

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора медицинских наук Темнова Андрея Александровича на

диссертационную работу Тихонович Марины Валерьевны

«Обоснование использования нестероидной противовоспалительной терапии для профилактики развития пролиферативной витреоретинопатии», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.07 – глазные болезни и 14.03.03 – патологическая физиология

**Актуальность темы диссертации.** Пролиферативная витреоретинопатия (ПВР) это финальная стадия развития регматогенной отслойки сетчатки и ряда других патологических состояний глаза, которая характеризуется избыточным воспалением и образованием соединительнотканых мембран, вызывающих слепоту. В настоящее время на этапе формирования мембран проводят только хирургическое лечение этой патологии глаза, но и оно не является надёжным, т.к. в послеоперационном периоде ПВР часто рецидивирует, приводя к повторной отслойке сетчатки. Нередко встречается многократное повторное развитие мембран и это уже ведет к стойкой потере зрения пациентом.

Так как в основе развивающегося патологического процесса лежит воспалительная реакция, проявляющаяся наличием альтерации, экссудации и пролиферации, то для повышения эффективности хирургического лечения ПВР его сочетают с применением стероидного противовоспалительного препарата- триамцинолона ацетонид. Однако оказалось, что включение этого препарата в терапию ПВР приводит к неоднозначной оценке результатов по рецидивам заболевания, сопровождается побочными эффектами и увеличивает вероятность развития эндофталмита. Выше изложенное убеждает в том, что поиск новых подходов к профилактике ПВР, особенно после хирургического вмешательства у пациентов с повышенной реакционной способностью, нарушенным иммунитетом и слаботекущим воспалительным процессом, является актуальной проблемой современной

офтальмологии.

Для повышения эффективности медикаментозной терапии ПВР необходимо четкое понимание патогенетических механизмов развития воспаления при ПВР. Между тем, до сих пор остаются не изученными ключевые механизмы развития этого процесса; в частности, отсутствует ответы на такие вопросы: какие воспалительные факторы участвуют в формировании мембран на разных этапах заболевания, какие медиаторы воспаления синтезируются в самих мембранных, какие процессы они запускают или поддерживают, а также какова эффективность регуляторного воздействия на эти процессы нестериоидных противовоспалительных препаратов, которые пока не используются в офтальмологии для коррекции ПВР.

Диссертационная работа Тихонович Марины Валерьевны «Обоснование применения нестериоидной противовоспалительной терапии для профилактики развития пролиферативной витреоретинопатии» посвящена изучению роли провоспалительных факторов в динамике развития ПВР и обоснованию целесообразности применения нового нестериоидного противовоспалительного препарата (лорноксикама) для профилактики данного заболевания. Всё выше изложенное даёт мне полное право признать, что диссертация Тихонович М.В. выполнена на актуальную тему. Однако работа Тихонович М.В. характеризуется не только актуальностью темы исследования. Её отличает фундаментальный подход к выявлению цепи процессов, происходящих в глазу при развитии ПВР, чёткая постановка цели и задач исследования, а также применение комплекса современных и адекватных методов исследования клинического и экспериментального материала, что и предопределило научную новизну проведенного исследования и практическую значимость полученных результатов.

**Научная новизна работы.** Впервые было доказано, что в развивающихся при ПВР эпиретинальных мембранных на поздних стадиях заболевания экспрессируются циклооксигеназы первого и второго типов (ЦОГ-1 и ЦОГ-2), которые синтезируют провоспалительные

простагландины; кроме того, на поздних стадиях ПВР экспрессируются нейротрофины BDNF и NGF и эндотелиальный фактор роста сосудов VEGF, которые способствуют поддержанию воспаления в глазу и росту мембран. Была установлена прямая корреляционная зависимость между экспрессией ЦОГ-1, VEGF и BDNF и на этом основании автор предположила, что использование нестероидных противовоспалительных средств может оказаться эффективным для профилактики развития пролиферативной витреоретинопатии. Для проверки выдвинутого предположения автором была создана диспазная модель пролиферативной витреоретинопатии и разработаны критерии для оценки состояния глаза и изменений сетчатки в данной модели, основанные на результатах офтальмоскопических и морфологических исследований ПВР на ранних и поздних стадиях развития заболевания. На созданной модели ПВР автор впервые исследовала действие нестероидного противовоспалительного препарата (лорноксикам) на состояние глаза и на состояние морфологических показателей сетчатки и хориоидеи. Впервые автор сравнила влияние нестероидного противовоспалительного препарата (лорноксикам) и стероидного противовоспалительного препарата (триамцинолона ацетонид) на состояние животных и их глаз, изучив морфологические изменения сетчатки и хориоидеи, в том числе выраженность и частоту образования пролиферативных мембран. Автор впервые изучила изменения экспрессии провоспалительных циклооксигеназ в сетчатке и хориоидее на разных стадиях развития ПВР в диспазной модели у крыс и экспериментально доказала преимущества и более высокую эффективность раннего применения нестероидного противовоспалительного препарата (лорноксикам) для профилактики развития ПВР по сравнению со стероидным противовоспалительным препаратом (триамцинолона ацетонид).

