

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу ОЛЕШКО Тетяни Богданівни “Зв’язок поліморфізму генів ендотеліну та ендотелінового рецептора з механізмами основних проявів ішемічного інсульту”, поданої до спеціалізованої вченої ради Д 55.051.05 Сумського державного університету МОН України на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 - патологічна фізіологія

1. Актуальність обраної теми дисертації

Судинна патологія тривалий термін «поставляє» великі показники інвалідності та смертності у пацієнтів працездатного віку. Серед таких захворювань найбільш тяжкими за перебігом, особливостями лікування, а також наслідками, є порушення мозкового кровообігу. В Україні щороку офіційно реєструється 110–130 тис. інсультів, 30–40 % хворих на інсульт помирають протягом першого місяця і 20–40 % з тих, які вижили, мають тяжку інвалідність. Захворюваність на мозковий інсульт у нашій країні істотно перевищує аналогічні показники в розвинених країнах світу і становить 31 % у нозологічній структурі всіх форм цереброваскулярних хвороб. Фахівці вважають, що якщо не змінити ситуацію на кращу, до 2025 року кожен п’ятий із жителів нашої країни помре від інсульту і ще кожен п’ятий після інсульту стане залежним від сторонньої допомоги.

Невпинне зростання кількості хворих з цереброваскулярними захворюваннями вимагає покращень існуючих методик діагностики, попередження розвитку та лікування цієї патології. Існують численні докази генетичної залежності цілого ряду механізмів, причетних до уражень кровоносних судин, що призводять до цереброваскулярної патології. В цьому аспекті актуальність дисертаційної роботи здобувача Олешко Тетяни Богданівни не викликає сумнівів, оскільки в роботі йдеться про дослідження патогенетичного взаємозв’язку генетичних чинників та ішемічного інсульту у вузькому сенсі цього явища та в хронічній ішемії – в широкому.

Вважаю, що при аналізі актуальності та важливості дисертаційної роботи для патологічної фізіології зокрема та медичної науки в цілому слід відокремити наступні три блоки. По-перше, важливим є вивчення патогенетичних механізмів ішемії головного мозку з точки зору обґрунтування провідної ролі в цьому ендотеліальної дисфункції. По-друге, ретельне вивчення взаємозв'язку генетичних асоціацій, дисфункції ендотелію та ішемічного інсульту не проводилося, тобто наукове дослідження здобувачки має стати важливим внеском в розвиток патологічної фізіології, неврології, генетики та низки споріднених дисциплін. По-третє, автор використовує в якості методологічного прийому концепцію патологічної дизрегуляції системи крові, серцевої та судинної систем, з'єднуючи все вищевказане з певними особливостями функціонування рецепторного апарату, що, з одного боку висвітлює високу теоретичну, а саме – патофізіологічну обізнаність дисертантки, а, з іншого, підтверджує високий рівень методологічної побудови дисертаційної роботи. Насамкінець, відзначу, що наукова робота є класично побудованою патофізіологічною дисертацією, але вважаю в якості переваги над аналогічними роботами за таким же фахом клінічну її спрямованість.

Критично аналізуючи підґрунтя, яке було поштовхом для ініціації дисертаційного пошуку та проведення клінічних спостережень, дисертант з перших сторінок роботи акцентує увагу на відсутній інформації стосовно механізмів взаємодії ендотеліну-1 та ендотелінового рецептора типу А, які є провідними чинниками формування серцево-судинної патології. При цьому вона відзначає, що таке співфункціонування детермінується структурними особливостями їх генів - генів ендотеліну-1 та ендотелінового рецептора типу А. Дисертант відзначила невідомі дотепер дані про патогенетичну роль одонуклеотидних поліморфізмів генів *EDN1* і *EDNRA* при ішемічному атеротромботичному інсульті.

Резюмуючи, впевнений, що дисертаційна робота Олешко Т.Б. є актуальною та важливою для патологічної фізіології, а також для окремих

суміжних клінічних дисциплін, що дозволяє говорити про вірогідні перспективи клінічного впровадження окремих її результатів.

