

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора медичних наук, старшого наукового співробітника Вайсермана Олександра Михайловича на дисертаційну роботу Гулковського Романа Владиславовича “Генні мутації у дітей з інтелектуальною недостатністю”, представлену до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика до спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 при Інституті молекулярної біології і генетики НАН України

Актуальність теми

Накопичені за останнє десятиліття експериментальні дані дозволили суттєво розширити наші уявлення про роль спадкових факторів в етіології психічних захворювань і, зокрема, інтелектуальної недостатності (ІН). Значною мірою прогрес у цій сфері зумовлений стрімким розвитком сучасних молекулярно-генетичних та біоінформатичних методів. Фактор спадковості є одним з ведучих у виникненні ІН. На сьогодні відомо кілька сотень різних спадкових патологій, що супроводжуються порушеннями інтелектуального розвитку. Але, попри останні досягнення у вивченні молекулярних основ різних форм ІН, наше розуміння патогенезу таких порушень все ще недостатнє. Тому виявлення нових генів і генних мереж, які можуть впливати на виникнення таких розладів, необхідне для кращого розуміння молекулярно-генетичних та нейробіологічних механізмів, що лежать в основі поведінкових і когнітивних порушень. Представлена до захисту дисертаційна робота Р.В. Гулковського має відношення до окресленої проблеми і присвячена дослідженню мутацій, виявлених в ході повноекзомного секвенування в генах *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*, *SCEL* та *Cborf223*, а також поліморфізму нуклеотидної послідовності гена *LIF* як потенційних генетичних факторів патогенезу інтелектуальної недостатності у дітей. Тема роботи пов’язана з одним з пріоритетних напрямків розвитку науки й техніки України, а саме «Геномні технології в біомедицині та сільському господарстві». Отже, актуальність дисертаційної роботи Р.В. Гулковського не викликає сумнівів.

Зв’язок з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота здійснена під час виконання плану науково-дослідних робіт відділу геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетної теми «Алельний поліморфізм генів, залучених до фенотипу моногенних та мультифакторних патологій» (шифр теми 2.2.4.13, № держ. реєстрації 0110U000695, 2011-2015 рр.) та отриманого на конкурсних засадах проекту

«Поліпшення діагностики розумової відсталості у дітей Центральної Східної Європи та Центральної Азії за допомогою генетичної характеристики та біоінформатики/статистики» (проект 7 Рамкової програми ЄС CHERISH, номер угоди про фінансову підтримку 223692, 2009-2012 рр.).

Особистий внесок здобувача

Автором самостійно проведено секвенування за Сенгером продуктів ПЛР генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*, *SCEL*, *C6orf223* та сегрегаційний аналіз, біоінформатичний аналіз досліджуваних мутацій та поліморфізмів, аналіз консервативності амінокислотної послідовності білкових продуктів досліджуваних генів в місцях локалізації ідентифікованих мутацій та моделювання за гомологією третинної структури нормальних та мутантних білкових продуктів відповідних генів, виділення та очищення геномної ДНК із зразків периферійної крові індивідів з групи обстеження та контрольної групи, розробку методик детекції досліджуваних алельних варіантів генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*, *SCEL*, *C6orf223* та *LIF*, статистичну обробку даних. Представлена дисертація може бути визнана самостійним дослідженням.

Достовірність і обґрунтованість результатів наукових положень і висновків

Наукові положення, висновки і рекомендації логічно впливають з фактичного матеріалу і обґрунтовані результатами досліджень. Дисертантом обрано коректну стратегію проведення дослідження, обстежено достатню кількість людей (319 осіб), для дослідження застосовано сучасні і адекватні методи молекулярно-генетичного, біоінформатичного та статистичного аналізу.

Новизна отриманих результатів

Р.В. Гулковським вперше ідентифіковано міссенс мутації с.1891G>A в 11-му екзоні гена *EPHA1* та с.212A>G в 1-му екзоні гена *PUS3*. Вперше отримано дані про розповсюдження виявлених у пацієнтів з інтелектуальною недостатністю алельних варіантів с.1475G>A та с.1891G>A гена *EPHA1*, с.212A>G гена *PUS3* та с.806_808CAT>TGTCGA гена *ZNF527* у популяційній вибірці населення України. Отримано моделі за гомологією просторових структур нормальних та мутантних білкових продуктів генів *EPHA1* та *PUS3*. Вперше отримано докази на користь того, що мутації с.1475G>A та с.1891G>A в гені *EPHA1* є генетичними чинниками патогенезу інтелектуальної недостатності моногенної природи. Вперше показано, що носійство алельних варіантів 1475A гена *EPHA1* та 4524G гена *LIF* є фактором спадкової схильності до розвитку інтелектуальної недостатності мультифакторної

природи. Доведено, що носійство алельних варіантів 3022C та 1399A гена *EPHA1* має протекторний ефект, що зумовлює знижений відносний ризик розвитку інтелектуальної недостатності у дітей.

