

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Дубовика Євгена Івановича "Патогенетичне значення поліморфізму генів циклу вітаміну К для розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту", подану на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія

Актуальність теми дисертації. Мозкові інсульти належать до надзвичайно актуальних проблем сучасної медицини у зв'язку з високою летальністю та інвалідизацією. В Європі на 100 тисяч населення щороку трапляється близько 200 мозкових інсультів, в Україні – 280-290, у т.ч. 100-120 – уперше [Українська Асоціація боротьби з інсультом, 2016]. Серед них кожен третій (35,5%) – це людина працездатного віку, кожен 6-й помирає, кожен п'ятий (20%) зрештою стане інвалідом. Якщо в Європі співвідношення частоти геморагічного інсульту до ішемічного 1:7, то в Україні – 1:3,6. А летальність перевищує 74 на 100 тисяч населення, тоді як у розвинутих країнах 47. Доривартісне лікування, тривала професійна реабілітація, медичний догляд, серйозні віддалені наслідки (фізичні, психологічні, соціальні і т.п.) робить дану недугу великим тягарем для середньостатистичного українця та його родини.

З огляду на вище сказане, пошук нових ланок патологічних механізмів розвитку ішемічного мозкового інсульту, у т.ч. генетичних та спадкових предриспозитивних, які стали би передумовою предиктивної діагностики, ранньої первинної та вторинної профілактики, чи персоніфікованого лікування є надзвичайно актуальним завданням, яке поставив перед собою дисертант у даній роботі. Важливість підсилюється ще і соціальною значимістю об'єкта дослідження для України та новизною для медичної науки загалом. Враховуючи вищевикладене, актуальність дисертаційної роботи не викликає сумнівів.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Рецензована робота є окремим фрагментом науково-дослідної теми Сумського державного університету МОН України "Зв'язок алельного

поліморфізму "генів ектопічної кальцифікації" з розвитком поширених серцево-судинних хвороб та їх ускладнень" (номер державної реєстрації 0115U000688).

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. Сформульовані Є.І. Дубовиком наукові положення, узагальнення та висновки базуються на достатній кількості спостережень: 170 хворих на ішемічний атеротромботичний інсульт (ІАТІ) та 124 особи без цереброваскулярної патології, що склали контрольну групу.

Використані методики дослідження є такими, що дозволяють вирішити поставлені завдання на сучасному методичному рівні, що дало можливість автору отримати вірогідні результати та зробити обґрунтовані висновки. При виконанні дослідження автором опрацьовано достатню кількість літературних джерел (260 першоджерел: 11 кирилицею, 249 латиницею). Висновки логічні, випливають з матеріалів дослідження, чітко сформульовані, конкретні, відповідають поставленим завданням.

Це дає підстави стверджувати про вірогідність отриманих результатів та обґрунтованість наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Достовірність і наукова новизна результатів дослідження. Достовірність наукових положень захищено аналітичними методами параметричної і непараметричної статистики: непарний критерій Стюдента (за нормального розподілу вибірки за тестом Шапіро-Вілка), однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) із поправкою Бонфероні, критерій узгодженості Пірсона- χ^2 (у т.ч. для встановлення відповідності розподілу генотипів до популяційної рівноваги Харді-Вайнберга), метод бінарної логістичної регресії для прогнозування ІАТІ із наступним застосуванням мультіваріабельної логістичної регресії (поправка на чинники). Для розрахунку частоти гаплотипів та аналізу нерівноважного зчеплення (linkage disequilibrium (LD)) за програмою Arlequin (3.1). Моделювання міжлокусних взаємодій послідовного впливу поліморфізму генів циклу вітаміну К на розвиток ІАТІ – методом скорочення

багатофакторної розмірності (MDR - multifactor dimensionality reduction), у т.ч. кластерний аналіз. Результати виконаного статистичного аналізу подаються в 63 таблицях, 25 рисунках із зазначенням рівня значимості для кожного дослідженого показника.

