

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Мицик Наталії Йосипівни «Молекулярно-генетична характеристика спадкових орфанних хвороб обміну, що супроводжуються дефіцитом β -галактозидази», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук із спеціальності 03.00.15 – генетика.

Актуальність обраної теми, її зв'язок з планами відповідних галузей науки і народного господарства.

На даний момент нараховують більше 700 видів вроджених порушень метаболізму з сумарною частотою 1:500-1:700 у новонароджених. Зазвичай, ці захворювання обумовлені мутаціями одиничних генів, що призводять до повної чи часткової втрати функцій ферментів, які перетворюють одні субстрати на інші. Тому відбувається накопичення проміжних субстратів, які внаслідок токсичності чи/та фізичного порушення компартментізації клітини призводять до системних незворотних змін в організмі.

За сучасної класифікацією розрізняють десять лише основних класів вроджених порушень метаболізму (вуглеводного обміну; обміну окремих амінокислот; органічних кислот; пуринів і піримідинів; лізосомні хвороби накопичення тощо).

Лізосомні хвороби накопичення (ЛХН, Lysosomal storage disease, LSDs) – один із класів вроджених порушень метаболізму, що поєднує більше 50 захворювань, які спричинено генетичними дефектами ферментів лізосом. Оскільки лізосоми є органелами, що виконують функцію внутрішньоклітинного розщеплення макромолекул і містять гідролітичні ферменти, то порушення нормального функціонування ферментів будь-якої ланки ланцюга перетворень субстратів зазвичай має фатальні наслідки як для клітини, так і для організму в цілому. Подібні спадкові розлади здебільшого спричинені дефіцитом одного з ферментів, необхідного для метаболізму ліпідів, глікопротеїнів, мукополісахаридів тощо. Зазвичай, дані порушення успадковуються за аутосомно-рецесивним типом, однак описано і випадки Х-зчепленого успадкування. Частота кожного із лізосомних захворювань накопичення, зазвичай, рідко перевищує 1:100000 новонароджених, але сумарна частота усіх можливих варіантів ЛХН сягає 1:5000-1:10000. Для більшості ЛХН притаманна як клінічна, так і генетична мінливість. Це у поєднанні зі стрімким та незворотнім перебігом призводить до того, що значна кількість летальних випадків, спричинених ЛХН, реєструється до уточнення або взагалі до встановлення діагнозу.

Саме тому розробка діагностичних підходів, які на основі клініко-біохімічних даних (як більш доступних та дешевих) дозволяють максимально звузити групу пошуку, пацієнти якої дійсно потребують молекулярно-генетичного підтвердження діагнозу. Тому дана робота, яка мала на меті виявлення критеріїв селективного відбору пацієнтів з підозрою на GM1-гангліозидоз, синдромом Моркіо В та галактосіалідоз серед хворих на ЛХН є вкрай важливою для своєчасної діагностики даних нозологічних форм ЛХН. Окрім прикладного значення робота безумовно має велику наукову цінність, оскільки робіт щодо розповсюдження, молекулярно-генетичного аналізу для жителів України не проводилось. В свою чергу, такі дані дають можливість застосовувати більш ефективний індивідуальний підхід щодо вибору методів обстеження пацієнтів, проводити якісне медико-генетичне консультування і, що особливо важливо для спадкових хвороб, пренатальну діагностику в сім'ях, обтяжених даною патологією. Тому видається цілком логічним вибір стратегії наукового дослідження Мицик Н.Й. щодо розробки алгоритму поетапного лабораторного обстеження осіб з групи високого ризику для ранньої і точної діагностики вищезгаданих захворювань. Запропоноване почергове звуження кола осіб з групи ризику за допомогою клінічних, біохімічних та молекулярно-генетичних методів дозволяє оптимізувати обстеження пацієнтів із групи ризику і скоротити кількість зразків, які дійсно потребують молекулярно-генетичного аналізу більше ніж на порядок.

