

ВІДГУК

на дисертацію Марченко Ірини Василівни

**"АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА
ЕКТОНУКЛЕОТИД ПІРОФОСФАТАЗИ/ФОСФОДІЕСТЕРАЗИ 1 (ENPP1)
З РОЗВИТКОМ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ
ТА ФАКТОРАМИ ЙОГО РИЗИКУ",**

що представлена до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук / доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина, 14.03.04 – патологічна фізіологія

Актуальність теми дисертації. Цукровий діабет (ЦД) на сьогодні визнано міжнародною медичною спільнотою неінфекційною пандемією ХХІ сторіччя. За даними ВООЗ на планеті у 2014 році 8,5% дорослих у віці 18 років і старше мали ЦД (WHO News, 2020). У 2016 році діабет був безпосередньою причиною смерті 1,6 мільйонів людей у світі, а в 2012 році високий рівень глюкози в крові спричинив ще 2,2 мільйона смертей, половина з яких припадає на працездатний вік до 70 років. Станом на 2016 рік ЦД був сьомою причиною смертності у світі (WHO News, 2020).

Незважаючи на те, що основні механізми ЦД 1-го і 2-го типів є доволі ґрунтовно вивчені, мультифакторну етіологію доведено, а спадкову схильність підтверджено, питання механізмів діабет-опосередкованого пошкодження органів-мішеней, стратифікації груп ризику, що базуються на молекулярно-генетичних predisposиціях, все ще потребують подальших досліджень. В цьому аспекті вивчення впливу поліморфізмів генів, які певним чином здатні впливати на появу інсулінорезистентності (ІР), чи викликати дисфункцію β -клітин підшлункової залози є вкрай актуальним.

Одним із таких генів-кандидатів ЦД 2 типу є ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (ENPP1), білковий продукт якого пригнічує дію інсуліну на клітини-мішені через вплив на тирозинкіназу, яка зменшує активність α -субодиниці рецептору інсуліну, знижує подальше аутофосфорилювання і утворення білків-транспортерів глюкози. Це призводить до гіперглікемії, гіперінсулінемії та розвитку, зрештою, ІР. Тому, стало цілком обґру-

нтованим і доцільним використання автором 2-х SNP поліморфізмів (rs997509- та rs1044498) даного гена (*ENPP1*) для дослідження в якості потенційних маркерів ЦД 2 типу.

Враховуючи вище зазначене, дисертаційна робота Марченко Ірини Василівни є безумовно актуальною та своєчасною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась в рамках тем наукових досліджень кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету "Патологічне значення поліморфізму поодиноких нуклеотидів у розвитку найпоширеніших патологічних процесів і хвороб людини" (державний реєстраційний номер 0114U006297) і "Молекулярно-генетичні та морфологічні особливості регенерації тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії" (державний реєстраційний номер 0117U003926), співвиконавцем яких була здобувач.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Сформовані у дисертації положення, висновки та рекомендації базуються на достатньому клінічному матеріалі (317 хворих на ЦД 2 типу та 302 особи контрольної групи без ЦД) із використанням сучасних, інформативних методів дослідження, які відповідають поставленій меті та завданням. Проведені дослідження схвалені Комісією з питань біомедичної етики медичного інституту Сумського державного університету на етапі планування та завершення і відповідають міжнародним вимогам GLP, GCP проведення досліджень за участю людини та Хельсінської декларації про права людини та біомедицину. Кількарівнева статистична обробка матеріалу з використанням сучасних методів SPSS-17 є переконливою, результати високо достовірними, на підставі чого автор доводила основні положення дисертації і зробила обґрунтовані висновки. Проведене дослідження повністю відповідає поставленій меті та завданням, а висновки є логічним завершенням отриманих результатів. Факти, які б свідчили про недостовірність наведеної в дисертації інформації не виявлені.

Наукова новизна отриманих результатів полягає в тому, що автор уперше встановила в популяції північно-східного регіону України нові механізми асоціації 2-х SNP поліморфізмів (rs997509, rs1044498) гена *ENPP1* із розвитком ЦД2 типу: у носіїв мінорного Т-алеля (rs997509) та Q-алеля (rs1044498) ризик розвитку ЦД 2 типу у 2 та 1,4 рази вище, ніж у гомозигот за основним алелем кожного поліморфізму (С- та К-алелей, відповідно).

Дисертант уперше виявила, що жінки з СТ-генотипом (rs997509) мають утричі вищий ризик розвитку ЦД 2 у обстеженій популяції ($P_{\text{спост}}=0,031$; $OR_{\text{спост}}=3,038$). Цікавим виявився факт появи недуги в асоціації не тільки з поліморфними варіантами гена *ENPP1*, але і віком та ожирінням. Носії мінорного Т-алеля (rs997509) у віковій категорії 75 років і старше хворіють на ЦД2 у 4,5 рази частіше ($OR_{\text{спост}}=4,561$; $CI=1,040-20,014$), а за наявності ожиріння у носіїв цього ж алеля (rs997509) ризик розвитку ЦД 2 типу утричі вищий ($OR=3,230$; $P=0,023$) в порівнянні з гомозиготами за основним С-алелем.

