

## **ВІДГУК**

**офіційного опонента** - завідувача відділу вітреоретинальної та лазерної хірургії ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії імені В. П. Філатова НАМН України», доктора медичних наук, професора **Олексія Олексійовича Путієнка**

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***

Цукровий діабет (ЦД) – соціально значуще захворювання. За даними ВООЗ, в економічно розвинутих країнах світу до 4-6 відсотків населення хворіє на цукровий діабет. В Європі питома вага таких хворих становить близько 4 відсотків. Визначаючи загрозу, яку становить для людства цукровий діабет, Генеральна Асамблея ООН прийняла 20 грудня 2006 р. Резолюцію про цукровий діабет, відповідно до якої витрати, пов'язані з наданням медичної допомоги хворим, оцінюються більш як у 2-3 відсотки загальних видатків з охорони здоров'я; майже 80 відсотків припадає на лікування ускладнень, 20 відсотків – на закупівлю цукрознижувальних препаратів і засобів контролю. Відповідно до світової статистики, кожні 13-15 років кількість хворих на цукровий діабет подвоюється. Аналогічна тенденція спостерігається і в Україні.

У більшості хворих на дану патологію, до 90%, діагностується ЦД 2 типу (ЦД2). Діабетична ретинопатія (ДР) відноситься до пізніх мікросудинних ускладнень діабету і у хворих на ЦД2 розвивається в 60% випадків. Діабетичний макулярний набряк (ДМН) може приєднуватися на будь-якій стадії ДР і викликає виражене зниження центральної гостроти

зору, що призводить до ранньої інвалідизації хворих працездатного віку. Ризик розвитку ДР спостерігається при порушенні контролю глікемії та гіпертензії. В патогенезі ДР одне з головних місць належить метаболічним порушенням, а механізм розвитку ДР багатокomпонентний і включає порушення обміну речовин: вуглеводного, ліпідного, білкового та електролітного. Ці напрями підлягають корекції і дають насагу впливати на розвиток та прогресування ДР. Також, за сучасними даними, такий фактор ризику розвитку ДР, як генетичний, відповідає 50 % всіх випадків. Рядом досліджень показано наявність спадковості при розвитку ДР в різних популяціях, незалежно від рівня гіперглікемії та супутніх факторів ризику навколишнього середовища.

Виходячи з вищевикладеного, представлена тема і мета дослідження – підвищити ефективність прогнозування та діагностики діабетичної ретинопатії на підставі комплексного вивчення клініко-лабораторних даних та поліморфних варіантів *rs759853* і *rs9640883* гена альдозоредуктази (*AKR1B1*) при цукровому діабеті 2 типу є актуальною для сучасної офтальмології.

### ***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 хворіб» (№ 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 – зниження частоти предкової алелі G (у 1,7 рази) та збільшення мутантної алелі A (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 ЦД2: при збільшенні тяжкості ДР рівень дієнових кон'югатів суттєво зростає, тоді як активність каталази – зменшувалася.

Вперше проведена оцінка розподілу генотипів поліморфізму *rs9640883* гена *AKR1B1*. Показано збільшення частоти предкового генотипу G/G при ЦД2 (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 A (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 A та генотипу A/A, а у поліморфізмі *rs9640883* ( $P_{(\chi^2)} < 0,001$ ) – алелі G та генотипу G/G. Наявність у поліморфізмі *rs759853* алелі A ( $P_{(\chi^2)} = 0,047$ ) 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 ЦД2 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***

В результаті проведених автором досліджень були доповнені дані про вплив на розвиток та прогресування ДР у хворих на ЦД2 оксидантного стресу та порушень ензиматичної антиоксидантної системи у внутрішньоочній рідині (рівень дієнових кон'югатів і активність каталази). У пацієнтів з української популяції вивчено розподіл поліморфних алелей і генотипів, а також гаплотипів поліморфізмів *rs759853* та *rs9640883* гена *AKR1B1* у хворих з ЦД2, визначена їх асоціація із виникненням та механізмами розвитку і прогресування ДР. Також автором визначено зв'язок вищевказаних поліморфізмів із показниками оксидантних порушень у внутрішньоочній рідині хворих на ДР із ЦД2.

