

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор
ФГБУ «МНИИ ГБ
им.Гельмгольца»
Минздрава России,
член-корр. РАН,
д.м.н., проф. Нероев В.В.



«18» ноября 2016 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертационной работы
Ердякова Алексея Константиновича
на тему «Роль циклооксигеназ в развитии конканавалин-
индуцированной пролиферативной витреоретинопатии у крыс»,
представленной на соискание учёной степени кандидата
биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология»

Актуальность исследования

Диссертационная работа А.К.Ердякова представляет собой комплексное фундаментальное исследование, посвященное изучению роли циклооксигеназ в развитии пролиферативной витреоретинопатии (ПВР). ПВР является тяжелой патологией, приводящей к слепоте, и характеризуется миграцией клеток пигментного эпителия, глии и иммунокомпетентных клеток на поверхность сетчатки и их пролиферацией, что в конечном счете приводит к образованию эпиретинальных мембран. Через некоторое время клетки, формирующие мембрану, начинают проявлять сократительную способность. Это приводит к образованию фиксированных складок отслоенной сетчатки с выраженным ее укорочением. Наиболее эффективным способом лечения ПВР считают хирургический, но даже после тщательного удаления мембран с поверхности сетчатки частота рецидивов велика, в

особенности, в течение первых трех месяцев после операции. Кроме этого, заболевание диагностируют уже в момент обнаружения сформировавшихся эпи- и/или субретинальных мембран. В связи с этим, особенно актуальным является изучение механизмов развития данного заболевания на экспериментальных моделях с целью выявления новых мишеней фармакологического воздействия и разработки методов профилактики и лечения ПВР.

В патогенезе заболевания особое значение отводится факторам, организующим очаг воспаления. Однако остается неясным, может ли воспаление напрямую приводить к развитию ПВР. Кроме этого, не изучена роль метаболитов арахидоновой кислоты в активации пролиферативных процессов в сетчатке. В связи с этим, диссертационная работа Ердякова А.К. является актуальной и может характеризоваться как перспективное, интересное и значимое исследование для широкого круга специалистов: физиологов, патофизиологов, офтальмологов.

Новизна исследования и ценность полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнения. В ходе исследования впервые создана оригинальная конканавалиновая модель, в которой воспалительная реакция приводит к активации пролиферации и синтетической активности клеток сетчатки, что в конечном счете сопровождается развитием ПВР. Впервые разработаны критерии оценки состояния глаза и сетчатки с учетом специфики данной модели. Впервые показано, что инициализация воспаления и применение ингибиторов метаболического каскада арахидоновой кислоты в начальный период развития воспаления изменяет профиль продукции циклооксигеназы-2 различными слоями сетчатки. Это говорит о

наличии положительной обратной связи между простагландинами и продукцией циклооксигеназы-2. Кроме этого, впервые выявлено, что применение именно ингибитора циклооксигеназ, а не фосфолипазы A2, разобщает взаимосвязь между экспрессией мРНК простагландинсинтаз и циклооксигеназ, в большей степени вызывает улучшение общего состояния глаза и сетчатки, снижает явление миграции и предотвращает развитие пролиферативной витреоретинопатии. Показано неоднозначное влияние глюкокортикостероида триамцинолона на состояние глаза и сетчатки в конканавалиновой модели воспаления.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов. Рекомендации по использованию результатов

Полученные соискателем данные можно охарактеризовать как имеющие фундаментально-прикладной характер. С одной стороны, показано, что циклооксигеназы продуцируются различными слоями сетчатки по-разному, а также выявлен контур регуляции их продукции. С другой стороны, на разработанной модели конканавалин-индуцированного внутриглазного воспаления с использованием оригинальных критериев состояния сетчатки и глаза можно изучать механизмы функционирования сетчатки, мишени фармакологического воздействия и эффективность фармакотерапии. Кроме этого, результаты диссертационной работы позволяют рассматривать нестероидные противовоспалительные средства в качестве группы препаратов, рекомендуемых для профилактики и лечения воспалительных заболеваний сетчатки, в том числе, пролиферативной витреоретинопатии. Эти данные имеют несомненный практический интерес для клиницистов.