2. Зв'язок теми дисертаційної роботи з державними чи галузевими науковими програмами

Дисертаційна робота Олешко Т.Б. виконана відповідно плану науково-дослідних робіт кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету “Роль поліморфізму генів у розвитку патологічних процесів і хвороб” (номер держреєстрації 0114U006297) та “Зв'язок алельного поліморфізму генів ектопічної кальцифікації з розвитком поширених серцево-судинних хвороб та їх ускладнень” (номер держреєстрації 0115U000688), при виконанні яких дисертант була співвиконавцем вказаних вище тем.

3. Новизна дослідження та одержаних результатів

Проведені дослідження дозволили авторові отримати принципово нові результати. Так, вперше встановленорозподіл генотипів та частоту алелів за поліморфізмами Lys198Asn гена *EDN1* та C+70G гена *EDNRA* у практично здорових осіб та хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом серед представників української популяції. При цьому виявлено суттєву розбіжність співвідношення генотипів за Lys198Asn-поліморфним варіантом гена *EDN1* між хворими з ішемічними атеротромботичними інсультами та особами контрольної групи.

В дисертації вперше проаналізовано вплив поліморфних варіантів генів *EDN1* та *EDNRA* на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту у пацієнтів із різними факторами ризику.

Вперше показано, що ішемічний атеротромботичний інсульт в осіб з індексом маси тіла понад 25 кг/м², гомозигот за мінорним алелем Lys198Asn-поліморфізму виникає у 4,6 раза частіше, ніж у гомозигот за основним алелем.

Автором продемонстровано суттєво (у 3,7 рази) більший ризик розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту у пацієнтів з індексом маси тіла

понад 25 кг/м², носіїв гетерозиготного (C/G) генотипу за C+70G-поліморфізмом, порівняно з гомозиготами за основним алелем.

При цьому вперше виявлено, що ризик виникнення інсульту вдвічі більший у носіїв гетерозиготного Lys/Asn-генотипу, які страждають на артеріальну гіпертензію, а в гомозигот за мінорним алелем (Asn/Asn) такий ризик збільшується в 4,1 раза порівняно з носіями Lys/Lys-генотипу.

Отримані авторкою дані дозволяють прогнозувати підвищення ризику розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту в 3,4 рази для носіїв Asn/Asn-генотипу, які не є курцями.

4. Теоретичне значення результатів дослідження

Проведення низки клінічних спостережень з використанням патофізіологічних, клінічних, лабораторних, інструментальних, молекулярно-генетичних та статистичних методів дослідження дозволило з'ясувати асоціації поліморфних сайтів Lys198Asn гена *EDNI* і C+70G гена *EDNRA* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб з різними чинниками його ризику.

З теоретичної точки зору важливим є доведені патогенетичні властивості однонуклеотидного поліморфізму генів при ендотеліальній дисфункції і таких її наслідків, як ішемічний атеротромботичний інсульт.

Узагальнення отриманих результатів створює передумови щодо розробки нових патогенетично обґрунтованих методів прогнозування ймовірності виникнення ішемічного атеротромботичного інсульту у пацієнтів з наявними чинниками ризику розвитку ендотеліальної дисфункції.

5. Практичне значення результатів дослідження

Практичне значення результатів, одержаних в дисертаційному дослідженні, полягає в тому, що виявлена під час роботи генетична схильність до ішемічного атеротромботичного інсульту дозволить своєчасно проводити заходи профілактики та застосовувати індивідуальний підхід до вибору методів лікування у випадку розвитку недуги.

Важливими в практичному відношенні є результати, які вперше показали наявність статевих особливостей у впливі досліджуваних генетичних чинників на розвиток цереброваскулярної патології. При цьому встановлено, що ризик виникнення ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб жіночої статі з Lys/Asn-генотипом (поліморфізм гена *EDNI*) більший у 2,6 рази, а в чоловіків, що є носіями Asn/Asn-генотипу, – у 3,5 рази, ніж у пацієнтів із Lys/Lys-генотипом.

