

ВІДГУК

офіційного опонента д.м.н. професора Гаяне Рубенівни Акопян на дисертаційну роботу Кучеренко Анастасії Михайлівни “Алельний поліморфізм генів цитокінів (*IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4*) у пацієнтів з моногенною та масовою патологією”, 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

Сучасна медицина поступово перетворюється на медицину молекулярну, що цілком виправдане, зважаючи на генетичне підґрунтя практично цілого спектру захворювань людини. Стало рутиною застосування молекулярно-генетичних досліджень для діагностики спадкової моногенної патології, а вимогою теперішнього часу є комплексна оцінка геному таких пацієнтів для з'ясування природи відмінностей у клінічних проявах та різної схильності до важких ускладнень. Поширена патологія людини (серцево-судинні хвороби, інсульт, рак тощо) добре діагностується без проведення молекулярно-генетичних досліджень, проте вони стають незамінні, коли йдеться про прогнозування ускладнень клінічного перебігу і адекватний підбір фармакотерапії.

Отже, потреба визначення когорти генів схильності до певних мультифакторних хвороб (поширених і рідкісних) – це сучасний науковий тренд, і, одночасно, єдиний можливий спосіб об'єктивно прогнозувати розвиток хвороби. З цієї точки зору, актуальність дисертаційної роботи А. М. Кучеренко не викликає сумнівів, оскільки вона присвячена дослідженню поліморфних варіантів генів цитокінів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4*, як потенційних факторів ризику розвитку мультифакторних патологічних станів, у патогенезі яких простежується дисбаланс запальних і протизапальних процесів (йдеться про спадкові ерозії рогівки, інсульт, репродуктивні втрати, чутливість до терапії інтерфероном при гепатиті С). Дисертація спрямована на визначення панелі інформативних генетичних маркерів мультифакторної патології, що з

одного боку, поглибить наші уявлення щодо подібних клініко-генетичних асоціацій, а з іншого, дозволить оптимізувати впровадження у медичну практику персоніфікованої тактики ведення пацієнта, що безумовно обмежить ризик виникнення важких ускладнень.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетної теми та двох отриманих на конкурсних засадах проектів.

Особистий внесок здобувача

Автором самостійно проведено біоінформаційний аналіз досліджуваних поліморфних варіантів, виділення та очищення геномної ДНК із зразків периферійної крові індивідів з груп обстеження та контрольних груп, розробку та модифікацію методик детекцій досліджуваних поліморфних варіантів генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4*, 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, використано достатній обсяг експериментального матеріалу (749 осіб у чотирьох дослідних і чотирьох контрольних групах, а також популяційній вибірці), для дослідження якого застосовано сучасні і адекватні методи молекулярно-генетичного та статистичного аналізу.

Новизна отриманих результатів

А. М. Кучеренко вперше встановлено, що алельні варіанти -174С гена *IL6*, -781С гена *IL8* та -592С гена *IL10* є вірогідними модифікаторами проявів гратчастої дистрофії рогівки. Доведено, що носійство алельних варіантів -781С гена *IL8* та -592С гена *IL10* є фактором спадкової схильності до розвитку

ішемічного інсульту, тоді як генотип -592 CC гена *IL10* є потенційним маркером позитивної динаміки при даній патології. Встановлено, що генотип -592 AA та носійство алеля -1082A гена *IL10* є факторами спадкової схильності до невиношування вагітності, а комбінований генотип, до складу якого входять алелі *IL6* -174G та *ESR1* -397C в гомозиготному стані може розглядатися в якості генетичного маркера підтримання вагітності на ранніх термінах. Створено банк лейкоцитарної ДНК індивідів з різною ефективністю лікування хронічного гепатиту С пег-інтерфероном. Вперше доведено асоціацію поліморфізму ss469415590 гена *IFNL4* з ефективністю лікування пацієнтів з хронічним гепатитом С із України.

