ВІДГУК

офіційного опонента - завідувача кафедри офтальмології
Харківського національного медичного університету МОЗ України,
доктора медичних наук, професора
Бездітка Павла Андрійовича
на дисертаційну роботу Бушуєвої Оксани Валеріївни
«Оптимізація прогнозування та діагностики діабетичної ретинопатії
у хворих на цукровий діабет 2 типу»,
що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії
з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина»,
у створену для разового захисту спеціалізовану вчену раду ДФ 35.600.005
у Львівському національному медичному університеті
імені Данила Галицького
МОЗ України

Актуальність обраної теми дисертації.

Захворюваність на цукровий діабет (ЦД) у світі постійно зростає і за прогнозом Міжнародної діабетичної федерації до 2040 року ним будуть страждати 642 млн чоловік. ЦД і його ускладнення є третьою причиною смертності у світі після серцево-судинних і онкологічних захворювань.

Одним з найбільш частих і прогностично несприятливих проявів ЦД є діабетична ретинопатія (ДР), яка веде до значного зниження зору, сліпоти і інвалідності. ДР займає 2-3 місце серед всіх причин сліпоти у працездатного населення розвинених країн. Частота сліпоти у хворих на ЦД в 25 разів вище, ніж у загальній популяції, а інвалідність по зору мають більше 10% хворих на діабет. Серед осіб, первинно визнаних інвалідами внаслідок офтальмологічних ускладнень ЦД, понад 97% складають інваліди I і II груп. Найбільш важка стадія ураження сітківки, яка безпосередньо призводить до інвалідизації – проліферативна ретинопатія – спостерігається у 10-30% пацієнтів.

Ризик розвитку ДР спостерігається при порушенні контролю глікемії та гіпертензії. Але наявність або відсутність факторів ризику не завжди пояснюють розвиток та тяжкість ДР. В патогенезі ДР одне з головних місць належить метаболічним порушенням. Гіперглікемія активує поліоловий шлях метаболізму глюкози, а ключовий фермент цього шляху – альдозоредуктаза,

яка перетворює глюкозу на сорбітол. Саме з цього ферменту починаються порушення внутрішньоклітинного гомеостазу.

Також в останні роки дуже актуальним стало вивчення генетичних факторів розвитку різних хвороб. Не виключенням є і ускладнення ЦД. Так, за даними літератури, 50 % пацієнтів з ДР генетично схильні до цього захворювання.

Отже вивчення нових ланок етіопатогенезу ДР та пошук нових методів її профілактики, діагностики та лікування є дуже актуальним для сучасної офтальмології. Представлене дослідження і його мета – підвищити ефективність прогнозування та діагностики ДР на підставі комплексного вивчення клініко-лабораторних даних та поліморфних варіантів гена альдозоредуктази *rs759853* і *rs9640883* при ЦД 2 типу відповідає сьогоденним завданням офтальмологічної науки.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами.

Дисертаційна робота була виконана на кафедрі офтальмології ФПДО Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького і є фрагментом науково-дослідних робіт “Оптимізація лікувально-діагностичних алгоритмів в офтальмології з використанням комп'ютерних технологій» (№ держреєстрації 0113U000204, 2013-2017 рр.) та «Вивчення нових біохімічних, молекулярно-генетичних, біофізичних та клінічних механізмів захворювань ока і розробка нових методів профілактики, лікування і прогнозування очних хвороб» (№ держреєстрації 0118U000103, 2018-2022р.р.), в яких дисертант був співвиконавцем.

Наукова новизна одержаних результатів дослідження.

Вперше в пацієнтів з української популяції проведена оцінка розподілу генотипів поліморфізму *rs759853* гена *AKR1B1*. Показано зниження частоти предкового генотипу G/G на тлі збільшення частоти гетерозиготи G/A при ЦД2 (у 1,9 рази). При ДР (у 3,3 рази при непроліферативній та у 3,9 рази при проліферативній) збільшувалася частота мутантної гомозиготи A/A. При прогресуванні ДР встановлено зниження частоти предкової алелі G (у 1,7 рази)

та збільшення мутантної алелі А (у 1,9 рази за умов проліферативної ДР у порівнянні з контролем; $P_{(\chi 2)}<0,001$ для всіх перелічених випадків).

Доповнено наукові дані про вплив оксидантного стресу та порушень ензиматичної антиоксидантної системи на розвиток та прогресування ДР у хворих на ЦД 2 типу: при збільшенні тяжкості ДР рівень дієнових кон'югатів суттєво зростав, тоді як активність каталази – зменшувалася.

