

## РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу  
Шиманської Іванни Єлисеївни  
«Мутації гена *ATP7B* у пацієнтів з ідіопатичними гепатобіліарними  
порушеннями та хворобою Вільсона»,  
що представлена на здобуття ступеня доктора філософії  
за спеціальністю 091 Біологія

**Актуальність теми.** Ефективність лікування того чи іншого захворювання залежить не лише від правильного поставленого діагнозу, але і від вчасно правильно поставленого діагнозу. За допомогою молекулярно-генетичних методів можна діагностувати хворобу ще до появи або при перших проявах будь-яких клінічних або біохімічних симптомів. Таким чином, у лікаря з'являється час для проведення так званої попереджувальної терапії - підбору раціональної тактики лікування. На жаль, рівень смертності від гастроентерологічних захворювань, що супроводжуються гепатобіліарними порушеннями, зростає. Тому розробка швидких і точних методів діагностики цих захворювань є актуальною. Саме тому дисертаційна робота Шиманської Іванни Єлисеївни присвячена важливій проблемі – визначенню та вдосконаленню інформативності молекулярно-генетичного тестування алельних варіантів генів серед пацієнтів із ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями для ранньої діагностики цих захворювань серед мешканців України.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій та зв'язок роботи з іншими науковими програмами.** У дисертаційній роботі Шиманської І.Є. на підставі результатів молекулярно-генетичних досліджень на зразках клітин крові представлено обґрунтування необхідності проведення досліджень конкретних алелей у хворих із гепатобіліарними порушеннями, що допоможе підтвердити діагноз, дозволить здійснити індивідуальний прогноз для кожного пацієнта і сформуванати групи ризику.

Робота виконана послідовно та логічно. Отримані результати відповідають поставленим завданням, статистично опрацьовані, ілюстративно продемонстровані у вигляді таблиць та рисунків, достатньо обговорені. Висновки є обґрунтованими, чіткими, мають наукову й практичну цінність, відповідають отриманим результатам. Дисертанткою опрацьована значний об'єм сучасної літератури за темою дослідження, використано сучасні методи для проведення молекулярно-генетичних досліджень: класична ПЛР та її модифікації (RT-PCR, Bi-PASA, метод

рестрикційного аналізу, аналіз кривих плавлення високої роздільної здатності (HRM), аналіз MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), метод секвенування за Сенгером.

Шиманською І.Є. зібрано достатній об'єм експериментального матеріалу, самостійно виконано більшість молекулярно-генетичних досліджень, професійно проаналізовано і узагальнено отримані результати.

Дисертаційна робота відповідає плану наукових досліджень ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» виконувалась у межах двох комплексних тем: "Дослідження генетичних чинників обтяженого клінічного перебігу моногенних і мультифакторних захворювань" (№ держ. реєстрації 0117U000655, 2017 –2019 рр.), «Аналіз чинників ранньої діагностики генетично зумовленої патології людини на прикладі вибраних моногенних та мультифакторних хвороб» (№ держ. реєстрації 0117U000655, 2020 –2021 рр.)

**Наукова новизна роботи.** В результаті глибокого і ретельного аналізу літературних даних та узагальнення власних результатів молекулярно-генетичного дослідження дисертантка на великому за обсягом експериментальному матеріалі запропонувала молекулярно-генетичні критерії діагностики для прогнозування перебігу захворювань, що супроводжуються гепатобілярними порушеннями. Нею вперше було встановлено частоту гетерозиготного носійства мутації с.3207C>A гена *ATP7B* серед загальної вибірки мешканців західних областей України і показано, що саме ця міссенс-заміна є мажорною для пацієнтів з хворобою Вільсона в Україні. Вперше описано спектр мутацій гена *ATP7B*, характерних для пацієнтів із хворобою Вільсона за результатами секвенування кодуючої послідовності та розраховано, що очікувана частота хвороби становить 1:13061 осіб загальної вибірки.

Також Шиманською І.Є. було запропоновано алгоритм генетичної діагностики у випадках ідіопатичних гепатобілярних порушень в осіб молодого віку.

З точки зору практичного застосування результатів роботи, то важливим є впровадження в медичну практику ранньої молекулярно-генетичної діагностики мутацій гена *ATP7B* при підозрі хвороби Вільсона, які є мажорними серед пацієнтів України. Прийом відповідної терапії у цих пацієнтів при вчасній діагностиці зупиняє прогресування хвороби у 100% випадків. Загалом, отримані результати є розробкою, яка необхідна для тісної співпраці фахівців-генетиків та лікарів з метою впровадження молекулярно-генетичних підходів у клінічну практику для ефективного лікування пацієнтів з гепатобілярними порушеннями, зважаючи на доступність патогенетичної терапії.