Практичне значення отриманих результатів

Встановлено діагностичну інформативність поліморфних варіантів -174 G/C гена *IL6* , -781C/T гена *IL8* , -592C/A та -1082G/A гена *IL10*, а також ss469415590 гена *IFNL4* в якості генетичних маркерів спадкової схильності до розвитку рецидивуючих ерозій у пацієнтів зі спадковими дистрофіями строми рогівки, ішемічного інсульту, звичного невиношування вагітності та індивідуальних особливостей відповіді на лікування хронічного вірусного гепатиту С пег-інтерфероном. Отримані результати роботи були впроваджені в закладах охорони здоров'я: відділенні реабілітації хворих з порушенням мозкового кровообігу клініки ДУ „Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України” та у Хмельницькій міській інфекційній лікарні.

Повнота викладу основного змісту дисертації в опублікованих працях у наукових виданнях

Основні положення роботи повністю викладені у 21 друкованій праці, зокрема, в 10 статтях у спеціалізованих наукових виданнях, із них 6 – у фахових виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз даних. Результати дослідження були апробовані на вітчизняних та міжнародних наукових форумах (11 доповідей).

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

Дисертація А. М. Кучеренко викладена в традиційній формі, з дотриманням вимог ДАК МОН України, на 136 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, списку використаних джерел і додатків. Робота добре ілюстрована 24 рисунками та 18 таблицями. Список використаної літератури охоплює 210 найменувань, з них більше половини (55%) надруковані за останні 10 років, а кожна третя публікація (35%) – за останні 5 років.

У вступі дисертант обґрунтувала актуальність, мету, задачі дослідження, визначила наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, показала зв'язок з науковими програмами і темами, підкреслила особистий внесок у виконання роботи та об'єм апробації результатів дослідження у виступах і публікаціях за темою дисертаційної роботи. Принципових зауважень до вступу немає. Хотілося б більш чіткого визначення досліджуваної моногенної патології, до якої відносилась спадкова гратчаста дистрофія строми рогівки з аутосомно-домінантним типом успадкування.

В огляді літератури представлено результати досліджень щодо ролі цитокінів та поліморфізму їх генів у патогенезі мультифакторних станів та в якості потенційних фармакогенетичних маркерів. Автором ґрунтовно викладено сучасні уявлення стосовно функції цитокінів в нормі та при патології, обґрунтовано вибір в якості генів-кандидатів для дослідження генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4*, наведено дані про поліморфізм даних генів та сучасний стан досліджень асоціації поліморфних варіантів даних генів з ризиком розвитку захворювань імунологічної природи. Зауважень до огляду літератури немає і хочеться відмітити чітко викладення матеріалу.

У розділі 2 обґрунтовано вибір стратегії дослідження, охарактеризовано основні та контрольні групи, детально описано критерії їх формування.

Вибірки цілком репрезентативні для проведення досліджень. Методики молекулярно-генетичних досліджень описані детально і чітко, є сучасними і адекватними для вирішення поставлених завдань. Зауважень немає, навпаки, хотілося би акцентувати на декількох принципових з методичної точки зору моментах. Групи порівняння підібрані узгоджено щодо обсягу вибірки, розподілу за віком і статтю. 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.

У розділі 3 дисертант виклав отримані результати дослідження. Усвідомлюючи неможливість безпосередньої верифікації патологічних ефектів досліджених поліморфних варіантів, проведено відбір функціонально значущих поліморфізмів генів *IL6*, *IL8*, *IL10* на засадах узагальнення відомих теоретичних і експериментальних напрацювань та власноруч проведеного біоінформаційного аналізу. Згідно з вимогами сучасного дизайну молекулярно-генетичних досліджень, для кожного дослідженого поліморфізму проаналізовано розподіл генотипів відповідно до співвідношення Харді-Вайнберга, проведено оцінку гетерозиготності та аналіз на відповідність можливій генетичній моделі (домінантній, рецесивній або адитивній).

Дисертантом охарактеризовано генетичну структуру вибірки з популяції України за алельними варіантами поліморфізмів генів *IL6*, *IL8* та *IL10* та проаналізовано їх асоціації із розвитком рецидивуючих ерозій у пацієнтів зі спадковою гратчастою дистрофією рогівки, ішемічним інсультом і звичним невиношуванням вагітності. Проаналізовано алельний поліморфізм гена *IFNL4* у хворих на гепатит С із різною чутливістю до лікування пег-інтерфероном. Проведено порівняльні дослідження основних і контрольних груп, а також груп хворих з відмінним характером перебігу хвороби. Обраховано показники ризику схильності до виникнення певного патологічного стану або можливого варіанту його клінічного перебігу. Отримано результати щодо достовірної

переваги носіїв окремих алелей і генотипів серед хворих з обтяжливим перебігом хвороби, що вказують на високу вірогідність залучення визначених варіантів поліморфізмів генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4* до генетичного підґрунтя досліджених патологічних станів.