Вперше проведена оцінка розподілу генотипів поліморфізму *rs9640883* гена *AKR1B1*. Показано збільшення частоти предкового генотипу G/G при ЦД 2 типу (у 1,4-1,6 рази) на тлі зменшення частоти гетерозиготи G/A (у 1,4-1,9 рази; $P_{(\chi 2)}<0,001$ для обох генотипів у порівнянні з контролем). ДР супроводжувалася відсутністю мінорної гомозиготи A/A *rs9640883* у всіх хворих, що вказує на протективний вплив гомозиготи A/A. При прогресуванні ДР відмічено збільшення частоти предкової алелі G (у 1,2 рази) та зменшення мінорної алелі А (у 1,9 рази при проліферативній ДР у порівнянні з контролем; $P_{(\chi 2)}<0,001$ для обох алелей).

Встановлено, що з розвитком ДР асоційована наявність у поліморфізмі *rs759853* ($P_{(\chi 2)}<0,001$) алелі А та генотипу A/A, а у поліморфізмі *rs9640883* ($P_{(\chi 2)}<0,001$) – алелі G та генотипу G/G. Наявність у поліморфізмі *rs759853* алелі А ($P_{(\chi 2)}=0,047$) підвищувала шанси розвитку ДР, а генотип A/A ($P_{(\chi 2)}<0,001$) збільшував такий ризик у 11 разів; наявність гомозиготи G/G поліморфізму *rs9640883* ($P_{(\chi 2)}=0,02$) також збільшувала ризик розвитку ДР.

Вперше доведена роль у розвитку ДР хворих на ЦД 2 типу гаплотипу обох поліморфізмів: гаплотипом ризику є (A/A *rs759853**G/G *rs9640883*), який зустрічався при ДР у 71,4% випадків. Асоціацію з ДР мали гаплотипи з поєднанням алелі А поліморфізму *rs759853* з предковою гомозиготою G/G поліморфізму *rs9640883*; гаплотипи (G/A *rs759853**G/G *rs9640883*) та (A/A *rs759853** G/G *rs9640883*) були маркерами наявності ДР у порівнянні з контрольною групою ($P_{(\chi 2)}<0,001$). Наявність гаплотипу (A/A *rs759853** G/A *rs9640883*) визначало розвиток проліферативної ДР ($P_{(\chi 2)}=0,003$).

Вперше доведена залежність інтенсивності перекисного окиснення ліпідів при ДР від поліморфізму гена *AKR1B1*: вона значущо ($p<0,05$) наростала за

наявністю мутантного генотипу A/A поліморфізму *rs759853* та предкового генотипу G/G поліморфізму *rs9640883*; розвиток ДР супроводжувався зниженням активності каталази, особливо за умов проліферативної ДР та наявності вказаних генотипів ризику.

Теоретичне значення результатів дослідження.

Дисертантом доповнено наукові дані щодо зв'язку оксидантного стресу та порушень ензиматичної антиоксидантної системи з розвитком та прогресуванням ДР у хворих на ЦД 2 типу. Також автором встановлено розподіл генотипів поліморфізму *rs759853* та *rs9640883* гена альдозоредуктази та проведена їх асоціація з розвитком та прогресуванням ДР. На підставі цих даних була побудована математична модель розрахунку ризику розвитку ДР.

Практичне значення результатів дослідження.

Вперше обґрунтована діагностична роль поліморфізмів *rs759853* і *rs9640883* гена *AKR1B1*: шляхом побудови логістичних моделей регресії показано, що ризик розвитку ДР менше у п'ять разів у носіїв генотипів G/G і G/A у порівнянні з носіями генотипу A/A поліморфізму *rs759853* ($p<0,001$). Також ризик у два рази більше ($p=0,01$) для носіїв генотипу G/G у порівнянні з генотипами A/A+G/A поліморфізму *rs9640883*. Ризик розвитку проліферативної ДР у 3,3 рази менше для носіїв генотипу G/G ($p=0,01$) та у 2,5 рази – для носіїв генотипу G/A у порівнянні з генотипом A/A поліморфізму *rs759853*.

Розроблена модель прогнозування розвитку ДР: найбільша ймовірність розвитку ДР була відмічена для гаплотипів (A/A *rs759853**G/G *rs9640883*), (G/A *rs759853**G/G *rs9640883*) та (A/A *rs759853**G/A *rs9640883*). Найменша ймовірність розвитку ДР була визначена для протективного гаплотипу (G/G *rs759853**A/A *rs9640883*). Діагностична роль поліморфізмів гена *AKR1B1* полягає і у визначенні швидкості розвитку ДР: у носіїв гаплотипу G/G *rs759853**G/A *rs9640883* непроліферативна ДР розвивається на 2,5 роки раніше, ніж в середньому по цій групі пацієнтів, а проліферативна ДР – на 7,2 роки раніше. Затримує розвиток ДР наявність гаплотипу G/A *rs759853**G/G *rs9640883*, а розвиток проліферативної ДР – ще й гаплотип A/A *rs759853**G/A *rs9640883*.

