

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Трофімової Наталі Сергіївни
**«АНАЛІЗ БІОХІМІЧНИХ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ЗМІН
В РОДИНАХ ВИСОКОГО РИЗИКУ МУКОПОЛІСАХАРИДОЗУ З
УКРАЇНИ»,**

що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Актуальність теми дисертаційної роботи та її зв'язок з науковою тематикою. Сьогодні в біологічних науках і біомедицині спостерігається значне підвищення інтересу до вуглеводів, участь яких в біологічних процесах тривалий час здавалась другорядною порівняно з провідною роллю нуклеїнових кислот і білків. Разом з тим все більше прихильників знаходить гіпотеза глікокоду – інформаційної системи, що працює на основі вуглеводів і їх похідних, яку розглядають як додаткову до генетичного коду (Сибірня Н.О. і співав., 2015). Синтез вуглеводів не є матричним процесом і вимагає участі багатьох ферментів і мембранних транспортерів. Порушення внаслідок мутації тієї чи іншої ланки цього складного багатоступеневого каскаду біохімічних реакцій може призвести до патологічних наслідків, що і спостерігається у випадку мукополісахаридозу (МПС) – гетерогенної групи рідкісних (орфанних) спадкових метаболічних захворювань. МПС характеризується великим різноманіттям проявів, що свідчать про залучення до патологічного процесу різних органів та систем – центральної нервової, опорно-рухової і серцево-судинної. Захворювання належить до лізосомних хвороб накопичення. На біохімічному рівні показано, що дефектний стан будь-якого з відомих лізосомних гідролаз, залучених у послідовне розщеплення глікозаміногліканів (ГАГ) призводить до накопичення аномальних вуглеводів в лізосомах клітин і порушенню їх нормального транспортування. Прояви цієї патології, для якої характерним є значний клінічний поліморфізм, досліджуються давно і ілюструють важливість нормального перебігу метаболізму глікозаміногліканів (ГАГ) для здоров'я людини, що має фундаментальне загально біологічне значення. Разом з тим генетичний аспект проблеми – виявлення мутацій, які визначають певний біохімічний дефект і дають підстави ідентифікувати один з 7 типів МПС, вимагає більш детальних досліджень і є основою високої актуальності дисертаційної роботи. Цей аспект є також передумовою розробки більш точного, порівняно з існуючими, алгоритму ранньої діагностики і призначення відповідної терапії, ефективність якої значною мірою залежить від адекватного встановлення типу МПС.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу генетичної діагностики ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України" «Оцінка ролі генетичних, епігенетичних та

середовищних факторів у формуванні та перебігу деяких видів спадкової патології» та «Оцінка ролі генетичних факторів у формуванні та перебігу лізосомних хвороб накопичення для оптимізації клінічної і лабораторної діагностики цих захворювань».

На основі глибокого вивчення стану питання з обраної тематики дисертантка чітко сформулювала мету роботи, яка стосувалась визначення біохімічних та молекулярно-генетичних характеристик в родинах високого ризику мукополісахаридозу в Україні, для підвищення ефективності ранньої діагностики. Відповідно сім завдань були спрямовані на досягнення поставленої мети.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що вперше для пацієнтів з України, що страждають на МПС, поєднано результати біохімічних досліджень з визначенням частоти і спектру відповідних первинних генетичних дефектів, на базі яких дана патологія виникає, і одержано критерії для ранньої і точної діагностики.

На моделі двох найбільш поширених захворювань з групи МПС (МПС I і МПС IIIA), альтернативних щодо проявів клінічного поліморфізму, вперше одержано детальну інформацію про молекулярно-генетичну характеристику українських пацієнтів з МПС I і МПС IIIA. Виявлено три раніше не описані місенс-заміни в гені *IDUA* (кодує фермент α -L-ідуронідазу) і визначено характер їх впливу на фенотип пацієнта: заміна, позначена як p.N372S, призводила до тяжкої хвороби – синдрому Гурлер; мутація p.S633* в гомозиготному стані проявлялась як синдром Гурлер/Шейє, а заміна p.Q563P асоціювалась з формуванням легкого фенотипу – синдрому Шейє. Аналогічно знайдено нові мутації також гені *SGSH* (кодує гепаран-N-сульфатазу).