Роботу виконано в рамках тематичного плану науково-дослідних робіт відділу генетичної діагностики ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН»: «Оцінка ролі генетичних, епігенетичних та середовищних факторів у формуванні та перебігу деяких видів спадкової патології», (пошукова), термін виконання: 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.

Отже, тема дисертаційної роботи Наталії Йосипівни Мицик безсумнівно є актуальною, що визначається як теоретичним, так і практичним значенням проблеми. Завдання, які було заплановано вирішити в ході виконання дисертації, мають важливе значення як для біології, так і для медицини.

Наукова новизна, теоретичне та практичне значення одержаних результатів.

Насамперед слід відзначити елементи наукової новизни у даній роботі. На мою думку, найважливіші наукові результати, отримані автором дисертації Наталії Йосипівни Мицик, такі:

- виявлено шість нових мутацій в гені *GLB1* серед пацієнтів з GM1-гангліозидозом та синдромом Моркіо В: делеції (с.699delG, с.833delG, с.1203_1205delTTA), місенс-мутації (р.Gly243Arg, р.Gly262Ala) та мутацію, що призводить до заміни нуклеотиду в сайті сплайсингу (IVS12+8T>C);
- показано, що місенс-мутація р.His281Tyr серед пацієнтів з GM1-гангліозидозом з України становить близько 37 %, що дозволяє визначити її як мажорну;
- запропоновано виявлення цієї мажорної мутації за допомогою дешевого та швидкого ПЛР-ПДРФ аналізу;
- зроблено аналіз географічного розповсюдження мутантних варіантів гена *GLB1* по регіонам України, зокрема високу частоту місенс-мутацій р.His281Tyr (74 %) та р.Gly255His (100%) в західних регіонах (Івано-Франківська та Закарпатська області);
- визначено частоти захворюваності на GM1-гангліозидоз в кількох областях України та показано, що найбільша частота спостерігалась в Закарпатській та Івано-Франківській областях.

Як згадувалось вище, **робота має пряму практичну спрямованість**. Так визначення варіації значень активності β -галактозидази для контрольної групи населення України дозволило встановити референтні значення нормальної активності ферменту для інтерпретації результатів за біохімічними показниками.

Виявлення мажорної мутації р.His281Tyr в гені *GLB1* за допомогою ПЛР-ПДРФ може бути рекомендовано для застосування при проведенні експрес-тестів при молекулярно-генетичній діагностиці у пацієнтів з дефіцитом β -галактозидази з України в генетичних центрах МОЗ України та медико-генетичних лабораторіях.

Особливості розповсюдження певних мутацій в окремих областях України у хворих на GM1-гангліозидоз та синдром Моркіо В можливо використовувати для планування медико-генетичного консультування пацієнтів з дефіцитом β -галактозидази у даних регіонах. **Запропонований алгоритм лабораторного обстеження пацієнтів з дефіцитом β -галактозидази вже впроваджено в практику** Спеціалізованого медико-генетичного центру (СМГЦ), Центру орфанних захворювань (ЦОЗ) НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України і використовуються в навчальному процесі на кафедрі медичної та лабораторної генетики НМАПО імені П. Л. Шупика.

Отже, очевидно, що мета роботи досягнена, і всі завдання повністю виконані із залученням адекватних методів та підходів.

Особистий внесок здобувача

Автором особисто виконано більшість робіт з дослідження та аналізу результатів

біохімічного скринінгу ензимів, що досліджувались у пацієнтів групи ризику та в контрольній групі донорів. Самостійно виділено ДНК та проведено молекулярно-генетичне дослідження біологічного матеріалу. Розроблено протокол для виявлення мажорної мутації p.His281Tyr в гені *GLBI* за допомогою ПЛР-ПДРФ аналізу та запропоновано алгоритм лабораторного обстеження осіб з підозрою на дефіцит β -галактозидази. Проведено статистичний аналіз даних та узагальнення результатів, написано і оформлено всі розділи дисертації. Ступінь участі в спільних наукових публікаціях відзначено у переліку опублікованих робіт.