Нові наукові дані розширюють сучасні уявлення стосовно таких генетичних чинників, як однонуклеотидні поліморфізми генів, причетних до розвитку ендотеліальної дисфункції і таких її наслідків, як ішемічний атеротромботичний інсульт.

Практична значимість отриманих результатів підтверджується впровадженнями основних положень та висновків наукових досліджень Т. Б. Олешко до науково-навчального процесу на кафедрах патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету МОЗ України, Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, Івано-Франківського національного медичного університету, Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського, на кафедрі фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету МОН України.

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

Наукові положення та висновки дисертаційної роботи Олешко Т.Б. базуються на комплексних клініко-лабораторних та інструментальних обстеженнях 294 осіб віком від 40 до 85 років, серед яких 170 осіб з ішемічним атеротромботичним інсультом становили основну групу клінічного спостереження. Групи порівняння не відрізнялись між собою за співвідношенням осіб різної статі, середніми показниками індексу маси тіла, кількістю осіб із надмірною вагою та кількістю курців. Загальне число

обстежень, клінічних груп та груп контролю є достатнім для обґрунтування основних положень та висновків дисертації.

Адекватна статистична обробка числових даних, яка включала не лише оцінку вірогідності відмінностей середніх величин та їх математичної похибки, але й кореляційний аналіз, підтверджує обґрунтованість висновків дисертації.

Достовірність отриманих даних підтверджена сучасними статистичними методами, а саме параметричним критерієм – коефіцієнтом Стюдента та непараметричними – критеріями Фішера та χ^2 -критерія Пірсона.

Зауважу також, що опосередкованими чинниками, які додатково свідчать на користь обґрунтованості та вірогідності отриманих результатів у дисертації, яка рецензується, є такі: перше – методологічним підґрунтям дисертаційної роботи є визнана концепція щодо провідної ролі ендотеліальної дисфункції в патогенезі церебросудинних захворювань; друге - дисертація виходить з відомої та авторитетної наукової лабораторії кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету; третє – трирічний термін виконання клініко-лабораторних обстежень та досліджень. Все це унеможливорює методологічні, технічні та системні помилки при виконанні цієї роботи та не викликає сумнівів в достовірності і вірогідності основних наукових положень, розробок і висновків, сформульованих в дисертації і авторефераті.

7. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті

За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових робіт, що повністю відображають зміст проведених досліджень. В активі дисертанта є 8 статей у наукових фахових виданнях, з числа яких 7 статей — у виданнях України, рекомендованих ДАК МОН України, та 1 стаття – у науковому виданні, яке індексується міжнародною наукометричною базою SCOPUS. За темою дисертаційних досліджень надруковані 11 тези доповідей та 1 патент на корисну модель. Дві наукові роботи є одноособовими.

8. Структура і зміст дисертації

Дисертаційна робота Олешко Т.Б. викладена гарною українською мовою і оформлена відповідно офіційних вимог МОН України. Її викладено на 164 сторінках комп'ютерного тексту. Вона складається з анотацій, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, розділу власних досліджень (загалом 4 підрозділи), аналізу й узагальнення результатів, висновків, переліку використаних джерел літератури і додатків. Робота ілюстрована 33 таблицями і 13 рисунками. Бібліографічний покажчик включає 261 джерело, з них 90 – кирилицею.

У «Вступі» дисертантом визначена загальнотеоретична важливість наукового дослідження залучення генетичних механізмів, з одного боку, та ендотеліальної дисфункції, з іншого, до патогенезу цереброваскулярних захворювань. Автор об'єктивно висвітлює актуальність проблеми, яку досліджує, наводить статистичні дані, які свідчать про прогресивне наростання хворих на атеротромботичний ішемічний інсульт, і відштовхується від тієї позиції, що подібний стан проблеми склався в тому числі й через неостаточне з'ясування патогенетичних механізмів хронічної ішемії мозку. Дисертант при цьому логічно обґрунтовує ті позиції, які послужили поштовхом для проведення низки наукових досліджень та становлять ґрунт теперішньої дисертаційної роботи.