На підставі визначення діагностичної значущості поліморфних варіантів гена альдозоредуктази, дисертантом розроблено модель прогнозування розвитку та прогресування 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 менший 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 більший ( $p = 0,01$ ) для носіїв генотипу G/G у порівнянні з генотипами A/A+G/A поліморфізму *rs9640883*. Ризик розвитку проліферативної ДР у 3,3 рази менший 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***

Дисертаційна робота Бушуєвої Оксани Валеріївни виконана на сучасному науково-методичному рівні та відповідає сучасним вимогам проведення загальноклінічних, офтальмологічних, біохімічних та молекулярно-генетичних досліджень. Фактичний матеріал дисертації відповідає встановленим нормам за якісними та кількісними показниками.

Робота базується на дослідженні 409 осіб, з яких 204 – пацієнти з

діагнозом ДР різної стадії, 98 осіб – група контролю та 107 осіб – група контролю молекулярно-генетичних досліджень.

Клінічні дослідження проводили з виконанням заходів щодо забезпечення безпеки та здоров'я пацієнтів, дотримання їх прав, людської гідності та морально-етичних норм у відповідності із принципами Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини та відповідних Законів України. Експериментальні дослідження проводили згідно всіх біоетичних вимог.

Статистична обробка отриманих результатів проведена на сучасному рівні, включає аналіз отриманого матеріалу за допомогою широкого спектру різноманітних статистичних методів. Статистичний аналіз повністю підтверджує достовірність отриманих результатів. Виконаний обсяг досліджень, їх характер, обробка матеріалу дозволяють вважати результати і висновки, отримані дисертантом, вірогідними. Наукові положення і висновки, сформульовані у дисертації, адекватні поставленим завданням, логічно пов'язані з одержаними результатами дослідження і дозволяють вважати їх повністю обґрунтованими.

### ***Оцінка змісту дисертації, її завершеність в цілому, зауваження щодо оформлення***

Дисертація викладена українською мовою, побудована за загальноприйнятою схемою і містить: анотацію, вступ, 6 розділів, висновки, практичні рекомендації, список використаних джерел, додатки.

«Вступ» дисертації відповідає загальноприйнятій схемі написання; в ньому в повній мірі викладена актуальність теми дисертації та обґрунтований її вибір; сформульовані мета і завдання дослідження та методи їх досягнення; описана наукова і практична новизна дослідження; вказані місця апробації роботи та особиста участь дисертанта у виконанні і написанні роботи; відображена загальна характеристика дисертації. Зауважень до розділу немає.

Перший розділ роботи являє собою огляд літератури. Ця частина дисертації побудована на узагальнені відомих на даний час наукових джерел з досліджуваної проблематики. Автором проаналізовані відомі сучасні погляди на етіологію та патогенез ДР, розглянуті аспекти її прогресування та можливості впливу на них з метою корекції процесу розвитку ДР. Велику частину розділу присвячено відомим даним щодо генетичного впливу на етіопатогенез ДР. Використаний в розділі перелік літературних джерел свідчить про його сучасність та зазначає освіченість і ерудованість дисертанта. Зауваження по даному розділу відсутні.

Другий розділ дисертації описує дизайн, матеріали і методи дослідження. Викладений матеріал написано чітко, лаконічно із застосуванням графічних і табличних матеріалів. Розділ повністю відображає умови та хід клінічних, біохімічних та молекулярно-генетичних досліджень. Всі використані в роботі методики представлені детально і повністю. В підрозділі «Методи статистичних досліджень» представлені методи статобробки даних, показана ґрунтовність їх використання. Всі методи статистичної обробки відповідають стандартам сучасної доказової медицини. Зауважень до розділу немає.