Наряду с этим, основные научные положения могут быть использованы для преподавания ряда фундаментальных дисциплин в медицинских и биологических вузах, в частности, нормальной физиологии, патологической физиологии, биохимии, клеточной биологии и т.д.

Разработанная модель конканавалин-индуцированной ПВР у крыс и введенные критерии оценки состояния глаза и сетчатки внедрены и успешно используются в научных целях на кафедре физиологии и общей патологии ФФМ МГУ как для изучения процессов протекания воспалительной реакции в тканях глаза, так и для разработки новых терапевтических подходов в лечении различных глазных заболеваний воспалительной этиологии. Результаты работы используются для обучения студентов в курсах физиологии и патологической физиологии. Экспериментальная работа и анализ получаемых результатов включены в обучающий план кафедры физиологии и общей патологии ФФМ МГУ.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Ердякова А.К. изложена на 158 страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц, 29 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, четырех глав собственных результатов, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 323 источника, из них 12 отечественных и 311 зарубежных.

Во введении автор обосновывает актуальность и целесообразность проведения данного научного исследования, формулирует цель и задачи, положения, выносимые на защиту, описывает научную новизну полученных результатов и научно-практическую значимость работы, внедрение в практику, апробацию

работы, сведения об имеющихся публикациях, а также объем и структуру диссертации.

Первая глава представляет собой обзор литературы, изложенный на 32 страницах. Автор кратко описывает современные представления об этиологии и патогенезе пролиферативной витреоретинопатии, функции различных метаболитов арахидоновой кислоты в норме и при воспалении, а затем переходит к подробному повествованию об участии различных клеток глаза и регуляторных факторов в реализации внутриглазного воспаления и пролиферативной витреоретинопатии. В этой части обзора автор рассматривает клетки ретинального пигментного эпителия, глиальные (в особенности, клетки Мюллера) и стволовые клетки сетчатки, клетки стекловидного тела, перициты и эндотелиоциты, указывает их функции в норме и при развитии внутриглазного воспаления. В заключительной части обзора перечислены возможные подходы к моделированию внутриглазного воспаления и пролиферативных заболеваний сетчатки, проведен их сравнительный анализ. Особое внимание уделено конканавалину – веществу, с помощью которого моделируется внутриглазное воспаление в настоящем исследовании.

Вторая глава – «Материал и методы исследования» – содержит подробную информацию, позволяющую воспроизвести все проводимые эксперименты. В работе использовали применяемый в офтальмологической практике блокатор фосфолипазы А2 триамцинолон и ингибитор циклооксигеназ лорноксикам. Протокол проведения исследования составлен корректно. Препараты вводили интравитреально и затем системно в начальный период развития воспалительной реакции, поскольку работа посвящена изучению механизмов активации

пролиферативных процессов. Глазное дно изучали методом непрямой офтальмоскопии. Глаза энуклеировали на различных экспериментальных сроках для осуществления гистологического анализа состояния сетчатки в срезах, окрашенных гематоксилин-эозином. Кроме этого, проводили иммуногистохимическое окрашивание срезов на циклооксигеназы обеих изоформ для изучения динамики их продукции хориоидеой и слоями сетчатки. В отдельной серии экспериментов извлекали витреоретинальные блоки для осуществления анализа экспрессии мРНК генов простагландинсинтаз и циклооксигеназ методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени. Все используемые методы являются адекватными для решения поставленных задач. Статистический анализ результатов выполнен на современном уровне согласно приведенным валидным критериям.

Главы 3-6 содержат информацию о результатах исследования. Стоит отметить, что каждая глава в своем конце содержит раздел обсуждения результатов, что удобно ввиду большого количества полученных данных.

Третья глава диссертационной работы посвящена разработке оригинальной конканавалиновой модели внутриглазного воспаления и ПВР у крыс. Показано, что введение конканавалина приводит к активации пролиферативных процессов в сетчатке и формированию эпиретинальных мембран. Установлена взаимосвязь между активацией воспаления и развитием пролиферативной витреоретинопатии.

Четвертая глава посвящена изучению влияния блокаторов каскада арахидоновой кислоты на динамику развития конканавалин-индуцированного внутриглазного воспаления и ПВР у крыс.