Наукова новизна отриманих результатів полягає в тому, що автор вперше на Україні визначив та проаналізував частоти алелів та поліморфних варіантів генів вітамін-К-епоксидредуктази (*VKORC1*, G-1639A і C1173T) та γ-глутамілкарбоксилази (*GGCX*, Arg406Arg). Також, встановлено асоціацію між поліморфними локусами G-1639A гена *VKORC1*, а також Arg406Arg гена *GGCX* та ІАТІ у населення Північно-Східного регіону України і не встановлено такого зв'язку між C1173T-поліморфізмом гена *VKORC1* та ІАТІ. Окрім того, на появу ІАТІ, за носійства певних поліморфних варіантів генів *VKORC1* (G-1639A) та *GGCX* (Arg406Arg), впливала стать (переважно ІАТІ виникав у жінок і чоловіків носіїв мінорного А-алеля G-1639A поліморфізму гена *VKORC1*), індекс маси тіла пацієнта (ІМТ >25 кг/м²), а також наявність/відсутність артеріальної гіпертензії та звички курити (до слова, остання не впливала на ризик ІАТІ в обстеженій популяції), що створює передумови для продовження наукової дискусії.

Дисертант вперше встановив, що у носіїв мінорного А-алеля (G-1639A поліморфізм) гена *VKORC1* ризик розвитку інфаркту головного мозку зростає у 2,1 рази, а у носіїв ТТ-генотипу гена *GGCX* (Arg406Arg поліморфізм) – у 3,1 рази. Гетерозиготний генотип (СТ) гена *GGCX* навпаки мав протективне значення із найнижчою ймовірністю появи ІАТІ в популяції

Вперше показано, що окремі гаплотипи гена *VKORC1* (за наявності хоча б одного мутаційного алеля у гомозиготному стані) призводять до значного збільшення ризику інсульту. Натомість гаплотип із комбінацією диких алелей гена *VKORC1* (-1639G/1173C) мав протективне значення щодо ІАТІ.

Практичне значення одержаних результатів та висновків. Дисертаційна робота є фундаментальним дослідженням, що відповідає паспорту спеціальності "патологічна фізіологія" (п. 2.6 – дослідження в галузі клінічної

патофізіології). Результати та висновки дослідження розширюють відомості про роль генів білків циклу вітаміну К у патогенезі ішемічного атеротромботичного інсульту та створюють передумови для корекції заходів профілактичного, діагностичного та лікувального характеру у цільовій категорії осіб.

Практична цінність роботи полягає в тому, що на підставі отриманих даних можна сформувати групи ризику появи ІАТІ (у т.ч. повторного) у популяції для вчасного запровадження методів первинної і вторинної профілактики у т.ч. за рахунок модифікації чинників ризику (найбільш "небезпечним" в генотипі людини, за даними автора дисертаційного дослідження, є наявність А-алеля гена *VKORC1* (G-1639A поліморфізм), чи ТТ-генотипу гена *GGCX* (Arg406Arg поліморфізм), чи комбінації в гаплотипі мінорних алелей гена *VKORC1* (G-1639A і С1173Т поліморфізми)).

Матеріали дослідження впроваджені у науково-дослідну роботу і навчальний процес на кафедрах патофізіології Національного фармацевтичного університету (м. Харків), Івано-Франківського національного медичного університету, Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, Одеського національного медичного університету, Української медичної стоматологічної академії (м. Полтава), ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України", на кафедрі фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету МОН України.

Повнота викладення результатів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових робіт, серед яких 6 статей (одна – у виданні з індексом цитованості в наукометричній базі Scopus, решта – у наукових фахових виданнях, що входять до затвердженого переліку ДАК України, у тому числі 3 одноосібно) і 8 тез доповідей.

Сукупність усіх публікацій у повній мірі відображає викладені в дисертації результати дослідження.

Зміст автореферату є ідентичним основним положенням дисертації.

Відповідність вимогам змісту та оформлення роботи. Дисертація побудована за загальноприйнятою схемою. Загальний обсяг роботи 167 сторінок комп'ютерного машинопису (основний текст – 137 сторінок). Складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, розділу власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів роботи, висновків, списку літератури (260 джерел, з яких 249 (95,8%) – латиницею). Мова дисертації – українська.