Чітко формулюється мета роботи, яка полягає у вивченні асоціації однонуклеотидних поліморфізмів Lys198Asn гена *EDN1* та C+70G гена *EDNRA* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту, а також аналіз впливу поліморфних варіантів досліджуваних генів на виникнення ішемії головного мозку в пацієнтів з найпоширенішими факторами ризику, а також п'ять конкретних задач, вирішення яких забезпечить, на думку автора, досягнення цієї мети.

У “Вступі” також характеризується наукова новизна і практичне значення отриманих результатів та особистий внесок дисертанта у виконання та узагальнення результатів досліджень.

В першому розділі роботи – огляді літератури, який має три підрозділи, – наведені дані численних наукових джерел стосовно сучасних уявлень про патогенетичні механізми ішемічного інсульту, про провідну роль в розвитку цієї патології ендотеліальної дисфункції, а також надає вичерпні дані про функціональне значення ендотеліну-1 та рецепторів до ендотеліну типу А за даних умов.

Підсумовуючи, автор обґрунтовує актуальність дослідження патогенетичного значення генетичних чинників, які шляхом взаємодії з чинниками зовнішнього середовища спричиняють розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту. Дисертант впевнена, що дисфункція ендотелію відіграє провідну роль у патогенезі ішемічного інсульту, саме тому вивчення молекулярно-генетичних механізмів функціонування вазодилататорних та вазоконстрикторних агентів є актуальним питанням сьогодення та, можливо, однією з найперспективніших можливостей запобігання даної судинної патології.

На підставі аналізу численних джерел наукової літератури, переважно зарубіжної, авторка резюмує стосовно важливої ролі гена *EDNRA* та його алельних варіантів у механізмах виникнення багатьох мультифакторіальних захворювань. Дисертант всебічно розглядає різні генетичні та внутрішні чинники, взаємодія яких має спричинитиме формування тяжкої цереброваскулярної патології. Окремо зупиняється на даних, які свідчать про залучення ендотеліну-1 та його рецептора типу А в патогенетичних механізмах розвитку ендотеліальної дисфункції та ішемічного атеротромботичного інсульту. Автор доводить про ймовірний вплив поліморфних сайтів на експресію й функціональні властивості білка.

У цілому, огляд свідчить про компетентність автора у розглянутих питаннях. Він написаний достатньо стисло, проте в той же час в ньому наведені численні дані різноманітних досліджень вітчизняних та зарубіжних авторів, які дисертант критично аналізує та висвітлює власне ставлення до проблеми, яка розглядається.

В другому розділі дисертаційної роботи “Матеріали та методи дослідження” наведені дизайн виконання клініко-лабораторних спостережень, характеристика клінічного матеріалу, основні молекулярно-генетичні методики дослідження. Прискіпливо описані особливості статистичного аналізу отриманих результатів.

Третій розділ дисертаційної роботи – це власні результати дисертантки. В ньому (в першому підрозділі) розглядається вплив алельних поліморфізмів Lys198Asn гена *EDNI* і C+70G гена *EDNRA* на розвиток ішемічного атеротромботичного інсульту. Автор на підставі численного фактичного матеріалу, який гарно обчислений статистично, наводить дані, які переконливо свідчать про збільшення ризику розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту при наявності Lys198Asn-поліморфізму гена *EDNI*.

