

ВІДГУК

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

Хвороба Паркінсона, або тримтячий параліч, є захворюванням нервової системи, що призводить до порушення контролю над рухами в результаті прогресуючого руйнування і загибелі нейронів, які виробляють нейротрансмітерний **допамін** – хімічну речовину, яка передає емоційну реакцію в мозку людини і дозволяє відчувати задоволення і не відчувати біль. **Допамін** також відповідає за рух, тому виробляється в певних клітинах мозку, які контролюють м'язову активність.

Основними особливостями хвороби Паркінсона є: м'язова жорсткість, гіпокенізія, тремор і постуральна нестабільність.

Захворювання зустрічається, в основному, у людей похилого віку. Близько 1% людей, старше 60 років, в тій чи іншій мірі, несуть в собі хворобу Паркінсона.

Медична наука вже понад 200 років не в змозі зупинити розвиток і прогресування хвороби, але наявні методи консервативного і хірургічного лікування, а також своєчасна діагностика і профілактика, можуть значно поліпшити життя пацієнтів.

На теперішній час хворобу Паркінсона вважають поліетіологічним, багатофакторним захворюванням, у розвитку якого відіграють роль чинники зовнішнього і внутрішнього середовища організму. До внутрішніх чинників відноситься спадковість, тобто батьківське носійство генів, що обумовлюють виникнення хвороби Паркінсона, може викликати цю хворобу у нащадків. І це є домінуючою думкою клінічних генетиків. І навіть те, що деякі дослідники розділяють генетично обумовлену та ідіопатичну форми хвороби Паркінсона, не заперечує припущенню, що деякі механізми, зокрема, перехресні з іншою, коморбідною, патологією, знаходять генетичне обґрунтування.

Таким чином, виходячи з багаточисельних тверджень клінічних генетиків про провідну роль спадковості у виникненні й розвитку хвороби Паркінсона, автор дисертації констатує, що, цитую: «...на сьогоднішній день не викликає сумнівів існування генетичних і біохімічних факторів, які визначають схильність конкретної особи до розвитку хвороби Паркінсона. Хоча результати відповідних досліджень деколи суперечливі, вони дозволяють з'ясувати внесок певних генів і їх поліморфізмів в провокування, маніфестацію і розвиток захворювання...»

Саме цій, вкрай актуальній проблемі – проблемі визначення ролі певних генів в маніфестації і розвитку хвороби Паркінсона і зняття, в тій чи іншій мірі, існуючої суперечливості, присвячена дисертаційна робота Коляди Олександра Костянтиновича.

Робота містить АНОТАЦІЇ, ВСТУП, ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ, ТРИ РОЗДІЛИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ, УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ, ВИСНОВКИ І СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ. Почнемо зі ВСТУПУ.

ВСТУП.

Структурований за класичним зразком з усіма потрібними рубриками. У актуальності описано етіологію захворювання, її розповсюдженість і віковий розподіл. Автор констатує, що хвороба Паркінсона - в основному генетично обумовлена. Однак, практично зразу відмічає, що результати, так званих, асоціативних досліджень, іноді суперечливі. І не дивлячись на суперечливість, вони дозволяють з'ясувати внесок певних генів і їхніх поліморфізмів в маніфестацію і розвиток захворювання.

На нашу думку, варто було б назвати ці певні гени, які або детермінують виникнення хвороби, або, якимось чином, провокують розвиток захворювання.

Мета роботи - вивчення ролі мутацій та поліморфних варіантів низки генів, а також довжини теломер у розвитку хвороби Паркінсона. Мета роботи не може бути ширшою за назву, тобто, назва генів і їхніх поліморфних варіантів має бути в меті, а не в назві, тому що це звужує вивчення ролі генів не взагалі, а конкретних.

Задачі роботи поділені на два блоки. На нашу думку, задачі сформульовані не зовсім вдало. Перші шість задач можна було б об'єднати в дві розширені, застосовуючи по одному дієслову для кожного блоку. Чому? Тому що перші три задачі несуть однорідне інформаційне навантаження, так само, як і три наступні.

Сьома задача сформульована занадто широко і без конкретики.

