

Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии им. А.Н.Баха  
Российской академии наук

119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, стр.2  
Тел.. 954-52-83, факс: 954-27-32

17.04.2014 № 12307-2177-218

на № 02.04.2014 NS 2-2/18-05



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения науки Институт  
биохимии им. А.Н.Баха Российской  
академии наук,

член-корреспондент РАН, д.х.н.,  
профессор В. О. Попов

17 апреля 2014 г.

### ОТЗЫВ

**Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук о диссертации Титова Бориса Васильевича на тему «Полиморфизм генов, белковые продукты которых играют роль в развитии воспаления при ишемическом инсульте», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 - "биохимия"**

### АКТУАЛЬНОСТЬ РАБОТЫ

Острые нарушения мозгового кровообращения являются одной из основных причин инвалидизации и смертности, как в России, так и во всем мире. Поэтому одной из наиболее серьезных задач современной медицины является поиск способов прогнозирования развития и течения сосудистых заболеваний мозга, и в первую очередь ишемического инсульта (ИИ), или инфаркта мозга, самого распространенного типа инсультов. Развитие инфаркта при ИИ включает в себя множество механизмов и патогенетических факторов, в число которых входят воспалительные реакции и дисбаланс цитокинов, которые на разных этапах ишемического каскада могут играть неоднозначную роль и оказывать влияние на другие иммунобиохимические процессы. Так, для одного из важнейших медиаторов острой фазы воспаления цитокина - интерлейкина 6 (IL-6) показано участие в регуляции синтеза фибриногена, уровень которого является одной из важных составляющих развития артериального тромбоза и повышенного риска ИИ. Важная роль в развитии ИИ отводится генетическим факторам, таким как носительство вариантов генов, влияющих на уровень и активность кодируемых белковых продуктов. При рассмотрении проблемы генетических факторов риска ИИ необходимо учитывать,

что у представителей разных этносов могут наблюдаться значительные различия в распределении вариантов многих генов, и данные о влиянии полиморфизма отдельных генов на развитие ИИ, полученные для одной популяции, нельзя автоматически переносить на другие этносы. В связи с этим, поиск генетических маркеров предрасположенности к ИИ у этносов России, в частности, у этнических русских, является актуальной задачей исследования.

Важным аспектом диссертационной работы Б.В. Титова является тот факт, что она направлена не только на выявление генетических факторов предрасположенности к ИИ, но и на анализ связи между ними и общепринятыми биохимическими маркерами, такими как уровень фибриногена и агрегация тромбоцитов, используемыми в клинической практике. Учитывая вышесказанное, можно заключить, что диссертационная работа Б.В. Титова является современной и актуальной.

### СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Диссертационная работа изложена на 160 машинописных страницах, содержит 10 рисунков и 19 таблиц. Работа написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 424 ссылки (43 отечественных и 381 иностранных) на работы, опубликованные в основном за последние 10 лет.

В обзоре литературы Б. В. Титов подробно описывает и анализирует современные представления о механизмах этиопатогенеза ИИ, а также современное состояние генетических исследований в этой области. Завершается раздел обоснованием выбора генов-кандидатов для проведенного автором исследования генетической предрасположенности к ИИ.

Основная цель диссертационной работы состояла в анализе ассоциации с ИИ носительства вариантов генов, влияющих на уровень и активность кодируемых белковых продуктов, участвующих в развитии воспалительной реакции. Все полученные результаты суммированы и обсуждены в главе «Результаты и обсуждение».

В первом разделе этой главы описан анализ ассоциации методом «случай-контроль» аллелей и генотипов 11 полиморфных участков 8 генов-кандидатов с ИИ у русских по этнической принадлежности, проведенный в общих выборках, а также отдельно у мужчин, женщин и лиц разных возрастных групп. Впервые выявлена ассоциация с развитием ИИ носительства аллелей/генотипов полиморфных участков -174G>C гена *IL6*, -509C>T гена *TGFBI* и 87C>T гена *PDE4D*, причем ассоциации аллелей и/или генотипов

каждого из этих участков с ИИ, наблюдавшиеся при сравнении общих групп больных и контролей, сохраняются при разделении на подгруппы по полу или по возрасту, по крайней мере, в одной из подгрупп.

Во втором разделе главы, исходя из известных данных о влиянии уровня ключевого цитокина IL6 на синтез фибриногена, сделан ранее не проводившийся анализ уровней фибриногена и показателей тромбоцитарного гемостаза в плазме крови носителей различных аллелей/генотипов полиморфного участка -174G>C гена *IL6*. Хотя последние различаются по уровню продукции IL6, между ними не выявлено значимых различий в показателях тромбоцитарного гемостаза, а также в концентрациях фибриногена в плазме крови.

В третьем разделе главы с помощью программного обеспечения APSampler проведен оригинальный анализ ассоциации сочетаний аллелей и генотипов исследуемых генов-кандидатов с ИИ, основанный на непараметрической статистике, причем как для общих групп, так и при их стратификации по полу и возрасту. Впервые показано, что аллели или генотипы полиморфных участков генов *IL6*, *PDE4D* и *TGFBI* входят в состав би- и триаллельных ассоциированных с ИИ сочетаний вместе с аллелями других исследованных генов, а именно *IFNG*, *CTLA4*, *IL4* и *TNF*, носительство которых в одиночку не было значимо ассоциировано с ИИ. Ассоциация ИИ с выявленными сочетаниями характеризуется бóльшим уровнем значимости, чем с одиночными аллелями.