**Теоретическая и практическая значимость работы** Полученные автором клинические данные об экспрессии провоспалительных, трофических и ростовых факторов эпиретинальными мембранами на поздней стадии развития ПВР и данные о динамике изменений экспрессии

проводоспалительных циклооксигеназ в слоях сетчатки и в хориоидее на ранних и отдалённых стадиях развития заболевания при его моделировании позволяет признать воспаление ведущим патологическим процессом на всех этапах развития ПВР. Полученные результаты позволили выработать гипотезу о том, что подавление синтеза провоспалительных простагландинов на ранних сроках развития заболевания снизит уровень воспаления и уменьшит процессы фиброзирования и роста мембран. В опытах *in vivo* с моделированием ПВР доказано, что подавление циклооксигеназного звена воспалительной реакции путём введения нестероидного противовоспалительного препарата - лорноксикама является перспективной стратегией терапевтической профилактики развития ПВР у пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки; эта стратегия будет способствовать также уменьшению частоты рецидивов ПВР после хирургического удаления мембран с поверхности сетчатки. В опытах с моделированием ПВР установлено, что стероидный противовоспалительный препарат – триамцинолона ацетонид – не должен использоваться интравитреально при остром воспалении в глазу, т.к. на ранних сроках развития ПВР он усиливает экспрессию циклооксигеназы-1 в хориоидее и в слоях сетчатки, содержащих ядра. Автором создана адекватная модель ПВР, которая может быть использована для лабораторного (преклинического) скрининга новых лекарственных препаратов и для разработки новых терапевтических путей лечения пролиферативных витреоретинальных заболеваний глаза.

**Общая характеристика диссертационной работы.** Работа построена по традиционному плану и изложена на 173 страницах компьютерного текста. Она содержит: введение, обзор литературы, главу, описывающую изучаемые объекты и методы исследования, четыре главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, список принятых сокращений и список цитированной литературы. Список литературы включает 265 источников, преимущественно зарубежных публикаций. Работа хорошо и достаточно полно документирована, содержит 22 таблицы и 25 иллюстраций (графики, электрофорограммы,

гистологические препараты) и даёт ясное представление о большом объёме выполненных исследований, а также об уникальности полученных результатов. Все иллюстрации выполнены в цвете и очень качественно. Достаточный объём клинического и экспериментального материала, включающего результаты ПЦР - анализа мембран, полученных в результате хирургического лечения 11 пациентов (11 глаз) с регматогенной отслойкой сетчатки, осложненной ПВР на поздних стадиях болезни, а также результаты экспериментов, проведенных на 300 крысах с грамотно спланированными протоколами исследования и применением большого арсенала современных и адекватных методов исследования (В-метод сканирования, биометрия глаза, непрямая офтальмоскопия с видеорегистрацией глазного дна и стекловидного тела крыс, ПЦР-анализ, иммуногистохимическое окрашивание) позволяют мне признать полученные автором результаты обоснованными и достоверными. Достоверность результатов, сформулированных в виде научных положений и выводов, подтверждена применением комплекса статистических методов. Так для оценки межгрупповых различий качественных переменных был использован метод  $\chi^2$ -квадрат или точный критерий Фишера. Для оценки межгрупповых различий количественных переменных использовался многофакторный вложенный дисперсионный анализ с построением смешанной линейной модели и с последующими попарными сравнениями методом наименьшей значимой разницы Фишера. Для оценки межгрупповых различий порядковых переменных и количественных переменных, не подчиняющихся нормальному распределению, использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Корреляция между параметрами определялась методом ранговой корреляции по Спирмену. Грамотное применение методов статистического анализа позволило автору дать объективную оценку полученным результатам и обеспечить логичность выводов о целесообразности раннего применения нестероидного противовоспалительного препарата - лорноксикама, который, подавляя

активность циклооксигеназного звена воспалительной реакции, способствовал снижению активности процессов фиброзирования и роста мембран на поверхности сетчатки, т.е. способствовал профилактике развития ПВР. Диссертационная работа Тихонович М.В. - это первое в нашей стране исследование, в котором на основании выявленных механизмов патогенеза ПВР осуществлена научно-обоснованная разработка новой стратегии терапевтической профилактики этого заболевания. Достоинством этой работы является чёткость построения работы с учётом современных представлений о ведущей роли воспаления в патогенезе ПВР, логичность и последовательность изложения результатов исследования, а также высокий уровень доказательности, обеспечиваемый применением комплекса современных адекватных медико-биологических методов исследования.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранной темы, определяет цель и задачи исследования, излагает научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, формулирует положения, выносимые на защиту, приводит сведения об апробации основных положений диссертации, ее структуре и публикациях.

