

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про дисертацію КУЧЕРЕНКО Анастасії Михайлівни «Алельний поліморфізм генів цитокінів (*IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4*) у пацієнтів з моногенною та масовою патологією» на здобуття наукового ступеню кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 — молекулярна генетика

Актуальність теми дисертації. Коли ми стверджуємо, що самий факт захворювання людини, а також картина перебігу патології залежить від генотипу людини, в цьому давно немає нічого нового і навряд чи хтось з біологів буде цьому заперечувати. Проте ця думка залишалася просто гаслом доти, поки спільними зусиллями молекулярних біологів, молекулярних генетиків та генних інженерів не було з'ясовано ключову роль окремих сигнальних пептидів та інших невеликих молекул у фізіологічних процесах, що протікають в організмі в нормі та за умов патологій. Не було встановлено нуклеотидну послідовність генів, що беруть участь в їхньому біогенезі, не було встановлено факт наявності однонуклеотидних замін, властивих геному людини. Але було висловлено припущення, доведене експериментально, що сам факт розвитку захворювання, або важкість його перебігу залежить від гаплотипу організму, тобто від сукупності певних алелів тих генів, продукти експресії яких тим чи іншим чином беруть участь у перебігу патогенезу. Тут знову можна згадати давно відоме висловлення: лікар має лікувати не хворобу, а хворого. От якраз молекулярні генетики працюють над тим, щоб забезпечити матеріальну базу для реалізації цього висловлення на практиці. Потрібно не лише знайти гени-кандидати, які потенційно можуть брати участь у реакції організму на патогенез, а і вивчити їхню поліморфність, визначити генетичну структуру окремих популяцій за різними алелями і перейти до пошуку таких алелів (поліморфізмів), наявність яких в організмі людини є фактором ризику розвитку певних хвороб. До праці залучаються лікарі, тому що саме вони ставлять діагноз та дають у руки дослідника популяції, які потрібно вивчати. В цьому аспекті робота Анастасії Михайлівни Кучеренко займає своє важливе місце в низці сучасних досліджень, спрямованих на те, щоб поставити справу корекції патологічних станів людини, в термінах профілактики та лікування, на

основу інформації про алельний склад пацієнта за генами, які визнані критичними для розвитку певних станів. Це – майбутнє медицини, яким вона певним чином буде зобов'язана молекулярно-генетичним популяційним дослідженням типу роботи Кучеренко.

Дослідження було виконано з метою встановлення можливої участі генів *IL6*, *IL8*, *IL0*, *IFNL4*, пов'язаних з реакцією на запальні процеси, у розвитку деяких патологій людини, через порівняння генетичної структури загальної популяції, субпопуляцій групи хворих та контрольних груп за поліморфізмами у некодуючих ділянках вказаних генів.

Дослідження виконувалось в рамках бюджетної теми «Молекулярно-генетичні дослідження чинників, що призводять до репродуктивних втрат та інвалідності (шифр теми 2.2.4.13, № держреєстрації 0105U005341, 2011-2015 рр.), а також проектів, отриманих на конкурсних засадах «Молекулярні основи функціонування геному та його регуляція (шифр теми 2.2.4.20, № держреєстрації 0104U000436, 2012-2016) та «Фармакогенетичне дослідження ДНК-маркерів для прогнозу перебігу та побічних ефектів лікування хронічного вірусного генотипу С» (Грант Президента України для обдарованої молоді, договір 72/43, 2014 р.).

Текст дисертації викладено на 111 сторінках, включаючи 18 таблиць та 24 рисунки, дві сторінки додатків. Список цитованих робіт налічує 210 джерело. З них одна україномовна робота, одна російськомовна, решта англійськомовні. 53 робота, тобто більше однієї четвертої частини, оприлюднено протягом останніх 5 років.

