

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Стрельникова Владимира Викторовича на диссертационную работу Белодедовой А.В. «Диагностика и хирургическое лечение кератоконуса на основе углубленного изучения генетических аспектов заболевания и фемто-ассистированной кератопластики», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности

14.01.07 – глазные болезни и 03.02.07 – генетика

Актуальность избранной темы

Диссертационная работа Белодедовой А. В. посвящена изучению диагностики и хирургического лечения кератоконуса на основе углубленного исследования генетических аспектов заболевания и фемто-ассистированной кератопластики.

Кератоконус — это хроническое дегенеративное заболевание роговицы у пациентов трудоспособного возраста в результате изменения ее анатомических и биомеханических свойств, снижающее количественные и качественные показатели зрения и приводящее к потере трудоспособности и снижению качества жизни пациента.

Одной из особенностей диагностики кератоконуса является сложность его диагностики на ранних стадиях заболевания с помощью стандартных офтальмологических методов. В то же время, за последние несколько лет существенно увеличилось количество рефракционных лазерных вмешательств на роговице, которые, в случае если кератоконус не был выявлен своевременно, приводят к реактивному течению заболевания. В связи с этим, в мире ведется активная работа по поиску не только клинико-функциональных подтверждений кератоконуса, но и перспектив молекулярной лабораторной диагностики.

К настоящему моменту доказана генетическая природа кератоконуса, однако неоднородность полученных данных в различных популяциях говорит о его генетической гетерогенности и затрудняет внедрение методов молекулярно-

генетической диагностики заболевания в клиническую практику. В РФ до настоящего момента было проведено только одно исследование - гена *SOD1* на выборке пациентов из Башкортостана. В представленной к защите работе Белодедовой А.В. предпринята попытка изучить на российской выборке ассоциацию панели генетических вариантов с кератоконусом, с учетом генетической гетерогенности заболевания, с целью повышения диагностических показателей системы маркеров.

В настоящее время наиболее распространенными современными методиками лечения кератоконуса являются: кросслинкинг роговичного коллагена, межслойная кератопластика с имплантацией интрастромальных роговичных сегментов, глубокая передняя послойная кератопластика (ГППК) и сквозная кератопластика (СКП).

При далекозашедших стадиях кератоконуса наиболее эффективным считается проведение передней глубокой послойной кератопластики (ГППК), однако, несмотря на очевидные преимущества, распространение ГППК не стало повсеместным. По данным мировой литературы даже самые опытные хирурги не могут полностью исключить разрыв ДМ, до 23% операций ГППК завершается как СКП.

С 2000 года предложены различные варианты и модификации отделения глубоких слоев стромы роговицы от ДМ, направленные на повышение безопасности данной процедуры. Наибольший интерес представляет предложение M.Anwar и K.Teichman, предложивших вводить воздух в глубокие слои стромы, для последующего выделения ДМ. Данная методика получила название техники «большого пузыря» или «big-bubble».

В последующем она неоднократно модифицировалась и пересматривалась. При этом частота перфорации ДМ варьировала в широких пределах от 0% до 20%.

Ряд исследований показал, что при помощи фемтосекундного лазера можно частично стандартизировать процедуру послойной кератопластики, повышая её безопасность и предсказуемость.

Несмотря на то, что, по мнению многих авторов, проведение ГППК с фемтосопровождением делает данную процедуру более безопасной и снижает риск послеоперационных осложнений, продолжается поиск новых методик, направленных на снижение риска перфорации ДМ.

Все вышеупомянутые проблемы обусловливают поиск путей по усовершенствованию методов диагностики и хирургического лечения кератоконуса.

Новизна результатов исследования

Автором впервые в российской популяции была определена частота встречаемости генетических вариантов, ассоциированных с кератоконусом, в генах *COL5A1*, *HGF*, *MAP3K19*, *KCND3*, *FOXO1*, *MPDZ*, *NF1B*, *WNT10A*. В результате исследования была установлена статистически достоверная ассоциация вариантов rs1536482 и rs2721051, расположенных соответственно вблизи генов *COL5A1* и *FOXO1*, с кератоконусом в российской популяции. Проведенный мета-анализ показал, что результаты, полученные в ходе данного исследования, сопоставимы с мировыми данными, что делает локусы, в которых расположены rs1536482 и rs2721051, перспективными для поиска каузальных вариантов.