Також дисертанткою встановлено внесок спадкових мутацій генів *HFE* та *UGT1A1*, які є передумовою формування індивідуального прогнозу і групи ризику для кожного пацієнта в етіологію ідіопатичних гепатобіліарних захворювань в осіб молодого віку.

**Оцінка структури, змісту та завершеності дисертаційної роботи.** Дисертаційна робота викладена на 154 сторінках тексту, матеріали дисертації проілюстровано 19 таблицями та 30 рисунками. Список використаних джерел налічує 150 найменувань, з яких 121 - іноземні. Виклад матеріалу логічно пов'язаний з поставленою метою та завданнями, висновки відповідають поставленим завданням. У дисертації представлені усі необхідні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, результати власних експериментальних досліджень, обговорення результатів досліджень, узагальнення, висновки, практичні рекомендації. Власні результати викладені у чотирьох підрозділах. У розділах «Узагальнення результатів» та «Висновки» підсумовані отримані результати.

**Повнота огляду та аналізу літератури у напрямі дослідження.** В огляді літератури, який складається з трьох основних підрозділів, Шиманська І.Є. всебічно та критично аналізує сучасну літературу, присвячену питанням генетичної гетерогенності та фенотипового поліморфізму захворювань, що супроводжуються гепатобіліарними порушеннями. Автор детально обговорює проблему сучасних підходів до діагностики цих захворювань у людини, прогностичного значення мутацій.

**Оцінка якості використаних методів досліджень, отриманих результатів, їх аналізу та обговорення.** Дисертанткою представлена детальна характеристика осіб обстежених груп, інформація про методи дослідження, про використаний великий об'єм первинної інформації, медичної документації, зразків біологічного матеріалу хворих. Слід відмітити, що автором проведено цілий ряд молекулярно-генетичних дослідження - виділення ДНК зі зразків крові, модифікації класичної ПЛР – ПЛР в реальному часі, Vi-PASA PCR, аналіз кривих плавлення високої роздільної здатності, гетеродуалексний аналіз, аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів та пряме автоматичне секвенування за Сенгером.

Результати досліджень представлені у вигляді таблиць і рисунків, їх проаналізовано та співставлено з даними літератури. Отримані результати є важливими для подальшого розвитку швидкої, недорогої і точної діагностики гепатобіліарних порушень у людини. Висновки логічні, витікають із проведених досліджень, відображають основний зміст роботи.

**Повнота викладу основного змісту дисертації в опублікованих працях у наукових фахових виданнях.** Основні положення дисертаційної роботи представлено у 14 наукових працях, з яких 5 статей у фахових періодичних виданнях України, в тому числі одна в журналі, що входить до бази Scopus, дві в закордонних виданнях, а також 7 тез доповідей на науково-практичних конференціях. Результати досліджень доповідалися та були обговорені на наукових форумах в Україні та за кордоном.

**При рецензуванні дисертаційної роботи виникли деякі побажання, та зауваження.** У роботі досліджувалися не лише мутації гена *ATP7B* в осіб із хворобою Вільсона, але і патогенні варіанти генів *HFE* і *UGT1A1*, які також призводять до гепатобіліарних порушень. Тому вважаю, що назву роботи «Мутації гена *ATP7B* у пацієнтів з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями та хворобою Вільсона», слід відкоректувати. Наприклад, «Молекулярно-генетичні підходи до діагностики гепатобіліарних порушень нез'ясованого генезу у пацієнтів молодого віку з України».

Назву хвороби Вільсона дисертантка в тексті подає по різному: хвороба Вільсона або хвороба Вільсона- Коновалова. Назву хвороби потрібно узгодити у відповідності до вимог клініко-статистичної класифікації хвороб. Те саме стосується і терміну «кільця Кайзера-Флейшера».

Вважаю, що неправильно вживати термін «пацієнти українського походження», оскільки дисертантка не досліджувала генеалогічні дерева цих людей.

У розділі «Вступ» (с.13) двічі повторюється один абзац. При цьому в кінці одного і того ж речення («... нові алелі повідомляються у всьому світі») є посилання на різні джерела літератури.