Наукова новизна складається з трьох пунктів, які констатують, що дисертант створив банк даних ДНК 216 пацієнтів та 300 людей без цієї хвороби, провів генотипування та встановив частоти алелів і гнотипів і визначив довжину теломерних ділянок в лейкоцитах та клітинах буккального епітелію у пацієнтів з України. По-перше, створення банку даних пацієнтів не є науковим досягненням, по-друге, провести генотипування і встановити частоти алелів і генотипів рутинними методами теж не є новизною тільки для тих пацієнтів, по-третє, як лейкоцити, так і клітини буккального епітелію не мають теломерних ділянок. Теломерні ділянки існують тільки у хромосомах. Однак, беззаперечним, з точки зору наукової новизни, є останній абзац з цієї рубрики.

Практичне значення одержаних результатів є переконливим. Розроблені дисертантом молекулярно-генетичні методи дають змогу визначати маркери генетичної схильності до хвороби Паркінсона, тобто, є можливість, крім медико-генетичного консультування пацієнтів та членів їх родин, провести відносно ранню діагностику цієї хвороби, і, відповідно, почати лікувальні і профілактичні дії.

За темою дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, з них 5 статей у фахових українських і зарубіжних виданнях, 6 тез доповідей у матеріалах українських і міжнародних конференцій, симпозіумів та з'їздів. Новітні положення захищено одним патентом на корисну модель.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. Містить 5 підрозділів, присвячених загальним відомостям про хворобу Паркінсона.

У першому підрозділі автором дисертації докладно проаналізовано дані світової наукової літератури щодо етіології захворювання, частоти виникнення захворювання в залежності від віку, статі, географічного положення, етнічності і

расової приналежності. Дисертантом робиться висновок, що поширеність хвороби є вищою в Європі та США, ніж в країнах Азії, Африки і Латинської Америки. Дисертант пояснює це більшою середньою тривалістю життя в Європі і США. Стосовно України дисертант наводить 59,6 випадків на 100.000 населення.

У першому підрозділі зустрічається словосполучення **«...поширеність хвороби серед загальної популяції...»**. В екології немає такого поняття, як *загальна популяція*. Будь яка популяція завжди прив'язана до конкретної місцевості і є конкретною.

І ще одне словосполучення нас вразило. Мова йде про те, що жінки хворіють менше. Пояснюється тим, що, цитую: «До... етіологічних факторів таких статевих відмінностей відносять нейропротекторний ефект естрогенів, генетичні фактори, відмінності в розвитку та функціонуванні мозку». З нейропротекторним ефектом естрогенів я згоден; нічого не маю проти генетичних факторів. А те, що мозок жінок розвивається і функціонує якимось, принципово, не так, як у чоловіків, погодитись важко.

Генетичні особливості хвороби Паркінсона дисертант проаналізував у другому підрозділі на прикладі результатів світових близнюкових та популяційно-епідеміологічних досліджень, які почалися у 80-х роках минулого століття. Спочатку результати були суперечливі щодо спадкової схильності в етіології хвороби.

Однак, вже в 90-ті роки з'явилися методи позитронно-емісійної томографії та однофотонно-емісійної комп'ютерної томографії, які дозволили припустити, що, цитую: **«... конкордантність для нігральної патології у близнюків, хворих на Паркінсон, може бути вище, ніж за даними попередніх досліджень»**. Для ясності, конкордантність (в генетиці) – це наявність певної ознаки у обох близнюків, або серед групи людей, або, це ймовірність того, що обидва близнюки будуть мати певні ознаки, за умови, що його має один з них.

Популяційно-епідеміологічні дослідження 2000-х років вже встановили безперечну спадкову схильність до розвитку хвороби Паркінсона. При аналізі великих вибірок пацієнтів було доведено, що наявність позитивного сімейного анамнезу є одним з провідних факторів ризику розвитку хвороби Паркінсона.

Далі дисертант проаналізував світові дані стосовно моногенних форм хвороби і показав, що до 10% пацієнтів мають цю форму, яка характеризується раннім віком початку і пов'язана з мутаціями в трьох генах: **SNCA**, **LRRK2** і **VPS3**, що обумовлюють аутосомно-домінантні форми хвороби Паркінсона.

Аутосомно-рецесивні моногенні форми хвороби Паркінсона обумовлені добре відомими аутосомно-рецесивними генами **PRKN**, **PINK1** і **DJ-1**

Ще один набір форм хвороби є **Х-зчеплені форми хвороби Паркінсона**. Цей вид хвороби пов'язаний з генами **Rab**, що кодують Rab-протеїни, мутація в яких безпосередньо спричиняє розвиток Х-зчеплених форм хвороби Паркінсона.