Новизна дослідження та одержаних результатів. Оцінено вибіркові параметри генетичної структури популяції України за такими алелями генів *IL6*, *IL8*, *IL0*, *IFNL4*, що за місцем внутрішньохромосомної локалізації однонуклеотидних поліморфізмів (результати біоінформативного аналізу) потенціально є функціонально значущими. Функціональну значущість алелів – 174 гена *IL6*, –781 гена *IL8* та –592 та –1082 гена *IL10* для протікання запальних процесів показано через доведення наявності статистичної різниці у генетичній

структурі субпопуляції хворих та контрольної субпопуляції. Гаплотип *-174G IL6 -397C ESR* є маркером позитивного прогнозу щодо виношування вагітності на ранніх її термінах. Динуклеотидний поліморфізм ss469415590 гена *IFNL4* асоційований позитивно з успіхом лікування хворих на гепатит С.

Практичне значення результатів дослідження. Однонуклеотидні поліморфізми у сайтах *-174* гена *IL6*, *-781* гена *IL8*, *-592* та *-1082* гена *IL10* можна використовувати у якості молекулярно-генетичних маркерів схильності до певних особливостей перебігу запальних процесів у організмі, що вивчено на прикладі ішемічного інсульту, спонтанного переривання вагітності, запального процесу рогівки, для профілактики та адекватної терапії відповідних захворювань. Зокрема, дослідником отримано акти впровадження на генотипування хворих на ішемічні розлади за генами *IL8 IL10* та на генотипування пацієнтів за геном *IFLN4* для підвищення ефективності терапії хронічного вірусного гепатиту С. Результати дослідження можна використовувати у педагогічному процесі, тому що вони цілком пасують для створення на їхній основі кількох задач для курсу «Популяційна генетика» і можуть згадуватися при викладанні курсу «Генетика людини» у популяційно-генетичному та фармакогенетичному аспектах.

Теоретичне значення результатів дослідження. У роботі показано, що алелі досліджуваних генів, знайдені через біоінформативний пошук як потенційно функціонально значущі, за даними порівняння генотипної структури популяцій хворих та контролю, є дійсно функціонально значущими. Це означає, що результати роботи можна вважати внеском у накопичення інформації про ідентифікацію та внутрішньогенну локалізацію регуляторних послідовностей гена, в тому числі на рівні однонуклеотидних замін, які впливають на його експресію. Крім того, отримані результати щодо участі досліджуваних генів у перебігу запальних процесів в організмі людини свідчать про їхнє входження у певні генні сітки, а розробка (development) генних сіток є зараз найактуальнішим питанням молекулярної генетики, молекулярної біології, біоінформатики та біології систем.

Дисертація починається вступом, сформованим у відповідності до норм ДАК МОН України. Перший розділ, огляд літератури, складається з чотирьох підрозділів. Два присвячені опису ролі цитокінів у нормальній фізіології та патофізіології і тут наводиться докладна характеристика структури генів цитокінів та асортимент відомих на сьогодні їхніх поліморфізмів. Третій підрозділ присвячений інтерферону лямбда як важливому компоненту противірусного імунітету, четвертий – підсумок огляду. Розділ написаний коротко, чітко, зрозуміло та ґрунтується на сучасній літературі.

Розділ «Матеріали та методи дослідження» включає обов'язкові підрозділи «Обґрунтування вибору напрямку досліджень», «Матеріали дослідження», «Методи дослідження». Останній підрозділ фактично включає всю інформацію про організацію дослідження, в тому числі формування вибірок, що формально мало б бути відбито у підрозділі 2.2. В цілому, розділ написано з оптимальним рівнем деталізації.

У розділі 3 викладено результати досліджень. У підрозділі 3.1 описано вибір функціонально значущих поліморфізмів досліджуваних генів, зроблено це аргументовано та переконливо. У підрозділі 3.2 – аналіз мононуклеотидних замін у генах цитокінів у вибірці з загальної популяції України. Добрий матеріал отримано та проаналізовано, ще він буде застосовуватися у майбутніх дослідженнях. Наступні три підрозділи присвячено вивченню асоціації певних алелів генів цитокінів з запальними станами організму людини, які розвиваються при ішемичному інсульті, запаленню рогівки та зі звичним невиношуванням вагітності. Обсяги вибірок значні, аналіз ретельний, виконаний у стандартному руслі популяційно-генетичних досліджень, висновки, на наш погляд, адекватні. Підрозділи 3.6 та 3.7 присвячені гену *IFNL4* і справляє враження відмінно зробленої роботи. Читати цю частину дисертації, до речі це відноситься і до обговорення результатів, і приємно і особливо цікаво. Може, через те, що матеріал більш багатоплановий, і було з чим порівнювати, що аналізувати, як і простежувати зв'язки. Розділ 4 – це обговорення. На наш погляд, як для молекулярно-генетичної роботи занадто

