

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Коляди Олександра Костянтиновича «Роль мутацій в генах *LRRK2*, *SNCA* та *GBA* та поліморфних варіантів генів *CYP1A1*, *GSTM1* та *APOE* й довжини теломер у ризику розвитку хвороби Паркінсона»**, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 — молекулярна генетика

Актуальність роботи. В сучасній структурі нейродегенеративних захворювань провідне місце займає хвороба Паркінсона. Вона може бути як набутою, так і мати спадкову обумовленість. В умовах генетичної детермінованості підвищується ризик більш раннього розвитку і тяжкого перебігу хвороби Паркінсона. В результаті однією з небезпечних рис такої генетично обумовленої патології є підвищений ризик розвитку резистентних до лікування форм. Все це суттєво впливає на подальший перебіг хвороби Паркінсона і значно погіршує прогноз.

Було показано, що як спорадична, так і сімейна форми хвороби Паркінсона пов'язана з генами *LRRK2*, *GBA*, *SNCA*. Глутатіон-трансферази можуть модифікувати відповідь клітини на присутність екзогенних та ендогенних реактивних інтермедіатів, впливаючи таким чином на індивідуальну схильність до хвороби Паркінсона. Інтерес до вивчення частоти мутацій гена *CYP1A1* у пацієнтів із хворобою Паркінсона обумовлений тим, що даний ген бере участь у трансформації ароматичних вуглеводнів у потенційно нейротоксичні продукти, які можуть призводити до розвитку захворювання. Асоціація гена *APOE* з хворобою Паркінсона є неоднозначною. Попередні дослідження свідчать про те, що $\epsilon 4$ є фактором ризику раннього початку хвороби Паркінсона, погіршення когнітивного стану та розвитку деменції. Алель $\epsilon 2$ також несе потенційний ризик розвитку хвороби Паркінсона, проте її ефект є слабким та суперечливим у різних роботах. Наявні дані з приводу недостатньої асоціації гена *APOE* як зі здоровим фенотипом, так і з хворобою Паркінсона.

У зв'язку з вищенаведеним, не викликає сумніву доцільність поглибленого вивчення реалізації молекулярно-генетичних механізмів розладів у розвитку та прогресуванні хвороби Паркінсона. Тому представлену дисертаційну роботу О.К. Коляди слід вважати актуальною

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України» на тему: «Поліморфізм генів *GBA, LRRK2, PARK2, SNCA* та *PINK1* при хворобі Паркінсона» (державний номер реєстрації 0113U002113, 01.01.2014–31.12.2016). Здобувач є співвиконавцем вказаної роботи.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Дисертаційна робота О. К. Коляди є комплексним науково-прикладним дослідженням, виконаним на належному методичному рівні.

На користь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, свідчить застосування автором адекватних та сучасних методів дослідження: виділення та очищення ДНК; ампліфікації послідовностей ДНК за допомогою ПЛР; ідентифікації мутацій методом рестрикційного аналізу; електрофоретичного розділення фрагментів ДНК; ідентифікації мутацій методом ПЛР в реальному часі; визначення довжини теломерних повторів методом ПЛР в реальному часі; статистичної обробки отриманих результатів.

Здобувачем чітко окреслено мету та визначено завдання дослідження, обґрунтовано підходи щодо їх виконання.

Мета роботи полягала у вивченні ролі мутацій та поліморфних варіантів низки генів, а також довжини теломер у розвитку хвороби Паркінсона.

Для цього здобувачем було сформульовано завдання наукового дослідження, та були комплексними, зумовлені поставленою метою та спрямованими на її досягнення, базувалися на принципах системного підходу і потребували від здобувача розробки спеціальної програми дослідження, що передбачала його реалізацію у кілька організаційних етапів з використанням

адекватних методів, на кожному з яких виконувалися взаємопов'язані завдання, що дозволило отримати репрезентативні результати для оцінки об'єкту і предмету дослідження.

Усі завдання автором виконано повністю.

Основні висновки роботи, що сформульовані автором дисертації, викладено на підставі результатів власних досліджень.

Достовірність отриманих результатів. Достовірність наведених у роботі наукових положень, висновків і рекомендацій підтверджується використанням належної інформаційної бази за темою дисертаційного дослідження, обсягом власних досліджень та вдало застосованим відповідним методологічним апаратом.