У наступному підрозділі огляду літератури аналізується можливість виникнення хвороби Паркінсона під впливом чинників навколишнього середовища, таких, як пестициди, молочні продукти, наявність меланом і черепно-мозкових травм. Дивно те, що світові учені пестициди і молочні продукти відносять до оточуючого середовища, а не до продуктів харчування, в яких містяться пестициди. Також провокаторами хвороби можуть бути кава, алкоголь та фізична активність.

У наступному підрозділі дисертант проаналізував зв'язок виникнення хвороби Паркінсона з ліпідним обміном. Було проаналізовано роль **холестерину**, як компоненту ЦНС і відмічено його важливість для нормального росту нейронів і розвитку синапсів. Однак, надлишок холестерину, який циркулює в рідинах організму, може збільшити ризик виникнення хвороби Паркінсона. Проаналізована нейропротекторна роль таких аполіпротеїнів як **apoD**, **apoA1** та **apoJ** і **apoE**, підвищення рівня якого свідчить про ризик розвитку хвороби Паркінсона.

Останній підрозділ огляду літератури дисертант присвятив аналізу довжин теломер у зв'язку з хворобою Паркінсона. Спочатку була представлена загальна інформація про теломерні ділянки хромосом, про білковий комплекс з шести білків, функція яких – захищати теломери і підтримувати їхню довжину і запобігати їх ерозії, про довжину теломер у людини і їхню важливість у процесах старіння.

Далі розглядається роль основного фермента, який збільшує довжину теломер і компенсує вкорочення їх під час поділу клітини.

Після генетико-біохімічної інформації щодо довжин теломер, дисертант привів низку наукових фактів про те, що у хворих на Паркінсон довжини теломер можуть бути скороченими, однак, далі йде інформація проте, що більшість досліджень, все ж таки, не підтверджують цю інформацію на 100%, тобто, дані про те, що у хворих на Паркінсон однозначно скорочені теломери їхніх хромосом – суперечливі.

Головним зауваженням до огляду літератури є те, що після кожного підрозділу має бути скорочений висновок, а наприкінці розділу - скорочене резюме, яких не має.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ. Цей розділ поділений на дві частини. В першій частині говориться проте, що дисертантом було здійснене проспективне дослідження 216 пацієнтів з хворобою Паркінсона та 300 здорових осіб групи контролю. Ці дослідження були проведені на базі ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова» НАМН України. Однак, словосполучення «...300 здорових осіб...» потребує роз'яснення.

Дисертант пише, що матеріалом для досліджень слугували зразки крові та букального епітелію пацієнтів та клінічно здорових людей. Що є «клінічно здорова людина»? Пацієнти були поділені за статтю і віковим дебютом хвороби. З контексту витікає, що діагноз хвороби Паркінсона встановлював сам дисертант, чого він не має права робити, оскільки не є лікарем. Далі, у наступному абзаці виявляється, що дисертант «...досліджував людей...», а не зразки крові.

У наступних підрозділах Матеріалів і методів описані всі молекулярно-генетичні методи, що були застосовані в роботі. Вони описані досить докладно для відтворення їх за потреби.

РОЗДІЛ 3. ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ, АСОЦІЙОВАНИХ З ХВОРОБОЮ ПАРКІНСОНА СЕРЕД НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ

У рамках цього розділу дисертант провів генотипування та встановив частоти алелів і генотипів, а також встановив показники фактичної та теоретичної гетерозиготності за мажорними мутаціями генів, асоційованих з паркінсонізмом. Це ті самі гени, які фігурують у перших трьох завданнях (LRRK2, SNCA, GBA).

Всі отримані експериментальні дані дисертант, чомусь, пов'язує з законом Харді-Вайнберга. Наприклад, цитую: «Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним ... для перевірки випадковості розподілу генотипів відповідно до співвідношення Харді-Вайнберга не дав результатів. Чому не дав результатів? Тому що, на думку дисертанта, «... у контрольній групі виявились відсутніми гетерозиготні носії генотипу с.6055AG», а в групі хворих вони присутні».

Виникає питання, в яких випадках він мав дати якісь результати, як що цей закон стосується ідеальних популяцій, а не окремих невиліковно хворих людей?