багато клінічних деталей перебігу станів. Таке уявлення, що потрібно було чимось заповнити розділ за відсутністю генетичних даних у літературі для аналізу. Але це не стосується останнього зі згаданих генів. Ще раз підкреслюю, що читати аналітичну частину про ген *IFNL4* – це отримати задоволення та чітко, предметно бачити, наскільки важливий матеріал для розуміння молекулярно-генетичних підстав фізіологічних процесів дають роботи, подібні до тієї, що виконано Анастасією Михайлівною.

У цілому робота справляє дуже позитивно враження і не викликає концептуальних або методичних заперечень. Особисто хочемо звернути увагу на великих обсягах вибірок, що аналізувались. Тепер, коли ми аналізуємо ДНК, це все дорого коштує, і вибірки для роботи беруться все меншими. Робота Кучеренко в цьому плані є позитивним прикладом того, як великий обсяг експериментальної роботи дає результати, в достовірності яких сумнівів не виникає.

При читанні дисертації виникла низка питань, що потребують пояснення.

Не зовсім зрозумілою є назва дисертації. Що таке моногенна патологія, рецензент розуміє, а що таке масова патологія — ні, може це не біологічний термін? Цікаво, що це словосполучення, «масова патологія» більше у дисертації не зустрічається.

Чим за суттю відрізняються пункти другого розділу 2.3.5, 2.3.7 та 2.3.8? У всіх йдеться про метод ПЛР-ПДРФ, яка між ними різниця?

Чому для субпопуляції хворих на запалення рогівки не створено контрольну групу?

В огляді літератури, де описуються гени цитокінів, не зрозуміло, до чого відносяться терміни апстрім та даунстрім. Якщо точкою відліку є сам ген, то чому у підписах до діаграм написано: «Розподіл поліморфізмів по структурних частинах гена», а до складу діаграми входять регіони апстрім та даунстрім? Не зрозуміло номенклатуру назв поліморфізмів. Знак «—» отримують нуклеотиди, які розташовані проти течії (апстрім) від точки початку транскрипції гена. Чому

тоді цей знак має поліморфізм $-781C/T$ гена *IL8*, що знаходиться в інтроні? Якись особливості будови гени? Чи змінилася номенклатура назви нуклеотидів?

Термін «носій» у генетиці використовується в двох різних значеннях: у генетиці людини, перш за все клінічній, — для позначення гетерозиготи, рецесивний алель якої у гомозиготному стані спричинює відхилення від норми, наприклад, гомофілію. У популяційній генетиці цей термін позначає організм, який несе конкретний алель певного гена, один (гетерозигота) чи два (гомозигота). У дисертації немає пояснення, яким сенсом наповнюється цей термін. Протягом читання дисертації в рецензента так і не сформувалось уявлення, що саме вкладається в цей термін.

Чому частоти генів (алелів), які є вибірковими оцінками популяційних параметрів, не супроводжуються показниками варіювання при їхньому наведенні у таблицях? Тобто або варіансу потрібно було навести, що більш розповсюджено у популяційно-генетичних роботах, або похибку. Рецензент завчасно не погоджується з аргументом «так прийнято у статтях». Зрозуміло, що формування науковця дуже залежить від того, що він читає. Судячи зі списку літератури і предмету дослідження, пані Анастасії довелося прочитати чимало медичних та медико-генетичних статей. Може для медичних наук і не прийнятий той рівень статистичної коректності, який вимагають у біологічних дослідженнях. Цього рецензент не знає, проте робота захищається з біологічних наук, тому дані мають бути представлені та оброблені належним чином. До речі, у біологічних дослідженнях рівнем значущості, прийнятим для спростовування нульової гіпотези, є 0,01, а не 0,05. 0,05 – це для сільськогосподарських наук. Для біологічних такий рівень приймається як виняток і має бути пояснено, чим обґрунтовується зміна рівня значущості проти стандартного. Щоб не бути голослівною щодо необхідності володіти статистичними навичками та застосовувати їх як слід, наведу лише один приклад з роботи. Мова йде про визначення мажорних алелів генів цитокінів у популяції України. Мажорний – той, який переважає. Висновок, що частота одного алеля переважає над частотою іншого спирається на статистичну