Структура і об'єм дисертації. Дисертаційна робота є рукописом і побудована за традиційним принципом. Вона складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, трьох розділів, присвячених результатам власних досліджень, розділу, в якому запропоновано власний алгоритм лабораторного обстеження осіб з підозрою наявності дефіциту β -галактозидази, розділу аналізу та узагальнення результатів, висновків та списку цитованої літератури. Роботу викладено на 134 сторінках машинописного тексту і проілюстровано 17 таблицями та 34 рисунками.

У «Вступі» (7 сторінок) автором вказано на актуальність проблеми, визначено мету і завдання дослідження, розкрито наукову новизну, теоретичне та практичне значення роботи.

Розділ "Огляд літератури" (22 сторінки) містить аналіз великої кількості літературних джерел за темою роботи, а саме аналізу особливостей клінічних, біохімічних та генетичних характеристик GM1-гангліозидозу, синдрому Моркіо В та галактосіалідозу, що спричинені дефіцитом β -галактозидази. Не менше половини публікацій вийшли з друку протягом останніх років, а більш ранні роботи дозволяють зрозуміти хронологію досліджень природи даних захворювань. Після ознайомлення з цим розділом дисертації стає зрозуміло, що ці захворювання характеризуються значним клінічним та біохімічним поліморфізмом та широким спектром генетичних порушень, на частоти яких часто мають вплив ще й етнічно-ізоляційні фактори. Описано спроби розробки підходів до лікування цих порушень метаболізму, зокрема із застосуванням генотерапії, шаперонотерапії, що можливо лише з врахуванням конкретних генетичних мутацій кожного з пацієнтів.

Підкреслюється, що дотепер в Україні не проводилось детального статистичного аналізу варіативності клінічних, біохімічних та молекулярно-генетичних характеристик як для населення в цілому, так і для пацієнтів з цими нозологічними формами лізосомних хвороб накопичення. Саме це і було поштовхом для виконання даної роботи.

Другий розділ (13 сторінок) присвячено детальному викладенню матеріалів і методів, які було використано для виконання дисертаційної роботи, зокрема, описано принцип поділу на окремі групи пацієнтів, які звертались з підозрою на лізосомні хвороби накопичення, а також походження зразків групи контролю. Підкреслено, що всі особи, які входили до груп дослідження, підписали інформовану згоду на участь в дослідженні. Біохімічні (тонкошарової хроматографія олігосахаридів та глікозаміногліканів сечі, визначення загальної кількості білка та активності β -галактозидази в гомогенаті лейкоцитів) та молекулярно-генетичні методи (виділення ДНК, проведення ПЛР та ПЛР-ПДРФ, в тому числі підбір специфічних праймерів, сиквенування та порівняльний аналіз отриманих хроматограм ампліфікатів із залученням баз даних відомих мутацій людини), які було використано при виконанні роботи, описано достатньо для розуміння процесів та для відтворення в інших лабораторіях. Окремий розділ присвячено опису статистичних підходів до аналізу даних, але, на жаль, в ньому лише згадано, які методи і критерії було застосовано без особливих подробиць та формул.

Результати експериментальної роботи викладено автором у розділах 3-6.

Наприкінці кожного розділу зроблено висновки і вказано, в яких публікаціях висвітлено результати відповідних досліджень.

Так в третьому розділі (11 сторінок) описано підхід щодо використання клініко-біохімічних методів, а саме визначення екскреції олігосахаридів та кератансульфату з сечею у

пацієнтів з підозрою на ЛХН, для звуження кола пацієнтів, яким дійсно необхідне подальше проведення ензимологічного та молекулярно-генетичного аналізу. Саме завдяки аналізу екскреції олігосахаридів з сечею вдалось виділити групу в 76 осіб з 1867, які звернулись за консультацією. Вже в сформованій групі було проаналізовано екскрецію кератансульфату та показано, що у одного пацієнта було зареєстровано високий вміст даного субстрату. І хоча гіперсекреція кератансульфату характерна не лише для синдрому Моркію типу В, а також для синдрому Моркію А, проведення подібної біохімічної диференціації є важливим етапом у розділенні зразків хворих з підозрою на ЛХН на кілька груп ризику.

