

О Т З Ы В

**официального оппонента доктора биологических наук, профессора
Гуляевой Людмилы Федоровны на диссертационную работу
ШЕВЧЕНКО АЛЛЫ ВЛАДИМИРОВНЫ**

**«Иммуногенетический анализ полиморфизма генов цитокинов,
матричных металлопротеиназ и фактора роста эндотелия сосудов при
ряде мультифакториальных заболеваний», представленную на
соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 14. 03.09 – клиническая иммунология, аллергология**

Актуальность темы. Диссертационная работа Шевченко А.В. посвящена актуальной проблеме современной иммунологии и медицинской генетики – комплексному исследованию генетического полиморфизма при некоторых социально значимых мультифакториальных заболеваниях (МФЗ). Исследование частоты встречаемости аллельных вариантов различных генов, продукты которых вовлечены в патогенез заболеваний человека, представляет на сегодня одну из важнейших проблем современной биологии и медицины. Это связано, прежде всего, с тем, что выявление таких локусов, особенно если речь идет о высоко пенетрантных генах, позволяет своевременно не только выявлять многие болезни человека, но и осуществлять профилактические мероприятия. С другой стороны, выявление ассоциаций того или иного варианта генетического полиморфизма помогает направить ученых на проведение фундаментальных исследований с целью установления патогенетических механизмов развития патологий. В этой связи диссертационная работа Шевченко А.В., направленная на проведение комплексного анализа полиморфизма генов ключевых цитокинов, матричных металлопротеиназ и фактора роста сосудистого эндотелия при мультифакториальных заболеваниях человека, находится в русле современных исследований, поэтому ее актуальность не вызывает сомнения.

Достоверность и новизна основных выводов диссертации.

Многие результаты проведенного исследования были получены впервые. Так, впервые выявлены половые и возрастные различия комплексных генотипов в выборке практически здоровых жителей Западной Сибири. При

проведении сравнительного анализа частот встречаемости аллельных вариантов регуляторных участков генов TNF α (позиции -863, -308, -238), IL1 β (позиция -511, -31), IL4 (позиция -590), IL6 (позиция -174), IL10 (позиции -1082, -592), матричных металлопротеиназ MMP2 (-1562), MMP3(-1171), MMP9(-1309), регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов VEGF(-2578,+936) впервые выявлены общие и частные закономерности частот встречаемости при таких социально-значимых заболеваниях, как ИБС, РМЖ, СД2 типа, РА. Впервые получены данные по взаимосвязи полиморфизма ансамбля генов цитокинов, матричных металлопротеиназ, фактора роста эндотелия сосудов, находящихся в сложных сетевых внутренних взаимодействиях при реализации иммунного ответа при развитии СД2, РА, РМЖ, ИБС. В некоторых случаях эти ассоциации подтверждены в исследованиях генотип:фенотип с измерением концентрации клинически значимых маркеров. Впервые на основе многомерного анализа выявлены индивидуально ассоциированные с заболеванием комплексные генотипы предрасположенности и резистентности к определенным анализируемым МФЗ.

Достоверность полученных автором результатов не вызывает сомнения. Для проведения генотипирования использовались адекватного размера выборки из условно здоровых людей и пациентов. В работе использовались современные иммунологические и молекулярно-генетические методы, позволяющие проводить исследования с высокой степенью точности. Все используемые в эксперименте методы содержали необходимые контроли. При проведении анализа полиморфизма генов проводилась проверка распределения генотипов на равновесие Харди-Вайнберга. Для оценки достоверности результатов автором используются современные статистические методы.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.

Диссертационная работа Шевченко А.В., направленная на комплексное исследование генетического полиморфизма большого разнообразия сигнальных молекул (цитокинов) и матричных металлопротеиназ при социально значимых мультифакториальных заболеваниях, представляет несомненный интерес для фундаментальной науки, так как ее результаты приносят новые знания о роли аллельных вариантов исследуемых генов в развитии мультифакториальных заболеваний человека, таких как: ИБС, атеросклероз, диабет, ревматоидный артрит и рак. Данная работа имеет также ярко выраженное практическое применение, так как полученные автором результаты могут быть использованы для формирования групп риска развития исследуемых патологий.

Таким образом, диссертационная работа имеет ярко выраженную научно-практическую направленность, что является основанием для ее положительной оценки с современных научных позиций.