Автор у перше створила класифікаційну апроксимаційну модель ризику розвитку ЦД у популяції на підставі аналізу поєднаного впливу поліморфних сайтів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 та відомих факторів ризику ЦД2 методом MDR із прогностичною значущістю моделі 57 % ($P<0,001$). Поєднання $IMT \geq 25$ кг/м^2 , носійства мінорного Т-алеля поліморфізму 1-го інтрона незалежно від варіантів генотипів К/К, К/Q або Q/Q за поліморфізмом 4-го екзона досліджуваного гена є значущим предиктором підвищеного ризику розвитку ЦД2 типу.

Теоретичне значення результатів дослідження. Молекулярно-генетичне дослідження проведене здобувачем та отримані результати дозволили поглибити розуміння патогенетичних механізмів розвитку ЦД 2 типу, акцентована увага на участь у цих механізмах 2-х поліморфних варіантів гена *ENPP1*, а саме rs997509 та rs1044498.

Таким чином, наукова новизна результатів, висновків та рекомендацій, наведених у дисертації та поданих на захист, є безсумнівною.

Практичне значення результатів дослідження. Для практичного використання авторка запропонувала спосіб прогнозування ризику розвитку ЦД2 типу з урахуванням поліморфізму гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1, асоційованого із формуванням ІР, що включає визначення rs997509 поліморфізму гена *ENPP1* (Пат. на корисну модель. 131229. Спосіб прогнозування розвитку цукрового діабету 2 типу, опубл. 10.01.19, бюл. № 1). Вперше встановлено, що ризик розвитку ЦД 2 типу та його ускладнень зростає в осіб, що є носіями мінорних алелей досліджуваних поліморфізмів (rs1044498 та rs997509). Отримані результати створюють передумови для виявляти осіб, генетично схильних до ЦД 2 типу, що дозволить проводити ранню діагностику ІР, лікування та формувати групи високого ризику.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Матеріали дисертації можуть бути використаними в науковій роботі, навчальному процесі та практичній лікарській діяльності, що підтверджують отримані здобувачем акти упровадження. Результати досліджень впроваджено в науково-дослідну роботу і навчальний процес на кафедрах патофізіології Медичного інституту Сумського державного університету, Української медичної стоматологічної академії (м. Полтава), Одеського національного медичного університету, Харківської академії післядипломної освіти, а також кафедри сімейної медицини Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці).

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях. За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових праць, серед них 6 статей (2 – в зарубіжному фаховому виданні, включеному до бібліографічної бази *Scopus*, 4 – у вітчизняних журналах, рекомендованих МОН України, з яких дві – одноосібно), 13 тез доповідей у матеріалах конгресів та конференцій, з яких одна у фаховому виданні закордоном; один патент на корисну модель.

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

Зміст автореферату є ідентичним основним положенням дисертації.

Структура та зміст дисертації. Дисертація побудована за класичною схемою: містить вступ, огляд літератури, опис матеріалу і методів дослідження, розділ з описом власних результатів, їх аналіз та узагальнення, висновки, список використаних джерел та додатки. Дисертація викладена на 151 сторінці друкованого тексту, ілюстрована 25 таблицями, 17 рисунками, містить 3 додатки. Наводяться посилання на 210 літературних джерел (17 – кирилицею, 193 – латиницею).

У "Вступі" наведена актуальність обраної теми, зв'язок із науковими темами кафедри, сформульовано мету та завдання, об'єкт, предмет і методи дослідження, наведено новизну та практичну значимість, зазначено особистий внесок дисертантки у виконанні роботи, рівні апробації результатів, перелік публікацій за темою, обсяг і структура власне самої роботи.

Розділ "Огляд літератури" (20 сторінок) містить два підрозділи. Ґрунтовно висвітлюються сучасні уявлення про патогенез ЦД2 та роль досліджуваних поліморфізмів гена у механізмах розвитку діабету. Даний розділ ілюстровано рисунками, що узагальнюють викладений матеріал. Дисертантом опрацьовано достатню кількість сучасних літературних джерел, як вітчизняних, так і зарубіжних науковців.

У розділі "Матеріал та методи" (3 підрозділи) наведено характеристику клінічного матеріалу. Всі дослідження проводилися з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Хельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етнічні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини та Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Наведено відомості щодо застосованих методів дослідження (клінічних, молекулярно-генетичних та статистичних). Детально описано методикку генотипування пацієнтів за досліджуваними поліморфізмами та наведено електрофореграми з детальних їх описом. Наприкінці розділу дисертант описала статистичні методи дослідження.

Третій розділ "Результати власних досліджень" (38 сторінок) складається з трьох підрозділів, кожен з яких є завершеною структурною одиницею.

