

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Барвинской Оксаны Юрьевны «ОПТИМІЗАЦІЯ СЕЛЕКТИВНОГО СКРИНІНГУ СПАДКОВИХ ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ АМІНОКИСЛОТ ТА АЦИЛКАРНІТИНІВ У ДІТЕЙ», представленную на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15 – генетика.

Представленная диссертационная работа Барвинской Оксаны Юрьевны посвящена оптимизации селективного скрининга наследственных нарушений обмена аминокислот и ацилкарнитинов. Она достигается путем определения биохимических и молекулярно-генетических особенностей указанных изменений, находящихся среди основных причин ранней неонатальной или младенческой смертности, либо инвалидности. Под воздействием большинства из них происходят быстрые неспецифические изменения состояния ребенка в первые дни или недели после рождения, проявляющиеся на фоне обычного рациона кормления. В этих условиях залогом предупреждения развития тяжелой формы болезни у пациента, а также ее эффективного лечения является ранняя диагностика.

Таким образом, диссертация Барвинской Оксаны Юрьевны является крайне актуальной. Актуальность данной работы еще более повышается с учетом того, что подобные исследования в Украине в других научных подразделениях практически не проводятся.

Структура диссертации включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, три главы результатов исследований, выводы, перечень иллюстративного материала и список использованных научных источников.

Глава 1 – «Обзор литературы» – состоит из 4 подразделов. В первом подразделе автор выясняет роль аминокислот и ацилкарнитинов в метаболизме человека. Второй и третий – посвящены наследственным нарушениям их обмена и анализу возможностей лабораторной

диагностики. В четвертом – представлены программы селективного скрининга. Обзор построен логично, а его материал репрезентативно отражает современное состояние проблемы диссертации, идейно и методически связан с результатами представленных в ней исследований. Он компактен, но при этом весьма информативен, что дает возможность оппоненту во всеоружии приступить к рассмотрению представленных в диссертации результатов исследований. Среди задействованных источников новейшие научные работы, а именно опубликованные за последние десять лет вплоть до 2018 года, составляют 79,5%. Это очень высокий показатель.

Фактически обзор литературы представляет собой развернутую методологию диссертационного исследования, что встречается крайне редко в подобных работах.

Глава 2 – «Материалы и методы исследования». В подразделе «материалы исследования» приведены сведения о полном количестве людей, обследованных в рамках селективного скрининга наследственных нарушений метаболизма: так называемая «группа поиска», состоящая из 6783 детей и юношей в возрасте от 7 дней до 18 лет. Из этого массива данных выделена «основная группа исследования» с аномальными показателями; «референтные группы» для установления половых и возрастных границ биологической вариации исследуемых показателей у новорожденных; а также «контрольная группа». Отдельная группа представлена родителями пациентов высокого риска, которым проводили ДНК-диагностику для уточнения диагноза их детей.

В процессе проведения исследований использовались биохимические, молекулярно-генетические и статистические методы.

Необходимо также отметить, что все исследования проводились на материале, взятом из украинской популяции.

Переходим к результатам экспериментальных исследований, изложенным в главах 3 – 5.

Как отмечалось выше, оптимизация селективного скрининга наследственных нарушений обмена аминокислот и ацилкарнитинов достигается путем определения биохимических и молекулярно-генетических особенностей указанных изменений. Для этого устанавливаются возрастные референтные интервалы уровней аминокислот и ацилкарнитинов в сухих пятнах крови у детей. Необходимо отметить, что достоверная интерпретация результатов наследственных нарушений обмена аминокислот и ацилкарнитинов невозможна без учета популяционных особенностей показателей их вариации и расчета референтных интервалов. Однако в Украине такие исследования до сих пор не проводились.

Приведенный в главе 3 анализ полученных диссертантом результатов не выявил региональных различий концентраций аминокислот и ацилкарнитинов у новорожденных детей Украины.

В тоже время оценка необходимости разделения значений их референтных интервалов, проведенная по полу и срокам гестации в указанной группе, показала неоднозначные результаты. Так, лишь четыре аминокислоты требовали отдельного расчета референтных интервалов для мальчиков и девочек. При сравнении референтных интервалов значений концентраций аминокислот у доношенных и недоношенных новорожденных было установлено, что в этих группах лишь для 6 из 15 проанализированных показателей следует использовать отдельные референтные интервалы.

Необходимость разделения референтных интервалов концентраций ацилкарнитинов по полу внутри групп доношенных и недоношенных детей была установлена только для показателя C8: 1. В то время, как для показателя C5 были найдены различия значений референтных интервалов для девочек и мальчиков внутри группы доношенных детей, а для показателя C8 в группе недоношенных детей.