Принципових зауважень до розділу немає. Звернула увагу доволі велика різниця між вибірками групи пацієнтів з рецидивуючими ерозіями рогівки та пацієнтів без ерозій. У здорових осіб із популяції України наведено дані щодо нерівноваги за зчепленням між поліморфними варіантами -592C/A та -1082G/A гена *IL10*, проте не вказано які саме алелі знаходяться в фазі зчеплення. Не для всіх досліджених поліморфних маркерів визначено можливу генетичну модель асоціації із виникненням патологічних станів.

У розділі 4 узагальнено результати дослідження та проведено їх обговорення відповідно до сучасних даних літератури. Для кожного з досліджених поліморфізмів зроблено спробу вибудувати можливий ланцюг патологічного впливу. Це не просто, зважаючи на важкість визначення вибіркового ефекту окремих цитокінів. Тому, незважаючи на поодинокі неузгодженості, я позитивно оцінюю намагання дисертанта пояснити можливий вплив досліджених поліморфізмів на реалізацію певного клінічного фенотипу.

Висновки відповідають поставленим меті та завданням дисертації, обґрунтовані результатами дослідження і відповідають сучасним уявленням щодо патофізіології досліджених патологічних станів.

Відповідність автореферату змісту дисертації

Матеріали дисертації адекватно відображені в авторефераті, який зі свого боку в достатній мірі віддзеркалює основні отримані результати.

Зауваження щодо змісту дисертації

У дисертації та в авторефераті зустрічаються окремі орфографічні помилки та невдалі стилістичні вирази. Усі наведені зауваження не є принциповими і носять рекомендаційний характер. В якості дискусії хотілося б отримати відповіді на наступні запитання:

1. Якщо генотип ТТ за алельним варіантом -781С/Т гена *IL8* розглядається як умовно протекторний, а генотип СС як ген схильності до ерозій у хворих зі спадковою гратчастою дистрофією рогівки, то чому розрахунок шансів проводили по С алелю (СС+СТ), а не по СС генотипу?
2. Чи спостерігалася асоціація комбінованого генотипу за поліморфними варіантами -592С/А та -1082G/А гена *IL10* із ризиком звичного невиношування вагітності?
3. Беручи до уваги полігенне підґрунтя досліджених патологічних станів та клінічних варіантів їх перебігу, чому не проводився аналіз комбінованих генотипів за поліморфізмами усіх досліджених генів цитокінів?

Резюмуючи вище викладене, хочу зазначити, що дисертаційна робота А. М. Кучеренко є добре спланованою, методично правильно виконаною і чітко викладеною працею. Серед великої кількості відомих досліджень поліморфізмів, що вивчалися в аспекті можливого впливу на реалізацією патологічних ознак у людини, рецензована робота позитивно виділяється методичною вивіреністю кожного кроку у напрямку поставленої мети. Все це дозволило виконати поставлені завдання в досягненні мети роботи – визначенні генетичних маркерів схильності до розвитку та/або варіантів обтяжливого перебігу моногенної патології (гратчаста дистрофія строми рогівки) і важливих з медико-соціальних міркувань поширених захворювань людини (інсульт, репродуктивні втрати, гепатит С).

Висновок

На підставі вищевикладеного вважаю, що дисертаційна робота Кучеренко А.М. є завершеним самостійним дослідженням, яке спрямоване на вирішення важливої проблеми – пошук генів схильності та модифікаторів клінічного перебігу моногенної та поширеної патології людини. 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 – Кучеренко Анастасія Михайлівна – заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,
заступник директора з наукової роботи,
ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ»,
в.о. завідувача відділення клінічної генетики,
доктор медичних наук, професор
05.10.2015 р.


Г. Р. Акопян