В ходе клинического этапа была разработана модифицированная техника проведения передней глубокой послойной фемто-ассистированной кератопластики с созданием интрастромальных тоннелей. Данная техника характеризуется небольшим процентом перфорации Десцеметовой мембранны, относительной простотой выполнения, сокращением времени проведения хирургического вмешательства и высокими клинико-функциональными результатами.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность выводов и рекомендаций не вызывает сомнений ввиду качественного отбора клинического материала, его достаточного объема (221 пациент), использования современных методов исследований, полностью отвечающих поставленным задачам. Современные методы статистической

обработки данных подтверждают достоверность и аргументированность положений, выносимых на защиту.

Ценность результатов работы для науки и практики

В ходе молекулярно-генетического этапа работы были определены молекулярно-генетические варианты (rs1536482 и rs2721051 вблизи генов *COL5A1* *FOXO1*), которые при исследовании образцов венозной крови пациентов позволяют увеличить вероятность обнаружения у исследуемого субъекта кератоконуса в 2,58 раз, что создает базовые предпосылки для дальнейшего углубленного поиска методов молекулярно-генетической диагностики этого заболевания.

Разработанная в ходе клинико-функционального этапа работы модифицированная техника проведения передней глубокой послойной фемто-ассистированной кератопластики, основанная на создании интрастромальных тоннелей, дает возможность достижения формирования «большого пузыря» у 64,3% пациентов, на фоне снижения числа интраоперационных перфораций Десцеметовой мембранны до 7,1%.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа Белодедовой А.В. построена по традиционному плану, изложена на 148 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка используемой литературы. Работа иллюстрирована 25 рисунками и 21 таблицей. Список литературы содержит 12 отечественных и 208 иностранных источников.

Во введении автор четко формулирует актуальность, цель исследования, основные задачи в логической последовательности для достижения поставленной цели.

Глава 1 представляет собой обзор литературы, в котором автор приводит и анализирует основные ранее опубликованные в отечественных и зарубежных источниках сведения по изучаемой теме. Даётся подробная оценка имеющихся

данных о генетической природе кератоконуса, а также о возможных каузальных генетических вариантах в различных популяциях. Автор, в том числе, дает свою предположительную оценку о влиянии данных вариантов на развитие кератоконуса в российской популяции.

Глава 2 (материалы и методы) содержит детальную информацию о критериях включения и исключения, а также проведенных современных методах исследования и статистической обработки данных.

Глава 3 включает в себя результаты молекулярного-генетического исследования. Автор описывает результаты генотипирования на отобранные варианты пациентам I.А (с наличием кератоконуса, $n=70$) и I.Б (с достоверным его отсутствием $n=100$). Все полученные результаты были обработаны в программе Unipro UGENE. Из восьми генетических вариантов, отобранных для проведения генотипирования, у пациентов с кератоконусом выявлены статистически достоверные отличия от лиц без кератоконуса в частоте встречаемости хотя бы одной аллели только для двух вариантов - rs1536482 в гене *COL5A1* и rs2721051 вблизи гена *FOXO1*. Различия в представленности аллелей варианта rs1324183, расположенного между генами *MPDZ* и *NF1B*, также заметны, однако не достигают уровня статистической значимости ($p=0,06$). Для данных генетических вариантов и их комбинаций были рассчитаны параметры чувствительности, специфичности, относительного риска и отношения шансов. Автор отмечает, что в результате исследования было зафиксировано, что при обнаружении одного из вариантов rs1536482 и rs2721051 исследование может обеспечить показатель чувствительности 0,81. Вместе с тем, коэффициент специфичности равен 0,5. Маркер с таким показателем специфичности не может быть применен в клинической практике. Комбинация маркеров rs1536482 и rs2721051 у исследуемого обеспечивает слишком низкие показатели чувствительности, что указывает на то, что она встречалась лишь у незначительного процента исследуемых больных с кератоконусом. Соискатель заключает, что на основании полученных результатов невозможно выделить вариант (или их комбинацию), которая могла бы гарантировать диагностику развития клинических проявлений

кератоконуса. Однако, несмотря на это, автор подчеркивает, что согласно полученным данным, показатели наличия аллелей rs1536482 и rs2721051 были достоверно выше в группе I.A у пациентов с кератоконусом, чем в контрольной группе (I.Б) - 81,4% против 50% ($p = 0,0001$), а детекция одного из маркерных аллелей повышает относительный риск кератоконуса в 2,58 раза (RR).

