахових виданнях, 10 статей у інших виданнях, 29 тезах доповідей конференцій.

Структура та обсяг дисертації: Структура та обсяг дисертації: Дисертація викладена на 304 сторінках друкованого тексту, містить вступ, огляд літератури, 3 розділи власних досліджень, висновки, практичні рекомендації. Список використаної літератури містить 434 джерела, з них робіт: 18 кирилицею, 416 – латиницею. Дисертація містить 54 таблиці, 78 рисунків.

У вступі до дисертаційної роботи автор наводить літературні дані, що обґрунтовують актуальність досліджуваної проблеми. Мета роботи та завдання сформульовані чітко та коректно.

Огляд літератури представляє собою науковий аналіз сучасного стану вивчення проблеми і світових набутків в цієї галузі, з відображенням

суперечливих та мало вивчених питань, що є обґрунтуванням вибору наукового напрямку дослідження. Розділ складається із 3 основних підрозділів, в яких послідовно висвітлено сучасний погляд на причини фенотипових відмінностей спадкових хвороб людини. Зазначено, що для моногенних спадкових хвороб притаманний складний фенотип, який обумовлений як етіологічними чинниками, так і іншими екзогенними і ендогенними вторинними факторами. Автором надана загальна характеристика фенотиповому поліморфізму генетичної гетерогенності лізосомних хвороб накопичення, відмічено, що ці захворювання є хронічними і прогресуючими, характеризуються великим спектром симптомів і тяжкості прояву. Докладно представлені сучасні дані щодо патогенетичних основ терапії з аналізом ефективності різних терапевтичних програм і перешкод на шляху терапії. Окремо розглянуто сучасні принципи і особливості лабораторної діагностики, зокрема необхідність двоетапного підходу, який передбачає застосування селективного скринінгу для формування групи високого ризику певної патології і підтверджуючої діагностики для остаточного встановлення нозологічного діагнозу і особливості інтерпретації результатів. Автором також висвітлені основні невирішені питання щодо ролі поліморфізму генів, асоційованих з псевдодефіцитом лізосомних ферментів і патогенетичних механізмів біохімічної та клітинної відповіді на внутрішньолізосомне накопичення недеградованих метаболітів, а також відносно оптимізації протоколів біохімічного моніторингу інтенсивності патологічного процесу та ефективності терапевтичних заходів при цьому захворюванні з урахуванням поліморфних варіантів генів спадкової схильності до розвитку більш тяжкого патологічного стану. В розділі наведена певна кількість ілюстративного матеріалу. На мій погляд, це є недоцільним, оскільки не відповідає основному завданню даного розділу – розгляду суперечливих питань у вирішенні наукової проблеми.

У 2 розділі охарактеризовані вибір напрямків дослідження, надана загально біологічна характеристика хворих, логічно та послідовно описані методи дослідження. Статистичного аналіз проводили з використанням сучасних пакетів програм Microsoft Exel 2010, Statistica 10.0 та MedCalc 17.5.3. та програму Arlequin ver.3.5 (Швейцарський інститут біоінформатики). Розподіл значень біохімічних досліджень аналізували з використанням тестів Колмогорова-Смірнова та Шапіро-Уїлка, порівняння середніх значень здійснювали з використанням параметричного *t* критерію Стюдента або непараметричного *U* критерію Мана-Уїтні. Для множинних порівнянь використовували поправку Бонфероні. Прогностичну значущість оцінювали за допомогою ROC-аналізу.

Розділ 3.1 присвячено дослідженню генетичних факторів впливу на фенотипові (*in vitro* та *in vivo*) прояви лізосомних хвороб накопичення. Розділ складається здекількох підрозділів в яких послідовно висвітлено характер структурних перебудов в генах-детермінаторах та їх вплив на біохімічний фенотип лізосомних хвороб накопичення. Окремо надана характеристика поліморфних алелів генів-детермінаторів, асоційованих з псевдодефіцитом лізосомних ферментів. Автор підкреслює наявність фактів, «псевдодефіциту» ензиматичної активності у пацієнтів, який у певних випадках призводить до неможливості відокремлення здорових осіб від хворих, що може призвести до суттєвих діагностичних помилок в ході біохімічної діагностики лізосомних хвороб накопичення в разі поєднання ензиматичного псевдодефіциту та патології іншого генезу. Тому, на думку автора є вкрай важливим популяційні дослідження щодо обтяженості алелями псевдодефіциту для визначення доцільності конкретних діагностичних етапів обстеження осіб з підозрою на відповідну патологію.