При сравнении референтных интервалов значений концентраций ацилкарнитинов у доношенных и недоношенных новорожденных было показано, что отдельные референтные интервалы в обеих группах детей необходимо устанавливать только для ацилкарнитинов: с короткой цепью для показателей C0, C3, C3DC, C4, C5; средней цепью для показателей C6, C8, C8: 1, C10: 2; и длинной цепью для показателей C12, C14: 1, C16, C18OH, C18: 1OH, C18: 2.

Глава 4. В ней представлены результаты селективного скрининга наследственных нарушений обмена аминокислот и ацилкарнитинов. На их основании установлены критерии разграничения специфических патогенетически обусловленных изменений концентраций аминокислот и ацилкарнитинов при наследственных нарушениях метаболизма от неспецифических вторичных нарушений обмена веществ. Установленные референтные интервалы уровней аминокислот и ацилкарнитинов позволили провести ретроспективный анализ результатов селективного скрининга, а также установить критерии для повышения его эффективности.

Всего было обследовано 6783 детей, из них у 1368 были обнаружены аномальные показатели. Наиболее распространенными симптомами у пациентов с аномальными показателями были поражения печени (300 человек, 22%) и судороги (331 человек, 24%). При этом наследственные метаболические заболевания были подтверждены для 28 лиц среди пациентов с поражением печени и для 13 лиц среди пациентов с судорогами.

У 272 пациентов с поражением печени были обнаружены метаболические изменения, которые могут быть связаны с нарушением работы печени под влиянием воспалительных процессов, скрывающих наследственные метаболические заболевания. Для повышения эффективности интерпретации результатов селективного скрининга наследственных нарушений, связанных с обменом аминокислот и

ацилкарнитинов, были установлены критерии, повышающие специфичность диагностики: тирозинемии I типа с 87,1 % до 98,3%; метилмалоновой ацидемии с 90,9% до 99,3%; изолированного дефицита ДЛ-3-ГАД с 98,9% до 100%.

В группе пациентов с судорогами у 318 пациентов выявлены следующие метаболические отклонения: повышение концентрации цитруллина у 44 человек, аргинина у 30, лейцина у 63, C5OH у 41, C8: 1 у 45 человек и снижение концентрации C0 у 95 человек. Для решения задачи, связанной с разграничением вторичных отклонений концентраций лейцина от повышения его уровня при лейцинозе, предложено использовать критерий <583 мкмоль / л в качестве верхнего предела концентрации лейцина при диагностике лейциноза. Такой подход повысил специфичность метода интерпретации результатов с 98,1% до 99,7% . Другие из перечисленных выше метаболических изменений, по мнению диссертанта, могли быть обусловлены спецификой лечения пациентов.

Глава 5. Посвящена установлению первичных генетических дефектов, обусловивших наследственные нарушения обмена аминокислот и ацилкарнитинов у детей.

Среди этой группы часто причиной тяжелых метаболических кризов являются органические ацидемии (изолированная метилмалоновая, глутаровая I-го типа, изовалериановая) и нарушение β -окисления жирных кислот (изолированный дефицит ДЛ-3-ГАД). Изучение спектра мутаций, вызывающих данные наследственные заболевания, позволит, по мнению диссертанта, разработать оптимальные алгоритмы их молекулярно-генетической диагностики, а также проводить ДНК-диагностику, в тех случаях, когда обследование пациентов по метаболическим показателям невозможно.

В данной главе приведены результаты молекулярно-генетического анализа спектра мутаций у пациентов с изолированным дефицитом ДЛ-3-

ГАД, изолированной метилмалоновой и изовалериановой ацидемиями, глутаровой ацидезией I-го типа.

Начнем с дефицита ДЛ-3-ГАД. Но прежде одно затруднение, которое необходимо было преодолеть диссертанту: схожесть первоначальных биохимических маркеров и клинических симптомов ДЛ-3-ГАД и другого наследственного заболевания, дефицита трифункционального белка. Для дифференцировки этих метаболических нарушений им был проведен молекулярно-генетический скрининг в гене *HADHA* миссенс-замены с.1528G> C, характерной для пациентов с изолированным дефицитом ДЛ-3-ГАД. В результате было установлено, что 94,4% аллелей (17/18) этих пациентов несли указанную мутацию, что позволило диагностировать у них изолированный дефицит ДЛ-3-ГАД и рассчитать его частоту, составившую 1: 255 451 новорожденных.

У пациентов с органическими ацидемиями также проведен анализ последовательностей всех экзонов и фланкирующих интронных участков генов *MUT*, *MMAA*, *GCDH*, *IVD*. Он выявил ряд особенностей спектра их мутаций. При этом родители больных детей также оказались носителями отмеченных наследственных изменений. На основе полученных результатов, Оксана Юрьевна усовершенствовала алгоритмы молекулярно-генетических исследований пациентов с органическими ацидемия, разработав способ оптимального лабораторного обследования пациентов с высокой группой риска.

С удовольствием отмечаю, что термин «аллель» на протяжении всего текста диссертации использовался исключительно в женском роде, как это принято в классических публикациях по генетике!

