

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Анисимова Сергея Игоревича на диссертационную работу Халимова Азата Рашидовича «Молекулярные и клеточные механизмы ультрафиолетового сшивания роговицы», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.02 – биофизика, 14.03.03 – патологическая физиология

Актуальность проблемы.

Мировая статистика последних десятилетий свидетельствует о росте эктатических заболеваний роговицы, в частности кератоконуса. Эктазии роговицы развиваются преимущественно у лиц молодого трудоспособного возраста, имеют прогрессирующее течение, приводящее в итоге к риску инвалидизации по зрению и социальной дезадаптации.

При кератоконусе патологический процесс приводит к изменению структуры всех слоев роговицы с нарушением морфологии клеток, архитектоники и плотности коллагеновых фибрилл стромы. Особую роль в этом процессе играет снижение количества внутри и межмолекулярных связей коллагена, которое отражается на функциональном состоянии фиброзных оболочек глаза.

В настоящее время наиболее распространенной операцией, направленной на приостановку прогрессирования кератэктазий и стабилизацию зрительных функций, является ультрафиолетовый кросслинкинг (сшивание) роговицы. Следует отметить, что патогенетические эффекты ультрафиолетового (УФ) сшивания весьма разнообразны и не в полной мере освещены в научной литературе. Требуют анализа особенности кросслинкинги индуцированной корнеальной трансформации. Мало изучены молекулярные механизмы иммунобиологических и морфофункциональных изменений роговицы. В связи с этим необходимо дальнейшее исследование этой медико-биологической проблемы, наряду с обоснованием и разработкой

целенаправленных мероприятий для повышения эффективности и безопасности проводимой фототерапии.

Актуальность исследования Халимова А.Р., посвященного изучению особенностей УФ сшивания роговицы на основе оценки биометрических, биомеханических, морфологических, биохимических и иммунных изменений, выявленных на различных экспериментальных моделях, не вызывает сомнений.

Цель исследования заключается в установлении механизмов ультраструктурной трансформации и изменения метаболизма роговицы при ультрафиолетовом воздействии. Для достижения поставленной цели автором сформулированы и успешно решены семь задач исследования, которые определили формат и структуру диссертационной работы. При этом, полученные результаты исследования имеют бесспорную научную новизну.

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

Полученные диссертантом результаты основаны на детальном анализе обширного экспериментального материала (96 крыс линии Вистар, 164 кролика Шиншилла, 45 морских свинок и 80 мышей) и клинических наблюдений (92 пациента).

Работа Халимова А.Р. имеет многоплановый характер. Для решения поставленных задач автором выполнен большой объем экспериментальных и клинических наблюдений. Протоколы исследований включали в себя изучение биометрических и биомеханических показателей роговицы, ее биохимических, морфологических и электронномикроскопических особенностей в условиях воздействия УФ излучения и при выполнении УФ кросслинкинга с применением разработанных рибофлавинсодержащих растворов (изоосмотического, Декстралинк, Риболинк, Хитолинк). Локальное и системное воздействие процедуры на организм оценивалось определением уровня цитокинов и по состоянию процессов прооксидантно – антиоксидантного статуса.

Методологические подходы, использованные автором, адекватны заявленным в работе задачам, что позволило разработать оригинальную

концепцию, подтверждающую возможность развития дисбаланса процессов ремоделирования и нарушения метаболизма в роговице при выполнении УФ кросслинкинга с применением различных растворов рибофлавина.

Исследования подкреплены хорошо продуманным протоколом экспериментов, адекватной статистической обработкой полученных результатов, которые логично изложены, хорошо иллюстрированы и квалифицированно проанализированы.

Выводы свидетельствуют о решении поставленных задач, при этом последовательно и доступно передают смысл выполненного диссертационного исследования. Практические рекомендации, сформулированные в диссертации, логичны, закономерно вытекают из содержания работы. Автором внедрены в медицинскую практику медицинские изделия для лечения больных с заболеваниями роговицы.

Основные положения диссертации опубликованы в 54 научных работах, из них 19 – в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, 1 – в цитируемом зарубежном издании. Автором опубликована монография, посвященная использованию современных методов лечения заболеваний роговицы, получены 14 патентов Российской Федерации на изобретения и полезные модели. Результаты диссертации были неоднократно доложены на российских и зарубежных конгрессах, научно-практических конференциях и съездах.

Достоверность и научная новизна исследований.

Обширный объем экспериментального материала и клинических наблюдений, включенных в исследование, соответствует уровню диссертации на соискание ученой степени доктора наук. Достоверность результатов и обоснованность выводов базируется на адекватности экспериментальных моделей, достаточном объеме исследований, обработке полученных данных с применением пакета программ Statistica 6.1 и Excel 2010.