В розділі чотири (9 сторінок) описано результати роботи з визначення активності β -галактозидази в лейкоцитах та плазмі крові пацієнтів групи ризику, їхніх батьків та в контрольній групі. Необхідність такого дослідження викликана тим, що цей показник має високу варіативність у різних країнах світу, а для України таких даних дотепер не було. Для цього було проаналізовано 120 умовно-здорових донорів, а потім проведено порівняння з групою ризику в 76 осіб, яку було сформовано на попередньому етапі дослідження. У 27 з них було зафіксовано низький рівень активності β -галактозидази в лейкоцитах крові (причому у 26 — і в плазмі також, що є характерним для GM1-гангліозидозу та синдрому Моркію В). У одного з 27 пацієнтів спостерігалась нормальна активність β -галактозидази, що свідчило на користь наявності у пацієнта галактосіалідозу. На жаль, внаслідок низької частоти даних нозологій ЛХН було виявлено лише по одному випадку синдрому Моркію В та галактосіалідозу і хоча автор при статистичному аналізі назвав обидва випадки "групами" і провів порівняння навряд це виправдано (детальніше у зауваженнях). Однак сам факт аналізу активності β -галактозидази у населення України має важливе значення для створення методичних підходів до диференційного клініко-біохімічного аналізу зразків хворих з підозрою на ЛХН.

Розділ п'ять (22 сторінки) є, як на мене, головним розділом дисертаційної роботи. В ньому наведено результати молекулярно-генетичного аналізу мутацій в гені *GLB1* у пацієнтів з дефіцитом β -галактозидази з різних регіонів України. Так, за допомогою ПЛР аналізу ДНК 26 пацієнтів, яких було відібрано за допомогою клініко-біохімічних критеріїв (як описано в двох попередніх розділах) та прямого секвенування отриманих ампліфікатів, було виявлено 17 різних мутацій в гені *GLB1*. Слід особливо підкреслити, що 6 з них взагалі було описано вперше в світі. Окрім опису самих мутацій та їх частот було проаналізовано можливі наслідки таких змін на функціональному рівні за допомогою програм MutationTaster, PolyPhen2, Provean. На основі аналізу частот мутацій та частоти захворюваності було створено карту розповсюдження алелів з мутаціями в гені *GLB1* у пацієнтів з дефіцитом β -галактозидази в різних регіонах України, при аналізі якої можна візуально прослідкувати і можливу етнічно-ізоляційну складову, яку описано для інших країн із вираженими ізоляційними факторами (хоча слід зазначити на даний момент карта носить більше інформативно-звітний, аніж статистично значущий характер). Крім того, було показано, що мутацію p.His281Tyr виявлено в 37% зразків пацієнтів з дефіцитом β -галактозидази, що дало підставу виділити її як мажорну для України. Виходячи з останнього, було запропоновано швидкий метод її виявлення за допомогою ПЛР-ПДРФ аналізу ДНК пацієнтів з підозрою на ЛХН, що прискорює та здешевлює молекулярно-генетичне підтвердження діагнозу GM1-гангліозидоз.

Матеріали викладені в розділі шість (6 сторінок) "Алгоритм лабораторного обстеження осіб з підозрою наявності дефіциту β -галактозидази", як на мене, було б більш доцільним представити в наступному розділі – "Аналіз та узагальнення результатів", оскільки в ньому представлено підхід щодо практичного використання даних, які отримано в дисертаційній роботі. Зокрема, наведено загальний алгоритм ведення хворих з підозрою на ЛХН від первинного виявлення до проведення молекулярно-генетичного аналізу і, відповідно, постановки відповідного, генетично підтвердженого, діагнозу.