Для проведения оценки значимости полученных результатов по сравнению с европейскими популяциями автором в данной главе был проведен мета-анализ имеющихся литературных данных и данных выполненного диссертационного исследования в российской популяции. В результате сравнения частот встречаемости маркерных аллелей в российской популяции и популяциях европейского происхождения, соискатель обнаружил, что варианты rs1536482, rs7044529, rs2721051 по данным мета-анализа имели сопоставимые результаты, что делает локусы, в которых они расположены, перспективными для дальнейших исследований.

Глава 4 посвящена разработке модифицированной техники ГППК с фемтосопровождением и созданием интрастромальных тоннелей, анализу интраоперационных осложнений, а также клинико-функциональным результатам ГППК с фемтосопровождением по различным методикам. Автор подчеркивает, что в основе как стандартной техники ГППК с фемтосопровождением, так и модифицированной техники с формированием интрастромальных тоннелей лежит успешное создание «большого пузыря» («БП») - расслоение резидуальной стромы и ДМ, что не только снижает количество интраоперационных осложнений, но также существенно сокращает время проведения хирургического вмешательства и, как следствие, время пребывания пациента в наркозе.

В разделе «Заключение» автор приводит всестороннюю оценку полученных результатов, демонстрирует способности к обобщению материала.

Выводы диссертации логично вытекают из результатов исследования и соответствуют поставленным цели и задачам.

Практические рекомендации подчеркивают значение данной работы для науки и практики.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертации опубликовано 3 печатных работы, из них 2 - в научных журналах, рецензируемых ВАК РФ и 1 печатная работа в издании, индексируемом в Scopus, получен 1 патент на изобретение.

Работа прошла апробацию на конференциях, конгрессах всероссийского и международного уровней.

Содержание автореферата полностью соответствует материалам и тексту, изложенным в самой диссертации.

Замечания по работе

Принципиальных замечаний по диссертационному исследованию Белодедовой А.В. нет. Все замечания были учтены диссертантом в процессе исследования. Объем выборки, использованной для проведения молекулярно-генетического исследования генотипов в российской популяции, довольно скромный для проведения подобных исследований: он представлен 170 пациентами. Этот недостаток компенсируется проведенным автором мета-анализом. Кроме того, следует отметить как положительный тот факт, что автор в полной мере оценивает ограничения этой части исследования и не предлагает прямо переносить полученные результаты в клиническую диагностическую практику.

Заключение по работе

Диссертация Белодедовой Александры Владимировны «Диагностика и хирургическое лечение кератоконуса на основе углубленного изучения генетических аспектов заболевания и фемто-ассистированной кератопластики» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методологическом уровне.

По актуальности темы, научной новизне, объему проведенных исследований и значимости полученных результатов диссертационная работа Белодедовой Александры Владимировны «Диагностика и хирургическое лечение кератоконуса на основе углубленного изучения генетических аспектов заболевания и фемто-ассистированной кератопластики» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.07 – глазные болезни и 03.02.07 – генетика, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени.

Официальный оппонент

доктор биологических наук, доцент,
заведующий лабораторией эпигенетики
ФГБНУ «Медико-генетический
научный центр имени академика
Н.П. Бочкова» (ФГБНУ «МГНЦ»)



Стрельников Владимир Викторович

«25» февраля 2020 г.

адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1

телефон: +7-499-612-00-19

адрес электронной почты: vstrel@list.ru

Подпись Стрельникова В.В. заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «МГНЦ», к.м.н.



Воронина Екатерина Сергеевна