

ВІДГУК

офіційного опонента Кучменко Олени Борисівни,
доктора біологічних наук, професора, провідного наукового співробітника
відділу імунології та біохімії ДУ «Національний науковий центр «Інститут
кардіології ім. акад. М.Д.Стражеска» НАМН України
на дисертаційну роботу Трофімової Наталії Сергіївни
«Аналіз біохімічних та молекулярно-генетичних змін в родинах високого
ризикі мукополісахаридозу з України», подану на здобуття ступеня
кандидата біологічних наук до спеціалізованої вченої ради Д 26.562.02.
при ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини» НАМН
України за спеціальністю 03.00.15 - генетика

Актуальність теми. Актуальність обраної дисертантом теми не викликає сумнівів, оскільки своєчасна рання діагностика спадкових захворювань на сьогодні є однією із важливих завдань медичної практики. Робота Трофімової Н.С. присвячена вивченню біохімічних та молекулярно-генетичних змін в родинах з високим ризиком мукополісахаридозу з України. Мукополісахаридози є групою рідких спадкових метаболічних захворювань, які відносяться до лізосомних хвороб накопичення і обумовлені порушенням метаболізму глікозаміногліканів в лізосомах клітин різних органів і тканин. Особливістю мукополісахаридозів є значний клінічний поліморфізм, що суттєво ускладнює встановлення діагнозу на підставі клінічних та параклінічних даних. Крім того, кожна популяція характеризується певною біологічною варіацією значень біохімічних маркерів патологічних станів, межі якої необхідно враховувати при встановленні гранично допустимих значень результатів біохімічних досліджень. Враховуючи вище зазначене, необхідними етапами ранньої і точної нозологічної діагностики мукополісахаридозів та визначення оптимальної терапевтичної стратегії є виявлення ключових біохімічних маркерів, специфічних для певного типу мукополісахаридозу, а також первинного генетичного дефекту, який спричинив виникнення захворювання у пацієнта. В Україні на сьогодні відсутні дослідження щодо біологічної варіабельності значень біохімічних маркерів наявності мукополісахаридозів, що суттєво ускладнює ефективну діагностику і проведення своєчасного лікування.

У зв'язку з цим актуальність роботи Трофімової Н.С. відповідає сьогоденним запитам біологічної та медичної науки, оскільки її метою є визначення біохімічних та молекулярно-генетичних характеристик в родинах високого ризику мукополісахаридозу в Україні для підвищення ефективності ранньої діагностики.

Зв'язок теми дисертації з державними та галузевими науковими програмами. Дослідження виконані в рамках тематичного плану НДР 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» (пошукова 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 роботи.

Наукова новизна одержаних результатів. Автором роботи вперше визначено межі біологічної варіації вікових значень кількості загальних глікозаміногліканів в сечі здорових осіб та пацієнтів з мукополісахаридозом з України, а також встановлено межі біологічної варіації значень активності лізосомальних ферментів, залучених до метаболізму глікозаміногліків для населення України та інтервали відповідних значень для пацієнтів з мукополісахаридозом і в родинах, обтяжених цією патологією. Дисертантом показано, що 47% алелів гена *IDUA* у пацієнтів з мукополісахаридозом I типу з України містять мажорні місенс-мутації p.Q70* та p.W402*, що збігається з поширеністю цих мутацій в інших країнах; інші алелі (53%) представлені рідкісними варіантами перебудов у 2-му, 7-му, 8-му, 9-му та 14-му екзонах. Виявлено три раніше не описані місенс-заміни в гені *IDUA* – p.N372S, p.Q563P та p.S633*, які призвели до розвитку захворювання у пробандів, про що свідчить ймовірний вплив цих замін на функціональну активність продукту гена *IDUA* за результатами *in silico* аналізу.

