

Відгук

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Ольхович Наталії Вікторівни

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

Дисертаційна робота Ольхович Наталії Вікторівни присвячена вивченню лізосомних хвороб накопичення - великої групи рідкісних спадкових захворювань. Значна кількість цих хвороб пов'язана з порушенням функції лізосомних ферментів, характеризуються клінічним поліморфізмом і генетичною гетерогенністю. Саме це, а також можливість практичної медицини ефективно корегувати метаболічні порушення шляхом специфічної терапії і обумовлює **актуальність** і необхідність подібних розробок. Тим більше, що для нашої держави вони є піонерськими. Вивчення популяційних особливостей частоти і спектру генетичних порушень, генотип-фенотипових кореляцій, частот поліморфних варіантів генів-детермінаторів, які впливають на індивідуальний біохімічний фенотип вкрай важливий для розробки адекватної персоналізованої терапії.

Виходячи з цього автор формулює головну тему роботи: визначення ролі первинних етіологічних і вторинних модифікуючих факторів у клінічному і біохімічному поліморфізмі лізосомних хвороб накопичення.

Відповідно до поставленої мети і завдання, що включали: визначення поліморфних варіантів генів ARSA, HEXA, GAA, GLAI, IDUA; визначити частоту місенс-замін p.Q292K в гені SMPDI; дослідити значимість перебудов в різних генах при хворобі Гоше і їх вплив на тяжкість перебігу захворювання. Крім того, автор поставила за мету розробити алгоритми персоналізованого підходу до діагностики та оцінки індивідуальних особливостей ЛХН.

Наукова новизна та практична значимість результатів дисертаційної роботи.

Для виконання запланованої теми автори провели велику попередню роботу по формуванню груп хворих на ЛХН. Крім того, треба було розробити і перевірити з використанням різних підходів специфічність і ефективність біохімічних, молекулярно-біологічних протоколів.

Автор встановила, що формування фенотипу ЛХН відбувається під комплексним впливом як первинних генетичних змін, так і вторинних модифікуючих факторів. Саме це і обумовлює індивідуальний перебіг захворювання і спадкову схильність до різних варіантів перебігу хвороби. Вперше, для населення України показана частота варіантів генів у хворих з

аномальним біохімічним фенотипом ЛХН. Вперше встановлено, що сумарна частота мажорних мутацій PN4095 та p.1.483p в гені GBA у пацієнтів в хворобою Гоше в Україні нижча за середньоевропейську. Вперше виявлено шість досі не описаних перебудов в гені GBA, які з високою ймовірністю, в тому числі вже описані, впливають на функціональну активність продукту гена.

Вперше показано, що наявність в обох алелях мутацій в гені GBA є сприятливим прогностичним фактором щодо неврологічних уражень, в протизага з генотипом із нуль-мутаціями в обох алелях. Автор виявила, що поєднання алельних варіантів гена IL8(-781C-T) та делеційного алелю GSTM1 призводить до більш тяжкого перебігу захворювання у пацієнтів з хворобою Гоше I типу. На основі отриманих результатів розроблено концепцію впливу первинних етіологічних і вторинних факторів на формування фенотипу ЛХН.

Виявлення високої частоти поліморфних алелів, асоційованих з псевдодифіцитом лізосомних ферментів обумовлює необхідність обов'язкового їх тестування в ході діагностики ЛХН. Важливим є визначення місенс-заміни p.Q292K в гені SMPD1 у пацієнтів з хворобою Німана-Піка дуплікації c 1049-1072 dup 24 в гені CHIT у пацієнтів з хворобою Гоше I типу, виявлення поліморфних варіантів генів GSTM1 (делеційний алель) та IL81(781C-T).

