

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук,  
заместителя директора по научной работе Федерального государственного  
бюджетного учреждения “Медико-генетический научный центр” Российской  
академии медицинских наук

Куцева Сергея Ивановича на диссертационную работу

Титова Бориса Васильевича на тему:

“Полиморфизм генов, белковые продукты которых играют роль в развитии  
воспаления, при ишемическом инсульте”,

представленную на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

по специальности 03.01.04 – биохимия.

**Актуальность научного исследования** Б.В.Титова не вызывает сомнения, поскольку острые нарушения мозгового кровообращения, преимущественно ишемического генеза, являются одной из самых частых причин летальности и инвалидизации населения, причем - в трудоспособном возрасте. Именно эти обстоятельства обуславливают высокую медико-социальную значимость данной работы. Патогенез ишемического инсульта сложен, так как в большинстве случаев это заболевание относится к группе мультифакториальных. Патогенез мозговой ишемии включает большое количество факторов, таких как гипоксия, реперфузионные повреждения, воспалительные реакции. Активно изучается роль генетических факторов, ассоциированных с ишемическим инсультом. Предполагается, что определенные аллели генов, кодирующих компоненты различных физиологических систем, ассоциированы с этим заболеванием, и могут быть рассмотрены как факторы риска развития ишемического инсульта.

Действительно, исследования ассоциаций генов, кодирующих различные факторы воспаления, с ишемическим инсультом изучены



недостаточно. Известно, что одними из важнейших факторов воспаления являются цитокины. Связь дисбаланса цитокинов и локальной воспалительной реакции в ответ на действие повреждающего фактора описаны в литературе. В связи с этим изучение полиморфизма генов *IL6*, *TGFB1*, *IL4*, *TNF*, *IFNG* и *LTA*, а также генов, кодирующих антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов и фосфодиэстеразу 4D, представляется актуальным и своевременным.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 160 страницах, написана в классическом стиле и состоит из введения, главы обзора литературы, главы описания материалов и методов, главы результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа достаточно информативно иллюстрирована 10 рисунками, 19 таблицами. Список литературы включает 424 современных источника отечественной и зарубежной литературы.

### **Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Диссертационная работа выполнена на большом материале, поскольку в ней представлены молекулярно-генетические данные по 2 выборкам: 200 больных ишемическим инсультом и 146 здоровых людей контрольной группы. В исследуемую и контрольную группы включены индивиды с учетом принципа моноэтничности (только индивидуумы русской национальности). Диагноз ишемического инсульта был подтвержден во всех случаях методами компьютерной и магнитно-резонансной томографии. Далее, достоверность полученных результатов подтверждается адекватно подобранными методами, о чем свидетельствуют приведенные в диссертации протоколы молекулярно-генетических методов исследования. Полученные данные обработаны с использованием современных методов статистического анализа. Материалы диссертационной работы изложены в 5 статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, что свидетельствует



об оценке полученных Б.В. Титовым результатов многими экспертами. Также материалы диссертационного исследования прошли апробацию в виде докладов на нескольких международных и всероссийских конференциях.

Все вышеизложенное убедительно доказывает достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, изложенных в диссертационной работе Б.В.Титова.

**Научная новизна** диссертационного исследования Б.В.Титова заключается в том, что впервые у этнических русских проведен анализ связи носительства аллелей, генотипов и сочетаний аллелей и генотипов полиморфных участков генов *CTLA4*, *IL6*, *TGFB1*, *IL4*, *TNF*, *IFNG*, *LTA* и *PDE4D*, кодирующих провосполительные белки, с развитием ишемического инсульта. Впервые в данном исследовании показана ассоциация с развитием ишемического инсульта носительства аллелей/генотипов  $-174G>C$  гена *IL6*,  $-509C>T$  гена *TGFB1* и  $87C>T$  гена *PDE4D*. Впервые анализ связи носительства аллелей, генотипов и сочетаний аллелей и генотипов полиморфных участков изученных генов проведен с учетом пола и возраста изученных индивидов. В диссертационной работе показано, что аллели или генотипы генов *IL6*, *PDE4D* и *TGFB1* входят в состав ассоциированных с ишемическим инсультом сочетаний, объединяясь как друг с другом, так и с аллелями других исследованных генов, из которых для *IFNG* и *TNF* наблюдается воспроизведение результатов на подвыборках.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Диссертационное исследование Б.В.Титова обладает как научной, так и практической значимостью. Так, в данной работе обнаружены ассоциации аллелей и генотипов генов *IL6*, *PDE4D* и *TGFB1* и развитием ишемического инсульта. Те или иные варианты генов, обнаруживаемые при генотипировании, зачастую сопровождаются вариабельностью их биологической активности. В связи с этим, с определённой долей



