

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук,
професора Ульянової Надії Анатоліївни
на дисертаційну роботу Бурдя Артема Вячеславовича
«Діагностична значимість делеційного поліморфізму генів
глутатіон-S-трансферази (*GSTM1* і *GSTT1*)
у розвитку та прогресуванні первинної відкритокутової глаукоми»,
представлену в разову спеціалізовану вчену раду ДФ 26.613.007
при Національній медичній академії післядипломної освіти
імені П. Л. Шупика МОЗ України,
що утворена наказом МОН України №1502 від 04.12.2020 р.,
на здобуття наукового ступеня доктора філософії
в галузі знань 22 Охорона здоров'я за спеціальністю 222 Медицина
(спеціалізація «Офтальмологія»)

1. Актуальність обраної теми дисертації.

Первинна відкритокутова глаукома (ПВКГ) складає приблизно 50% випадків всіх глауком, та є однією з головних причин слабкозорості та сліпоти серед дорослого населення. За попередніми оцінками, ПВКГ може стати причиною необоротної сліпоти для 80 мільйонів чоловік у всьому світі до 2020 року. Рання діагностика та ефективна профілактика є єдиними ефективними методами запобігання виникнення сліпоти при ПВКГ. Нажаль тільки в 50-53% випадків лікар-офтальмолог своєчасно діагностує у пацієнта ПВКГ, тай то – лише за умови тривалого спостереження пацієнта, наприклад, у випадку супутніх захворювань очей чи профілактичних оглядів.

Останнім часом доведено, що інтенсифікація перекисного окиснення ліпідів та окисний стрес є невід'ємним компонентом нейродегенерації та апоптозу гангліозних клітин сітківки. З іншої сторони існують захисні механізми протидії окисного пошкодження, до яких відноситься каталаза, супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і глутатіон-S-трансферази (GST), які є мультігенним сімейством ферментів, що відіграють важливу роль в системі антиоксидантного захисту, в процесах детоксикації та ліквідації ксенобіотиків, в тому числі канцерогенів, окислювачів, токсинів та лікарських засобів.

Тривалі делеції в генах *GSTT1* і *GSTM1* призводять до синтезу білкових продуктів із зменшеною кількістю амінокислотних залишків, такі білки

характеризуються зниженою ферментативною активністю. Результатом тривалої делеції є поява алелі *GSTM1-null*, а її наявність в генотипі призводить до відсутності синтезу білкового продукту взагалі. Частота «нульової» алелі гена *GSTM1* варіє від 40% до 60% в залежності від популяції та етнічної групи. У європейців синтез білкового продукту гену *GSTT1* без ферментативної активності внаслідок делеційного поліморфізму зустрічається у 20% населення. Делеційні поліморфізми генів *GSTT1* або *GSTM1* та поліморфізм Ile105Val (*A313G*) гену *GSTP1*, який локалізований в 5 екзоні (rs1695), характеризуються відсутністю активності білкового продукту, та збільшують ризик розвитку різних захворювань, включаючи рак, серцево-судинні захворювання, захворювання дихальних шляхів і офтальмологічні проблеми, такі як катаракта та глаукома.

Отже, існує нагальна потреба у визначенні генетичного ризику дляожної популяції окремо. В Україні досі не було проведено дослідження щодо визначення діагностичної та прогностичної ролі поліморфізму генів глутатіон-S-трансферази у розвитку та прогресуванні ПВКГ, що і визначає актуальність науково-прикладного завдання сучасної офтальмології. Вирішенню цього завдання і присвячена дисертаційна робота Бурдея Артема Вячеславовича.

2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана на кафедрі офтальмології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика як фрагмент планової науково-дослідної роботи «Клінічне та експериментальне обґрунтування діагностики, лікування та профілактики рефракційних, дистрофічних, травматичних і запальних захворювань органа зору» (№ держ. реєстрації 0116U002821), термін виконання 2016–2020 роки. Автор був співвиконавцем і виконував фрагменти дослідження.

3. Новизна дослідження та одержаних результатів.