Було проведено дослідження частоти алелів генів, які асоційовані з псевдодефіцитом п'ятих лізосомних ензимів: алелі с.1055A>G і с.*96A>G гена *ARSA*; с.739C>T і с.745C>T гена *HEXA*, алелі с.1726G>A і с.2065G>A гена *GAA*, с.937G>T гена *GLA1* та с.898G>A гена *IDUA* в контексті порівняння поширеності в інших популяціях і у зв'язку з важливістю ранньої

та точної діагностики відповідних захворювань через впровадження для них специфічної фермент-замісної терапії. Автором встановлено особливості частоти зустрічаємості досліджених алелей в Україні на основі порівняльного аналізу поширення таких серед населення Нідерландів, Турції, Японії, Китаю та деяких регіонів Європи, що дало можливість окреслити характер генетичного тягара в популяції відносно цих захворювань, окреслити молекулярно-генетичний протокол лабораторного обстеження осіб при підозрі на наявність даної патології, а також визначення обтяженості популяції генетичними факторами ризику хибнонегативної або хибнопозитивної діагностики ЛХН. Зокрема автор вважає, що висока частота с.1049-1072dup24 в гені *CHIT1* серед населення України робить скринінг цього генетичного варіанту важливим етапом діагностичного протоколу при виявленні пацієнтів з хворобою Гоше. Підсумовуючи результати аналізу впливу первинного генетичного дефекту на клінічний та біохімічний фенотип захворювання, автор робить висновок, щодо наявності індивідуальних особливостей перебігу хвороби Гоше, які обумовлені первинними генетичними факторами, тобто природою безпосередньої перебудови в гені *GBA* і її впливом на функціональну активність продукту гена і вторинними факторами, які обумовлюють індивідуальну відповідь організму на патологічний процес накопичення недеградованого субстрату.

Розділ 3.2 присвячено вивченню впливу модифікуючих факторів на формування фенотипу ЛХН. На основі визначення первинного генетичного дефекту у пацієнтів з хворобою Гоше в Україні автор виділив три найрозповсюдженіші генотипи – р.N409S/р.N409S, р.N409S/р.L483P, р.N409S/р.R159W і відносно них у пацієнтів було проведено дослідження фенотипового поліморфізму та генетичних факторів впливу на нього. Встановлено, відсутність впливу первинного генетичного дефекту на фенотиповий поліморфізм в цих випадках. В той же час, показано вплив вторинних факторів на інтенсивність патологічного процесу і формування клінічної картини захворювання незалежно від генотипу.

В якості протизапальних маркерів були використані активність хітотриозидази та рівень неоптерину в плазмі крові для оцінки інтенсивності хронічного запального процесу і ступеня активації макрофагів. В якості маркерів оксидативного стресу - активність глутатіон-S-трансфераз та рівень оксидативно модифікованих протеїнів в плазмі крові.

Показано залежність рівню хітотриозидази та неоптерину в плазмі крові у пацієнтів від тяжкості захворювання, що підтверджує ключову роль хронічного запалення у патогенезі хвороби Гоше і свідчить про доцільність використання цих маркерів для оцінки активності патологічного процесу в динамиці. Було показано також, що поєднання мутантних варіантів генів *GSTM1*, *IL1b* та *IL8*, а також наявність алелю *GSTM1*, навіть у поєднанні з функціональним алелем *GSTM1*"+" має суттєвий асоціативний зв'язок з «тяжкішим» перебігом хвороби Гоше, що свідчить про доцільність використання цього дослідження в менеджменті пацієнтів з хворобою Гоше.