Третій розділ дисертації присвячено клінічним та біохімічним дослідженням частоти і характеру розвитку та прогресування ДР при ЦД2, стану показників оксидантного стресу та антиоксидантної системи внутрішньоочної рідини. В результаті проведених досліджень автором встановлено, що у хворих ЦД2 частота ДР складала 62,7%, серед них співвідношення непроліферативної та проліферативної форм складала 1:1. ДР, особливо її проліферативна форма, характеризувалася потовщенням сітківки у 1,6 рази, центральний об'єм зростав у 1,5 рази. У кожного хворого з проліферативною ДР були відмічені прояви неоваскуляризації та/або гемофтальм. Дисертантом визначено значне накопичення у внутрішньоочній рідині дієнових кон'югатів (у 3,6 рази) при зниженні активності каталази (на 9,5%). Цифровий матеріал для наглядності

представлений як у табличному, так і у графічному варіанті у вигляді діаграм. Зауважень до розділу немає.

Четвертий розділ дисертації присвячено молекулярно-генетичним дослідженням, а саме вивченню розподілу генотипів та алелей поліморфізмів *rs759853* і *rs9640883* гена *AKR1B1* та встановлення їх зв'язку із розвитком ДР. За результатами дослідження автором доведена значущість ролі алельного поліморфізму *rs759853* у розвитку ЦД2 та ДР. Збільшення частоти гетерозиготи G/A супроводжувало розвиток ЦД2 без ретинопатії, тоді як збільшення мутантної гомозиготи A/A – розвиток ДР, й більшою мірою – проліферативного її варіанту. При наростанні важкості патологічного процесу та прогресуванні ДР відмічено зниження частоти предкової алелі G та збільшення частоти мутантної алелі A. Наявність алелі G у гетеро- або гомозиготному стані суттєво знижувало шанси розвитку ДР, що, на думку автора, мало протективний ефект. В результаті дослідження поліморфізму *rs9640883* встановлено суттєве збільшення шансів предкового генотипу G/G у хворих на ЦД2 на тлі зменшення шансів гетерозиготи G/A. За умов наростання важкості патологічного процесу та прогресування ДР відмічена чітка закономірність – збільшення частоти предкової алелі G та зменшення частоти мінорної алелі A. При цьому, наявність ДР супроводжувалася взагалі відсутністю мінорної гомозиготи A/A. Це дало можливість припустити наявність протективного ефекту гомозиготи A/A, за відсутністю якої складаються умови для розвитку ДР. Наявність гомозиготи за предковою алеллю G/G та алелі G поліморфізму *rs9640883* суттєво підвищувало шанси, тоді як наявність алелі A у гетеро- або гомозиготному стані – суттєво зменшувало шанси розвитку ЦД2. Встановлені алелі «ризик», які негативно впливали на розвиток ДР у хворих на ЦД2. Алель A поліморфізму *rs759853* у 1,5 рази підвищувала шанси розвитку ДР, а у гомозиготному стані (генотип A/A) – ризик збільшувався у 10,8 рази. Також і наявність гомозиготи G/G поліморфізму *rs9640883* збільшувала ризик розвитку ДР у 1,5 рази. Окремо встановлено,



що на розвиток проліферативної форми ДР поліморфізми *rs759853* та *rs9640883* гена *AKR1B1* не впливали. Виявлений гаплотип «ризик»: *A/Ars759853 + G/Grs9640883*, який зустрічався в основному за умов ДР (71,4%). Наростання інтенсивності ПОЛ наростало за наявності мутантного генотипу *A/A* поліморфізму *rs759853* та предкового генотипу *G/G* поліморфізму *rs9640883*. При ЦД2 активність каталази компенсаторно підвищувалася, водночас, розвиток ДР супроводжувався зниженням активності ферменту, що було зумовлено наявністю тих самих генотипів. Розділ написано дуже детально, варіює науковим описом багатьох подробиць. Зауважень до розділу немає.