В другому підрозділі надані дані стосовно асоціації Lys198Asn-поліморфізму гена *EDNI* і C+70G-поліморфного варіанта гена *EDNRA* з ішемічним атеротромботичним інсультом у осіб з різними факторами ризику. Окремо розглянуті перспективні чинники ризику при формуванні атеротромботичного ішемічного інсульту, а саме, вік хворих, наявність або відсутність паління, чи є обстежені носіями Lys198Asn-поліморфного варіанта гена ендотеліну-1 або ні. В цьому підрозділі автором наведено значний за об’ємом матеріал, який всебічно відповідає на питання стосовно визначення чинників ризику досліджуваної патології.

В третьому підрозділі висвітлені дані кореляційного аналізу впливу Lys198Asn- і C+70G-алельних поліморфізмів генів *EDNI* та *EDNRA* на основні характеристики ішемічного атеротромботичного інсульту. Авторка підсумовує, що Lys198Asn- і C+70G-поліморфні сайти генів *EDNI* та *EDNRA* детермінують характеристики ішемічного атеротромботичного інсульту. При цьому виявлено асоціацію Lys198Asn-поліморфізму з артеріальним кровопостачанням, атеротромботичні зміни якого призводять до розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту, у осіб з індексом маси тіла менше 25 кг/м². аналіз отриманих результатів дозволяє зробити висновок стосовно того, що

поліморфізм гена *EDN1* впливає на ступінь тяжкості ішемічного атеротромботичного інсульту у осіб з артеріальною гіпертензією та у осіб, які не палять. Щодо C+70G-поліморфізму, встановлено асоціацію з артеріальним басейном, що зазнає уражень у осіб з нормальним артеріальним тиском. Показано, алельний варіант гена *EDNRA* впливає на тяжкість клінічного перебігу ішемічного атеротромботичного інсульту у осіб з індексом маси тіла понад 25 кг/м².

Четвертий підрозділ роботи дисертант закінчує висновком про те, що найбільшу прогностичну здатність на обраній для тестування вибірці моделей мала двокомпонентна модель, що включала поліморфний локус Lys198Asn гена *EDN1* та артеріальну гіпертензію з акуратністю тестування, яка дорівнює 62 %, максимальною кросвалідаційною постійністю, чутливістю в 56 % та специфічністю в 77 %. Наприкінці підрозділу автор висловлює, що, за даними кластерного аналізу, найбільша частка ентропії серед усіх факторів належала поліморфному локусу Lys198Asn та артеріальній гіпертензії.

Аналіз та обговорення отриманих результатів чітко структуровано, проводиться з використанням власних результатів, які порівнюються та співставляються з відомими даними. Логічна висновки та співставлення отриманих результатів із такими, які наведені в сучасній науковій літературі, допомагають краще зрозуміти отримані дані щодо чинників ризику виникнення серцево-судинних захворювань взагалі та ішемічного інсульту, зокрема. Дисертант визначає, що алельний поліморфізм генів, які відіграють певну роль у формуванні та прогресуванні ендотеліальної дисфункції, є важливим чинником спадкової схильності до багатьох судинних захворювань, зокрема ішемічного атеротромботичного інсульту.

Висновки дисертації чітко сформульовані. Їх зміст повністю підтверджується фактичним матеріалом, одержаним автором. Висновки повною мірою відображають результати проведених досліджень, розкривають мету дисертаційної роботи та відповідають поставленим завданням наукового дослідження.

9. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і оформлення

Під час рецензування дисертаційної роботи і автореферату виникли окремі запитання і зауваження, на які варто звернути увагу переважно в дискусійному аспекті.

Мені цікава думка дисертанта на наступні запитання.

1. Якими можуть бути прогностичні рекомендації в осіб, які є носіями мінорних алелів за поліморфними варіантами генів *EDN1* і *EDNRA*, стосовно профілактичних заходів щодо формування ішемічного атеротромботичного інсульту?
2. Чи можливо зробити висновок стосовно того, що є найбільшим чинником впливу на потенціальний розвиток ішемічного інсульту в осіб, які є носіями *Asn/Asn*-генотипу: підвищення артеріального тиску або паління?
3. Яка авторка зможе прослідкувати ланцюг розвитку патологічних процесів в разі тривалого анамнезу паління з акцентом на формування ендотеліальної дисфункції? Інакше кажучи, чи можна говорити, що термін паління детермінує ризик формування ендотеліальної дисфункції або спричиняє розвиток ішемічного інсульту?

