

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Чернобривцева Олександра Петровича
«Роль генетичного поліморфізму у розвитку ендотеліальної дисфункції при
цукровому діабеті 2-го типу», подану до офіційного захисту в спеціалізовану
вчену раду Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця
НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за
спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія

Актуальність теми дисертації. Цукровий діабет 2-го типу у зв'язку з широкою поширеністю і швидким прогресуванням ускладнень небезпідставно розглядають як пандемію XXI століття. Поширені тяжкі ускладнення діабету, які є причиною інвалідизації і загибелі хворих, пов'язані з мікро- та макроангіопатіями. На судини при діабеті впливає комплекс патогенних чинників, в тому числі порушення енергетичного метаболізму, патологічна посттрансляційна модифікація білків, гіпоксія, окисний стрес, прозапальні та цитотоксичні метаболіти, порушення нейроендокринної регуляції тощо. Діабетичні порушення потенціюють ендотеліальну дисфункцію, яка, в свою чергу, перешкоджає компенсації метаболічних розладів, утворюючи *circulus viciosus* патологічного процесу. Ці особливості патогенезу сприяють швидкому розвитку тяжких ускладнень при декомпенсованому діабеті. Однак індивідуальні особливості перебігу діабету 2 типу, в тому числі, схильність до розвитку тих чи інших судинних порушень, порушення компенсаторних процесів, резистентність до терапевтичних втручань, які визначають прогноз захворювання, потребують детального патогенетичного обґрунтування.

За останні 20 років накопичені важливі відомості про роль генетичних чинників в розвитку діабету і його ускладнень. Особливе значення має встановлення ролі генетичних поліморфізмів в патогенезі діабету, в тому числі, у формуванні його судинних ускладнень на підставі ендотеліальної дисфункції.

Численними дослідженнями встановлено ряд генів-кандидатів та їх асоціативний зв'язок з мікро- та макросудинними проявами діабету. У той же час більшість досліджень мають популяційні обмеження, є неспівставними за критеріями системної оцінки різних за інтенсивністю або спрямованістю впливів на метаболізм комбінацій декількох поліморфних генотипів, що формує фенотип та реактивність індивідів.

Таким чином, незважаючи на велику кількість досліджень, присвячених дисфункції ендотелію при діабетичних ускладненнях, генетичні механізми її розвитку висвітлено недостатньо. Необхідною є комплексна оцінка регуляторної ролі молекулярно-генетичних факторів на чинники ендотеліальної дисфункції за напрямом їх впливу на тяжкість перебігу діабету, в тому числі в популяції України. Потребує дослідження наявності генетичних відмінностей, які впливають на термін клінічної маніфестації та ступінь вираженості ускладнень діабету. З огляду на це, актуальність теми дисертаційної роботи О.П. Чернобривцева не викликає сумніву.

Наукова новизна, теоретичне та практичне значення отриманих результатів дослідження

Наукова новизна одержаних результатів полягає, по-перше, у встановленні зв'язку наявності мікро- і макросудинних ускладнень з молекулярними чинниками дисфункції ендотелію, порушеннями метаболічних показників у хворих з діабетом 2 типу на підставі комплексних досліджень.

По-друге, вперше охарактеризовано розподіл поліморфних алелей генів, пов'язаних з ендотеліальною дисфункцією, в українській популяції хворих на цукровий діабет 2 типу. Показано, що наявність в генотипі пацієнтів ризикових алелів генів ендотеліальної синтази оксиду азоту, фактору некрозу пухлин і рецепторів ендотеліну типу А і В збільшувало шанси розвитку діабету, сприяло його декомпенсації та прогресуванню. Завдяки математичному аналізу встановлено поєднання ризикових алелів, які патологічно впливали на вміст у

крові чинників ендотеліальної дисфункції та визначали характер і тяжкість діабетичних ускладнень у хворих.

Теоретичне значення результатів дослідження полягає у суттєвому доповненні патогенезу цукрового діабету та його ускладнень, пов'язаному з наявністю генетичної схильності. Доведено, що переважання алелів ризику досліджених поліморфізмів в генотипі пацієнтів здатне призводити до дизрегуляції ендотеліальної функції, що значною мірою визначає перебіг захворювання, характер діабетичних ускладнень і швидкість їх прогресування. Результати роботи впроваджено в науково-дослідну роботу Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України; в науковий та навчальний процеси кафедр патологічної фізіології 8-ми вищих навчальних закладів України медичного профілю та кафедри патологічної і топографічної анатомії Національної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України.

