

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу **Гулковського Романа Владиславовича**
«ГЕННІ МУТАЦІЇ У ДІТЕЙ З ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ»
представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Актуальність обраної теми. Інтелектуальна недостатність є патологією, яка може бути наслідком значної кількості генетичних порушень і траплятися як ізольовано так в асоціації з іншими вродженими вадами і/чи соматичними розладами. Слід відзначити значну кількість екзо- та ендогенних чинників, які можуть зумовлювати виникнення інтелектуальної недостатності. Цей розлад значно впливає на якість життя самої хворої людини, її родини і суспільства в цілому, оскільки значна кількість таких хворих потребують соціальної та освітньої підтримки протягом усього життя. Дуже часто інтелектуальна недостатність приводить до інвалідності у ранньому дитячому віці. Відомими є ціла низка генетично детермінованих нозологій (хромосомних та моногенних), які зумовлюють формування інтелектуальної недостатності. Проте, причина значної кількості випадків є невідомою. Часто у таких випадках прослідковується виразна генетична компонента, проте сам ген чи локус є невідомими. Пошук генетичних чинників інтелектуальної недостатності: ідентифікація самих генів та визначення ймовірних механізмів патогенезу, що виступають завдання даної роботи, є актуальним напрямом молекулярної генетики. Актуальність досліджуваної тематики зумовлена не лише науково-медициними, а й соціальними та економічними факторами.

Достовірність і обґрунтованість результатів наукових положень і висновків. Наукові положення, висновки і рекомендації випливають з фактичного матеріалу і носять об'єктивний характер, оскільки обґрунтовані результатами досліджень. Для дослідження дисертантом застосовано сучасні і адекватні методи молекулярно-генетичного і статистичного аналізу. Висновки ґрунтуються на значній кількості спостережень та на достатньому обсягу експериментальних досліджень.

В дисертаційній роботі Гулковського Р.В. для реалізації поставленої мети вирішувалися чітко сформульовані завдання, які відображають хід і методологію роботи. Для досягнення поставленої мети дисертант освоїв та провів широкий спектр сучасних молекулярно-генетичних досліджень, проаналізував експериментальний матеріал, провів біоінформаційний аналіз, що дозволило оперувати достатнім масивом даних. Отримані результати експериментальних досліджень проаналізовані та піддані відповідній статистичній обробці, на основі якої ґрунтуються висновки до роботи.

Дисертаційна робота пов'язана із виконанням бюджетної теми Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Алельний поліморфізм генів, залучених до фенотипу моногенних та мультифакторних патологій» (2011-2015 рр.). Частина роботи виконано в рамках міжнародного 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.).

Новизна та практична значимість результатів дисертаційного дослідження. Наукова новизна дисертаційного дослідження Гулковського Р.В. визначається тим, що на основі власних лабораторних досліджень автором вперше ідентифіковано та описано мутації с.1891G>А гена *EPHA1* та с.212A>G в гена *PUS3* та отримано дані про їх розповсюдження. Вперше отримано дані про розповсюдження виявлених у пацієнтів з інтелектуальною недостатністю алельних варіантів с.1475G>А та с.1891G>А гена *EPHA1*, с.212A>G гена *PUS3* та с.806_808CAT>TGTGCA гена *ZNF527* у популяційній вибірці населення України. Отримано моделі за гомологією просторових структур нормальних та з ідентифікованими у роботі мутаціями білкових продуктів генів *EPHA1* та *PUS3*. Встановлено, характер асоціації ряду алельних варіантів генів *EPHA1* та *LIF* із розвитком інтелектуальної недостатності мультифакторної природи.

Автором визначено новий потенційний ген-детермінатор інтелектуальної недостатності *EPHA1* та ідентифіковано вірогідний механізм виникнення інтелектуальної недостатності, які можуть бути використані як мішені для розробки нових терапевтичних середників.

У ході виконання роботи розроблено методики детекції ряду алелів генів, для яких автор довів асоціацію із виникненням інтелектуальної недостатності, що забезпечує передумови для покращення диференційної діагностики спадкових форм інтелектуальної недостатності.

Вважаю, що проведені дослідження є базовими для подальшої роботи по встановленню внеску ідентифікованого механізму у виникнення інтелектуальної недостатності при інших нозологіях в тому числі моногенних та хромосомних.

Оцінка наукової та літературної якості складу матеріалу і стилю дисертації та автореферату. Дисертація Р. Гулковського написана в традиційній формі, оформлена відповідно до вимог ДАК України і викладена на 145 сторінках машинописного тексту, складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, розділу власних досліджень, узагальнення, висновків та переліку використаних джерел. Робота ілюстрована 12 інформативними таблицями та 22 рисунками. Список використаної літератури охоплює 255 найменувань. Дисертаційна робота викладена у науковому стилі літературною українською мовою.

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

Огляд літератури побудований на аналізі публікацій за досліджуваною у роботі тематикою у світі. Наведено дані про різні причини інтелектуальної недостатності, їх класифікацію та етіологію. Відомі генетичні аномалії, без сумніву, є однією з основних причин порушень інтелектуального розвитку і автор

приділив значну увагу цим нозологіям. Цікавими є опис та аналіз різних стратегій пошуку нових генів-кандидатів інтелектуальної недостатності.

В розділі 2 «Матеріали та методи дослідження» викладені методики застосовані при виконанні дослідження: виділення та очищення геномної ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів, секвенування, біоінформатичне моделювання та статистична обробка даних. Слід відзначити детальний опис використаних методик та широку панель застосованих у роботі методів молекулярної генетики. Застосовані методи є цілком адекватними для вирішення поставлених задач на сучасному рівні.