У "Вступі" послідовно і логічно аргументується актуальність обраної теми, наводиться зв'язок дисертаційної роботи з науковою тематикою навчального закладу, чітко і конкретно сформульовано мету і завдання дослідження, об'єкт, предмет і методи дослідження, показано новизну та практичну значимість результатів, визначається особистий внесок автора у виконанні дисертації, наводяться відомості про апробацію результатів, а також пункт "Обсяг і структура дисертації".

Огляд літератури займає 24 сторінки складається з трьох підрозділів. стисло і вичерпно висвітлює сучасні уявлення про роль генетичного поліморфізму у патогенезі ішемічного атеротромботичного інсульту з різних позицій виникнення гострої судинної катастрофи: атерогенезу, активності РААС, ендотеліальної дисфункції, ремоделювання судин, змін гемостазу - тромбогенезу з урахуванням активності вітамін К-залежних білків. Автор описав структуру та функцію білків циклу вітаміну К та зв'язок поліморфізму генів циклу вітаміну К із розвитком серцево-судинних захворювань. Підрозділи написано чітко і логічно, гарною мовою, а відбір літературних джерел та їх аналіз свідчить про широку ерудицію та наукову зрілість дисертанта.

У 2-му розділі "Матеріали і методи" наводиться загальна характеристика клінічного матеріалу, діагностика ІАТІ, вказано, що дослідження проводилося з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину, отримано інформовану згоду від кожного пацієнта на участь у дослідженні, дано перелік станів, що слугували критеріями не включення у дослідження. Із розділу стає зрозумілим, що дослідження були одно-

моментні, на кшталт "case-control", без періоду спостереження. Із методів дослідження окремих підрозділ присвячено дослідженню поліморфізму генів, де дисертант вичерпно і розширено описує методику молекулярно-генетичних досліджень: двох поліморфізмів гена *VKORC1* (G-1639A і C1173T) та Arg406Arg поліморфного локусу гена *GGCX*; наводить результати рестрикційного аналізу у вигляді електрофореграм із їх детальним описом. Наприкінці розділу дисертант дає стислий опис методів статистичного аналізу, котрі було використано в дослідженні.

Розділ 3 "Результати власних досліджень" складається з чотирьох підрозділів, кожний з яких є завершеною самостійною структурною одиницею. У першому і другому підрозділах автор досліджує асоціацію G-1639A і C1173T поліморфізмів гена *VKORC1*, а у третьому Arg406Arg поліморфізму локусу гена *GGCX* із розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту. Наводиться частота зустрічання в популяції мешканців Сумської області (із/без інсульту) алелів та генотипів двох ізоформ (G -1639A і C1173T поліморфізмів) гена вітамін-К-епоксидредуктази, та Arg406Arg поліморфізму γ -глутамілкарбоксилази як загалом, так із урахуванням статі, зросту, маси тіла та індексу маси тіла (ІМТ), наявності гіпертензії, рівня АТ (систоличного, діастолічного, пульсового та середнього) у т.ч. з урахуванням гендерних особливостей, впливу куріння, вмісту глюкози плазми та коагулограми. Аналізуються чотири моделі успадкування патології у т.ч. з поправкою на чинники ризику (домінантна, рецесивна, наддомінантна та адитивна).

Четвертий підрозділ присвячено комплексному аналізу поєднаного впливу вище вказаних ізоформ генів циклу вітаміну К на розвиток ІАТІ із застосуванням сучасної класифікаційної полікомпонентної моделі для прогнозу ризику розвитку хвороби у загальній популяції (розрахунку частоти генотипів та аналізу нерівноважного зчеплення), та з урахуванням впливу окремих чинників ризику (АТ, статі). Для цього автор застосував кластерний аналіз результатів моделювання міжлокусних (поєднаний вплив поліморфізму

генів циклу вітаміну К) та міжфакторних взаємодій за ІАТІ методом МІЖ (скорочення багатофакторної розмірності)