Вперше в Україні виявлено асоціацію мутантного гомозиготного генотипу Val/Val поліморфізму Ile105Val гена *GSTP1* з розвитком ПВКГ як за загальною ($p=0,03$), так і за рецисивною ($p=0,01$) моделями, що при стратифікації за стадією глаукоми зберігалося для III та IV стадій. Мутантна алель Val мала

асоціацію з розвитком ПВКГ ($p=0,01$), що при стратифікації за стадією глаукоми зберігалося для II та III стадій. Характер асоціації мав гендерні розбіжності: у жінок-носійок алелі Val шанси розвитку ПВКГ були збільшені у 1,65 рази при порівнянні з жінками контрольної групи ($p=0,04$).

Вперше у хворих з української популяції встановлено асоціацію «нульової» алелі гена *GSTT1-null* з ПВКГ ($p=0,03$), для «нульової» алелі гена *GSTM1-null* така асоціація не встановлена. Обидві «нульові» алелі (*GSTM1-null* або *GSTT1-null*) збільшували ризик розвитку IV стадії ПВКГ ($p<0,05$). Закономірністю розвитку ПВКГ було збільшення частоти подвійного «нульового» генотипу (*GSTM1-null*GSTT1-null*), особливо, у хворих з III та IV стадіями ($p<0,05$). Подвійний «нульовий» генотип (*GSTM1-null*GSTT1-null*) збільшував ризик розвитку ПВКГ у сім разів ($p=0,0E-01$).

Вперше у хворих з української популяції виявлені вірогідні відмінності частот комбінацій генотипів *GSTP1*, *GSTM1* та *GSTT1* у хворих на ПВКГ у порівнянні з контролем ($p=0,00E-01$). Генотип *GSTP1(Val/Val)*GSTM1-null*GSTT1+* збільшував ризик розвитку I стадії у 15 разів. Генотип *GSTP1Ile/Ile*GSTM1-null*GSTT1-null* збільшував ризик розвитку II стадії у 5,1 рази, III стадії – у 6,6 рази та IV стадії – у 13 разів. Розподіл сполучень всіх трьох генотипів мав достеменний вплив на тривалість захворювання, стадію, ранг та величину ВОТ (для всіх показників $p<0,05$).

Вперше показано, що найбільше значення у прогнозуванні швидкості розвитку та прогресування ПВКГ мали: «*GSTT1*» > «*GSTP1*» > «*GSTM1*». Обґрунтована необхідність визначення генотипів ризику на етапі, коли у пацієнта відсутні початкові ознаки захворювання (при проведенні профілактичних оглядів, виявленні спадкової склонності тощо).

Доповнені знання про клінічний перебіг ПВКГ: встановлено, що зростання тривалості захворювання відповідно до стадій ПВКГ склало від 0 до чотирьох років ($H=10869$; $p=0,00E-01$). Запропоновані показники швидкості розвитку (ШР_{ПВКГ}) за стадіями (стадія/рік життя) та швидкості прогресування (ШП_{ПВКГ}) (стадія/рік хвороби) прогресивно збільшувалися за стадіями глаукоми ($p<0,05$). ШП_{ПВКГ} мав значущий вплив на стадію ПВКГ ($F=21,1$; $p=2,16E-11$).

4. Теоретичне значення результатів дослідження полягає в тому, що вона містить поглиблений та деталізований дані щодо патогенетичних особливостей ПВКГ, які дозволяють визначити індивідуальний ризик розвитку цього захворювання та спланувати режим профілактики та диспансерного спостереження у кожному окремому випадку.

5. Практичне значення результатів дослідження.

Вперше розроблена оригінальна модель прогнозування віку пацієнта (з урахуванням генотипу і статі), в якому слід очікувати розвиток I стадії ПВКГ та швидкості прогресування, якщо глаукома вже є (тобто через скільки років розів'ється певна стадія ПВКГ, або, навпаки, – яка стадія ПВКГ буде через певний період часу). Розрахована таблиця відповідності для всіх можливих варіантів генотипу віку розвитку ПВКГ. Використання молекулярно-генетичного аналізу з метою визначення поліморфізмів *Le105Val* гена *GSTP1*, делеційних поліморфізмів генів *GSTM1* і *GSTT1* в поєднанні з існуючими алгоритмами функціональної діагностики ПВКГ дозволить оцінити ризик розвитку та прогресування захворювання, сформувати групи підвищеного ризику з метою прийняття своєчасних профілактичних заходів та зниження інвалідизації хворих.