Далі було проведено перевірку відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним... і робиться висновок «... про відсутність відхилень в розподілі генотипів у групі хворих від очікуваного розподілу, що говорить про випадковий розподіл генотипів відповідно до рівноваги за Харді-Вайнберга.» Тобто, в даному випадку, на думку дисертанта, цей закон працює. Однак, під рівновагою за Харді-Вайнбергом мається на увазі «...не випадковий розподіл генотипів...», а те, що частота алелей будь-якої ознаки в популяції в будь-якому поколінні залишається незмінною (тобто, досягається рівновага частот алелей в поколіннях) за умови відсутності зовнішнього впливу (тобто, відсутність зовнішнього впливу є головною умовою зберігання рівноваги).

Повністю закон звучить наступним чином: «...рівновага генотипів в нескінченно великих популяціях, в яких немає змішання популяцій, відбору і мутацій досягається тільки після (увага) не менш як однієї генерації панміктичного (випадкового) схрещування...», тобто ця рівновага досягається, починаючи з популяції, яка виникла після другої генерації. Це

означає, що через покоління можна, застосовуючи математичний вираз цього закону, розрахувати скільки буде хворих на Паркінсон, і все.

У зв'язку з цим, виникають питання, на які потрібні роз'яснення дисертанта. Так звана, популяція хворих на хворобу Паркінсона є нескінченно великою? Члени популяції хворих все життя жили в одному регіоні? На вашу «популяцію» хворих протягом їхнього життя не впливали мутагенні фактори (з питною водою, через атмосферне повітря, з їжею?) А що робити з панміксією серед хворих? Яке відношення має цей закон до хвороби Паркінсона?

Далі, дисертант пише, що якщо відхилення в розподілі генотипів у групі хворих від очікуваного розподілу відсутні, то це говорить про випадковий розподіл генотипів відповідно до рівноваги за Харді-Вайнберга», а це, в свою чергу, свідчить про те, що дана група (тобто, група хворих) може вважатися репрезентативною. Дано визначення поняттю «репрезентативна вибірка». **«Репрезентативна вибірка** - це така вибірка, в якій всі основні ознаки генеральної сукупності, з якої вилучено дану вибірку, представлені приблизно в тій же пропорції або з тією ж частотою, з якою дана ознака виступає в цій генеральній сукупності». Що таке «генеральна сукупність»? Це – 40 млн населення України. Таким чином, як що ми, випадково, беремо вибірку у 100000 осіб, то в цю вибірку мають входити всі представники населення за віком, статтю і соціальною приналежністю. І серед цих 100000 шукаємо і находимо якусь кількість хворих на Паркінсон. Тоді ця вибірка є репрезентативною. В даному випадку дисертант виконував, з епідеміологічної точки зору, когортні дослідження.

Таким чином, в рамках цього розділу було встановлено, що частота гетерозигот в гені LRRK2, що може обумовити хворобу Паркінсона, складала 1,86%, частоти гетерозигот в генах **SNCA** не були виявлені через їхній низький рівень, а частота гетерозигот в гені **GBA** також була відсутня, хоча в таблиці 3.2 вказано, що гетерозиготні носії мутації c.1448T>C гена **GBA** складають 4 випадка тобто, 1,83%. І далі в тексті ця частота згадується.

РОЗДІЛ 4. Присвячений аналізу алельного поліморфізму генів **CYP1A1** ТА **GSTM1** і гену **APOE**, як факторів спадкової схильності до розвитку хвороби Паркінсона.

У результаті експериментальних досліджень вдалося встановити відносний ризик для алелі с.1384G гена **CYP1A1** на рівні 1,76, що, на думку дисертанта, свідчить про те, що присутність у генотипі алелі с.1384G підвищує ризик захворіти на ХП в 1,76 рази.

Аналогічний показник для гомозиготної делеції у гені **GSTM1** для генотипу **del** склав 1,65 і цей факт підвищує ризик захворіти на хворобу Паркінсона в 1,65 разів.

Відповідно, показник відносно ризику для алелі **ε4** гену **APOE** склав 2,36, що також, на думку дисертанта, є фактом підвищення ризику захворіти на Паркінсон.

РОЗДІЛ 5. ВИЗНАЧЕННЯ ДОВЖИНИ ТЕЛОМЕР ЯК МАРКЕРУ ХВОРОБИ ПАРКІНСОНА. У цьому розділі дисертант на 5 сторінках навів чудовий літературний огляд стосовно лінійних еукаріотичних хромосом і ролі їхніх теломер в різних захворюваннях. На цих сторінках по 3-4 строчки тексту присвячені власним дослідженням довжин теломер в хромосомах лейкоцитів і клітин букального епітелію.

Наприкінці розділу містяться висновки. Читаю перший з них.