"Аналіз і узагальнення результатів" містить стислий виклад основних положень дисертації, порівняння власного фактичного матеріалу з результатами світових досліджень. На підставі аналізу літератури автор пропонує схематичний механізм можливого впливу поліморфних варіантів генів циклу вітаміну К у патологічному процесі розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту: через послаблення експресії гена вітамін-К-епоксидредуктази та зменшення швидкості трансляції γ -глутамілкарбоксилази, що зумовлює зменшення активності γ -карбоксилювання і через каскад плеiotропних ефектів – вплив на фактори згортання крові (II, VII, IX, X), антикоагуляційні протеїни S, C, Z, сигнальні білки GAS6 (впливає на ріст ГМК) і періостин (POSTN), а також регулятори кальцієвого обміну, зумовлює ріст та запалення атеросклеротичної бляшки з наступним розвитком судинної катастрофи.

Висновки досить конкретні, відповідають завданням дослідження, впливають із результатів дослідження, обґрунтовані і достовірні, відрізняються новизною, хоча і потребують певної стилістичної корекції (висновок 2).

Наведений список літератури (29 сторінок), складений згідно діючих вимог ДСТУ 7.1.2006.

Під час аналізу змісту роботи та вивчення матеріалів дисертації у порядку наукової дискусії виникли наступні зауваження:

- наявні помилки технічного характеру, в окремих місцях є нерозшифровані аббревіатури (в "Огляді літератури" – ЕПР, ТДМ), які не мають пояснення в списку скорочень;

- окремі речення є стилістично незавершеними, повторно дублюються деякі числові дані, зустрічаються неточності формулювання;

- нумерацію таблиць та рисунків доцільно наводити відповідно до номеру розділу наскрізно, а не кожного підрозділу окремо, в окремих таблицях – недоречності форматування, у назві таблиць наявні складні аббревіатури;

Слід підкреслити, що наведені зауваження не носять принципового характеру, не впливають на загальну позитивну оцінку дисертації, не знижують наукової цінності роботи. Основні наукові положення та висновки автора не підлягають сумніву.

У процесі рецензування виникли окремі **питання**, на які хотілося б почути відповідь дисертанта у порядку наукової дискусії:

1. З якою метою було застосовано моделі успадкування патології та що вони означають?

2. Чи достатньо вивчених даних (вік, стать, зріст, маса тіла, показники АТ, ліпідограма, глюкоза крові, скорочена коагулограма, куріння, наявність / відсутність артеріальної гіпертензії), для з'ясування ролі поліморфізму генів циклу вітаміну К у патогенезі ішемічного атеротромботичного інсульту?

3. У висновку 2, вказується, що "Однонуклеотидний поліморфізм G-1639A промоторної ділянки гена *VKORC1* є вагомим предиктором ішемічного атеротромботичного інсульту та незалежним фактором його ризику." Чи є відмінність між "предиктором" ІАТІ і "фактором ризику" ІАТІ? Якщо так, то в чому вона полягає?

На додаток слід відмітити використання та вільне володіння дисертантом сучасними методами статистичного аналізу, що вирізняє роботу, справляє гарне враження і підкреслює наукову ерудицію дисертанта.

Висновок на відповідність дисертації вимогам, які висуваються до наукового ступеня кандидата медичних наук. Дисертаційна робота Дубовика Євгена Івановича "Патогенетичне значення поліморфізму генів циклу вітаміну К для розвитку ішемічного атеротромботичного інсульту" є завершеною самостійною кваліфікаційною науковою працею, у якій містяться нові науково обґрунтовані результати проведених здобувачем досліджень, що розв'язують конкретне наукове завдання в галузі медичних наук – патологічної фізіології: встановлення ролі поліморфізму генів циклу вітаміну К у патогенезі ішемічного атеротромботичного інсульту із різними факторами ризику.

За актуальністю, обсягом та науково-методичним рівнем проведених досліджень, науковим та практичним значенням, дисертація Є.І. Дубовика відповідає вимогам п. 11 "Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 зі змінами та доповненнями, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

Офіційний опонент:

завідувач кафедри сімейної медицини

ВДНЗ України "Буковинський державний медичний університет"

д.мед.н., професор

Л.П. Сидорчук



" ____ " _____ 2017 р.