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

Положення, висновки, рекомендації, що містяться у дисертації, науково обґрунтовані, вірогідні, логічно витікають із результатів досліджень. Робота виконана на сучасному науково-методичному рівні із застосуванням принципів доказової медицини, сучасних методик та відповідає існуючим вимогам щодо проведення клінічних досліджень. Наукові положення, висновки, рекомендації, які викладені у роботі, одержані на достатньому фактичному матеріалі. Протягом виконання дослідження було обстежено 270 осіб. Генотипування проведено у 172 осіб основної групи з підтвердженням діагнозом ПВКГ і 98 осіб контрольної групи, що достатньо для статистичної обробки і дозволяє вважати отримані результати вірогідними. Методи статистичного аналізу, використані в роботі адекватні, проведенні на сучасному рівні, за допомогою стандартних

програм статистичного аналізу, коректні. Вірогідність отриманих наукових результатів підтверджена на практиці в основних та групах порівняння. Рисунки та таблиці, які наведені в роботі переконливі. Висновки і практичні рекомендації конкретні, науково обґрунтовані, повністю підтверджуються результатами досліджень.

7. Оцінка змісту, оформлення й обсягу дисертації, зауваження щодо оформлення.

Дисертація викладена на 158 сторінках комп'ютерного тексту і складається з анотацій, вступу, 8 розділів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел та 2 додатків. Дисертація ілюстрована 61 таблицею та 30 рисунками, з яких чотири таблиці та один рисунок займають окремі сторінки (всього 5 сторінок). Список використаних джерел включає в себе 288 вітчизняних і закордонних праць.

Робота написана у науковому стилі, грамотною літературною мовою. Всі розділи дисертації написано чітко із дотриманням структури роботи відповідно до дизайну дослідження.

У «Вступі» стисло викладена актуальність теми дисертації, сформульовані мета і задачі дослідження, відображені загальна характеристика роботи. Вступ написано за загальноприйнятою схемою. Зауважень немає.

В розділі 1 представлені та проаналізовані дані сучасної вітчизняної та закордонної літератури про етіологію, патогенез, фактори ризику, клінічні прояви та класифікації ПВКГ. Розділ написано чітко. Зауважень немає.

В розділі 2 викладено дизайн дослідження, матеріал і методи загальноклінічних, офтальмологічних, молекулярно-генетичних і статистичних досліджень. Загалом використані методики цілком адекватні для вирішення поставленої мети та конкретних завдань роботи. Зауважень до розділу немає.

В розділі 3 представлена клінічна характеристика пацієнтів, залучених у дослідження. Описаний протокол обстеження хворих з ПВКГ, а також розподіл хворих за стадіями ПВКГ і рангом ВОТ. Для узагальнення даних по швидкості розвитку патологічного процесу пацієнти були ранжировані по двом показникам: швидкості розвитку патологічного процесу за стадіями (стадія/рік

життя) та швидкістю прогресування за стадіями (стадія/рік хвороби). Розрахунок показників у групах хворих (по стадіях ПВКГ) показав їх прогресивне збільшення з підвищением стадії патологічного процесу. Це дозволило вважати використання цих показників обґрунтованим та доцільним для подальшого аналізу ролі генетичних чинників у розвитку ПВКГ. Розділ написано чітко, наглядний матеріал представлений в повному обсязі, достатньо ілюстрований таблицями та діаграмами. Наприкінці розділу наведено резюме та перелік публікацій автора, які відображають його вміст. Зауважень до розділу немає.

В розділі 4 наводяться дані щодо розподілу генотипів та зв'язку поліморфізмів гену GSTP1 Ile105Val з розвитком ПВКГ. Розділ достатньо ілюстрований таблицями та діаграмами, наприкінці містить резюме та перелік публікацій автора, які відображають його вміст. Зауважень до розділу немає.