Практичне значення отриманих результатів

Ідентифіковано генотип, до складу якого входить мутація с.1891G>A в компаунді з мононуклеотидною заміною с.1475G>A в гені *EPHA1* як новий генетичний чинник інтелектуальної недостатності. Розроблено методики детекції мутантних варіантів с.1475G>A та с.1891G>A гена *EPHA1*, а також мононуклеотидних замін rs11767557 і rs11771145 в гені *EPHA1* та rs929271 в гені *LIF*, придатні для генетичного тестування в групах з інтелектуальною недостатністю.

Повнота викладу основного змісту дисертації в опублікованих працях у наукових виданнях

Основні положення роботи викладені у 11 друкованих працях, зокрема, в 5 статтях у фахових наукових виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз даних. Результати дослідження були апробовані на вітчизняних та міжнародних наукових форумах (6 доповідей).

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

Дисертація Р.В. Гулковського викладена в традиційній формі, з дотриманням вимог ДАК МОН України, на 145 сторінках стандартного друкованого тексту. Дисертація складається зі вступу, літературного огляду, розділу матеріалів і методів дослідження, єдиного розділу власних результатів експериментальних досліджень, узагальнення та обговорення отриманих результатів, висновків і списку використаних джерел. Робота добре ілюстрована 22 рисунками та 12 таблицями. Список використаної літератури охоплює 255 найменувань, з них більше половини (63%) надруковані за останні 10 років, а кожна третя публікація (33%) – за останні 5 років.

У вступі дисертант обґрунтував актуальність, мету, задачі дослідження, визначив наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, показав зв'язок з науковими програмами і темами, підкреслив особистий внесок у виконання роботи та об'єм апробації результатів дослідження у виступах і публікаціях за темою дисертаційної роботи.

В огляді літератури представлено результати досліджень щодо ролі фактора спадковості у патогенезі інтелектуальної недостатності. Огляд літератури складається з трьох частин. У першій частині дано визначення інтелектуальної недостатності, а також висвітлені проблеми її класифікації, етіології та епідеміології. У другій частині автором ґрунтовно викладено сучасний стан досліджень стосовно спадкових форм інтелектуальної недостатності. Зокрема, розглянуто внесок в патогенез даної патології хромосомних і моногенних мутацій, а також геномних реорганізацій. Остання частина присвячена розгляду стратегій пошуку генів- кандидатів, пошкодження яких впливають на розвиток інтелектуальних порушень. Огляд побудований логічно, а його матеріали ідейно і методично органічно пов'язані зі змістом дисертації.

Розділ 2 включає інформацію про організацію дослідження. Наведено дані клініко-генеалогічного аналізу досліджуваної родини № 094, а також охарактеризовано основну та контрольну групи, детально описано критерії їх формування. З розділу випливає, що досліджені вибірки цілком репрезентативні для проведення роботи. Коректність формування клінічних груп гарантована участю у проведенні досліджень авторитетних, високо професійних лікарів. Зважаючи на особливості генетичної структури популяції України, контрольну групу сформовано з представництвом населення різних регіонів. Методи молекулярно-генетичних досліджень, а також біоінформатичні і статистичні методи описані детально і чітко, є сучасними, коректними і адекватними для вирішення поставлених завдань.

У розділі 3 дисертант виклав отримані результати дослідження.

Романом Владиславовичем обстежені члени сім'ї, що складається з двох хворих сибсів (хлопчиків) з несиндромальною ІН, а також здорових батьків, які не перебувають у родинних стосунках між собою. Проведено секвенування екзомів хворих сибсів та аналіз виявлених змін нуклеотидної послідовності у хворих сибсів та їх здорових батьків. Виявлено 5 генів з мутантними алелями у обох сибсів. Проведені автором дослідження асоціації виявлених мутацій з патогенезом ІН в даній родині дозволили відібрати на роль потенційних чинників ІН мутантні варіанти генів *EPHA1*, *PUS3* і *ZNF527*. Проведений біоінформатичний аналіз консервативності амінокислотної послідовності білкових продуктів досліджуваних генів в місцях локалізації ідентифікованих мутацій підтвердив зроблений вище висновок про те, що мутантні варіанти генів *EPHA1*, *PUS3* і *ZNF527* є функціонально важливими. можуть бути потенційними індукторами ІН. Подальший порівняльний аналіз розповсюдження мутантних варіантів генів *EPHA1*, *PUS3* і *ZNF527* у групі пацієнтів з легкою інтелектуальною

недостатністю та в популяції України, а також моделювання за гомологією третинної структури нормальних та мутантних білкових продуктів генів *EPHA1* та *PUS3*, дозволив автору зробити висновок про те, що саме генотип з мутантним алелем с.1891C>A в компаунді з мутантним алелем с.1475C>A гена *EPHA1* міг детермінувати ІН у хлопчиків.