Показано, что блокирование именно циклооксигеназ приводит к улучшению состояния хориоидеи и сетчатки в конканавалиновой модели ПВР. Оценен показатель миграции ядер в срезах, окрашенных гематоксилин-эозином. Выявлено, что применение лорноксикама в начальный период развития воспаления в большей степени, чем применение триамцинолона способствует поддержанию уровня миграции ядер на уровне группы с введением только физиологического раствора.

В пятой главе представлены результаты по изучению продукции белков циклооксигеназ обеих изоформ хориоидеи и отдельными слоями сетчатки в конканавалиновой модели воспаления, а также влияние ингибиторов метаболизма арахидоновой кислоты на этот процесс. Показано, что конканавалин-индуцированное воспаление в большей степени приводит к изменению продукции циклооксигеназы второго типа. В особенности ярко это выражено на первые сутки после провокации воспалительной реакции, когда циклооксигеназа-2 появляется в хориоидеи, где ее нет в норме, и ее количество увеличивается в ряде слоев сетчатки по сравнению с группой интактного контроля. Оба препарата нормализуют уровни второй циклооксигеназы на первые сутки эксперимента и на 56-е сутки эксперимента. На 7-е сутки продукция циклооксигеназы-2 падает в ядерных слоях вне зависимости от экспериментальной группы. Стоит обратить внимание, что все полученные результаты не остаются без объяснения и четко вписываются в центральную линию рассуждений о механизмах развития внутриглазного воспаления и ПВР.

В шестой главе описаны результаты по изучению экспрессии мРНК генов циклооксигеназ и простагландинсинтаз

витреоретинальными блоками крыс в конканаватиновой модели ПВР, а также влияние ингибиторов метаболизма арахидоновой кислоты на этот процесс. Показана значимость витреоретинального интерфейса в поддержании процессов регуляции функций сетчатки даже в условиях внутриглазного воспаления. Тем не менее, увеличение экспрессии мРНК генов простагландинсинтазы E2 и циклооксигеназы-1 в группе с применением триамцинолона с учетом результатов гистологического анализа, описанных в 4 главе, позволяют сделать вывод о том, что ингибирование метаболического каскада арахидоновой кислоты в начальный период воспаления приводит к неоднозначному влиянию на процессы инициации ретинальной пролиферации и развития ПВР. Интересным является тот факт, что лорноксикам разобщает взаимосвязь между экспрессией мРНК генов простагландинсинтаз и циклооксигеназ, что соискатель также рассматривает как положительный эффект противовоспалительной терапии.

В заключении соискатель обобщает все полученные данные и выстраивает четкую линию рассуждений о месте и участии системы циклооксигеназ в активации ретинальной пролиферации и развитии ПВР. После заключения следуют выводы.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов

Диссертационное исследование А.К. Ердякова выполнено с помощью современных методов, адекватных поставленной цели. Объем экспериментального материала является достаточным, а дизайн эксперимента – продуманным. Статистическая обработка данных выполнена на высоком уровне с применением современных методов. Научные исследования Ердякова А.К. неоднократно докладывались и обсуждались на конференциях как российского,

так и международного уровня. По материалам диссертации автором опубликовано 18 печатных работ, в том числе 3 статьи, из них 2 – в центральных рецензируемых журналах из списка ВАК РФ, 1 патент РФ на изобретение.

Содержание диссертации полностью соответствует указанной специальности 03.03.01 – физиология. Содержание автореферата полностью отражает полученные результаты и выводы диссертации.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

1. На чем основан выбор объема вводимых препаратов? Отмечали ли Вы повышение внутриглазного давления после их введения?

2. Не считаете ли Вы, что разработанную вами модель было бы корректнее рассматривать как модель увеального воспаления с пролиферативными проявлениями?

3. Триамцинолон хорошо зарекомендовал себя при лечении глазных болезней. Какие опасности Вы видите в его применении при ПВР?

Принципиальных замечаний, снижающих ценность представленного исследования, нет.