Ступінь обґрунтування та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Отримані в дисертаційний роботі Бушуєвої Оксани Валеріївни результати ґрунтуються на достатній кількісній та якісній базі спостережень та досліджень. Згідно до завдань дослідження пацієнти були розподілені на чотири групи: пацієнти когорти порівняння (98 осіб без ЦД2); пацієнти з І стадією ДР без змін на очному дні (76 осіб); пацієнти з ДНПР (64 особи); пацієнти з ДПР (64 особи). Крім того, до дослідження була залучена ще одна контрольна група для співставлення генетичних досліджень (107 офтальмологічно здорових осіб).

Обробка первинного матеріалу, отриманих результатів та зроблених висновків виконана на високому науково-методичному рівні із застосуванням актуальних на сьогоднішній день статистичних методів та математичних моделей прогнозування.

Проаналізувавши дизайн дослідження та використані методи його виконання можна зробити висновок, що наукові положення і висновки, сформульовані у дисертації, адекватні поставленим завданням, логічно пов’язані з одержаними результатами і дозволяють вважати їх повністю обґрунтованими.

Оцінка змісту дисертації, її завершеність в цілому, зауваження щодо оформлення.

Дисертація викладена українською мовою, побудована і оформлення згідно вимог наказу № 40 МОН України від 12.01.2017 року та складається із анотації, вступу, шести розділів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, додатків.

У першому розділі дисертації наведено огляд літератури з сучасним поглядом на проблеми етіології та патогенезу діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет. Проведений автором аналіз наукових робіт показав невирішеність проблем розуміння як розвитку і прогресування даної патології, так і їх лікування. Це надало можливість автору розкрити потенціал вивчення біохімічних та молекулярно-генетичних чинників розвитку та прогресування ДР на сучасному рівні розвитку науки. Зауважень немає.

У другому розділі дисертації представлено аспекти дизайну дослідження. Розділ дає повне представлення про кількість та загальний стан залучених у дослідження хворих та офтальмологічно здорових осіб, їх розподіл по групах. Опис методів дослідження виконано в повному обсязі. Підрозділ статистичної обробки отриманих результатів містить різноманітний ряд статпоказників, методів та засобів обчислення даних, що говорить про ретельність у підході автора до застав доказової медицини та перевірку отриманих результатів з різних боків. Викладений в розділі матеріал дозволяє вважати отримані результати вірогідними і достовірними. Зауваження відсутні.

Третій розділ висвітлює питання частоти розвитку ДР та клініко-лабораторних показників перебігу патологічного процесу у досліджуваних групах. Автором виявлено, що при ЦД 2 типу частота ДР складає 62,7%, а співвідношення ДНПР та ДПР складає 1:1, при цьому у кожного хворого з ДПР були відмічені прояви неоваскуляризації та/або гемофтальм. Зв’язок оксидантного стресу та порушень ензиматичної антиоксидантної системи з розвитком та прогресуванням ДР проявився у збільшенні рівня дієнових кон’югатів від 1,5 до майже 4 разів в залежності від стадії ДР і зниженні активності каталази на 9,5%. Розділ написано інформативно, зрозумілою мовою із доданням великої кількості таблиць і рисунків, які допомагають сприйняттю та співставленню викладених даних. Клінічні та біохімічні дослідження проведені на високому рівні та дають підґрунтя для проведення молекулярно-генетичних досліджень, які описані в наступних двох розділах. Зауважень до розділу немає.

Четвертий розділ дисертації присвячено вивченню розподілу поліморфних генотипів та алелей відповідно до груп хворих за стадією ДР та встановленню зв'язку поліморфізмів *rs759853* та *rs9640883* гена *AKR1B1* з розвитком ЦД та ДР та їх впливу на біохімічні показники перебігу патологічного процесу. Оцінка розподілу генотипів поліморфізму *rs759853* показала зниження частоти генотипу G/G на тлі збільшення частоти гетерозиготи G/A. При прогресуванні ДР знижується частота предкової алелі G (у 1,7 рази) та збільшується частота мутантної алелі A (у 1,9 рази). Що

стосується поліморфізму *rs9640883,* показано збільшення частоти предкового генотипу G/G на тлі зменшення гетерозиготи G/A. Наявність ДР у всіх хворих супроводжувалася відсутністю мінорної гомозиготи A/A, що вказує на її протективний вплив. Динаміка частоти предкової алелі G та мінорної алелі A протилежна поліморфізму *rs759853*. Також автором встановлена асоціація алелей та генотипування і виявлені маркери-гаплотипи розвитку ДР. Що стосуються впливу набору генотипів на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів, то вона наростала при генотипах A/A *rs759853* та G/G *rs9640883*. При цьому розвиток ДР супроводжувався зниженням активності каталази, особливо за умов проліферативної ДР та наявності вказаних генотипів ризику. Розділ написано грамотно, із дотриманням логіки дослідження. Текст перемежовується великою кількістю таблиць і порівняльних діаграм у зв'язку із великою варіабельністю досліджуваних параметрів. Зауважень до розділу немає.