Ці діагностичні протоколи підсумовані автором розробкою алгоритма персоніфікованого підходу до лабораторної діагностики і оцінки індивідуальних особливостей біохімічного фенотипу ЛХН. Важливо і те, що вони вже впроваджені в практичну діяльність Центру орфанних захворювань та Спеціалізованому медико-генетичному центрі НДСЛ «Охмадит МОЗ України». Це підтверджується відповідними методичними рекомендаціями робота, інформаційним листом про нововведення, повідомленням про впровадження. Тобто, робота Ольхович Н. В. є зразком практичної реалізації фундаментальних досліджень.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень дисертації.

Робота Ольхович Н. В. виконана на високому рівні із застосуванням сучасних молекулярно-генетичних, біохімічних, аналітичних методів. Висока вирішальна здатність застосованих методів, відповідна статистична обробка свідчать про достовірність результатів роботи.

Висновки групуються на значному обсязі експериментальних досліджень проведених автором. Автором самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, розроблено основні теоретичні і практичні положення, методичні підходи до виконання завдань.

Робота виконувалась в рамках науково-дослідної теми «Оцінка ролі генетичних, епігенетичних та середовищних факторів у формуванні та перебігу деяких видів спадкової

патології», термін виконання: 2014 р. та НДР «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.) на базі відділу генетичної діагностики ДУ Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України.

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

Дисертаційна робота Ольхович Наталії Вікторівни побудована за стандартною схемою, викладена на 304 сторінках друкованого тексту та складається із «Вступу», «Огляду літератури», розділів «Матеріали та методи», «Результати досліджень та їх обговорення» (3 підрозділи), а також «Аналіз узагальнення отриманих результатів», «Висновків», «Практичних рекомендацій» і «Списку використаної літератури» (434 посилань). Робота містить 78 рисунків та 54 таблиць. Дисертаційна робота написана у науковому стилі українською мовою.

Вступ. Чітко обґрунтована тема дисертаційної роботи та її зв'язок з науковими програмами і темами, сформульована мета і конкретні задачі досліджень, а також наукова новизна одержаних результатів та їх практичне значення. Надано інформацію про участь інших науковців у виконанні роботи, приведено інформацію про апробацію результатів досліджень, які були представлені на вітчизняних та закордонних конференціях.

Розділ 1. Огляд літератури. Охоплює велику кількість літературних джерел. Він складається із трьох підрозділів. У **підрозділі 1.1** автор розглядає сучасний погляд на причини фенотипових відмінностей спадкових хвороб людини. Лізосомні хвороби накопичення були в числі перших груп генетичних захворювань для яких розроблені ефективні терапевтичні засоби. Автор підкреслює, що розуміння деталей патогенезу є ключом для розробки ефективних терапевтичних засобів. В значній мірі цьому буде сприяти розуміння фенотипового поліморфізму та генетичної гетерогенності ЛХН. У **підрозділі 1.2** дається загальна характеристика ЛХН, розглядається роль лізосом у клітинному гомеостазі (рис. 1.1), представлено різні класифікації ЛХН, описано механізми формування захворювання та патогенетичні основи терапії. Розділ добре проілюстровано. Бажано, щоб підписи на рисунках 1.1 та 1.2 були українською мовою.

В **підрозділі 1.2.6** змістовно описано «особливості лабораторної діагностики ЛХН».

В **підрозділі 1.3** розглядається хвороба Гоше, як модель лізосомної хвороби накопичення. Детальний опис цієї хвороби є логічним, тому що значна кількість

експериментального матеріалу присвячена саме цій хворобі. Дисертант розглядає історію вивчення, патогенетичні основи клінічного поліморфізму, молекулярну генетику і ензимологію. Представлені рисунки 1.4 і рис. 1.5 і їх аналіз свідчать про широту інтересів Ольхович Н. В. На завершення літогляду, в **підрозділі 1.3.3**, розглянуто сучасні терапевтичні підходи до лікування - фермент-замісна, субстрат-специфічна, терапія фармакологічними шаперонами, трансплантація кісткового мозку та стовбурових клітин. Розглянута ефективність дії декількох комерційних препаратів. Огляд написано літературною мовою, дуже послідовно і логічно. Ольхович Н.В. вдалось доступно і досить коротко пояснити деякі базові поняття. Його зміст вводить в проблематику, сприяє кращому розумінню експериментальної частини роботи. Автор акцентує увагу на важливості розробок комплексних алгоритмів, з урахуванням персональних даних конкретного пацієнта.