У розділі 3.3 досліджено вплив методологічних факторів на біохімічний *in vitro* фенотип при ЛХН. Автором було досліджено біологічна варіація активності β -галактозидази, α -глюкозидази та глюкоцереброзидази в зразках крові здорових осіб з України, висушених на фільтрувальному папері (сухих плямах крові) і проведено порівняння впливу рівня гематокриту (Ht) та показника кількості білих клітин крові (WBC) на результат визначення ферментативної активності.

Кореляційний аналіз результатів показав, що існує певний зв'язок між дослідженими параметрами. Було доведено, що використання для аналізу сухих плям, отриманих зі зразків крові з низьким показником кількості білих клітин, призводить до отримання заниженого показника активності лізосомних ферментів і загрожує хибнопозитивною діагностикою відповідного захворювання і, що зважаючи на певні переваги використання DBS в ході діагностики ЛХН, цей метод є скринінговим і не може виступати критерієм остаточного встановлення діагнозу. Визначення ферментативної активності в лейкоцитах, фібробластах або плазмі крові є необхідним етапом підтверджуючої діагностики ЛХН.

Останній розділ присвячений аналізу та узагальненню отриманих результатів у співставленні з світовими набутками в цій галузі. Проведений аналіз свідчить про високу наукову обґрунтованість отриманих даних і великий внесок у фундаментальну і прикладну галузі генетики в контексті визначення ролі первинних етіологічних і вторинних модифікуючих факторів у клінічному і біохімічному поліморфізмі лізосомних хвороб накопичення і розробки концепції комплексного впливу цих факторів на формування індивідуального фенотипу захворювання. Положення цієї концепції лягли в основу розробки алгоритму генетичного супроводу хворого на основі персоналізованого підходу лабораторної діагностики ЛХН і оцінки індивідуальних факторів ризику більш тяжкого перебігу захворювання.

Викладення матеріалу свідчить про високу професійну обізнаність дисертанта і високу ерудицію, а також про прогресивне наукове мислення при трактовці отриманих результатів. Проведений аналіз також свідчить про перспективність подальшої розробки даного наукового напрямку.

Автореферат повністю відповідає матеріалам, викладеним в дисертаційній роботі, а у висновках, повністю відображені усі наукові положення дисертації.

Відносно оформлення дисертаційної роботи слід зазначити, що вона викладена хорошою академічною українською мовою. Рукопис містить високоякісний ілюстративний матеріал, який демонструє сучасний методичний рівень досліджень і значно полегшує сприйняття матеріалу.

Існує певна кількість неточностей і помилок в тексті, але вони не заважають загальному сприйняттю матеріалу і не мають принципового значення.

У процесі рецензування виникли деякі дискусійні питання:

1. Чи можливе поєднання у однієї особи перебудов у гені певної лізосомної гідролази, які обумовлюють псевдодефіцит та дійсний дефіцит цієї гідролази? Який вплив на біохімічний *in vitro* фенотип спричинює таке поєднання?

2. Чим пояснюється асоціативний зв'язок поліморфних варіантів гені GSTM1 та IL8 з більшою тяжкістю перебігу хвороби Гоше?
3. В чому полягають головні положення запропонованого вами персоналізованого підходу до визначення оптимальних шляхів лабораторної діагностики ЛХН?

Висновок. дисертаційна робота Ольхович Н. В. «Молекулярно-генетичні основи формування біохімічного фенотипу лізосомних хвороб накопичення», представленої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика є завершеною науковою працею, за актуальністю і новизною, науковою концепцією і методичними підходами виконання характеризується як високопрофесійна робота, яка має перспективи розвитку. В роботі представлена достатня кількість досліджень для отримання достовірних результатів, на основі яких базуються наукові висновки, відповідає обраній спеціальності і вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, а її автор заслуговує присвоєння наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Рецензент:

завідувач лабораторії
імуногенетики державної установи
«Національний науковий центр
радіаційної медицини НАМН
України», доктор біологічних наук,
професор



Ж. М. Мінченко

Підпис засвідчую
вчений секретар ІКР
В.Г. Гончарук