На етапі аналізу наукової літератури інформаційну базу дослідження було сформовано з 606 наукових джерел, із них латиницею — 588. Пошук наукових джерел проводився у вітчизняних інтернет-ресурсах, в базах даних Кокранівської бібліотеки, Pubmed, Scopus, Web of Science тощо, а також на офіційних Інтернет-порталах профільних міжнародних організацій та Всесвітньої організації охорони здоров'я, літературного фонду національних та регіональних бібліотек. Автором проведено патентно-інформаційне дослідження щодо мутацій в генах *LRRK2*, *SNCA*, *GBA* та поліморфних варіантів генів *CYP1A1*, *GSTM1*, *APOE* й довжини теломер за хвороби Паркінсона на регіональному рівні, в Україні, у ближньому зарубіжжі та загалом у світі.

З метою вивчення ролі мутацій та поліморфних варіантів низки генів, а також довжини теломер у розвитку хвороби Паркінсона автором проведено проспективне контрольоване рандомізоване дослідження, яке охоплювало 216 пацієнтів з хворобою Паркінсона та 300 здорових осіб групи контролю. База даних власного дослідження достатня за обсягом, репрезентативна, що було забезпечено типологічними властивостями вибірок та розрахунком необхідного обсягу спостережень для досягнення належної статистичної потужності дослідження.

Статистичну обробку проведено з використанням статистичних модулів програми Statsoft Statistica шляхом кількісного та якісного аналізу, з розрахунком абсолютних та відносних центральних величин і їх коливань, визначенням статистичної значущості відмінностей, міри зв'язку тощо. Для оцінки сили впливу факторів ризику на розвиток ознак було здійснено розрахунок показників атрибутивних ризиків, вірогідність змін ознак під дією фактора ризику оцінено за показниками відношення шансів, з розрахунком граничного ризику похибки — менше за 5 % ($p < 0,05$).

Таким чином, можна констатувати, що обраний дисертантом дизайн, програма та методологічний апарат дослідження дозволили забезпечити репрезентативність даних, розв'язати поставлені завдання, отримати достовірні результати, які було покладено в основу обґрунтування і розробки нових підходів до діагностики й прогнозування хвороби Паркінсона, виявлення груп ризику на основі даних генотипування.

Наукова новизна результатів дисертаційної роботи. Наукова новизна результатів дисертаційної роботи полягає у тому, що автором уперше серед мешканців України, досліджено роль одонуклеотидних мутацій у генах *LRRK2*, *SNCA*, *GBA* поліморфних варіантів генів *CYP1A1*, *GSTM1*, *APOE*, а також довжини теломер у розвитку хвороби Паркінсона; обґрунтовано фундаментальні принципи медико-генетичного консультування.

Методологічно коректно створено банк ДНК 216 пацієнтів з хворобою Паркінсона (включаючи тих, які мали родичів з проявами захворювання, та тих, які не мали таких родичів) та референтної групи 300 осіб без неврологічної патології. Ретельно охарактеризовано антроподемографічні показники та клінічний статус кожного учасника — вік, стать, дебют хвороби, клінічну форму, ціночний бал за уніфікованою рейтинговою шкалою UPDRS, сімейний анамнез тощо.

Дослідженням встановлено фактори генетичної схильності до хвороби Паркінсона шляхом оцінки частот мутацій генів *LRRK2* та *GBA* серед жителів України. Доведено асоціацію ризику розвитку хвороби Паркінсона з носійством:

алельних варіантів гена *CYP1A1* — алеля с.1384G зі збільшення ризику у 1,76 (ДІ 95 % 1,30–2,39) разів; гена *GSTM* — гомозиготної делеції, що підвищує ризик захворювання у 1,65 (ДІ 95 % 1,5–2,37) разів; гена *APOE* — генотипу $\epsilon 3/\epsilon 4$ зі збільшенням ризику у 2,08 (ДІ 95 % 1,18–3,65) разів, генотипу $\epsilon 4/\epsilon 4$ зі зростанням ризику у 3,53 (ДІ 95 % 0,90–13,86) разів.

Означено меншу довжину теломер в клітинах букального епітелію у пацієнтів з хворобою Паркінсона порівняно зі здоровими особами, яка корелює з довжиною теломер в клітинах крові ($r = 0,55$; $p < 0,01$).

Теоретичне значення одержаних результатів дослідження.

Теоретичне значення одержаних результатів дослідження полягає у доповненні теорії молекулярної біології в частині патогенезу хвороби Паркінсона, зокрема, щодо одонуклеотидної заміни с.6055G>A в гені *LRRK2*, г.85907C>A в гені *SNCA*, с.1448T>C та с.1226A>G в гені *GBA*, алельного поліморфізму с.1384A>G у 7-му екзоні гена *CYP1A1*, гомозиготної делеції у гені *GSTM1*, алельного поліморфізму гена *APOE*, довжини теломер.

Крім того, за результатами дослідження одонуклеотидної заміни с.209G>A (A53T) гена *SNCA* встановлено, що мутантні алелі відсутні як у пацієнтів з хворобою Паркінсона, так і у неврологічно здорових осіб, що автором було пов'язано із наднизькою частотою такої мутації у мешканців України та зроблено припущення про перспективність пошуку мутацій у регуляторних ділянках гена.