вероятности, выявленные варианты генов *IL6*, *PDE4D* и *TGFB1* могут обуславливать функциональные различия кодируемых ими медиаторов воспаления и, как следствие, участвовать в формировании патогенетических событий на различных стадиях, предшествующих ишемии. В связи с полигенной природой ишемического инсульта можно предположить аддитивный эффект выявленных вариантов в предрасположенность к этому заболеванию. Конечно, в настоящее время не представляется возможным использовать во врачебной практике данные об одиночных аллелях и генотипах для расчета риска развития мультифакториальных заболеваний. Тем не менее, выявленные в работе одиночные аллели и генотипы, а также сочетания аллелей и генотипов, могут служить в последующем маркерами для оценки индивидуального риска развития ишемического инсульта у этнических русских в комплексе с другими признаками.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 5 – в журналах, рекомендуемых ВАК МОН РФ для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание научной степени доктора и кандидата наук. Публикации полностью отражают основные положения работы. Материалы диссертации неоднократно докладывались на международных и всероссийских конференциях и конгрессах.

**Общая характеристика работы.** Во Введении диссертант обосновывает актуальность выбранной темы исследования. Следует отметить, что в этом же разделе автор четко сформулировал цель исследования, которая полностью отражает содержание исследования. В соответствии с выбранной темой диссертационной работы и поставленной целью диссертант четко определил задачи исследования, включающие проведение геномного типирования выбранных на основе анализа литературы полиморфных участков генов-кандидатов (*CTLA4*, *IL6*, *TGFB1*, *IL4*, *TNF*, *IFNG*, *LTA* и *PDE4D*), проведение анализа ассоциации аллелей и генотипов исследованных генов с развитием ишемического инсульта, проведение анализа ассоциации носительства



сочетаний аллелей/генотипов («генетических ансамблей») исследованных генов с развитием ишемического инсульта, Оценить гендерные и возрастные особенности ассоциации генетических маркеров с предрасположенностью к ишемическому инульту.

Глава “Литературный обзор” свидетельствует о хорошем знании автором имеющихся литературных источников по изучаемому вопросу. В обзоре литературы приводятся данные о модифицируемых и немодифицируемых факторах риска ишемического инсульта. Справедливо делается заключение, что мультифакториальность ишемического инсульта предполагает анализ сочетания действия различных факторов риска, включая и генетические. В следующем разделе обзора литературы Б.В.Титов приводит данные о многочисленных молекулярно-генетических исследованиях при ишемическом инсульте, которые были предприняты за последние годы как при изучении крайне малочисленных моногенных форм этого заболевания, так и полигенных. Основываясь на данных литературы, автор справедливо заключает, что исследование генетических основ ишемического инсульта должно проводиться в гомогенной этнической популяции, так как представленность различных аллелей в различных популяциях значительно варьирует. Рассматривая моногенные формы ишемического инсульта автор указывает на то, что при некоторых заболеваниях инсульт является ведущим симптомом, в других случаях – частью сложного симптомокомплекса.

Автор обоснованно подчеркивает сложность молекулярно-генетических исследований при мультифакториальной форме ишемического инсульта в связи с многокомпонентностью его патогенеза. В связи с этим, ряд авторов изучает предрасположенность к развитию ишемического инсульта, анализируя молекулярно-генетические данные по отдельным факторам риска этого заболевания, такими как, например, артериальная гипертензия или атеросклероз сосудов головного мозга. В разделе посвященном анализу данных литературы по поиску маркеров



риска ишемического инсульта автор компетентно описывает существующие подходы к идентификации генов, определяющих развитие этого заболевания - функционального и позиционного картирования. Далее автор приводит данные литературы об основных генах 5 функциональных групп, ассоциированных с патогенезом ишемического инсульта. Это гены системы липидного и гомоцистеинового метаболизма, гемостаза, продукции оксида азота, ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) и воспаления. Также в обзоре приведены последние данные об использовании полногеномных исследований (GWAS), показавших ассоциацию ишемического инсульта с локусами 4q25, 12p13.33, 18p11.21.

Далее автор не только анализирует и обобщает современные данные литературы по ишемическому инсульту, но и на их основе, уже в обзоре литературы, создает дизайн своего исследования, обосновывая выбор генов-кандидатов и их полиморфных участков для настоящего диссертационного исследования.

В заключении обзора литературы автор справедливо отмечает, что несмотря на обширный экспериментальный материал, посвященный иммунно-воспалительному статусу пациентов с ишемическим инсультом, роль генов воспаления в развитии инсульта изучена недостаточно, и многие вопросы остаются открытыми.