В первой главе «Обзор литературы» автор представляет материал, исходя из современных представлений об определяющей роли фактора воспаления, и анализирует различные аспекты его участия в развитии ПВР. Вначале даются общие представления о роли воспаления в развитии ПВР, рассматриваются клетки, участвующие в генезе заболевания, и факторы, способствующие миграции и пролиферации данных клеток. Затем разбирается роль метаболитов арахидоновой кислоты (в том числе циклооксигеназы-1 и циклооксигеназы-2) в нормальной и патологической физиологии глаза и в особенности сетчатки; рассматриваются вопросы участия факторов роста (VEGF, BDNF, NGF) в развитии сетчатки, их роль в поддержании её нормального функционирования у взрослого человека, а также участие данных факторов в ангиогенезе и нейропротекции при нормальных и патологических состояниях сетчатки.

Поскольку одной из задач диссертационной работы являлось создание

экспериментальной модели ПВР и разработка критериев для оценки состояния глаза автор проанализировала более 25 способов моделирования ПВР у экспериментальных животных, дала описание и обоснование преимуществ использования протеолитического фермента диспазы для формирования ПВР у крыс. В обзоре также дана достаточно подробная информация о двух противовоспалительных препаратах с различным механизмом действия (триамцинолона ацетонид и лорноксикам), указаны их достоинства и недостатки, выявленные при лечении различных патологий, в том числе и глазных. Поскольку интравитреальное применение триамцинолона ацетонида - стероидного противовоспалительного препарата часто приводит к неблагоприятным последствиям, а применение лорноксикама - нестериоидного противовоспалительного препарата в офтальмологической практике не производилось, то становится понятной актуальность решения тех целей и задач, которые были сформулированы во Введении настоящего исследования.

Обзор написан на основании современных источников, он актуален, читается с интересом и свидетельствует как о хорошей медико-биологической подготовке автора, так и о необходимости использования фундаментального подхода для решения стоящих задач, который и был предпринят автором.

Глава вторая «Материалы и методы исследования» имеет два раздела: клинический и экспериментальный. В клиническом разделе автором дана характеристика 11 пациентов с ПВР, подробно описано проведение хирургического удаления мембран для дальнейшего исследования полученных образцов методом ПЦР анализа. В экспериментальном разделе соискателем представлены детальные протоколы проведения исследований на крысах ( $n=300$ ) с диспазной моделью ПВР и дано описание отдельных групп животных. Исчерпывающие описаны морфологические, иммуно-гистохимические методы анализа, метод обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, а также методы статистической обработки полученных результатов, которые позволили автору получить принципиально новые данные, составившие научную новизну и

практическую значимость работы.

В третьей главе «Результаты анализа экспрессии ростовых, трофических и провоспалительных факторов в эпиретинальных мембранах» автор представила результаты ПЦР анализа образцов мембран, полученных у пациентов с поздними стадиями ПВР. В работе впервые была обнаружена экспрессия ЦОГ-1, ЦОГ-2, VEGF, BDNF и NGF в такого типа мембранах, проведен корреляционный анализ их экспрессии и выявлены новые положительные взаимозависимости. Полученные результаты позволили автору предположить, что уменьшение экспрессии провоспалительной ЦОГ-1 приведет к уменьшению пролиферативной активности мембран.

В четвертой главе «Результаты разработки крысины диспазной модели пролиферативной витреоретинопатии и критериев оценки состояния сетчатки и хориоидей» детально описана отработка диспазной модели ПВР у крыс и разработка оригинальных критериев оценки состояния сетчатки на разных сроках развития заболевания. Важно, что автором были апробированы три разные дозы фермента и произведена оценка полученных результатов на разных сроках эксперимента. На основе статистических сравнений показано, какие эффекты зависят от дозы вводимого препарата, как меняется сетчатка (в целом и её отдельные слои) в ходе эксперимента, а также как, с какой скоростью и частотой происходит развитие мембран в каждой экспериментальной группе животных. Приведено убедительное обоснование выбора конкретной (минимальной) дозы интравитреально вводимого фермента диспазы и временной точки окончания эксперимента.