У розділі 3 викладені результати експериментальних досліджень. У розділі 3.1 автором описано та проаналізовано усі перебудови, які були виявлені в ході повноекзомного секвенування в родині, яка стала базовою для роботи. У подальшому підрозділі викладено аналіз консервативності амінокислотної послідовності білкових продуктів цих генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*, в місцях локалізації ідентифікованих мутацій, а також моделювання та порівняльний аналіз третинної структури нормальних та мутантних білкових продуктів відповідних генів. Розділі 3.3. присвячений аналізу розповсюдження алельних варіантів гена *ZNF527* за заміною с.806_808CAT>TGTGCA у групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю та популяції України. Порівняльний аналіз розповсюдження алельних варіантів гена *PUS3* за заміною с.212A>G та алельних варіантів гена *EPHA1* за замінами с.1475G>A та с.1891G>A у групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю та популяції України викладені у розділах 3.4 і 3.5. Окрім аналізу виявлених мутацій, автор провів дослідження алельного поліморфізму ряду локусів гена *EPHA1* та гена *LIF* як факторів спадкової схильності розвитку легкої інтелектуальної недостатності (розділи 3.6 – 3.8). Вибір досліджуваних локусів автором є переконливо обґрунтованим.

У розділі 4 узагальнено результати дослідження та проведено їх обговорення відповідно до відомих даних літератури. Даний підрозділ написаний чітко, науково – грамотно, що свідчить про фаховість здобувача наукового ступеню.

Висновки, які зроблені дисертантом, відповідають меті та завданням дисертації, є обґрунтовані результатами дослідження і базуються на статистично вірогідних даних.

Відповідність автореферату змісту дисертації: Автореферат повністю відповідає змісту дисертаційної роботи.

Повнота викладу основного змісту дисертації в опублікованих працях у наукових фахових виданнях: За результатами дисертаційної роботи опубліковано 11 наукових праць, у тому числі 5 статей у фахових періодичних виданнях України, які мають індекс цитування. Результати роботи доповідалися на 6 конференціях, в тому числі тричі за межами України. Слід вказати, що чотири з п'яти статей опубліковані автором в одному періодичному виданні, що дещо зменшує коло ознайомлення з результатами дослідження.

Зазначені недоліки в оформленні дисертаційної роботи та питання, які виникли в процесі рецензування назагал не зменшують значення роботи.

Дискусійні положення і запитання.

1). Зважаючи на те, що у результаті даного дослідження ідентифіковано новий потенційний ген інтелектуальної недостатності, автору доцільно було б приділити більше уваги аналізу публікацій, у яких подібно до рецензованої дисертаційної роботи встановлено нові, раніше не ідентифіковані гени та можливі механізми виникнення інтелектуальної недостатності, які часто ґрунтуються на поодиноких спостереженнях. Які є літературні дані щодо інших нових генів-кандидатів спадкової схильності до розвитку інтелектуальної недостатності? Які є інші нові потенційні гени-детермінатори інтелектуальної недостатності?

2). Зважаючи, що значна частина роботи та її хід ґрунтуються на даних обстеження однієї родини, ідентифікованої у ході реалізації міжнародного проекту *CHERISH*, в одному із розділів дисертації доцільно було б обґрунтувати чому саме цей випадок був обраний для поглибленого аналізу. Які інші цікаві знахідки були виявлені у ході реалізації проекту? Чи були серед них випадки, де відзначали декілька уражених осіб як в родині 094? Чи проводиться поглиблений аналіз в інших випадках? Якими саме критеріями Ви керувалися обираючи дану родину?

4) Чи є літературні дані щодо моделей просторових структур нормальних та мутантних білкових продуктів генів, які Ви досліджували і як вони співвідносяться з отриманими Вами моделями?

3). Автором висунуто гіпотезу, що в оогенезі матері відбулася *de novo* мутація *c.212A>G*, що є достатньо рідкісним явищем. Які інші можливі гіпотези походження мутації? Яким чином виключено можливості методично-технічної помилки?

4). При проведенні підрахунку різних генотипів та алелів за мононуклеотидною заміною *c.1475G>A*, гена *EPHA1* до групи пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю з родини 094 були включені обидва пацієнти, один чи жоден не включений?

5). Які Ваші рекомендації щодо практичного використання розроблених у роботі діагностичних методики для генетичного тестування маркерів спадкової схильності до розвитку інтелектуальної недостатності?

Загальна оцінка роботи і висновок. Вважаю, що дисертаційна робота Гулковського Романа Владиславовича «Генні мутації у дітей з інтелектуальною недостатністю» є завершеною науковою працею, у результаті виконання якої ідентифіковано новий потенційний ген-детермінатор інтелектуальної недостатності та встановлено асоціацію ряду алелів досліджуваних генів із спадковою схильністю до розвитку досліджуваної патології. Враховуючи актуальність та обсяг проведених досліджень, наукову новизну одержаних результатів, обґрунтованість висновків, перспективи наукового та практичного застосування, вважаю, що дисертаційна робота Гулковського Р.В. відповідає

вимогам постанови КМ України від 24 липня 2013 року №567 “Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника”, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент

Провідний науковий співробітник
відділення діагностики
спадкової патології ДУ «Інститут
спадкової патології НАМН України»,
д. біол. наук, ст. наук. співробітник
30.03.2016 р.

Г.В. Макух

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ СПАДКОВОЇ ПАТОЛОГІЇ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»
Особистий підпис *Макух*
ЗАСВІДЧУЮ
Начальник відділу кадрів *3/10*