Общая оценка работы. Диссертация изложена на 441 страницах, она состоит из «Введения», главы 1 «Проблемы иммуногенетики мультифакториальных заболеваний человека. Аналитический обзор», посвященной обзору литературы, главы 2 «Материалы и методы», а также глав 3-8 результатов с обсуждением каждой главы. Работа заканчивается небольшими разделами «Заключение», «Выводы», «Список литературы» и «Приложения». Работа иллюстрирована, главным образом, таблицами. В списке литературы цитируется более 594 работы отечественных и зарубежных авторов.

Обзор литературы диссертации состоит из 8-ми глав:

1. Особенности иммуногенетических взаимодействий при развитии мультифакториальных заболеваний
2. Современные представления о роли цитокинов в иммунном ответе при воспалительных процессах
3. Значение матричных металлопротеиназ в иммунном ответе.
4. Фактор роста эндотелия сосуда.

5. Функциональный полиморфизм генов цитокинов, матричных металлопротеиназ, фактора роста эндотелия сосудов при развитии сердечно-сосудистой патологии
6. Функциональный полиморфизм генов цитокинов, матричных металлопротеиназ, фактора роста эндотелия сосудов у пациентов с сахарным диабетом второго типа
7. Роль медиаторов воспаления в развитии онкопатологии
8. Иммуногенетические механизмы и роль процессов воспаления при развитии ревматоидного артрита.

В этих главах представлены современные данные о роли цитокинов в развитии мультифакторных заболеваний, а также о вкладе генетических факторов в развитие исследуемых патологий.

Для решения поставленных задач Шевченко А. В. применяет современные методы молекулярной биологии, генетики и иммунологии. Полиморфизм исследуемых генов был определен методами ПДРФ-ПЦР и ПЦР с детекцией в реальном времени с использованием красителя SYBR Green I и технологии Tag man. В работе также использован ряд иммунологических методов, таких как: культивирование мононуклеарных клеток периферической крови, проточная цитофлюорометрия, иммуноферментный анализ. В этом разделе также представлено описание групп здоровых и больных людей, что дает представление об анализируемой популяционной выборке. Исследования генетического полиморфизма проведены на представительной выборке: 353 мужчин с диагнозом ишемическая болезнь сердца; 83 мужчины со стенозирующим коронарным атеросклерозом, 316 пациенток с СД 2 типа; 395 пациенток с диагнозом рак молочной железы и 162 женщины, больные ревматоидным артритом. Группу популяционного контроля составили 603 человека европейской внешности, проживающих на территории Сибирского Федерального округа. В целом, этот раздел диссертации изложен профессионально, все методы при желании могут быть легко воспроизведены.

Собственные результаты диссертационной работы изложены в 6-ти главах. Они включают исследование аллельных вариантов ключевых цитокинов, матричных металлопротеиназ и фактора роста сосудистого эндотелия у пациентов с мультифакториальными заболеваниями.

Оригинальность диссертационной работы Шевченко А.В. заключается в:

1. Проведении генетического полиморфизма и выявления его особенностей для цитокинов *TNF α* -863 (rs1800630), *TNF α* -308 (rs1800629), *TNF α* -238 (rs 361525), *IL1 β* -511 (rs16944), *IL1 β* ,-31 (rs1143627), *IL 4* -590 (rs2243250), *IL6* -174 (rs 1800795), *IL10*-1082 (rs1800896) , *IL10* ,-592 (rs 1800872); матричных металлопротеиназ *MMP2*-1306 (rs243865) , *MMP3*-1171 (rs3025058), *MMP9*-1569 (rs3918242); гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF*-2578 (rs699947), и *VEGF* +936 (rs3025039) у жителей Западной Сибири.
2. Выявлении комплексных генотипов, определяющих структуру генных сетей, белковые продукты которых принимают участие в процессах воспаления, деструкции, ангиогенеза. Такие генотипы ассоциированы с определенной структурой популяции и гендерными особенностями. При этом аллельные варианты генов цитокинов, матричных металлопротеиназ, *VEGF* могут опосредовано влиять на другие медиаторы воспаления.
3. Установлении взаимосвязи аллельных вариантов генов *TNF α* -863 C \rightarrow A, *TNF α* -308 G \rightarrow A, *TNF α* -238 G \rightarrow A, *IL1 β* -511 T \rightarrow C, *IL1 β* -31 C \rightarrow T, *IL1 β* -511 T \rightarrow C, *IL-4* -590 C \rightarrow T, *IL-6* -174 G \rightarrow C, *IL-10* -1082 G \rightarrow A и *IL-10* -592 A \rightarrow C; матричных металлопротеиназ *MMP2* -1306 C \rightarrow T, *MMP9* -1562 C \rightarrow T; гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF* -2578 A \rightarrow C и *VEGF* +936 C \rightarrow T с риском развития ИБС и ее осложнений, СД2, РА, РМЖ, с отдельными факторами риска, характером и особенностями течения болезни, вкладом наследственной отягощенности, сопутствующими патологиями.