Пятая глава «Результаты действия противовоспалительных препаратов на динамику развития пролиферативной витреоретинопатии у крыс» посвящена описанию результатов применения стероидного и нестериодного препаратов на разных сроках развития ПВР. Результаты детально описаны в тексте и представлены в виде графиков и таблиц. Отмечено, какие эффекты препаратов были статистически значимы. Автор обратила особое внимание на то, что само проведение интравитреальной инъекции сопровождается изменениями со стороны сетчатки, но не приводит к развитию мембран на её поверхности. Полученные результаты показывают, что применение

лорноксикама даёт в отношении ПВР выраженный профилактический эффект и уменьшает тяжесть течения экспериментально вызванной патологии.

В шестой главе «Результаты действия противовоспалительных препаратов на экспрессию циклооксигеназ в диспазной модели пролиферативной витреоретинопатии у крыс» описана динамика изменений экспрессии циклооксигеназ в ходе развития заболевания. Охарактеризовано действие противовоспалительных препаратов на экспрессию ЦОГ-1 и ЦОГ-2. Показано, что лорноксикам, в отличие от триамцинолона ацетонида, достоверно и быстро нормализует экспрессию циклооксигеназы первого типа. Автор логично заключает, что, скорее всего, это является одним из механизмов, благодаря которому данный препарат оказался столь эффективен для профилактики ПВР.

В разделе «Заключение» на высоком теоретическом уровне произведен анализ полученных в ходе исследования результатов. Автор показала, что использование триамцинолона ацетонида для профилактики ПВР не эффективно; более того, в ходе исследования подтвердились данные о том, что данный препарат токсичен для эндотелия сосудов и способствует развитию эндофталмита. Напротив, использование лорноксикама оказалось полезным и эффективным и по мнению автора его применение в клинике будет более перспективным, чем использование других терапевтических средств, имеющихся на данный момент в офтальмологии.

Выводы диссертации являются логическим завершением проведенных исследований, изложены ясно, соответствуют поставленным задачам и не вызывают сомнений.

Практические рекомендации вытекают из результатов проведенной работы и конкретизируют наиболее значимые научные и практические результаты.

В 16 публикациях, из которых 4 в журналах, рецензируемых ВАК РФ, и 2 патента РФ на изобретение, а также в автореферате полностью отражено основное содержание диссертационной работы. Материалы диссертации

неоднократно обсуждались на российских и зарубежных научно-практических конференциях и получали положительную оценку

Принципиальных замечаний по содержанию и изложению работы не имею. Замечания касаются оформления отдельных глав. Так, в конце «Обзора литературы» желательно было бы подытожить состояние проблемы и указать вопросы, которые ждут своего решения и которые будут решаться в данной работе. В Главе 2 было бы желательно выделить отдельный раздел «Методы исследования», где было бы дано описание всех методов, использованных в работе, а не распределять их по группам исследований. А так возникает вопрос - почему нет описания метода ПЦР в клиническом разделе работы. Кроме того, встречаются опечатки и стилистические погрешности. Считаю, однако, уместным ещё раз подчеркнуть, что высказанные замечания не принципиальны, не умаляют несомненные достоинства работы и неискажают сущность её содержания.

### **Заключение**

Диссертационная работа Тихонович Марины Валерьевны «Обоснование использования нестероидной противовоспалительной терапии для профилактики развития пролиферативной витреоретинопатии» представляет собой законченное самостоятельно выполненное, научно-квалификационное исследование, в котором решена важная научно-практическая задача – установлены пусковые и поддерживающие провоспалительные механизмы развития пролиферативной витреоретинопатии, а также предложен новый эффективный нестероидный противовоспалительный препарат для профилактики и лечения этого заболевания. Полученные данные имеют принципиальное значение и для офтальмологии и для патофизиологии, т.к. раскрывают фундаментальные патогенетические механизмы формирования ПВР и указывают новое направление поиска эффективных медикаментозных препаратов для профилактики и лечения этого заболевания в клинике

По актуальности темы исследования, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов, а также по объему и высокому качеству проведенных исследований - диссертационная работа

Тихонович Марины Валерьевны полностью соответствует требованиям предъявляемым ВАК Министерства образования и науки РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.), а её автор несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.07 – глазные болезни и 14.03.03 – патологическая физиология.

Заведующий научной лабораторией клеточных  
и физико-химических медицинских технологий  
ГБУ здравоохранения города Москвы «НИИ скорой  
помощи имени Н.В. Склифосовского  
Департамента здравоохранения города Москвы»,  
доктор медицинских наук

Темнов А.А.

« 1 » ноября 2016 г.

Подпись Темнова А.А. заверяю

Ученый секретарь института  
доктор медицинских наук

Булава Г.В.



Юридический и почтовый адрес: 129090, Москва, Большая Сухаревская  
площадь, д. 3  
Телефон: 8 (495) 680-41-54  
Сайт в интернете: <http://sklifos.ru>  
E-mail: [sklifos@inbox.ru](mailto:sklifos@inbox.ru)