У завданні 4 «Провести молекулярно-генетичний аналіз мажорної мутації *c.3207C>A* (H1069Q) гена *ATP7B* у групі з пацієнтів різного віку з клінічними проявами хвороби Вільсона» в дужках слід уточнити конкретний вік (від...років –до років).

У розділі 3 «Результати експериментальних досліджень» на деяких фото електрофореграм пропущено підписи. Зокрема, на рис. 3.2 не підписано номери смуг та нечітко видно маркер молекулярної ваги 100 н.п. Бажано вказати його стрілкою. На рис. 3.7 підписати розміри фрагментів, які утворюються. Окрім цього, підписи розмірів фрагментів ДНК слід уніфікувати, оскільки в одних випадках дисертантка їх подає у парах нуклеотидів (п.н.), в інших – base pares (bp). На рис. 3.12 не вказано (і в тексті не описано) котрого розміру утворюються фрагменти.

Посилаючись на праці ряду авторів, дисертантка не вказала джерел літератури. Так, на с. 71 після речення «...за даними низки авторів» не

вказано посилання на праці цих авторів. Так само на с. 86 після речення «...оскільки за даними літератури...», на с. 88 «Відповідно до даних літератури ...», на с. 114 «Ці спостереження були доповнені біохімічними, біофізичними та генетичними дослідженнями, які...» потрібно вказати джерела літератури.

На с.76 опечатка в реченні «Як видно з даних, наведених в таблиці 1,...»). Має бути «.....таблиці 3.6». Також опечатка є на с.77 : на рисунку 3.7 чітко видно, що температура кривої плавлення  $67^{\circ}\text{C}$ , в тексті вказана –  $77^{\circ}\text{C}$ .

Українською мовою правильно писати «за відсутності/наявності.....», а не «при відсутності/наявності.....»,

У табл. 3.8 замість напису в колонці «Частота,% серед жінок, чоловіків» потрібно писати Частота серед жінок, чоловіків (у %).

Загалом, робота є актуальною, викладена логічно і грамотно. Окрім зазначених вище недоліків і запитань, в тексті також трапляються орфографічні помилки, проте ці недоліки і питання не впливають на позитивне враження від роботи та не зменшують її теоретичного та практичного значення. Принципових зауважень до роботи немає.

#### **При рецензуванні дисертаційної роботи виникли наступні запитання.**

1. У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень», підрозділі 2.1.2 «Збір генеалогічної інформації» Ви писали: «Родовід зображали схематично, стрілкою позначали пробанда. При графічному зображенні родоводів використовували загальноприйнятту систему умовних позначень». Не зрозуміло, у скількох пацієнтів досліджувані захворювання виявилися спадковими?

2. «Частота гетерозиготного носійства на рівні 1:57, практично співпадає з даними жителів Франції - 1:31». Чи можна стверджувати, що вони практично співпадають, оскільки різниця в частоті майже вдвічі. Частота носійства може бути статистично достовірною або недостовірною.

3. Що означає термін «практично здорові»?

4. Чи в осіб із однакою мутацією в межах сім'ї Ви спостерігали різницю у фенотипових проявах захворювання, і яка з цього приводу існує інформація в літературі? Чи у пацієнтів із унікальними мутаціями Ви спостерігали неописані раніше симптоми?

**Висновок.** Дисертаційна робота Шиманської Іванни Єлисеєвни «Мутації гена *ATP7B* у пацієнтів з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями та хворобою Вільсона», є завершеною науково-дослідною роботою, в якій запропоновано систему молекулярно-генетичних досліджень, що полягає у встановленні популяційних частот генетичних чинників

гепатобіліарних порушень та визначенні частки серед них мутацій гена *ATP7B*. Отримані дані є вагомим внеском у фундаментальні дослідження щодо визначення інформативності генетичного тестування алельних варіантів генів *ATP7B*, *HFE*, *UGT1A1* серед пацієнтів молодого віку з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями, а також мають практичне значення, оскільки розроблений алгоритм досліджень може бути використаний для надання допоміжних діагностичних та прогностичних оцінок цієї патології.

Дисертаційна робота «Мутації гена *ATP7B* серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями та хворобою Вільсона» за своєю актуальністю, новизною, теоретичним значенням та практичною цінністю, глибиною та обсягом проведених досліджень цілком відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» та п. 6 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44, а її авторка, Шиманська Іванна Єлисеївна, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія.

Офіційний рецензент  
кандидат біологічних наук,  
доцент кафедри генетики та біотехнології  
Львівського національного університету  
імені Івана Франка

Наталія ГОЛУБ