«Довжина теломер в клітинах букального епітелію значимо коротша у пацієнтів з хворобою, ніж у контролі і корелює з довжиною теломер в клітинах крові. Виражене вкорочення теломер в клітинах периферичної крові виявлено і за інших захворювань (в тому числі, за цукрового діабету, хвороби Альцгеймера, нікотинової залежності і ожиріння), а також у матерів з високим рівнем психологічного стресу, пов'язаного з доглядом за хворими дітьми». До цього висновку я можу додати ще з власного досвіду. Як що людина вип'є горячої, або холодної води, з'їсть перченого, соленого, кислого і т.д. то можна отримати скорочення довжин теломер в клітинах його букального епітелію.

РОЗДІЛ 6. УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ. Левова частина цього розділу присвячена огляду літератури, але чіткої тенденції генетичної залежності цієї хвороби нам знайти не вдалося. Типовий приклад. Цитую один з абзаців.

«Найпоширенішою генетичною причиною як спорадичної, так і сімейної форми ХП є мутації у гені *LRRK2*». Тобто, мутація в цьому гені, з точки зору світових генетиків, є переконливим фактом генетичної причини виникнення хвороби Паркінсона. Читаємо далі. «Хоча, точна фізіологічна функція даного гену лишається, до певної міри, невідомою». Більше того, «...у нещодавніх дослідженнях було показано, що *LRRK2* залучений до таких клітинних функцій, як підтримка цитоскелету, розростання нейритів, везикулярний транспорт, аутофагічна деградація білків та робота імунної системи». Виходить, що цей ген вкрай потрібен організму. На наш погляд, такі, скажімо так, «вузькі місця» в визначенні причини виникнення цієї хвороби, якимось чином треба було б пояснити.

Загальним зауваженням до дисертації, є таке.

Увесь текст дисертацій, починаючи з актуальності і закінчуючи останнім розділом, перевантажений посиланнями на провідних учених в області генетичних аспектів виникнення хвороби Паркінсона. Їх аж 606 і вистачило б на три кандидатські дисертації (або на дві докторські). Від цього, сам текст роботи сприймається важко. До того ж, суперечливі дані заважають знайти певні закономірності.

ВИСНОВКИ. Їх існує шість. У преамбулі до висновків дисертант пояснює суть роботи і відмічає, що визначив роль одонуклеотидних заміні... ..., а також довжини теломер, чомусь, у клітинах крові і букального епітелію, а не в їхніх хромосомах.

Висновки також, умовно, поділені на два блоки. Перші три висновки про мутації у тих генах, що можуть бути причиною виникнення хвороби; другі три висновки - про асоціацію ризику розвитку хвороби з носійством трьох інших генів. Тобто, існують мутації в генах, що детермінують виникнення хвороби і мутації в інших генах, що сприяють розвитку хвороби.

Окремим є висновок стосовно того, що довжина теломер в клітинах букального епітелію є меншою у пацієнтів з хворобою Паркінсона, ніж у здорових осіб. В розділі Матеріали і методи і в інших розділах не згадується про здорових людей. До того ж, хромосомний апарат клітин букального епітелію є на стільки чутливим до дії різних факторів, що він перестав бути, на нашу думку, діагностичним фактором

Автореферат дисертації за своїм змістом повністю відображає основні положення, результати і висновки, що сформульовані й обґрунтовані в дисертаційній роботі.

Вказані зауваження не впливають на зміст дисертації, в якій відображені результати самостійно виконаного завершеного дослідження, що мають наукову новизну, практичне значення та достатній рівень апробації. До того ж, дисертант має право на власну думку відносно суті проблеми, яку він вирішує.

ВИСНОВОК. Дисертаційна робота КОЛЯДИ ОЛЕКСАНДРА КОСТЯНТИНОВИЧА «Роль мутацій в генах *LRRK2*, *SNCA* та *GBA* та поліморфних варіантів генів *CYP1A1*, *GSTM1* та *APOE* й довжин теломер у ризику розвитку хвороби Паркінсона» є актуальним, завершеним, самостійно виконаним науковим дослідженням у галузі генетики, що дає змогу стверджувати, що за рівнем наукової новизни, якості дослідження, обґрунтованості висновків, повністю відповідає вимогам пунктів 9, 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами), до оформлення кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

В.о. декана факультету біотехнології і біотехніки
Національного технічного університету України
"Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського",
доктор біологічних наук, професор

Олексій ДУГАН



Місце проф. Дуґана
Завідувач