В розділі "Аналіз та узагальнення результатів" (12 сторінок) автор аналізує одержані результати у порівнянні з відомими літературними даними. Окрім того, в кінці розділу

наведено дані щодо практичного використання запропонованого алгоритму в діагностичній практиці центру орфанних захворювань (ЦОЗ) та спеціалізованого медико-генетичного центру (СМГЦ) НДСЛ «ОХМАТДИТ» та пропозиції щодо її використання у інших регіональних медико-генетичних центрах України.

У "Висновках" дисертант формулює основні наукові надбання. Висновки конкретні, відповідають поставленим завданням і базуються на одержаних результатах.

У розділі "Список використаних джерел" представлено 196 посилань на наукові роботи вітчизняних та закордонних авторів, які наведено в алфавітному порядку.

Новизна і якість використаних для дослідження методів, репрезентативність отриманих результатів. Наукові результати, які наведено в дисертації, одержано із застосуванням адекватних методів і представлено в достатньому обсязі. Автор застосував комплекс сучасних методів дослідження, які дозволили вирішити всі поставлені завдання на високому методичному рівні. Усе це дозволило на високому рівні виконати всю заплановану роботу. Достовірність представлених результатів в цілому сумніву не викликає, хоча внаслідок низької частоти захворювання деякі нозології представлено одиничними зразками. Ці вади, сподіваюсь, буде усунено при накопиченні даних під час подальшого аналізу більших груп пацієнтів з підозрою на ЛХН. Текст дисертації та автореферату ілюстровано достатньою кількістю рисунків та таблиць. Слід відзначити хорошу якість оформлення дисертації, зрозумілий виклад матеріалу, а незначні стилістичні та орфографічні помилки не впливають на позитивне враження від ознайомлення з роботою.

Повнота опублікування основного змісту у фахових виданнях. Наукові праці дисертанта містять основні наукові здобутки й висновки дисертаційної роботи. Основні експериментальні результати опубліковано в 11 наукових роботах: в чотирьох наукових фахових виданнях, які рекомендовано МОН України, одному закордонному наукометричному виданні, 1 – в виданні, яке не входить до вищезгаданих категорій, та п'яти тезах доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Відповідність автореферату змісту дисертації. В авторефераті адекватно відображено і повністю розкрито основний зміст матеріалів дисертаційної роботи.

Зауваження. Хоча після ознайомлення дисертаційна робота справляє позитивне враження, необхідно висловити деякі зауваження і побажання.

1. Не дуже логічною видається подача матеріалу в розділі "Огляд літератури" в послідовності "білок" — "захворювання" — "молекулярно-генетичні чинники". Звичайно, у "Вступі" наведено основну характеристику роботи, але і у "Огляді літератури" було б доцільніше розпочати з характеристики саме захворювань, які є об'єктом дослідження, а потім переходити до опису біохімічних та молекулярно-генетичних чинників, які характерні для окремих нозологій.
2. В розділі 2.1 вказано, що "Група контролю для дослідження активності β -галактозидази склали 120 добровільних донорів з різних регіонів України без наявності клінічних ознак лізосомної патології", але ніде в тексті не згадується як саме вона формувалась. Особливо важливим є географічний розподіл з огляду на те, що отримані дані пропонується використовувати як референтний критерій порівняння для всієї України (висновок 1).
3. Дуже поверхнево в роботі наведено дані статистичної обробки: як в розділі матеріали і методи, в якому не наведено жодної формули, так і в самій роботі в деяких випадках не зовсім зрозуміло яким саме методом користувався автор для статистичної обробки. Як приклад наведу фразу з розділу 4.2. (С. 64) дисертаційної роботи: "Статистичний аналіз

значущості різниці активності β -галактозидази в плазмі крові у пацієнта з галактосіалідозом та у групі пацієнтів з GM1-гангліозидозом та синдромом Моркіо В свідчив про те, що різниця значень активності β -галактозидази між даними групами є достовірно значущою ($p < 0,01$). Такий результат підтверджував можливість використання методу визначення активності β -галактозидази в плазмі крові для ідентифікування вторинного дефіциту β -галактозидази – галактосіалідозу".