В целом работа выполнена на высоком методическом уровне, и ее результаты представляются вполне обоснованными. При прочтении возникают лишь несколько принципиальных вопросов. Первый вопрос связан с понятием «этнический русский». Понятно стремление автора выявить ассоциации у этнических русских, но уверен ли диссертант, что используемые им критерии отбора достаточны для включения в эту группу населения. Второй вопрос связан с распределением аллелей риска по возрастным группам. В чем причина выявления аллеля *PDE4D* 41G>A у лиц младше, но не старше 60 лет? Не может ли она быть связана с уменьшением частоты этого аллеля в связи с высокой смертностью от ИИ? Какой механизм может лежать в основе влияния однонуклеотидного полиморфизма в интронных последовательностях исследованных генов на риск развития ИИ?

#### НОВИЗНА И ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Все результаты, полученные диссертантом, отвечают критерию новизны. Так, Б. В. Титовым впервые проведен анализ генетической предрасположенности к ИИ у этнических русских, направленный на поиск маркеров среди генов-кандидатов, играющих роль в

развитии воспаления при ИИ. В результате проведенной работы показана ассоциация носительства аллелей полиморфных участков 49A>G гена *CTLA4*, 41G>A и 87C>T гена *PDE4D*, -590C>T гена *IL4*, -308A>G гена *TNF*, 252G>A гена *LTA*, -174G>C гена *IL6*, 874A>T гена *IFNG*, -509C>T, 869T>C и 915G>C гена *TGFBI*, белковые продукты которых участвуют в формировании патогенетических событий на различных стадиях ишемического каскада, с развитием ИИ. Знание генетических факторов, определяющих предрасположенность к ИИ, позволяет расширить понимание этиопатогенеза заболевания и как следствие облегчить выбор терапевтических средств.

Наиболее значимый вклад в развитие ИИ вносят гены *IL6*, *PDE4D* и *TGFBI*; аллели или генотипы полиморфных участков этих генов являются индивидуальными факторами риска ИИ и входят в состав ассоциированных с ИИ сочетаний из двух и трех аллелей/генотипов различных генов. Для этих генов ассоциацию с ИИ наблюдали и для мужчин, и для женщин отдельно, что свидетельствует о валидации полученных результатов на независимых выборках. Согласно современным представлениям, это является окончательным подтверждением выявленных ассоциаций и существенно увеличивает значимость полученных результатов.

Сравнение частот носительства аллелей и генотипов полиморфных участков не только в общих группах больных ИИ и индивидов без анамнестических и диагностических указаний на нарушения мозгового кровообращения (контрольная группа), но и в их подгруппах, стратифицированных по гендерному признаку или по возрасту развития ИИ, открывает важную для персонализированной медицины возможность индивидуализации рисков у отдельных категорий больных. Более того, выявление генетических маркеров ИИ, в том числе композитных, может послужить основой для прогностического теста, направленного на определение предрасположенности пациента русской этнической принадлежности к развитию ИИ. Создание такого теста может иметь решающее значение для своевременной научно обоснованной профилактики ИИ.

#### РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ

Результаты диссертационной работы Б. В. Титова можно использовать при проведении исследований генетической предрасположенности к различным сердечно-сосудистым заболеваниям. Обнаруженные индивидуальные маркеры риска, а также аллельные сочетания (композитные маркеры) могут быть основой для создания теста для прогнозирования развития ИИ. Кроме того, их можно использовать при поиске новых терапевтических мишеней для профилактики и лечения ИИ. Полученные в исследовании

результаты можно включить в курсы лекций, посвященных патогенезу ИИ и прогнозированию его развития.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение можно отметить, что все полученные в работе результаты являются новыми и достоверными, а сделанные выводы обоснованы. Основные положения автореферата и опубликованные работы в полной мере отражают содержание диссертации.

Таким образом, можно заключить, что диссертация Б.В. Титова «Полиморфизм генов, белковые продукты которых играют роль в развитии воспаления при ишемическом инсульте» представляет собой научно-квалификационную работу, в которой решена научная задача, имеющая существенное значение для понимания молекулярного механизма действия компонентов системы воспаления – выявлены высокоспецифичные индивидуальные и композитные генетические маркеры, ассоциированные с развитием ИИ, и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук в п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» Высшей Аттестационной Комиссии Министерства образования и науки Российской Федерации, утвержденных Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 года. Автор заслуживает искомой научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - "биохимия".

Отзыв рассмотрен и утвержден на межлабораторном семинаре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук 9 апреля 2014 года.

Руководитель лаборатории  
молекулярной генетики  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения  
науки Институт биохимии им. А.Н.Баха  
Российской академии наук  
(119071, г. Москва,  
Ленинский проспект, дом 33, стр. 2  
e-mail: inbi@inbi.ras.ru)

чл.-корр. РАН, д.б.н.



 М.Д. Тер-Аванесян

«15» апреля 2014 года