Виявлення нових мутацій в гомозиготному стані є свідченням їх поширення саме в досліджуваній популяції. Елементи новизни і діагностичне значення мають також результати методичних розробок, спрямованих на визначення межі вікових значень показників рівня ГАГ та активності відповідних лізосомних ферментів для здорових осіб, а також хворих на МПС і членів їх родин.

Практичне значення одержаних результатів. Ефективність сучасного лікування пацієнтів з МПС великою мірою залежить від правильної ідентифікації змін молекулярної структури генів, асоційованих з фенотиповим проявом і характером перебігу захворювання. В дисертаційній роботі Н. С. Трофімової розроблено систему підходів для ранньої і точної діагностики, а також чітко окреслено критерії щодо інтерпретації результатів на кожному етапі обстеження пацієнтів. У випадку окремих форм захворювання (зокрема, МПС I) визначення відповідного генотипу дає можливість адекватно визначати тактику лікування. Одержана в ході виконання дослідження інформація є корисною для проведення профілактичної роботи і медико-генетичного консультування в родинах, обтяжених МПС.

Одержані автором результати впроваджено в роботу Центру орфанних захворювань та Спеціалізованого медико-генетичного центру НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України, регіональних медико-генетичних центрів, використовуються в підготовці кваліфікованих кадрів на базі кафедри медичної та лабораторної генетики НМАПО імені П.Л.Шупика.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій. Дисертація має типову структуру, викладена на 167 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 45 рисунками і 30 таблицями. Список використаних джерел містить 291 посилання, серед яких достатньо представлені роботи останніх років.

Представлений у розділі 1 літературний огляд, що обіймає 24 сторінки, є змістовним і демонструє високий рівень теоретичної підготовки дисертантки, але дещо перевантажений інформацією щодо етіології і патогенезу різних проявів МПС. Заключний підрозділ – «Проблеми диференційної діагностики мукополісахаридозів, складності в постановці діагнозу» є обґрунтуванням обраної теми і визначає коло питань, перспективних для подальшого дослідження

Сучасний методичний рівень роботи, представлений у розділі 2, забезпечено поєднанням біохімічних методів, які стосуються визначення рівня екскреції ГАГ і активності лізосомних ферментів, що відповідають за їх деградацію, і ключових методів молекулярної генетики: виділення ДНК, ПЛР, визначення поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ), пряме автоматичне секвенування за Сенгером, використання біоінформатичних ресурсів та баз даних. Результати супроводжуються статистичним аналізом і їх висока якість не викликає сумніву. Детальне викладення методичного матеріалу є безумовним свідченням особистої участі дисертанта у виконанні експериментів.

Експериментальна частина (розділ 3) насичена матеріалом і добре проілюстрована таблицями і рисунками. Вона складається з трьох розділів, які логічно і послідовно відображають стратегію вирішення завдань дисертаційної роботи. На першому етапі (підрозділ 3.1) необхідно було на біохімічному рівні охарактеризувати особливості біологічної варіації значень рівня глікозаміногліканів (ГАГ) в лейкоцитах та біологічних рідинах у пацієнтів з МПС та членів їх родин і порівняти з відповідним контролем – представниками населення України різних вікових груп. Аналогічне дослідження стосувалось активності лізосомних гідролаз, залучених у послідовне розщеплення ГАГ. Успішне вирішення цих завдань дозволило визначити межі біологічної варіації основних біомаркерів МПС у пацієнтів з України і встановити їх відмінності від аналогічних показників для представників деяких інших країн. В результаті було запропоновано комплексний алгоритм біохімічного обстеження осіб при підозрі на МПС, здатний забезпечити більшу ефективність ранньої диференціальної діагностики цієї групи захворювань. Наступний етап (підрозділи 3.2 і 3.3) присвячено оригінальним дослідженням