Во второй главе, посвященной описанию материалов и методов диссертационного исследования, Б.В.Титов приводит подробное описание группы больных ишемическим инсультом, включенных в исследование, а также группу контроля, приводит протокол молекулярно-генетического исследования, с подробным описанием использованного метода для генотипирования отобранных полиморфных локусов на основе метода полиморфизма длины рестрикционных фрагментов продуктов ПЦР. Для каждого из 11 выбранных полиморфных участков 8 генов-кандидатов приводится отдельный протокол. Подробно описан статистический анализ полученных данных.



В третьей главе “Результаты и их обсуждение” достаточно подробно приведены результаты собственных исследований диссертанта. Уже в начале описания собственных результатов исследования обращает внимание профессионализм автора.

В результате проведенного анализа Б.В.Титовым показано в этой главе, что из 11 полиморфных участков 8 генов, наиболее значимый вклад в развитие ишемического инсульта этнических русских вносят гены *IL6*, *PDE4D* и *TGFB1*. По-видимому, провосполительные медиаторы, которые кодируются этими генами, могут принимать участие в формировании патогенетических событий на различных стадиях, предшествующих ишемии. Также в диссертации показано, что при сравнении группы больных ишемическим инсультом и контрольной группы аллели или генотипы полиморфных участков этих генов являются индивидуальными факторами риска.

Комплексный анализ показал также, что аллели или генотипы генов *IL6*, *PDE4D* и *TGFB1* входят в состав ассоциированных с ишемическим инсультом сочетаний из двух и трех аллелей/генотипов различных генов. Составные генетические маркеры ишемического инсульта данные аллели присутствуют попарно и/или совместно с аллелями других исследованных генов, - *IFNG*, *CTLA4*, *IL4* и *TNF*, которые в отдельности не ассоциированы с ишемическим инсультом.

При разделении группы больных ишемическим инсультом и контрольной группы по гендерному признаку автор выявил значимую позитивную ассоциацию с ишемическим инсультом частоты носительства аллеля *IL6*\*-174G у женщин и генотипа *TGFB1*\*915G/G у мужчин. При разделении больных ишемическим инсультом на две группы по возрасту у лиц старше 60 лет выявлена позитивная ассоциация с ишемическим инсультом носительства аллелей *IL6*\*-174G и *IFNG*\*874T, а у лиц ≤60 лет – носительства аллеля *PDE4D*\*41A



Полученные автором данные позволили ему предположить аддитивность вклада рассмотренных генов в предрасположенность к ишемическому инсульту. Также, полученные данные подтверждают важную роль воспаления при ишемическом инсульте.

Важно отметить, что каждый подраздел диссертации содержал в конце промежуточные обобщения полученных результатов.

В главе “Заключение” диссертант дает краткое описание полученных результатов. Представленные автором выводы соответствуют поставленной цели и сформулированным задачам.

**Замечания.** Принципиальных замечаний нет. В работе выявлены незначительные опечатки и неточности, которые не влияют на положительное впечатление от диссертации. В целом работа оценивается положительно.

#### **Вопросы.**

1. При отборе пациентов в исследуемую группу каким образом проводилась дифференциальная диагностика полигенных случаев ишемического инсульта с моногенными заболеваниями, клиническая картина которых сопровождается ишемическим инсультом?

#### **Заключение.**

Диссертационная работа Титова Бориса Васильевича “Полиморфизм генов, белковые продукты которых играют роль в развитии воспаления, при ишемическом инсульте” по актуальности темы, объему исследования, методической обоснованности, научной новизне, значимости полученных результатов и сделанных на их основе выводов является завершенным научно-квалификационным исследованием, выполненным под руководством доктора биологических наук, профессора Фаворовой Ольги Олеговны, в котором решена актуальная научная задача по поиску полиморфизмов кодирующих провоспалительные медиаторы генов, предрасполагающих к развитию ишемического инсульта.



Диссертационная работа полностью соответствует п.7  
 “Положения о порядке присуждения ученых степеней” (Постановление  
 Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842), предъявляемым к кандидатским  
 диссертациям, а соискатель заслуживает присуждения ученой степени  
 кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Заместитель директора по научной работе  
 Федерального государственного бюджетного учреждения  
 “Медико-генетический научный центр”  
 Российской академии медицинских наук  
 доктор медицинских наук

Куцев С.И.

115478, Москва,  
 ул.Москворечье, д. 1  
 Тел. (499) 3249169  
 E-mail: kutsev@mail.ru

Подпись доктора медицинских наук С.И. Куцева заверяю

Ученый секретарь ФГБУ  
 “Медико-генетический научный центр” РАМН  
 кандидат медицинских наук



Смирнихина С.А.