Розділ 2. Матеріали та методи. Наведено дані щодо пацієнтів з ЛХН, що спостерігались в спеціалізованому медико-гематологічному центрі та Центрі орфанних захворювань в період з 1995 по 2016 рік. Група контролю медико-генетичних досліджень складала 622 особи, біохімічних досліджень - 117 осіб.

В роботі використовували сучасні біохімічні методи визначення активності і ферментів в гомогенаті лейкоцитів, сухих плямах крові, визначення активності хітотриозидази, вмісту неоптерину, модифікованих протеїнів в плазмі крові. Детальний опис методів свідчить про добру обізнаність автора. Молекулярно-генетична частина включала визначення мутацій в генах, що розглядались. Статичний аналіз одержаних результатів проводили з використанням різних статистичних програм.

Розділ 3. Результати дослідження та їх обговорення. Представлено трьома підрозділами. В підрозділі 3.1. автор вивчає вплив структурних перебудов в генах – детермінаторах на біохімічний фенотип ЛХН. Характеризуються поліморфні алелі генів детермінаторів. Визначається частота різних алелів, їх вплив на фенотип відповідних хвороб, оцінюються генотип – фенотипові кореляції у пацієнтів з хворобою Гоше в Україні.

Розділ 3.2 Вивчення впливу модифікуючих генетичних факторів на формування фенотипу ЛХН представлено 5 підрозділок. Вражає великий об'єм роботи по характеристиці біохімічного поліморфізму пацієнтів з хворобою Гоше з генотипом p.N409S/p.N409S, p.N409S/p.L483P та p.N409S/p.R159W.

В **підрозділі 3.2.2** автор використовує активність хітотриозидази та рівень неоптерину в плазмі крові для оцінки запального процесу і ступеня активації макрофагів. Встановлено, що активність хітотриозидази, рівень неоптерину та оксидативно модифікованих протеїнів в плазмі крові у пацієнтів з хворобою Гоше I типу з легким перебігом достовірно нижчі

порівняно з пацієнтами з більшим ступенем тяжкості. Аналіз частоти алельного поліморфізму генів GSTT1, GSTM1 засвідчив асоціативний зв'язок делеційних варіантів цих генів з розвитком клінічної картини хвороби з більшим ступенем тяжкості.

В підрозділах 3.2.4, 3.2.5 оцінюється вплив поліморфних варіантів генів IL1b, IL8, GSTM1 на перебіг хвороби Гоше. Трохи не зрозуміло, чому такий великий об'єм експериментальних даних представлено лише однією публікацією.

Важливою частиною експериментальної роботи є **розділ 3.3**, де вивчено вплив методологічних факторів in vitro на біохімічний фенотип при ЛХН. Автор переконливо приводить дані, що використання сухих плям призводить до зниження показника активності лізосомних ферментів. Це, безумовно, треба брати до уваги при проведенні діагностики відповідного захворювання. Крім того, автор рекомендує визначати для кожної діагностичної лабораторії власні референтні межі.

Важливо, що результати експериментів одразу підсумовуються в таблицях, схемах, порівнюються з результатами авторів з інших країн. Автор екстраполює свої результати в стерео – діаграмній моделі (рис. 3.29). Кожний підрозділ експериментальної частини має свою теоретичну преамбулу. Крім того, результати експерименту ґрунтовно обговорюються в кінці кожного підрозділу.

Зауваження до експериментальної частини:

1. На мій погляд дещо перевантажено виглядає інформація підрозділу 3.1, де розглядаються різні алельні варіанти, різні нозологічні форми, фенотипові прояви хвороб і т.п.
2. Не зазначено у якому гелі, у якій концентрації проводився електрофорез. Як приклад- рис.3.1, 3.3, 3.4 та інш.
3. Не зазначено збільшення на рис. 3.9.
4. Не зазначено сторінки публікацій в посиланнях 2 та 3 (стр. 110).