Практичне значення роботи полягає в розробці нових підходів до діагностики цукрового діабету 2 типу і його судинних ускладнень. Автором запропоновано оригінальний індекс тяжкості хвороби та розраховано його межові значення, що свідчать про швидкість прогресування діабету у пацієнтів. На підставі математичного аналізу побудовано багатофакторні математичні моделі для індивідуального прогнозу розвитку судинних ускладнень діабету в залежності від генетичних поліморфізмів і вмісту в крові пацієнтів чинників ендотеліальної дисфункції. Розраховано критичні рівні останніх, що характеризують наявність певних діабетичних ускладнень. Одержані результати придатні для клінічного використання.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, викладених у дисертації

Дисертаційна робота О.П. Чернобривцева виконана на сучасному доказовому науково-методичному рівні. Для вирішення наукових завдань здобувачем використано комплекс сучасних методів клініко-лабораторних

досліджень, комп'ютерної обробки результатів та кількісного багатофакторного аналізу. Дизайн роботи відповідає критеріям адекватності щодо формування дослідницьких груп і презентації даних. Усі наукові положення і висновки роботи є науково обґрунтованими, статистично достовірними, логічно і послідовно витікають із фактичних результатів, отриманих автором. Аналіз та узагальнення результатів проведений ретельно, з посиланням на дані, отримані з опрацьованих автором джерел наукової літератури. Дослідження проведено з дотриманням вимог морально-етичних правил ІСН/ГСР Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації (1964 р.), а також положенням чинних законодавчих актів України.

Таким чином, ступінь обґрунтованості положень і висновків, сформульованих в дисертації, відповідає необхідним вимогам.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри патофізіології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України «Роль генетичних поліморфізмів у патогенезі метаболічних порушень при цукровому діабеті 2 типу», № держреєстрації 0115U005799 та прикладної науково-дослідної роботи МОЗ України «Вивчити значення генетичних чинників та зовнішніх впливів у розвитку і прогресуванні мікроциркуляторних ускладнень при цукровому діабеті 2 типу», № держреєстрації 0118U001214. Дисертант є співвиконавцем цих тем.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті

За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових робіт, серед яких 12 статей у журналах, рекомендованих МОН України і 7 – в матеріалах наукових форумів. Сукупність усіх публікацій у повній мірі відображає викладені в дисертації результати дослідження. Зміст анотації є ідентичним основним положенням дисертації. Автореферат дисертації за змістом та формою повністю

відображує основний зміст дисертації. Таким чином обсяг надрукованих робіт та їх кількість повністю відповідають вимогам ДАК МОН України щодо публікацій основного змісту дисертації на здобуття ступеня кандидата медичних наук.

Структура й обсяг дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 164 сторінках тексту, що включає в себе вступ, основну частину з 7-ми розділів (у тому числі огляду літератури, опису матеріалів і методів, 4-х розділів опису результатів власних досліджень, узагальнення й аналізу отриманих результатів), висновки, практичні рекомендації, та супроводжується переліком літературних джерел, що містить 254 найменування (50 кирилицею і 204 латиницею) та додатками А і Б. Роботу ілюстровано 67 таблицями та 36 рисунками.

Загальна характеристика роботи

У *вступі* до дисертації автором обґрунтовано актуальність обраної теми, наведена загальна характеристика проблеми з'ясування ролі молекулярно-генетичних факторів в розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2 типу, сформульовано мету й завдання дослідження. Визначено об'єкт, предмет і методи роботи, охарактеризовано наукову новизну і практичне значення отриманих результатів. Охарактеризовано особистий внесок здобувача, його публікації й апробацію результатів дисертації, що відповідають вимогам до дисертаційних робіт.