Практичне значення одержаних результатів. Практичне значення одержаних результатів полягає у тому, що:

а) отримані результати дослідження є підставою для створення якісно нової ефективної моделі виявлення груп ризику хвороби Паркінсона на основі даних генотипування;

б) визначено молекулярно-генетичні маркери та принципи їх застосування, що дасть змогу більш ефективно та цілеспрямовано здійснювати діагностику та медико-генетичне консультування пацієнтів та членів їх родин з метою прогнозування ризику розвитку та прогресування хвороби

Паркінсона;

в) встановлено прогностичну значимість окремих мутацій генів чи алельного поліморфізму, що потребують визначення під час молекулярно-генетичного тестування щодо хвороби Паркінсона.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із анотації, вступу, огляду наукової літератури, опису матеріалів та методів досліджень, трьох розділів власних досліджень з аналізом отриманих даних, узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, додатку. Дисертацію викладено на 176 сторінках друкарського тексту, який містить 13 таблиць, 7 рисунків. Бібліографія включає 606 джерел, із них кирилицею — 18, латиницею — 588.

Характеристика розділів та оцінка змісту дисертації

У *вступі* розкрито актуальність теми дисертаційної роботи, представлено її мету та завдання, визначено наукову базу дослідження, об'єкт, предмет і методи дослідження, викладено наукову новизну, теоретичне та практичне значення отриманих результатів, наведено інформацію про їх апробацію та впровадження, висвітлено особистий внесок автора у виконання роботи, наведено дані про кількість публікацій за темою роботи.

Перший розділ дисертації, «Молекулярно-генетичні характеристики пацієнтів з хворобою Паркінсона (огляд літератури)», викладено автором на основі бібліосемантичного аналізу наукових джерел. В ньому узагальнено міжнародний та вітчизняний досвід у розв'язанні проблем молекулярно-генетичних аспектів хвороби Паркінсона, виявлено не розв'язані питання щодо впровадження найбільш оптимальних шляхів медико-генетичного консультування, скринінгу. У ході проведеного аналізу було визначено високі показники захворюваності, смертності та інвалідності внаслідок хвороби Паркінсона; виявлено аспекти, які потребують дослідження. Встановлено низку нерозв'язаних питань, обґрунтовано актуальні напрями дослідження, обґрунтовано актуальність та новизну його мети і задач.

В *другому розділі* («Матеріал і методи дослідження») здобувачем описано обсяги, програму, методичний апарат та наукову базу дослідження. В розділі представлено розрахунок забезпечення репрезентативності вибірки та обсяг виконаних досліджень за кожним завданням.

У *третьому розділі* («Поліморфізм генів, асоційованих з хворобою Паркінсона, серед населення України») автором було вивчено роль мутацій у певних генах, асоційованих із хворобою Паркінсона, шляхом визначення однонуклеотидних замінів с.6055G>A в гені *LRRK2*, г.85907C>A в гені *SNCA*, с.1448T>C в гені *GBA*, с.1226A>G гена *GBA*. Для цього методом ПДРФ-ПЛР було проведено генотипування відповідних мутацій, оцінено їх частоти, здійснено перевірку відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в досліджуваній групі пацієнтів з хворобою Паркінсона, з'ясовано випадковий розподіл генотипів відповідно до рівноваги за Харді-Вайнберга, зроблено висновок про репрезентативність вибірок, здійснено розрахунок співвідношення шансів, зіставлено отриману інформацію з даними літератури. В результаті цієї частини проведеного дослідження дисертантом зроблено відповідні висновки, а також наведено перелік публікацій за матеріалами розділу.

У *четвертому розділі* («Алельний поліморфізм генів біотрансформації ксенобіотиків *CYP1A1* та *GSTM1*, і гена *APOE* як факторів спадкової схильності до розвитку хвороби Паркінсона») здобувачем викладено результати проведеного генотипування та наведено частоти алелів і генотипів, показники фактичної та теоретичної гетерозиготності за мажорними мутаціями генів *CYP1A1*, *GSTM1*, та *APOE* в групі пацієнтів з України. Було здійснено аналіз алельного поліморфізму с.1384A>G в гені *CYP1A1*, гомозиготної делеції у гені *GSTM1* (генотипу +/-del), алельного поліморфізму ε2/ε3/ε4 гена *APOE* у пацієнтів з хворобою Паркінсона. Автором охарактеризовано ризик розвитку хвороби Паркінсона у асоціації з відповідними поліморфізмами, зіставлено із даними літератури. Розділ

завершено висновками до цієї частини досліджень і переліком публікацій, де відображено його зміст.