Заключение

Таким образом, диссертация Ердякова Алексея Константиновича на тему «Роль циклооксигеназ в развитии конканавалин-индуцированной пролиферативной витреоретинопатии у крыс», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология», выполненная под руководством кандидата биологических наук С.А.Гавриловой, является научно-квалификационной работой, представляющей собой научное достижение, связанное с раскрытием роли

циклооксигеназ в механизмах активации пролиферативных процессов в сетчатке и развитии пролиферативной витреоретинопатии. Диссертация имеет важное значение для развития клеточной физиологии сетчатки. По своей актуальности, объему, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК Министерства образования и науки РФ (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор А.К. Ердяков заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология».

Отзыв рассмотрен и утвержден на совместном заседании отдела патофизиологии и биохимии и отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 4 от 17 ноября 2016 г.

Начальник отдела патофизиологии и биохимии
МНИИ ГБ им.Гельмгольца, д.б.н. проф.

Чеснокова Н.Б.

Врач отдела патологии сетчатки и зрительного нерва
МНИИ ГБ им.Гельмгольца, к.м.н.

Охоцимская Т.Д.

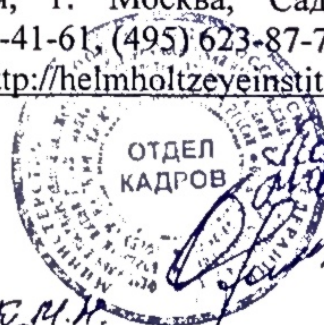
Федеральное государственное бюджетное учреждение Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "МНИИ ГБ им. Гельмгольца" Минздрава России)

Адрес: 105062, Российская Федерация, г. Москва, Садовая-Черногрозская ул., д. 14/19. Тел.: (495) 623-41-61, (495) 623-87-73.

Е-mail: kanc@igb.ru, сайт: <http://helmholtzeyeinstitute.ru>

Заверяю

Ученый секретарь
Московского научно-
исследовательского
института глазных
болезней им.Гельмгольца



Людмила заверяю, слича

К.М.Н.

В диссертационный совет Д 501.001.93, созданный на базе ФГБОУ
ВО «Московский государственный университет имени М.В.
Ломоносова» (119234, Москва, Ленинские горы 1, строение 12)

СВЕДЕНИЯ

о ведущей организации, представившей отзыв по диссертации
Ердякова Алексея Константиновича на тему «Роль циклооксигеназ в
развитии конканавалин-индуцированной пролиферативной
витреоретинопатии у крыс», представленной на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности
03.03.01 – физиология

Полное и сокращенное название организации	Федеральное государственное бюджетное учреждение Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "МНИИ ГБ им. Гельмгольца" Минздрава России)
ФИО, ученая степень, ученое звание руководителя ведущей организации	Нероев Владимир Владимирович, чл.-корр. РАН, доктор медицинский наук, профессор
ФИО, ученая степень, ученое звание, должность, отрасль науки, специальность сотрудника, составившего отзыв ведущей организации	Чеснокова Наталья Борисовна, д.б.н. (биохимия – 03.01.04), профессор, начальник отдела патофизиологии и биохимии МНИИ ГБ им. Гельмгольца. Охотимская Татьяна Дмитриевна, к.м.н. (глазные болезни – 14.01.07), врач отдела патологии сетчатки и зрительного нерва МНИИ ГБ им. Гельмгольца
Список основных публикаций работников ведущей организации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет	1. Нероев В.В., Цапенко И.В., Зуева М.В., Рябина М.В., Чиковани К.Р. Морфофункциональные изменения сетчатки и ретинального пигментного эпителия у больных центральной серозной хориоретинопатией на фоне длительной системной стероидной терапии // Российский офтальмологический журнал. 2012; 5 (3): 34-38. 2. Ченцова Е.В., Пак Н.В., Зуева М.В., Цапенко И.В., Полтавцева Р.А., Александрова М.А., Сухих Г.Т. Влияние трансплантации

нейральных стволовых клеток на процессы регенерации сетчатки в эксперименте // Российский офтальмологический журнал. 2012; 5 (4): 83-88.

3. Хорошилова-Маслова И.П., Лепарская Н.Л., Набиева М.К., Андреева Л.Д. Разработка патогенетически обоснованной стандартной экспериментальной модели пролиферативной витреоретинопатии, индуцированной цитокинами // Российский офтальмологический журнал. 2013; 6 (1): 78-80.