процедуру, порівняння частот алелів. Якщо б пані Анастасія розрахувала варіансу частот (при кодомінуванні це буде одна і та сама варіанса для обох частот) для кожної вибірки та порівняла частоти, вона б побачила, що частоти альтернативних алелів 781СТ гена *IL8* та алелів 1082GA гена *IL10* один від одного не відрізняються, тобто жоден з них не може бути визнаний мажорним. Це лише один приклад, їх можна множити. Зауваження полягає в тому, що не слід нехтувати статистичною обробкою даних і не можна свої компетенції в цьому плані обмежувати вмінням користуватися відповідними програмними пакетами, іноді це підводить.

Друге зауваження стосується використання генетичних термінів. Іноді здається, що автор роботи не зовсім правильно їх розуміє. Наприклад, нерівновага за зчепленням має синонім асоціація генів. Гени (чи їхні структурні частини, як у дослідженні) можуть бути асоційовані у фазі coupling – це притягнення, а не зчеплення (linkage), або repulsion – відштовхування. Так ці фази позначаються у генетиці з самого початку введення цих термінів, а якщо у сучасних статтях відбувається підміна термінів, слід ставитися до цього критично та не повторювати помилки. Анастасія Михайлівна, здається, плутає терміни пенетрантність та експресивність. Пенетрантність не залежить від дози гена, як про це згадується у обговоренні, розділ 4. Це експресивність залежить і може мати адитивний прояв. Крім того, біологічний термін не обов'язково має писатися як транслітерація англійського слова. Чому про предковий алель потрібно писати анцестральний? Таких прикладів у тексті багато.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дослідження виконано з застосуванням сучасних молекулярно-генетичних, популяційно-генетичних, біоінформатичних методів. Обсяг виконаних досліджень, по-перше, великий, по-друге, запланований адекватно меті дослідження у відповідності до його завдань. На цьому ґрунтується достовірність сформульованих висновків та рекомендацій щодо маркерної значущості певних алелів. Логіка дослідження

обґрунтована, починаючи з мети біоінформатичного пошуку та прагнення працювати з алелями, частоти яких у популяції наближаються до середніх. Завдання дослідження виконані, мету досягнуто. Висновки повністю обґрунтовані результатами експериментальної частини, сформульовані коректно. Дисертацію оформлено згідно вимогам ДАК МОН України до оформлення кандидатських дисертацій.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Результати дослідження, що містяться у дисертаційній роботі, повністю представлені у 10 статтях рецензованих фахових видань та 11 тезах доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних форумів спеціалістів. Зміст автореферату відбиває основний зміст дисертації.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук. Дисертацію написано за результатами завершеного експериментального дослідження, націленого на вирішення конкретної наукової проблеми: знайти функціонально значущі поліморфізми (алелі) генів-кандидатів, продукти яких задіяні у перебігові процесів запалення на прикладі чотирьох захворювань чи станів людини. Робота відповідає паспорту спеціальності 03.00.22 — молекулярна генетика та оцінюється позитивно за всіма пунктами вимог ДАК МОН України до дисертацій, висунутих на здобуття наукового ступеню кандидата біологічних наук, а її автор, Кучеренко Анастасія Михайлівна, заслуговує на присудження їй наукового ступеню кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.22 — молекулярна генетика.

Зав. кафедри біології факультету
природничих наук Національного університету
"Києво-Могилянська академія"
доктор біол. наук професор
15 жовтня 2015 р.

Т.К. Терновська Т.К. Терновська



Ваш підпис *Терновської Т.К.*
ЗАСВІДОЧУЮ
Підпис