Читачам і рецензентам лишається лише здогадуватись за якими критеріями підтверджено статистичну значущість з ймовірністю навіть не 0,05, а 0,01 і як один пацієнт з галактосіалідозом чи один пацієнт з синдромом Моркіо В, змогли стати "групами" для такого порівняння. Як на мене, в даному випадку можна було б проаналізувати чи належать значення активності ферменту цього пацієнта до значень характерних для пацієнтів з GM1-гангліозидозом, але не більше.


4. Вважається передчасним п'ятий висновок дисертаційної роботи, оскільки для більшості областей представлено аналіз одиничних зразків, а для майже половини областей хворих не було виявлено взагалі (див табл 5.4.1 та 5.4.2 дисертації та рис. 6 автореферату). Звичайно ці дані буде уточнено під час накопичення даних при подальшому аналізі пацієнтів з підозрою на ЛХН, а зараз можна було статистично перевірити чи різняться розповсюдження захворювання на GM1-гангліозидоз скажімо в Закарпатській та Івано-Франківській областях і порівняти з Київською тощо.
5. Навпаки в третьому висновку автор використовує фразу "Шість видів мутацій не були описані раніше в літературі....", замість "нами вперше було описано 6 нових мутацій...", що надало б цьому висновку зовсім іншого звучання.
6. У тексті дисертації та автореферату досить рідко, але все ж таки зустрічаються невиправлені технічні помилки, кількість яких не перевищує однієї помилки на сторінку. В списку скорочень "ПЛР" розшифровано як "полімеразно ланцюгова реакція", а не використано загальноприйнятий варіант "полімеразна ланцюгова реакція", у змісті та в тексті дисертації переважно зустрічається "катепсина", хоча у скороченнях написано — катепсину (останній варіант, як на мене, і є вірним, оскільки родовий відмінок для більшості хімічних сполук має закінчення -у), EDTA чомусь розшифровано як "калієваї сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти", в тексті зустрічається ЄДТА замість ЕДТА тощо.

Однак, в цілому, наведені зауваження не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи. Це зріла наукова праця, яка базується на узагальненні власних і літературних даних. Безумовно, автор дисертації є висококваліфікованим спеціалістом у своїй галузі. Значний об'єм експериментальної частини дисертації, узагальнення отриманих результатів та опрацювання літературних джерел виконано автором особисто. Все це дозволяє стверджувати, що перед нами довершена наукова робота, яка, окрім наукової, має очевидну практичну спрямованість.

Рекомендації з подальшого використання результатів праці та доцільність продовження і розвитку відповідних досліджень.

Хоча запропонований алгоритм лабораторного обстеження пацієнтів з дефіцитом β -галактозидази вже впроваджено в практику Спеціалізованого медико-генетичного центру (СМГЦ), Центру орфанних захворювань (ЦОЗ) НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України, але, на мою думку, необхідно оформити його у вигляді методичних рекомендацій, інформаційних листів МОЗ України тощо для використання і в інших регіональних медико-генетичних центрах країни. Матеріали досліджень також має сенс оформити в якості навчального посібника як для лікарів первинної ланки (оскільки своєчасне первинне виявлення таких хворих залежить саме від них), так і для лікарів та дослідників медико-генетичних центрів для оптимізації та стандартизації підходів до диференційної діагностики цих нозологічних форм серед хворих на ЛХН.

Висновок. Отже, я маю всі підстави вважати, що дисертаційна робота Мицик Н.Й. представляє собою завершене, самостійно виконане дослідження, яке досягло поставленої мети. За важливістю та обсягом експериментальних і теоретичних завдань, які знайшли вирішення в даній роботі, науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів дисертаційна робота Мицик Наталії Йосипівни «Молекулярно-генетична характеристика спадкових орфанних хвороб обміну, що супроводжуються дефіцитом β -галактозидази», відповідає всім вимогам постанови Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р № 567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів», які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор Мицик Наталія Йосипівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 - генетика.

Офіційний опонент,
кандидат біологічних наук,
науковий співробітник відділу молекулярної генетики
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України  М.В. Дибков