Крім того, було проведено пошук факторів спадкової схильності до розвитку мультифакторних форм інтелектуальної недієздатності. Для цього були відібрані 65 неспоріднених пацієнтів з легкою несиндромальною ІН. В якості контрольної була сформована група з неспоріднених 250 індивідів, яка представляла загальну популяцію України. З числа генів-кандидатів був обраний ген *LIF*, що є ключовим регулятором процесів ембріогенезу та нейрогенезу у ссавців, як і ген *EPHA1*. Проведено відбір функціонально значущих поліморфізмів генів *EPHA1* (rs11767557 та rs11771145) та *LIF* (rs929271) на засадах узагальнення відомих теоретичних і експериментальних напрацювань та власноруч проведеного біоінформатичного аналізу. Згідно з вимогами сучасного дизайну молекулярно-генетичних досліджень, для кожного дослідженого поліморфізму проаналізовано розподіл генотипів відповідно до співвідношення Харді-Вайнберга, проведено оцінку гетерозиготності.

Дисертантом охарактеризовано генетичну структуру вибірки з популяції України за алельними варіантами генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527* та *LIF*, а також проаналізовано їх асоціації із патогенезом легкої інтелектуальної недостатності у дітей. Проведено порівняльні дослідження основної і контрольної груп. Обраховано показники ризику схильності до виникнення ІН. Отримано результати щодо достовірної переваги носіїв окремих алелей і генотипів серед хворих з легкою ІН, що вказують на високу вірогідність залучення визначених варіантів генів *EPHA1* та *LIF* до генетичного підґрунтя ІН.

У розділі 4 узагальнено результати дослідження та проведено їх обговорення відповідно до сучасних даних літератури. Автор, аналізуючи власні результати у загальному контексті даних інших дослідників, пропонує можливий інтерактом (генні мережі) патологічного процесу для досліджених генів та робить висновки про можливість залучення мутацій та алельного поліморфізму цих генів в патогенез ІН. Це видається досить важким завданням, зважаючи на важкість визначення вибіркового ефекту окремих генів.

Висновки відповідають поставленим меті та завданням дисертації, обґрунтовані результатами дослідження та базуються на ретельно виконаних експериментах, є коректними і достовірними, мають наукову та практичну цінність.

Відповідність автореферату змісту дисертації

Автореферат дисертації відповідає суті дисертації, адекватно відображає її основний зміст і оформлений у відповідності з встановленими вимогами.

Зауваження щодо змісту дисертації

1. Видається, що завдання 7 та 8 було б доцільно поєднати, наприклад, таким чином: «Порівняти розподіл генотипів та алелів за досліджуваними мутаціями... у дітей з розвитком легкої інтелектуальної недостатності та в популяційній вибірці населення України».
2. Формальне зауваження щодо висновків. Вони зазвичай починаються з узагальнюючого висновку. У даній роботі цього нема. Кількість завдань дослідження та висновків не співпадає (8 проти 5). Як вже зауважено вище, деякі завдання, наприклад, 7 та 8, можна було б поєднати.
3. У роботі є певні неточності, наприклад, на початку дається аббревіатура ІН, проте потім автор у багатьох місцях пише «інтелектуальна недостатність» повністю.

У тексті є й інші незначні помилки та неточності. Проте, їх не дуже багато та вони не заважають сприймати текст дисертації.

При розгляді дисертаційної роботи виникли наступні запитання:

1. Чи може ризик розвитку ІН залежати не тільки від генетичної обумовленості, а й від статі дитини? Якщо так, чи були стандартизовані за статтю групи дослідження та контролю?
2. Щодо членів дослідженої родини № 094. Чи не було можливості обстеження інших членів родини (братів/сестер батьків, тощо)?
3. У розділі «Матеріали та методи дослідження» зазначено, що: «матеріалом дослідження були зразки крові індивідів з 95 сімей, включаючи хворих, для яких за результатами клінічного та психіатричного обстеження було встановлено діагноз ідіопатична інтелектуальна недостатність, їх батьків та сибсів». Потім йдеться про 65 неспоріднених пацієнтів з легкою несиндромальною ІН. Чому тільки 65?
4. Чи здійснювалися дослідження розповсюдженості визначених дисертантом генів-кандидатів у популяціях інших країн? Адже, якщо їх частота є невеликою, виникає питання, чи достатньою є кількість осіб у групі дослідження?

В цілому робота відповідає встановленим вимогам до кандидатських дисертацій, недоліки її змісту та оформлення не є суттєвими та не впливають на загальну позитивну оцінку.

Висновок

На підставі вищевикладеного вважаю, що дисертаційна робота Гулковський Р.В. є завершеним самостійним дослідженням, яке спрямоване на вирішення важливої проблеми – дослідженню нових молекулярно-генетичних чинників патогенезу інтелектуальної недостатності, одного із найбільш поширених та важких порушень когнітивних функцій у дітей. За актуальністю, науковою новизною, обсягом виконаних досліджень, достовірністю висновків та практичною цінністю робота відповідає вимогам постанови Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567 «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», що пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор – Гулковський Роман Владиславович – заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,
завідувач лабораторією епігенетики
ДУ «Інститут геронтології імені
Д.Ф. Чеботарьова» НАМН України,
доктор медичних наук,
старший науковий співробітник

 О.М. Вайсерман

25.03.2016 р.