Також автором показано, що 64,3% алелів гена *SGSH* у пацієнтів з мукополісахаридозом III A типу з України містять мажорну місенс-мутацію p.R74C; інші алелі (35,7%) представлені рідкісними варіантами перебудов у 2-му, 4-му, 7-му та 8-му екзонах. Ним виявлено три раніше не описані мутації в гені *SGSH* – c.216delC, p.G149A та c.1045_1070del27, які призвели до розвитку захворювання у пробандів, про що свідчить ймовірний вплив на функціональну активність продукту гена *SGSH* за результатами *in silico* аналізу.

Практичне значення результатів дослідження. Отримані Трофімовою Н.С. у дисертаційній роботі результати мають велике практичне значення, оскільки встановлені межі біологічної варіації значень специфічних для мукополісахаридозів біохімічних маркерів дозволяють визначити особливості біохімічного профілю здорових осіб та пацієнтів з мукополісахаридозом з України, що може використовуватись для оптимізації ранньої та точної нозологічної діагностики цієї групи захворювань та визначення критеріїв інтерпретації результатів на кожному етапі обстеження. Ідентифікація 100% первинного генетичного дефекту у пацієнтів з мукополісахаридозом I типу дає можливість більш точно визначати тактику лікування (пересадка кісткового мозку або фермент-замісна терапія) у хворих в залежності від наявності певного генотипу, а також для проведення ефективної медико-генетичної консультації в родинах, обтяжених мукополісахаридозом I та III A типів.

Одержані дисертантом результати впроваджені в роботу Центру орфанних захворювань та Спеціалізованого медико-генетичного центру НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України, регіональних медико-генетичних центрів, використовуються в педагогічному процесі кафедри медичної та лабораторної генетики НМАПО імені П.Л.Шупика.

Ступінь обґрунтованості та достовірність положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Достовірність результатів та висновків дисертаційної роботи базується на достатній кількості біохімічних та молекулярно-генетичних досліджень. У дисертації Трофімової Н.С.

застосовані сучасні біохімічні (визначення рівню екскреції глікозаміногліканів в сечі методом нефелометрії, тонкошарова хроматографія глікозоаміногліканів, визначення активності лізосомальних ферментів, що відповідають за деградацію глікозоаміногліканів, з використанням синтетичного флюорогенного субстрату), молекулярно-генетичні (полімеразна ланцюгова реакція, метод поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів, метод прямого автоматичного секвенування по Сенгеру), статистичні методи, адекватні поставленим завданням.

На основі чітко сформульованих завдань, використання комплексного методичного підходу дисертанту вдалося досягти поставленої в роботі мети. Усі висновки дисертаційної роботи є обґрунтованими і доведеними.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. У приведених публікаціях повністю відображено основні результати з усіх розділів дисертації. Автореферат Трофімової Н.С. повністю розкриває зміст дисертації і дає повне уявлення про наукову цінність і практичну значимість дисертаційної роботи. Зміст автореферату ідентичний основним положенням дисертації. Оформлення дисертації та автореферату здійснено у відповідності до вимог ДАК МОН України. Ступінь оприлюднення матеріалів дисертації достатній.

Загальна характеристика дисертації. Дисертація Трофімової Н.С. побудована за загально прийнятою та рекомендованою структурою: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, їх узагальнення, висновки та список використаних джерел, що налічує 291 найменування. Дисертація викладена на 167 сторінках друкованого тексту, містить 45 рисунків та 30 таблиць, написана гарною науковою мовою.

У загальній характеристиці роботи автор розкриває суть обраного напрямку наукових досліджень та обґрунтовує його актуальність. Автором сформульовані мета, завдання дослідження, викладені наукове і практичне значення отриманих результатів.

В огляді літератури Трофімова Н.С. дала усебічну характеристику мукополісахаридозам, навела їх класифікацію та описала етіологію і патогенез різних типів мукополісахаридозів. Крім цього, автором описані підходи до лікування даної патології та різноманітні проблеми, що виникають при діагностиці цього захворювання. Розділ характеризується достатньою повнотою аналізу новітніх наукових праць як вітчизняних, так і закордонних авторів та їх критичною оцінкою, що дозволило дисертанту окреслити невирішені питання. Огляд свідчить про широку ерудицію дисертанта, обізнаність з досягненнями в галузі обраної ним проблеми та вміння визначити шляхи наукового пошуку.