У *першому розділі* роботи **Патогенез ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу. Роль генетичних факторів (огляд літератури)**, який викладено на 15 сторінках, проведено аналіз основних літературних даних про сучасний стан проблеми цукрового діабету 2-го типу, його поширеність, і структуру основних діабетичних ускладнень. Детально охарактеризовано особливості патогенезу ендотеліальної дисфункції при діабеті, її чинники та роль у виникненні діабетичних ускладнень. Проведений аналіз даних про асоціацію генетичних поліморфізмів з клінічними проявами ендотеліальної дисфункції дозволив автору виявити невирішені питання, недоліки існуючих підходів до їх

вирішення і на цій підставі визначити характер, мету і основні завдання дослідження. Матеріал цього розділу свідчить про значний об'єм проведеної автором роботи з літературними джерелами, вміння працювати з сучасними інформаційними системами. Джерела цитуються доречно і обґрунтовано, літературні посилання оформлені згідно до існуючих вимог.

Другий розділ **Матеріали і методи дослідження** присвячений опису об'єктів дослідження, матеріалів і методів, які застосовано автором для вирішення завдань дослідження та досягнення мети роботи. Розділ складається з 4 підрозділів, в яких представлено детальну інформацію щодо контингенту хворих, які прийняли участь у дослідженні, описано клініко-лабораторні методи встановлення діагнозу цукрового діабету 2 типу, наявності і ступеня його ускладнень. Описано методи біохімічних, імуноферментних і молекулярно-генетичних досліджень, застосованих для діагностики діабету та його ускладнень, визначення чинників ендотеліальної дисфункції, алельного поліморфізму генів. Математичну обробку отриманих результатів проведено з використанням адекватних сучасних методів варіаційної статистики і багатофакторного регресійного аналізу за допомогою пакету програм Statistica 10 (StatSoft).

Третій розділ **Аналіз клініко-лабораторних показників по групах хворих** представлений результатами власних досліджень, які містять характеристику клініко-лабораторних показників, частоти та ступеню ускладнень у хворих на цукровий діабет 2-го типу за групами. Проведено аналіз структури судинних ускладнень діабету в залежності від його тяжкості. На підставі отриманих результатів запропоновано індекс тяжкості хвороби (ІТХ), величина якого відображає тяжкість перебігу захворювання.

Четвертий розділ власних досліджень **Характеристика чинників ендотеліальної дисфункції** поєднує результати, що характеризують зв'язок рівня таких факторів, як ендотелін 1, метаболіти оксиду азоту, ендотеліальна

синтаза оксиду азоту, фактор некрозу пухлин альфа, прояви окисного стресу з тяжкістю перебігу цукрового діабету 2-го типу. За допомогою регресійного аналізу встановлено зв'язок цих показників з розвитком певних судинних ускладнень діабету, визначено їх критичний вміст у крові, притаманний наявності цих ускладнень. Важливою є прогностична здатність розроблених моделей, максимальною з яких є 90,8% щодо впливу чинників ендотеліальної дисфункції на розвиток нефропатії (за альбумінурією).

В п'ятому розділі Вплив генетичних поліморфізмів на розвиток цукрового діабету 2-го типу та його ускладнень послідовно доведено асоціативний зв'язок поліморфізмів *rs1799983* гена *ендотеліальної синтази оксиду азоту*, *rs1800629* гена *фактору некрозу пухлин*, *rs6842241* гена *рецептору до ендотеліну типу А* та *rs5351* гена *рецептору до ендотеліну типу В* з розвитком цукрового діабету 2 типу. Аналіз власних даних дозволив автору встановити ризикові алелі для означених поліморфізмів і ступінь їх впливу на стан ендотеліальної дисфункції при розвитку ретинопатії, полінейропатії, нефропатії, артеріальної гіпертензії та макросудинних уражень стопи у пацієнтів, хворих на цукровий діабет.

В шостому розділі Прогнозування розвитку ускладнень цукрового діабету 2-го типу та його тяжкості з урахуванням генетичного поліморфізму та чинників ендотеліальної дисфункції представлено математичні моделі для прогнозування розвитку окремих діабетичних ускладнень і математична модель для прогнозування тяжкості перебігу цукрового діабету. Моделі побудовано на підставі багатofакторного регресійного аналізу. В якості предикторів для кожної з моделей використано найбільш впливові чинники ендотеліальної дисфункції і генотипи. Приведено дані щодо обчислювальних можливостей запропонованих моделей і межові значення для ймовірностей прогнозованих показників.