4. Зуева М.В., Цапенко И.В., Рябина М.В., Охочимская Т.Д., Гринченко М.И. Изменение функции нейронов сетчатки и глиальных клеток мюллера у больных сахарным диабетом 2-го типа при лечении диабетической ретинопатии ингибитором ангиотензинпревращающего фермента // Вестник офтальмологии. 2013; 129 (3): 44-47.

5. Катаргина Л.А., Осипова Н.А. Основные принципы экспериментального моделирования ретинопатии недоношенных на животных // Российская педиатрическая офтальмология. 2014; 1: 56-60.

6. Нероев В.В., Колчин А.А., Зуева М.В., Киселева Т.Н., Рябина М.В., Цапенко И.В. Изменение функциональной активности сетчатки и гемодинамики глаза у пациентов с тяжелыми стадиями диабетической ретинопатии // Российский офтальмологический журнал. 2014; 7 (3): 19-26.

7. Слепова О.С., Нероев В.В., Захарова Г.Ю., Кондратьева Ю.П., Куликова И.Г., Андриюшин А.Е. Концентрация цитокинов в субретиальной жидкости глаз, прооперированных по поводу регматогенной отслойки сетчатки, как фактор прогрессирования периферических витреохориоретинальных дистрофий в парном глазу // Российский офтальмологический журнал. 2014; 7 (3): 44-

49.

8. Зуева М.В., Арапиев М.У., Цапенко И.В., Ловпаче Д.Н., Маглакелидзе Н.М. Функциональная активность ганглиозных клеток парво- и магноцеллюлярной систем сетчатки и снижение толщины ВНВС при нормальном старении и начальной ПОУГ // Новости глаукомы. 2015; 1: 115-118.

9. Денисова Е.В., Слепова О.С., Катаргина Л.А., Петровская М.С., Куликова И.Г. Цитокины во влаге передней камеры глаза и их роль в патогенезе пролиферативных осложнений у детей с эндогенными увеитами // Российский офтальмологический журнал. 2015; 8 (3): 5-9.

10. Хорошилова-Маслова И.П., Лепарская Н.Л., Набиева М.М., Андреева Л.Д. Экспериментальное моделирование пролиферативной витреоретинопатии (экспериментально-морфологическое исследование) // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015; 159 (1): 112-114.

11. Зуева М.В., Арапиев М.У., Цапенко И.В., Ловпаче Д.Н., Маглакелидзе Н.М., Лантух Е.П. Морфофункциональные особенности изменения ганглиозных клеток сетчатки при физиологическом старении и в ранней стадии глаукомы // Вестник офтальмологии. 2016; 132 (1): 36-42.

12. Чеснокова Н.Б., Безнос О.В., Лозинская Н.А., Бейшенова Г.А., Нестерова Т.В. Влияние инстилляций мелатонина на характер течения экспериментального увеита и биохимические процессы в слезной и внутриглазной жидкостях // Биомедицинская химия. 2016; 62 (2): 164-168.

13. Чеснокова Н.Б., Безнос О.В., Бейшенова Г.А.. Влияние инстилляций мелатонина и дексаметазона на клиническое течение увеита и биохимические процессы во влаге передней камеры // Российская педиатрическая офтальмология. 2016; 11 (1): 27-32.

	14. Катаргина Л.А., Чеснокова Н.Б., Безнос О.В., Осипова Н.А., Витер Б.В. Экспериментальное исследование патогенеза ретинопатии недоношенных как перспективное направление поиска новых медикаментозных подходов к ее профилактике и лечению // Российский офтальмологический журнал. 2016; 9 (1): 68-72.
--	---

Адрес ведущей организации:

Индекс	105062
Объект	ФГБУ "МНИИ ГБ им. Гельмгольца" Минздрава России
Город	Москва
Улица	Садовая-Черногрозская
Дом	14/19
Телефон	(495) 623-41-61
E-mail	kanc@igb.ru
Web-сайт	http://helmholtzeyeinstitute.ru

Ведущая организация подтверждает, что соискатель не является ее сотрудником и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе ведущей организации или в соавторстве с ее сотрудниками

Ученый секретарь
ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца»,
к.м.н.

Е.Н. Орлова



Подпись заверено
Е.Н. Орлова
спечск