Розділ 4. Аналіз і узагальнення отриманих результатів. Наталія Вікторівна на основі експериментальних досліджень представляє патогенетичний каскад порушень при ЛХН. На кожному рівні формування патології визначається комплексний характер впливу первинних і вторинних факторів. Аналізується внесок ланок каскаду - генотипу, ферменту, субстрату, лізосоми, клітини на фенотип захворювання. На цій основі формується концепція комплексного впливу первинних етіологічних і вторинних модифікованих факторів на формування фенотипу лізосомних хвороб накопичення. Автор підкреслює важливість

персоналізованого підходу до визначення оптимальних шляхів лабораторної діагностики (рис. 4.6) як фактору оцінки ризику перебігу захворювання і тактики терапії.

Безумовно, виграшною стороною роботи є її практична значимість. Це підтверджується численими методичними рекомендаціями, інформаційним листом про нововведення, повідомленнями про впровадження. У зв'язку з широким впровадженням в медичну практику специфічної патогенетичної терапії автор визначає три (в тексті роботи чотири) передумови ефективності лікування:

1. Раннє та точне визначення первинного біохімічного дефекту;
2. Оцінка рівня вторинних біохімічних маркерів;
3. Визначення первинного генетичного дефекту, який обумовив виникнення хвороби у конкретної особи;
4. Визначення вторинних факторів впливу на формування відповіді на накопичення недеградованого субстрату.

Тільки дотримання цих заходів забезпечує можливий персоналізований підхід до ефективної діагностики і лабораторного супроводу терапії кожного пацієнта.

Повнота викладу основного змісту дисертації в опублікованих працях у наукових фахових виданнях.

За темою дисертації опубліковано 56 наукових робіт, у тому числі 19 - статті у фахових журналах згідно зі списку МОН України, 5- статті в журналах, що входять до міжнародної бази, 4- статті у інших фахових виданнях. Ольхович Н. В. має 3 методичні рекомендації, 1 інформаційний лист про нововведення, 4 повідомлення про впровадження, 29 тез доповідей на наукових конференціях.

Відповідність автореферату змісту дисертації.

Автореферат повністю розкриває зміст дисертаційної роботи та повноту опублікованих по темі даних.

В процесі роботи над відгуком виникло декілька **дискусійних запитань**, на які хотілося б почути відповідь Наталії Вікторівни :

1. Ваша дисертація має практичне значення. Які ж маркери Ви вже використовуєте в своїй практиці?
2. Які зразки біологічного матеріалу краще надавати для аналізу і чи використовуєте Ви вже референтні межі ферментативної активності ?
3. Чим обумовлений вибір саме цих нозологічних форм ЛХН?
4. Як Ви бачите подальший розвиток цієї тематики?

Дисертаційна робота Ольхович Н. В. добре оформлена і чітко написана літературною мовою, окремі похибки стилістичного і технічного характеру, як і низка питань і зауважень дискусійного плану, не знижують її науково-практичну значимість.

Висновок.

Вважаю, що дисертаційна робота Ольхович Наталії Вікторівни «**Молекулярно-генетичні основи формування біохімічного фенотипу лізосомних хвороб накопичення**» за своєю актуальністю, об'ємом, новизною отриманих результатів, науково-практичною значимістю відповідає вимогам постанови Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», які пред'являються до докторських дисертацій, а її автор Ольхович Наталії Вікторівни заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент,

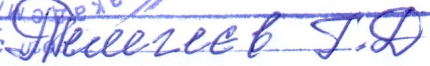
завідувач відділу молекулярної

генетики Інституту молекулярної

біології і генетики НАН України, д.б.н.



Г.Д. Телегєєв

Підпис 
посвідчується