В мене також виникли окремі зауваження. Здається некоректним вживати слова «куріння» та «фактори», тоді як українською мовою краще говорити «паління» та «чинники».

Різниця у відтінках сірого кольору на рисунках 3.4.1, 3.4.3, 3.4.6 та схожих є складною для розуміння, тому можливо було би рисунки подати у вигляді будь-якого штрихування.

Таблиці 3.2.3-3.2.7 є достатньо великими, тому доцільно було би їх розбити на менші за об'ємом, до того ж в менших таблицях краще було би описати наявні фактичні дані. Крім того, частину фактичного матеріалу можна було би навести в рисунках.

До того ж важко було аналізувати фактичний матеріал, наведений в розділі власних досліджень, та потім його верифікувати з табличними даними,

які наведені в додатках. Вважаю за доцільне перенести таблиці в додатках 1-16 до тієї частин наукової роботи, де описані результати власних досліджень.

Є поодинокі граматичні та стилістичні помилки, проте, наведені зауваження є непринциповими та не впливають на позитивну оцінку дисертаційної роботи в цілому.

10. Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці

Досліджені та визначені дисертантом наукові дані про зв'язок Lys198Asn-поліморфного сайту гена *EDN1* та C+70G-поліморфізму гена *EDNRA* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту можуть бути впроваджені в клінічні та реабілітаційні заклади охорони здоров'я з метою прогнозування ймовірності виникнення цього захворювання у пацієнтів із чинниками ризику виникнення ендотеліальної дисфункції.

Виявлення генетичної схильності до ішемічного атеротромботичного інсульту дозволить своєчасно проводити заходи профілактики та застосовувати індивідуальний підхід до вибору методів лікування у випадку розвитку недуги.

Матеріали дисертаційної роботи Олешко Т.Б. можуть бути рекомендовані для подальшого поглибленого вивчення у навчальній діяльності вищих медичних закладів при викладенні розділів загальної патофізіології, патофізіології серцево-судинної системи.

Відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота ОЛЕШКО Тетяни Богданівни “Зв'язок поліморфізму генів ендотеліну та ендотелінового рецептора з механізмами основних проявів ішемічного інсульту” є самостійною завершеною науковою працею, в якій отримані нові обґрунтовані результати, що в сукупності вирішують актуальне науково-практичне завдання патологічної фізіології, яке полягає у полягає у з'ясуванні асоціації поліморфних сайтів Lys198Asn гена *EDN1* і C+70G гена *EDNRA* з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту в осіб з різними чинниками його ризику.

Тема дисертації є актуальною, а науковий напрям досліджень – оригінальним. Автор застосував сучасні методи наукового дослідження – патофізіологічні, клінічні, лабораторні, інструментальні, молекулярно-генетичні та статистичні, адекватні вирішенню поставлених у роботі задач. Проведено великий об'єм досліджень, які дозволили отримати важливі нові, науково обґрунтовані результати.

Все це дозволяє зробити висновок, що робота “Зв’язок поліморфізму генів ендотеліну та ендотелінового рецептора з механізмами основних проявів ішемічного інсульту” відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія, а її автор Олешко Т.Б. заслуговує присудження шуканого наукового ступеня.

Офіційний опонент

завідувач кафедри загальної та клінічної патологічної
фізіології Одеського національного медичного
університету МОЗ України,
доктор медичних наук, професор



Вастьянов Р. С.

Підпис професор Вастьянова Р.С. засвідчую:
Проректор з науково-педагогічної роботи
Одеського національного медичного університету
МОЗ України, з.д.н.т. України, професор

Бажора Ю. І.