У першому та другому підрозділах автор досліджує асоціацію поліморфних варіантів (rs1044498 та rs997509) гена *ENPP1* із розвитком ЦД 2 типу та факторами його ризику. Наводиться частота зустрічання в популяції мешканців Сумської області алелів та генотипів двох поліморфізмів (rs1044498 та rs997509) досліджуваного гена як загалом, так і з урахуванням статі, ІМТ, звички палити, наявних супутніх ожиріння та АГ. Аналізуються різні моделі успадкування патології у т.ч. з поправкою на фактори ризику. Третій підрозділ присвячено комплексному аналізу поєданого впливу поліморфізмів гену *ENPP1* на розвиток ЦД 2 типу із застосуванням сучасної класифікаційної полікомпонентної моделі для прогнозу ризику розвитку хвороби у загальній популяції (розрахунку частоти гаплотипів та аналізу нерівноважного зчеплення), та з урахуванням впливу окремих факторів ризику діабету. Для цього автор застосувала кластерний аналіз результатів моделювання міжлокусних та міжфакторних взаємодій методом MDR.

"Аналіз та узагальнення результатів" (17 сторінок) містить стислий виклад основних положень дисертації, порівняння власного фактичного матеріалу з результатами світових досліджень.

Висновки досить конкретні, відповідають завданням, випливають із результатів дослідження, обґрунтовані і достовірні, відрізняються новизною.

Наведений список використаних джерел складений згідно Національного стандарту України ДСТУ 8302:2015.

Роботу фіналізують 3 додатки, які містять список публікацій здобувача за темою дисертації, із вказанням особистого внеску, та відомості про апробацію результатів дисертації. У додатку 3 наведено скани актів упровадження результатів дослідження у навчальний процес кафедр державних закладів вищої медичної освіти України та практичну охорону здоров'я.

Дотримання принципів академічної доброчесності. Ознак порушення принципів академічної доброчесності не встановлено: перевірка програмним забезпеченням "Antiplagiarism" в БДМУ засвідчила оригінальність текстових даних 84%.

Недоліки дисертації щодо її змісту та оформлення. Під час аналізу змісту роботи та вивчення матеріалів дисертації у порядку наукової дискусії з'явилися непринципові зауваження технічного характеру:

- привести у відповідність перенесення таблиць на іншу сторінку (ст 70, 73,78), нумерацію таблиць і рисунків в межах розділу; окремі рисунки потребують корекції кольорових відтінків для роздільної чіткості; привести у відповідність нумерацію додатків за буквами української абетки;

- багаторазово наводиться повна назва нозологій, замість абrevіатур;

- наявні поодинокі граматичні та стилістичні помилки у вигляді неточності формулювань, чи двозначних висловів.

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

Після аналізу дисертаційної роботи залишилися деякі **дискусійні питання** на які хотілося отримати б відповіді дисертанта:

1. Відомо, що в одному гені можуть бути сотні і тисячі поліморфізмів. Частина з них перебувають у тісному нерівноважному зчепленні, створюють гаплотипи, як у Вашому випадку ($D'=0,970$; $r=0,157$). На Вашу думку, чи інші поліморфні сайти гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1, що знаходяться в нерівноважному зчепленні, чи навіть інших генів за неповного зчеплення і кросинговеру, розташованих на цій же хромосомі могли вплинути на отримані Вами результати і наскільки вагомо?

2. У хворих на ЦД ризик серцево-судинних захворювань значно вищий, ніж у загальній популяції. На Вашу думку, який із механізмів, досліджених у Вашій роботі, є найбільш впливовим у розвитку таких наслідків ЦД?

На додаток слід відмітити глибокий аналіз та узагальнення результатів, що вирізняє роботу, справляє гарне враження і підкреслює наукову ерудицію дисертантки.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Марченко Ірини Василівни: "Аналіз асоціації поліморфних варіантів гена ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*) з розвитком цукрового діабету 2 типу та факторами його ризику" 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 алельного поліморфізму гена *ENPP1* у патогенезі ЦД 2 типу, з урахуванням факторів його несприятливого перебігу.

За актуальністю, обсягом та науково-методичним рівнем проведених досліджень, науковим та практичним значенням, дисертація І.В. Марченко відповідає вимогам п.11 "Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника" затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 року зі змінами та доповненнями, внесеними Постановою Кабінету Міністрів України від 21.10.2020 року №979, а також п.10 "Вимоги до рівня наукової кваліфікаційної роботи", затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 року №167, а її автор заслуговує на присудження ступеня кандидата медичних наук / доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина, 14.03.04 – патологічна фізіологія.

Офіційний опонент:

Завідувач кафедри сімейної медицини

Буковинського державного медичного університету МОЗ України

д.мед.н., професор

Л.П. Сидорчук

Дата:

Підпис *Сидорчук*
Начальник відділу кадрів
Буковинського державного медичного університету



І. Марченко