П'ятий розділ дисертації присвячено визначенню ризику розвитку ДР різних стадій та можливостям її прогнозування методом множинної регресії. Розроблені автором логістичні моделі регресії встановили, що ризик розвитку ДР менше у п'ять разів у носіїв генотипів G/G і G/A у порівнянні з носіями генотипу A/A поліморфізму *rs759853;* ризик у два рази більший для носіїв генотипу G/G у порівнянні з генотипами A/A+G/A поліморфізму *rs9640883*. Розділ написано логічно, матеріал розкрито на високому методологічному рівні. Зауважень до розділу немає.

У шостому розділі «Аналіз та узагальнення отриманих результатів» автором було проведено порівняльний аналіз одержаних результатів з даними сучасної літератури із досліджуваної проблеми. На підставі цього аналізу автором обґрунтована доцільність виконання молекулярно-генетичних досліджень поліморфізмів *rs759853* та *rs9640883* гена альдозоредуктази з метою підвищення рівня прогнозування та лікування хворих на ДР. Дисертантом вказані можливі подальші кроки і шляхи розвитку запропонованих генетичних досліджень та впливу на біохімічні патогенетичні аспекти розвитку ДР. Зауваження по даному розділу відсутні.

Висновки відповідають завданням дослідження та повністю відобража-

ють результати проведеної роботи.

Робота не містить академічного плагіату та відповідає принципам наукової доброчесності, а представлені інформативні формулювання мають відповідні посилання, що відображає сумлінне ставлення дисертанта до інтелектуальних надбань інших авторів.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.

За темою дисертації опубліковано 15 наукових праць, з яких 8 – статті. 5 статей опубліковано в журналах і збірниках відповідно «Переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора наук, кандидата наук та ступеня доктора філософії»; 2 статті у закордонних виданнях, з наукового напряму, за якого підготовлено дисертацію, в тому числі 1 – у періодичному науковому виданні держави, яка входить до Європейського Союзу; 3 статті опубліковані у виданнях, що входять до наукової бази Scopus. 7 робіт опубліковано у матеріалах науково-практичних конференцій, у тому числі з міжнародною участю, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації.

Питання, недоліки дисертації щодо її змісту і оформлення.

Під час вивчення роботи виникли наступні питання:

1. З чим пов’язано зменшення ризику розвитку ДР у носіїв предкової алелі генотипів *G/G* і *G/A* у порівнянні з носіями генотипу *A/A* поліморфізму *rs759853* гена *AKR1B1*?

2. Ви показуєте визначальну роль у розвитку ДР так званого «гаплотипу ризику» по вивченим поліморфізмам. Як можна пояснити такий результат?

3. Вами показаний зв’язок між наявністю певних генотипів і станом перекисного окиснення ліпідів. З чим це пов’язано?

Зауваження.

1. Робота обтяжена формулами і статистичними розрахунками, які можна було надати у додатках до дисертації, щоб не обтяжувати сприйняття основних наукових положень дисертації.

2. В роботі зустрічаються поодинокі орфографічні, пунктуаційні та стилістичні помилки.

Зазначені питання та зауваження не носять принциповий характер і не знижують наукової цінності дисертації.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження.

Отримані автором наукові та практичні дані обґрунтували виконання генетичних досліджень для прогнозу розвитку ДР на різних стадіях і можуть бути включені як в клінічну практику, так і в програму лекцій медичних навчальних закладів.

Відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Бушуєвої Оксани Валеріївни «Оптимізація прогнозування та діагностики діабетичної ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2 типу» є завершеною науковою працею, що містить обґрунтовані положення наукової та практичної значимості, положення, результати та висновки, які розв'язують важливе науково-прикладне завдання офтальмології – підвищення ефективності профілактики, діагностики та лікування хворих на діабетичну ретинопатію.

Представлена дисертаційна робота сучасна, актуальна, вносить вклад в теоретичну та практичну офтальмологію та відповідає вимогам «Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету міністрів України від 06.03.2019 р. № 167, а її автор – Бушуєва Оксана Валеріївна заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 22 – «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 – «Медицина».

11.12.20р.

Офіційний опонент:
завідувач кафедри офтальмології
Харківського національного медичного
університету МОЗ України,
доктор медичних наук, професор Бездітко П.А.