молекулярно-генетичних особливостей поширених в Україні форм МПС-I типу і МПС-IIIА типу, що базувались на визначенні спектра мутацій в гені *IDUA* та гені *SGSH*. Найсуттєвішим результатом було виявлення трьох місенс-замін в гені *IDUA*, а також трьох перебудов в гені *SGSH*, які не увійшли до відомої бази даних HGMD, і були описані автором вперше. Цікаво, що за спектром певних мажорних мутацій пацієнти з МПС, які проживають в різних країнах Європи можуть істотно відрізнитись. Зокрема, автором встановлено, що частота мажорної мутації Q70* у пацієнтів з МПС I в Україні є найближчою до аналогічного показника у Польщі.

Проведені ретельні дослідження дозволяють зробити обґрунтований висновок, що в сучасних умовах молекулярно-генетичне обстеження є абсолютно необхідним етапом для диференціації клінічних форм МПС і призначення відповідного лікування. Ці заходи у поєднанні з біохімічними тестами здатні значно покращити якість і подовжити строки життя хворих на МПС і своєчасно надати консультативну допомогу обтяженим цими патологіями родинам.

У розділі 4, присвяченому аналізу та узагальненню отриманих результатів, матеріали дисертаційного дослідження докладно коментуються відповідно до відомих даних літератури. Розділ доповнено таблицями і проілюстровано схемами, які чітко узагальнюють алгоритми, розроблені автором для обстеження хворих з підозрою на МПС.

Ознайомлення з результатами дисертаційної роботи Трофімової Н.С. дозволяє дійти висновку, що експериментальний матеріал отримано автором особисто або при безпосередній участі. Досліди поставлено коректно, а результати проаналізовано за допомогою відповідних статистичних програм.

Висновки приведено у відповідність до мети і завдань дисертації. Вони обґрунтовані і цілком відображають основний зміст роботи.

Повнота викладення основних результатів дослідження. Матеріали дисертації повністю висвітлені у фахових друкованих виданнях. За темою дисертації опубліковано 13 наукових робіт, у тому числі – п'ять статей у виданнях, рекомендованих МОН України. Серед них 3 статті надруковано в журналі, що входить до наукометричної бази даних. Результати дослідження доповідались на 7 представницьких міжнародних та вітчизняних наукових форумах.

Відповідність автореферату змісту дисертації. Матеріали дисертаційної роботи адекватно представлено в авторефераті. Дисертація та автореферат написані в академічному стилі і легко сприймаються. **Зауваження по змісту та оформленню дисертації.** Дисертація добре оформлена і принципових зауважень не викликає. Разом з тим, до дисертаційної роботи виникли наступні зауваження:

1. Потребує коментарів вживання терміна «етнічна група» в тексті і в назвах деяких таблиць.

2. Недоліком є те, що оригінальні розробки автора не закріплено патентом.

3. В роботі зустрічаються невдалі вирази і технічні помилки.

Наведені зауваження жодним чином не впливають на загальну високу оцінку розглянутої дисертаційної роботи.

Висновок про відповідність встановленим вимогам. Враховуючи великий об'єм експериментального матеріалу, застосування сучасних адекватних методів дослідження, наукову новизну і практичне значення одержаних результатів вважаю, що дисертація Трофімової Наталі Сергіївни «Аналіз біохімічних та молекулярно-генетичних змін в родинах високого ризику мукополісахаридозу з України» є цілісною завершеною науковою працею, яка повністю відповідає вимогам п. 11 чинного «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №56, що пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент,
старший науковий співробітник
відділу білкової інженерії та біоінформатики
Інституту молекулярної біології і
генетики
Національної академії наук України,
доктор біологічних наук



I.S.Карпова

Підпис *Карпова І.С.*
посвідчується
Зав. кафедр. І.С. Матейко