Наприкінці кожного розділу автором наведено коротке узагальнення аналізу отриманих результатів. Всі розділи ілюстровано таблицями і діаграмами,

які побудовано на підставі одержаних даних. Представлено також посилання на публікації автора, які включають основні результати відповідних розділів дисертації.

Сьомий розділ Аналіз і узагальнення результатів дослідження дозволив автору на підставі наукового аналізу об'єднати фактичний матеріал з попередніх розділів роботи, зробити логічні висновки і довести попередньо висловлене припущення, що судинні ускладнення за клінічним видом і ступенем тяжкості залежать від індивідуальної комбінації алелів ризику, які наявні у пацієнта, а також продемонструвати новизну одержаних результатів на підставі порівняльного аналізу з даними літератури. Узагальнені результати представлені у загальній схемі, яка висвітлює роль генетичних поліморфізмів в патогенезі ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.

Висновки послідовно узагальнюють проведене дослідження і складаються з 7 пунктів, цілковито відповідають меті і завданням роботи і логічно підсумовують аналіз одержаних результатів.

Автором сформульовано також *практичні рекомендації*, які містять важливі для клінічного застосування положення.

Зауваження:

1. Невдало сформульовані предмет дослідження, практичні рекомендації.
2. Автор описує застосування турнікетної (манжеткової) проби з метою оцінки ендотеліальної дисфункції, тоді як її рекомендоване призначення дещо інше.
3. У п. 4.2 автор інтерпретує зв'язок факторів ендотеліальної дисфункції з проявами діабету як «вплив» перших на останні, тоді як причинно-наслідкові зв'язки цих параметрів можуть бути іншими.
4. У тексті зустрічаються численні помилки, некоректне вживання термінів. У роботі є повтори числових даних у таблицях, діаграмах і тексті.
5. Текст дисертації містить багато таблиць з проміжними математичними

розрахунками, які можна було випустити або винести у додатки.

Наведені зауваження є здебільшого технічними і не зменшують наукової цінності роботи.

Запитання для обговорення:

1. Чому при розробці ІТХ використано вік хворих, але не враховано тривалість захворювання (з огляду на односпрямовану значущість цих показників у 2 і 3 групах)?
2. Чи розраховували коефіцієнти атерогенності? Яку роль у патогенезі захворювання могло відігравати зниження у хворих 1 і 2 груп холестерину ЛПНЩ?
3. Розроблена математична модель прогнозу тяжкості перебігу цукрового діабету 2 типу за ІТХ у якості найбільш впливового чинника виділила ендотелін-1. Чим можна пояснити факт широкого зв'язку цього чинника з мікро-, але не макроангіопатіями?
4. У дослідженнях автора всі вивчені генетичні поліморфізми мали зв'язок з розвитком цукрового діабету 2 типу та його ускладнень, тоді як за даними літератури такі результати отримуються не завжди. Чим можна пояснити такі розбіжності?
5. Яку патогенетичну роль у розвитку діабету та ендотеліальної дисфункції мають порушення енергетичного метаболізму, а також виявлені прояви лептинорезистентності у хворих?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота Чернобривцева Олександра Петровича на тему «Роль генетичного поліморфізму у розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу», яка представлена на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук, є завершеною науковою працею, у якій автор із використанням сучасних методів дослідження отримав нові результати щодо ролі генетичних

поліморфізмів у розвитку цукрового діабету 2 типу, ендотеліальної дисфункції та пов’язаних з нею діабетичних ускладнень, що має важливе значення для сучасної патофізіології, ендокринології, нефрології, офтальмології, геронтології. За актуальністю теми, науковим і практичним значенням одержаних результатів, глибиною і обсягом досліджень, змістом та оформленням дисертація повністю відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами та доповненнями, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015, № 1159 від 30.12.2015 і №567 від 27.07.2016), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

Офіційний опонент:

Заступник директора з наукової роботи
Міжнародного центру астрономічних та
медико-екологічних досліджень НАН України,
доктор медичних наук,
старший науковий співробітник

А.Г. Портниченко