4. Проведении детального анализа генных взаимодействий исследуемых генотипов и мультифакторных заболеваний.
5. Проведении анализа генотип:фенопит с установлением функциональности исследуемых полиморфизмов генов, таких как: FNO_A, IL-1B, IL-1RA, IL6, IL-8, СРБ, CD40, MMP-3, MMP-9 и их роли в развитии патологий.

Считаю, что полученные автором результаты вносят существенный вклад в исследование роли генетического полиморфизма цитокинов и матричных металлопротеиназ в развитие мультифакториальных заболеваний человека, таких как: ИБС, атеросклероз, диабет, ревматоидный артрит и рак молочной железы.

Диссертация написана строгим научным языком, содержит незначительное количество грамматических ошибок и неточностей. Полученные автором результаты работы корректно обсуждены и проанализированы с позиций современной литературы. Основные выводы диссертации изложены в 41 печатных работах, опубликованных в отечественной научной печати. Все сказанное позволяет мне высоко оценить диссертационную работу Шевченко А.В. Вместе с тем, при прочтении работы у меня возникли некоторые вопросы:


1. Чем объясняется гендорная разница при исследовании разных заболеваний? Например, при исследовании артрита взяты женщины, тогда как группу с атеросклерозом представляют мужчины.
2. При исследовании частот генотипов у больных раком молочной железы автор выделяет группу больных с наследственной отягощенностью онкозаболеваниями, в том числе раком молочной железы (табл. 6.12 и табл. 6.13). Достаточно ли одного семейного анамнеза для объективной оценки наследственного фактора, когда для пациентов с этим диагнозом доказана роль гена *BRCA*?

Данные вопросы в большей мере носят дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки работы.

Заключение. Диссертационная работа Шевченко А.В. на тему: «Иммуногенетический анализ полиморфизма генов цитокинов, матричных металлопротеиназ и фактора роста эндотелия сосудов при ряде мультифакториальных заболеваний», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является законченной научной работой, в которой устанавливается роль генетического полиморфизма при мультифакториальных заболеваниях, что имеет существенное значение для современной иммунологии и медицины. Работа соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к докторским диссертациям согласно п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., ее автору Шевченко Алле Владимировне следует присудить ученую степень доктора биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

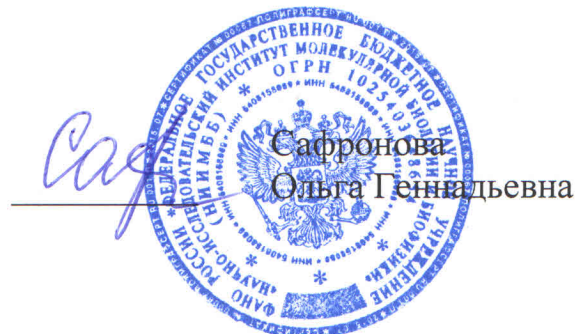
Официальный оппонент
доктор биологических наук,
профессор, руководитель
лаборатории молекулярных
механизмов канцерогенеза
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский
институт молекулярной биологии и
биофизики»
630117, Россия, г. Новосибирск,
ул. Тимакова, 2/12
Тел. 8(383) 335-98-47
imbb@niimbb.ru
http://niimbb.ru

Подпись профессора Гуляевой Л.Ф.
заверяю:
Ученый секретарь, к.б.н.

 Гуляева Людмила
Федоровна

Диссертация на соискание ученой
степени доктора биологических наук
защищена по специальности

_____ « _____ »



14 сентября 2015 г.