У *п'ятому розділі* («Визначення довжини теломер як маркеру хвороби Паркінсона») автором викладено дані дослідження довжини теломер у лейкоцитах та букальному епітелії учасників. Для досягнення мети дисертантом було додатково проведено зіставлення і їх кореляційний аналіз відносної довжини теломер. Підтверджено гіпотезу про закономірне вкорочення теломер за хвороби Паркінсона. На основі отриманих даних здобувачем доповнено медико-генетичні критерії прогнозування захворювання. Розділ завершується висновками і переліком публікацій автора, у яких відображено матеріали розділу.

У *шостому розділі дисертації* («Узагальнення та обговорення результатів досліджень») автором на основі всебічного аналізу доказової інформації, результатів міжнародних досліджень, а також власних даних надано характеристику мутацій у гені *LRRK2*, які асоційовані з хворобою Паркінсона, пенетрантності хвороби Паркінсона у гомозиготних та гетерозиготних носіїв мутацій гена *GBA*; частоти сполучень генотипів за генами *APOE*, *GSTM1* та *CYP1A1* у групі пацієнтів з хворобою Паркінсона та в контрольній групі. На цьому етапі автором також окреслено перспективи подальших досліджень.

Загалом, обговорення, узагальнення результатів власних досліджень виконано в повній мірі із аналізом фундаментальних та сучасних робіт інших вітчизняних та зарубіжних авторів.

Висновки є обґрунтованими і відображають суть дослідження.

Результати дослідження мають високі показники доцільності впровадження на усіх дієвих рівнях: індивідуальному, груповому та популяційному; запропоновані рекомендації відзначаються значною безпечністю й зручністю.

Здобувачем у достатньому обсязі проведено апробацію результатів дослідження на наукових форумах різних рівнів.

Повнота викладення основних результатів досліджень у наукових фахових виданнях. За темою дисертації здобувачем опубліковано 13 друкованих робіт, в тому числі 5 статей у наукових фахових журналах, 7 тез доповідей на наукових форумах, 1 патент на корисну модель. Публікації повністю відображають зміст дисертації.

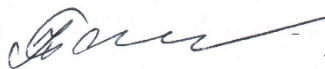
Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації. Оцінюючи загалом роботу позитивно, слід звернути увагу здобувача на деякі недоліки та упущення.

1. Тавтологічність опису у підрозділах, присвячених оцінці одонуклеотидних замін у досліджуваних генах.
2. У розділах, що стосуються результатів дослідження міститься велика кількість інформації оглядового характеру, яку бажано було б винести в огляд літератури або в обговорення результатів.
3. У розділі 3, у підрозділі 3.1 бажано було б пояснити, чому обрано саме цю мутацію для проведення генотипування.
4. У розділі 3 слід було б подати більше фотографій з результатами аналізу ПДРФ.
5. Дані в табл. 4.1, 4.2, 4.3 краще було представити у відсотках.

Висновок по дисертації. Враховуючи наведене вище, вважаю, що дисертаційна робота Коляди Олександра Костянтиновича на тему: «Роль мутацій в генах *LRRK2*, *SNCA* та *GBA* та поліморфних варіантів генів *CYP1A1*, *GSTM1* та *APOE* й довжини теломер у ризику розвитку хвороби Паркінсона» є самостійним завершеним дослідженням, виконаним на сучасному науково-методичному рівні, яке містить нове розв'язання наукової задачі: визначення ролі одонуклеотидних замін та поліморфних варіантів генів, пов'язаних із хворобою Паркінсона, а також довжини теломер у клітинах крові й букального епітелію у розвитку хвороби Паркінсона у мешканців України. За актуальністю, обсягом отриманого експериментального матеріалу, методичним рівнем, науковою новизною та практичним значенням отриманих результатів,

обґрунтованістю наукових положень і висновків, повнотою викладу матеріалів в опублікованих наукових працях і рівнем впровадження дисертаційна робота відповідає вимогам, зазначеним у п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567 до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів № 656 від 19.08.2015, № 1159 від 30.12.2015, № 567 від 27.07.2016, № 943 від 20.11.2019 та № 607 від 15.07.2020, та сучасним вимогам до оформлення дисертацій, затверджених наказом Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 р. № 40, а її автор Коляда О. К. заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 — молекулярна генетика.

Офіційний опонент,
професор кафедри молекулярної генетики та біотехнології
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича
доктор біологічних наук, професор



І.І. Панчук

Підпис *Панчук І.І.* засвідчую
Учений секретар Чернівецького національного
університету імені Юрія Федьковича
Даровська Я.О.
" 15 " *Квітень*