В розділі 5 наводяться дані щодо розподілу генотипів та зв'язку делеційних поліморфізмів генів GSTM1 та GSTT1 з розвитком та клінічними проявами ПВКГ. Матеріал розділу надано чітко та послідовно, в кінці розділу наведено резюме та перелік публікацій автора, які відображають його вміст. Зауважень до розділу немає.

Розділ 6 присвячений дослідженню розподілу поліморфних генотипів генів GSTP1, GSTM1 і GSTT1 та їх зв'язок з ПВКГ. Розділ достатньо ілюстрований таблицями та діаграмами, наприкінці містить резюме та перелік публікацій автора, які відображають його вміст. Зауважень до розділу немає.

Розділ 7 присвячено дослідженю прогнозування розвитку та прогресування ПВКГ. В даному розділі з використанням регресійного аналізу був розроблений алгоритм прогнозування віку початкових клінічних проявів ПВКГ та швидкості розвитку ПВКГ при первинному зверненні пацієнта. Для практичного використання запропоновані моделі прогнозування віку пацієнта (з урахуванням генотипу і статі), в якому слід очікувати розвиток І стадії ПВКГ та швидкості прогресування, якщо глаукома вже є. Матеріал розділу надано чітко та послідовно. Зауважень до розділу немає.

Розділ 8 присвячено аналізу та узагальненню результатів дослідження.

Детально систематизовано отримані результати дослідження, проведено їх порівняння з результатами відомих сучасних досліджень з теми дисертації, зроблені конкретизуючи висновки та практичні рекомендації.

Висновки, які наведені в дисертації, повністю відображають зміст роботи, зроблені на основі фактичного матеріалу дисертації та статистичної вірогідності отриманих результатів, відповідають завданням дослідження та свідчать про досягнення поставленої мети.

Всі публікації за матеріалами роботи відповідають вимогам МОН України. В цілому робота виконана та написана на високому методологічному рівні та немає принципових зауважень, ані до суті, ані до оформлення. Після ознайомлення з роботою виникли декілька запитань:

1. Як отримані Вами результати молекулярно-генетичних досліджень в Української популяції співвідносяться з даними досліджень геномних асоціацій у хворих з первинною відкритокутовою глаукомою у рамках Genome-wide association studies (GWAS), що були проведені у 2013-14 роках?

2. Існує ряд публікацій, в яких показано кореляцію міопічної рефракції з ризиком розвитку глаукоми, зокрема, у молодому віці. Що Ви можете сказати стосовно переважної рефракції у хворих, з встановленим за допомогою запропонованого Вами методу прогнозування високим ризиком прогресування глаукомної оптиконейропатії, в рамках Вашого дослідження?

3. Як, на Вашу думку, має бути скориговане лікування пацієнтів з первинною відкритокутовою глаукомою, які потрапляють до груп ризику прогресування згідно результатів запропонованих Вами тестів?

8. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Основні результати дисертаційної роботи А.В. Бурдея достатньо повно викладені в 8 наукових публікаціях. З них 5 робіт – статті в журналах відповідно до «Переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора наук, кандидата наук та ступеня доктора філософії», у тому числі 3 – у журналах, що входять до міжнародних науково-метрических баз (SCOPUS), 1 – у періодичному науковому виданні держави, яка входить до Європейського

Союзу; 2 роботи – тези у матеріалах науково-практичних конференцій.

9. Особистий внесок здобувача в одержання наукових результатів, що виносяться на захист.

Автором самостійно проведений інформаційний і патентний пошук, аналіз наукової літератури з досліджуваної проблеми. Клінічні спостереження за хворими ПВКГ автором проведено самостійно в ТОВ «Британський офтальмологічний центр» та Київський міській клінічній офтальмологічній лікарні «Центр мікрохірургії ока», яка є клінічною базою кафедри офтальмології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України.

Статистична обробка результатів клінічних та генетичних досліджень виконана здобувачем самостійно. Аналіз та узагальнення отриманих результатів, формулювання основних наукових положень і висновків дисертації були виконані спільно з науковим керівником доктором медичних наук, професором С. О. Риковим.

У наукових працях, опублікованих за матеріалами дисертації в співавторстві здобувачу належить провідна роль у формулюванні мети, завдань, методології дослідження, статистичній обробці та аналізі результатів.