Подытоживая рассмотрение материала диссертации, хочу отметить, что Оксана Юрьевна продемонстрировала способность критически и всесторонне анализировать данные, в большей мере полученные ей самостоятельно. Материалы диссертации и автореферата изложены ясно, хорошим литературным языком, научные положения и выводы логичны,

всесторонне обоснованы и репрезентативно отражают результаты проведенных исследований. Труды соискателя опубликованы в специализированных научных изданиях, в том числе входящих в наукометрическую базу данных, и целиком отображают содержание, все положения и выводы диссертации. Автореферат в сжатой форме адекватно передает ее содержание. Сама диссертация, по своей сути и направленности проведенных исследований, полностью отвечает паспорту специальности 03.00.15 – генетика.

Однако, несмотря на все достоинства, диссертация и автореферат не лишены недостатков. Они касаются как их оформления, так и содержания.

Начнем с автореферата.

– (стр. 1). «Найбільш поширеною причиною ранньої перинатальної патології серед СПОАА є органічні ацидемії (метилмалонова (MIM251000), глутарова ацидемія I-го типу (MIM231670), ізовалеріанова ацидемії (MIM243500)) та порушення β -окислення жирних кислот (ізолюваний дефіцит ДЛ-3-ГАД MIM609016)». Получается, что, глутаровая и изовалерановая ацидемии не являются органическими ацидемиями. Это же замечание относится к диссертации (стр. 18);

– (стр. 5). Из контекста не понятно, что является контролем для референтной группы?;

– (стр. 13). Использован термин миссенс замена. Правильно – миссенс мутация;

Теперь перейдем к диссертации.

Аннотация.

– (стр. 2) «В роботі досліджувались сухі плями крові новонароджених, дітей віком від 7 днів до 18 років, дітей з підозрою на спадкові метаболічні порушення та групи порівняння методом рідинної хроматографії тандемної мас-спектрометрії.». Неудачная редакция;

– (стр. 4) «В результаті дослідження спектру мутацій у 5 пацієнтів з

глутаровою ацидемією I-го типу з України було ідентифіковано 100% алелів в гені *GCDH*». О чем идет речь можно только догадываться.

– (стр. 5) «В результаті проведення молекулярно-генетичного аналізу спектру мутацій у 5 пацієнтів з ізольованою метилмалоною ацидемією було ідентифіковано 80% алелів: 3 мутації в гені *MUT* та 2 мутації в гені *ММАА*». А здесь в чем смысл?

Перечень условных сокращений.

– (стр. 16) Перечень куций, лишен аббревиатур на латинице.

Обзор литературы. В нескольких местах встречаются не расшифрованные аббревиатуры. Например, на стр. 36 – MCADD, LCHADD, VLCADD, TFP.

Материалы и методы исследования. (стр. 49) «Цю групу сформували 1163 особи (778-хлопчиків та 625-дівчат)...». Якщо скласти 778-хлопчиків та 625-дівчат то вийде 1403 дитини.

Переходим к результатам исследований.

Глава 4. (стр. 91) «Неонатальні судоми є одним з основних індикаторів дисфункції центральної нервової системи, у 40-50% випадків вони є вторинними внаслідок гіпоксично-ішемічної енцефалопатії, інфекції, кортикальної мальформації, або ж спадкових порушень метаболізму (СПМ)». Поскольку дання аббревиатура уже была в тексте ранее, то в данном случае используется либо СПМ, либо ее рас шифровка.

Глава 5. (стр. 105) «В цьому дослідженні було проведено аналіз послідовностей всіх екзонів та фланкуючих інтронних ділянок генів *MUT*, *ММАА*, *GCDH*, *IVD* з метою вивчення молекулярно-генетичних особливостей у 5 пацієнтів...». Перед «...молекулярно-генетичних особливостей...» необхідно написать їх.

Однако отмеченные выше недостатки не умаляют очевидных достоинств представленной нам сегодня работы.

Внимательно ознакомившись с диссертацией Барвинской Оксаны Юрьевны «ОПТИМІЗАЦІЯ СЕЛЕКТИВНОГО СКРИНІНГУ

СПАДКОВИХ ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ АМІНОКИСЛОТ ТА АЦИЛКАРНІТИНІВ У ДІТЕЙ» констатую, що вона являється завершеною науко-исследовательской роботою на актуальну тему. В цілому вказана робота повністю відповідає вимогам п.п. 11 і 12 Постановлення Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 г. №567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів...», пред'являемим к кандидатским дисертаціям, а її автор заслуговує присудження научної ступені кандидата біологічних наук по спеціальності 03.00.15 – генетика.

Оппонент:
ведущий научный сотрудник
отдела молекулярной онкогенетики
Института молекулярной биологии
и генетики НАН Украины,
доктор биологических наук



Ю. В. Вагин

Підпис *Вагин Ю.В.*
посвідчується
Зав. кафедрою К. Мельник