Розділ «Матеріали та методи досліджень» присвячений характеристиці методів досліджень. В роботі використано сучасні біохімічні і молекулярно-генетичні методи досліджень, біоінформаційні web-ресурси та бази даних, а також проведена статистична обробка результатів досліджень. Експериментальна частина дисертаційної роботи побудована за єдиною логічною схемою, виконана на високому сучасному науково-методичному рівні.

Автором було охарактеризовано біологічну варіацію маркерів, які визначають специфічний біохімічний профіль мукополісахаридозів, запропоновано новий підхід до інтерпретації результатів визначення цих маркерів та встановлено інтервали значень активності лізосомних ферментів, залучених у внутрішньолізосомну деградацію глікозаміногліканів, для населення України. Це дозволило розробити алгоритм біохімічного обстеження осіб при підозрі на мукополісахаридоз з використанням оптимізованих методів селективного скринінгу і підтверджуючої діагностики з метою забезпечення ефективної ранньої диференціальної діагностики цієї групи захворювань.

Дисертантом було проведено аналіз молекулярно-генетичної характеристики пацієнтів з мукополісахаридозом I типу в Україні, в ході якого було ідентифіковано та описано 100% мутантних алелів. Автор

зазначає, що висока частота серед пацієнтів з України мутацій p.Q70* (32,35%) та p.W402* (14,7%) робить доцільним проведення ПДРФ-скринінгу на їх наявність на першому етапі молекулярно-генетичного аналізу. При цьому при визначенні рідкісних мутацій, які призвели до розвитку захворювання у пробанда, доцільно починати аналіз з «гарячих» ділянок гена *IDUA* – 2-го, 7-го, 8-го, 9-го та 14-го екзонах, в яких були локалізовані більшість патогенних мутацій у обстежених нами пацієнтів.

Автором також було проведено аналіз молекулярно-генетичної характеристики пацієнтів з мукополісахаридозом IIIA типу в Україні, в ході якого було ідентифіковано 100% мутантних алелів. Автор наголошує, що висока частота серед пацієнтів з України мутації p.R74C (64,3%) робить доцільним проведення ПДРФ-скринінгу на її наявність на першому етапі молекулярно-генетичного аналізу. Мутація p.R245H, дуже поширена в деяких європейських популяціях, серед обстежених нами пацієнтів була знайдена лише в одному алелі, таким чином її ПДРФ-скринінг не є актуальним для нашої країни. При визначенні рідкісних мутацій, які призвели до розвитку захворювання у пробанда, доцільно починати аналіз з «гарячих» ділянок гена *SGSH* – 2-го, 7-го та 8-го екзонів, в яких були локалізовані більшість патогенних мутацій у обстежених нами пацієнтів. Такий порядок при плануванні аналізу дозволить оптимізувати час і ресурси на проведення аналізу і забезпечить максимальну ефективність молекулярно-генетичної діагностики мукополісахаридозу IIIA типу в Україні.

Базуючись на отриманих даних, дисертант запропонувала алгоритми діагностики мукополісахаридозу I і IIIA типу. Так, при виявленні у пацієнта біохімічного дефекту, який підтверджує мукополісахаридоз I типу, необхідно проводити подальшу молекулярно-генетичну діагностику. На першому етапі, проводиться скринінг мажорних мутацій p.Q70* та p.W402* в гені *IDUA*. Наявність у хворого мажорних мутацій p.Q70* та p.W402* у гені *IDUA* підтверджує синдром Гурлер. Якщо у пацієнта не знайдено мажорних мутацій, або вони знайдені лише в одному алелі, проводять подальші

дослідження для визначення рідкісних мутацій, які призвели до розвитку захворювання у пробанда, методом прямого автоматичного сиквенування по Сенгеру. Доцільно починати аналіз з «гарячих» регіонів гена *IDUA* – 2-му, 7-му, 8-му, 9-му та 14-му екзонах, в яких були локалізовані більшість патогенних мутацій у обстежених нами пацієнтів з мукополісахаридозом I типу в Україні.