10. Дані про відсутність текстових запозичень та порушень академічної доброчесності (академічного plagiatу, самоплагіату, фабрикації, фальсифікації).

Розглянувши та проаналізувавши матеріали дисертації здобувача наукового ступеня доктора філософії Бурдей Артема Вячеславовича на тему: «Діагностична значимість делеційного поліморфізму генів глутатіон-S-трансферази (*GSTM1* і *GSTT1*) у розвитку та прогресуванні первинної відкритокутової глаукоми», не було виявлено ознак академічного plagiatу, самоплагіату, фабрикації, фальсифікації. Встановлено, що при комп’ютерному тестуванні електронної форми дисертації і наявних за її темою публікацій через програму «Anti-Plagiarism» та за допомогою системи StrikePlagiarism в наданих матеріалах дисертації не виявлено порушень академічної доброчесності.

Текст представлених матеріалів дисертації Бурдей Артема Вячеславовича є оригінальним: всі цитати коректно позначені та правильно відображені в списку літератури, всі текстові співпадіння мають відповідні посилання на першоджерело, що міститься в списку використаних джерел; робота не містить ніяких маніпуляцій з алфавітом, зміни букв, прихованого тексту тощо; виявлені у роботі запозичення є сумлінними і не мають ознаки plagiatu. Робота визначається самостійною та може бути допущеною до захисту.

11. Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці.

Наукові та практичні положення дисертації були впроваджені в навчальний процес на кафедрі офтальмології Одеського національного медичного університету МОЗ України, кафедрі офтальмології Української медичної стоматологічної академії, кафедрі офтальмології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України, кафедрі офтальмології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, кафедрі офтальмології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», кафедрі офтальмології ФПДО Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького; в практичну діяльність в ТОВ «Британський офтальмологічний центр» (м. Київ).

12. Відповідність дисертації спеціальності та профілю спецради.

Дисертація Бурдея Артема Вячеславовича за темою «Діагностична значимість делеційного поліморфізму генів глутатіон-S-трансферази (*GSTM1* і *GSTT1*) у розвитку та прогресуванні первинної відкритокутової глаукоми» повністю відповідає паспорту спеціальності 14.01.18 – офтальмологія. Дисертація повністю відповідає профілеві спеціалізованої вченої ради.

13. Висновок про відповідність дисертації вимогам, які пред'являються до наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація Бурдей Артема Вячеславовича на тему: «Діагностична значимість делеційного поліморфізму генів глутатіон-S-трансферази (*GSTM1* і *GSTT1*) у розвитку та прогресуванні первинної відкритокутової глаукоми» представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань

22 Охорона здоров'я за спеціальністю 222 Медицина присвячена актуальній проблемі сучасної офтальмології, є закінченою науково-дослідною роботою, яка містить нові положення і нові науково-обґрунтовані результати у галузі офтальмології, що в сукупності розв'язують важливі науково-практичне завдання підвищення ефективності діагностики та прогнозування розвитку первинної відкритокутової глаукоми на підставі комплексного аналізу поліморфізмів генів GSTP1, GSTM1 і GSTT1. Виходячи з актуальності теми, об'єму та рівня досліджень, наукової новизни результатів, теоретичної та практичної цінності отриманих даних, об'єктивності та обґрунтованості висновків, беручи до уваги отримані результати та особистий внесок здобувача, дисертаційна робота Бурдей Артема Вячеславовича «Діагностична значимість делеційного поліморфізму генів глутатіон-S-трансферази (GSTM1 і GSTT1) у розвитку та прогресуванні первинної відкритокутової глаукоми», повністю відповідає вимогам п.10, 11 Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 22 Охорона здоров'я за спеціальністю 222 Медицина, затвердженого постановою КМУ від 06.03.2019 №167 та Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України від 12.01.2017 №40, а її автор, Бурдей Артем Вячеславович, заслуговує на присвоєння наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 Медицина.

Офіційний опонент:

Завідувач обласного офтальмологічного центру
КП «Волинська обласна клінічна лікарня»
д.мед.н., професор

Ульянова Н.А.

Підпис професора Ульянової Н.А. засвідчує

В.о. медичного директора

КП «Волинська обласна клінічна лікарня»



Галей М.М.