П'ятий розділ дисертації присвячено визначенню можливості прогнозування розвитку ДР від стану поліморфізмів *rs759853* та *rs9640883* гена *AKR1B1* та побудові на цих засадах моделі прогнозування виникнення та розвитку захворювання. Автором встановлено, що ризик розвитку ДР зменшувався у 5 разів для генотипу *G/A* і *G/G* поліморфізму *rs759853* у порівнянні з генотипом *A/A*. Виявлено зростання у 2 рази ризику розвитку ДР для генотипу *G/G* поліморфізму *rs9640883* порівняно з генотипами *A/A+G/A*. Також автором було виявлено зменшення ризику розвитку проліферативної ДР з віком пацієнта. Ризик розвитку ДПР зменшується у 2,5 рази для генотипу *G/A* з і у 3,3 рази для генотипу *G/G* поліморфізму *rs759853*. Зв'язку ризику розвитку ДПР з поліморфізмом *rs9640883* встановлено не було. На підставі цих даних було запропоновано модель прогнозування розвитку ДР шляхом побудови множинної регресії з достатньою надійністю ступеню впливу незалежних змінних на розрахунковий показник. Значення ймовірності розвитку ДР більше або рівне  $Z=0,231$  встановлювало позитивний результат, а менша величина – вказувала на негативний результат. Значення, що перевищувало цю межу, прогнозувало схильність до розвитку ДР з 61 % правильного результату. В розділі текстовий матеріал добре розмежовується таблицями та наглядними діаграмами. Зауважень до розділу немає.

У шостому розділі «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» автором було проведено порівняльний аналіз одержаних результатів з даними сучасної літератури із досліджуваної проблематики. На підставі цього аналізу автором обґрунтована доцільність дослідження поліморфізмів *rs759853* та *rs9640883* гена *AKR1B1* у хворих із ДР та ЦД2, як додаткових факторів визначення ступеня виникнення та прогресування розвитку ДР. Дисертантом вказані можливі подальші кроки і шляхи розвитку запропонованого дослідження. Зауваження по даному розділу відсутні.

Висновки повністю відповідають меті та завданням дослідження, повністю відображають результати проведеної роботи.

Оформлення дисертації відповідає вимогам наказу № 40 МОН України від 12.01.2017 року.

Під час вивчення дисертаційної роботи текстових запозичень, збігів, ідентичності чи схожості викладених даних без відповідних посилань не було. Робота не містить академічного плагіату та відповідає принципам наукової доброчесності.

#### ***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 напрямку, 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. Ви вважаєте, що результати генотипування по поліморфізмам гена AKR1B1 можна використовувати на практиці. Яким саме чином це можна зробити для ДР?
2. Також Вами розроблена математична модель прогнозування розвитку ДР. Які висновки це дозволило Вам зробити?
3. Ви вживаєте термін українська популяція. А для інших популяцій існують ті ж самі дані?

Зауваження.

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 проведення молекулярно-генетичних досліджень з метою визначення можливості прогнозу розвитку ДР. Це дозволяє вважати доцільним включення отриманих даних в клінічну практику очних відділень та відділень мікрохірургії ока, а наукові дані для використання в програмах лекцій медичних навчальних закладів та закладів післядипломної освіти.

### ***Відповідність дисертації встановленим вимогам***

Я вважаю, що 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 наукові положення та результати, які розв'язують

важливе науково-прикладне завдання офтальмології – підвищення ефективності профілактики, діагностики та лікування хворих з діабетичною ретинопатією.

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».

Офіційний опонент:

завідувач відділу вітреоретинальної та лазерної хірургії ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії імені В. П. Філатова НАМН України», д.мед.н., професор



Путієнко О.О.

*Справжність підпису проф. Путієнко О.О. засвідчую*

НАЧАЛЬНИК ВІДДІЛУ КАДРІВ  
ДЕРЖАВНОЇ УСТАНОВИ  
«ІНСТИТУТ ОЧНИХ ХВОРОБ  
І ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ  
ІМЕНІ В.П. ФІЛАТОВА НАМН УКРАЇНИ»



*Dr. B. Venger*

*3, 12, 20.*