Так само, при виявленні у пацієнта біохімічного дефекту, який відповідає мукополісахаридозу III A типу, доцільно проводити двохетапну молекулярно-генетичну діагностику. На першому етапі, доцільно здійснити пошук мажорної мутації R74C в гені *SGSH* методом ПДРФ-аналізу. Якщо хоча б одна з двох алелей буде не визначена, продовжити пошук рідкісних або нових мутацій методом прямого автоматичного сиквенування по Сенгеру, починаючи аналіз з «гарячих» регіонів гена *SGSH* – 2-го, 7-го та 8-го екзонів, в яких були локалізовані більшість патогенних мутацій у обстежених пацієнтів з мукополісахаридозом IIIA типу в Україні.

Використання запропонованого автором алгоритму дозволило підтвердити діагноз мукополісахаридозу у 98 пацієнтів з України.

Разом із викладенням отриманих результатів автор проводить їх узагальнення, аналізує отримані результати, що є прикладом логічної систематизації та критичного підходу до аналізу власних результатів. Одержані результати стали основою для висновків, які об'єктивно віддзеркалюють власні спостереження, відповідають меті і завданням дослідження. Список використаних джерел оформлений у відповідності до сучасних вимог та не викликає зауважень.

Питання та побажання щодо змісту та оформлення дисертації.

Дисертаційна робота справляє позитивне враження – вона викладена доступно, логічно, добре оформлена. Оцінюючи дисертаційне дослідження, впевнено можна сказати, що одержані матеріали мають значне теоретичне та практичне значення.

В якості побажань і зауважень слід відмітити наступне:

1. В тексті дисертаційної роботи автор називає мутацію p.Q70* місенс-мутацією і нонсенс-мутацією. Краще було б уніфікувати.
2. В розділі «Матеріали і методи» автором зазначено, що молекулярно-генетичні дослідження були проведені в групі хворих і в групі членів обтяжених родин. Проте в роботі не наведено результатів дослідження осіб з групи членів обтяжених родин. Було б краще навести ці результати.

Під час ознайомлення з роботою виникли деякі питання, на які хотілось би отримати відповідь:

1. Чому автор виділяє саме чотири вікові групи для оцінки рівня глікозаміногліканів в сечі?
2. Автор вимірювала активність деяких лізосомальних ферментів в лейкоцитах, а деяких – в плазмі крові. З чим це пов'язано? Яким чином лізосомальні ферменти потрапляються в плазму крові?
3. З чим може бути пов'язане градієнтне поширення вивчаємих в дисертаційній роботі мутацій (рис. 4.2. і рис. 4.4)?

Проте, як висновок, слід зауважити, що зауваження та поставлені питання не зменшують значущості даної роботи, яка в цілому, носить закінчений характер.

Відповідність дисертації встановленим вимогам. Висновок.

Дисертаційна робота Трофімової Наталії Сергіївни «Аналіз біохімічних та молекулярно-генетичних змін в родинах високого ризику мукополісахаридозу з України», представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика, є самостійною, завершеною науково-дослідною роботою. Вона містить нові дані, що стосуються особливостей біохімічних та молекулярно-генетичних змін в родинах високого ризику мукополісахаридозу в українській популяції. Робота має не лише наукове, але й практичне значення, оскільки в ній запропоновано алгоритми для більш ефективної діагностики мукополісахаридозу різних типів серед населення України.

За актуальністю, новизною отриманих результатів, їх теоретичною та практичною значимістю, глибиною узагальнень та висновків, а також за технічним оформленням представлена дисертаційна робота у повному обсязі відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 року, а її автор, без сумніву, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент -

провідний науковий співробітник

відділу імунології та біохімії

ДУ «Національний науковий центр

«Інститут кардіології ім. М.Д.Стражеска»

НАМН України,

доктор біологічних наук, професор



О.Б. Кучменко
СВІДЧУЮ
Підписуючий
Начальник відділу кадрів Л.М.Турівна
"09" 06 2017р.

О.Б. Кучменко