Результаты исследования отражены в 6 положениях, выносимых на защиту, 8 выводах, которые также согласуются с задачами работы, ее целью и в полной мере отражают основные результаты диссертации.

Автором получены новые сведения об особенностях динамики биометрических и биомеханических показателей роговицы, обоснованы подходы к применению разработанных рибофлавинсодержащих растворов при выполнении УФ кросслинкинга. Показано, что УФ протекторный эффект исследованных растворов зависит от степени проницаемости рибофлавина в роговицу.

Выявлено усиление процессов свободно-радикального окисления и изменение метаболизма продуктов ПОЛ в интраокулярных тканях животных на фоне ослабления системы антиоксидантной защиты при воздействии УФ излучения с рибофлавином.

В эксперименте получены новые данные об ультраструктурной организации коллагеновых волокон передних и средних слоев стромы, связанные с увеличением диаметра фибрилл и снижением плотности фибриллярной упаковки после УФ сшивания роговицы.

Оригинальные результаты конфокальной микроскопии позволили установить прижизненные морфологические особенности роговицы животных после УФ воздействия и УФ сшивания с растворами рибофлавина, характеризующиеся набуханием стромы, снижением количества кератоцитов в ее передних и средних слоях, с последующим восстановлением архитектоники роговицы при отсутствии повреждения эндотелия.

Показано что УФ сшивание роговицы сопровождается кратковременным местным повышением содержания провоспалительных цитокинов и трансформирующих факторов роста, характеризуется локальным ослаблением антиоксидантного статуса при отсутствии системных изменений.

На основании выполненных исследований автором сформулированы принципы предупреждения развития осложнений при проведении УФ кросслинкинга с использованием различных рибофлавинсодержащих растворов.

Значимость диссертации для науки и практики.

Диссертационное исследование Халимова А.Р. относится к числу работ, имеющих как фундаментальный, так и прикладной характер. Автором

получены данные относительно молекулярных и клеточных механизмов формирования кросслинкингиндуцированных изменений в роговице, а также патогенетические последствия негативного интракорнеального воздействия ультрафиолета (370 нм). Выявленные таким образом особенности представляют основу для разработки новых подходов к коррекции дисбаланса прооксидантно-антиоксидантной систем и изменений цитокинового статуса.

Результаты диссертационной работы соискателя имеют весомое значение для науки и практики – могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах офтальмологии, патологической физиологии, курсах повышения квалификации врачей и оформлены в виде учебно-методических пособий. Оригинальные результаты исследований защищены Патентами РФ.

Ценность данной работы заключается в том, что автором зарегистрированы и внедрены: устройство офтальмологическое для УФ облучения роговицы «УФалинк» (рег.удостоверение №ФСР 2009/05489) и протектор роговицы «Декстралинк» (рег.удостоверение №ФСР 2010/09071). В настоящее время указанные медизделия применяются более, чем в 120 клиниках Российской Федерации.

Оценка содержания диссертации.

Диссертационный материал изложен на 280 страницах машинописного текста, содержит 33 таблицы, 71 рисунок. Список литературы включает 451 источник, из которых 317 иностранных. Объем и структура диссертации отвечают требованиям ВАК при Минобрнауки РФ и соответствуют действующему ГОСТ Р 7.0.11-2011.

Во введении обоснована актуальность исследования, обращено внимание на нерешенных вопросах по данной проблематике, определены цель и задачи, которые дают представление о научном замысле и дизайне работы. Формулировка положений, выносимых на защиту, не вызывает возражений.

Обзор литературы (глава 1) основывается на современных литературных сведениях, написан весьма обстоятельно и вводит в курс

проблемы, при этом подчеркивает актуальность и своевременность проведенного исследования.

В разделе «Материал и методы» (глава 2) автором дана исчерпывающая информация о методологическом оснащении работы, которое соответствует поставленной цели и задачам.

Результаты собственных исследований представлены в 3 главах характеризуются системным и подробным изложением.

В 3-й главе автором представлены и проанализированы основные вопросы исследования: прочностно-механические и биометрические характеристики роговиц при воздействии на них УФ излучения и УФ обработке с рибофлавинсодержащими растворами; динамика уровня рибофлавина в тканях глаза в зависимости от размеров корнеальной дезэпителизации; величина ультрафиолетовой абсорбции роговицей пропитанной фотосенсибилизатором. Эксперименты проводились как *ex vivo*, так и *in vivo*.

Диссертантом установлено увеличение биомеханической прочности роговиц после рибофлавин-ультрафиолетового сшивания. Было показано, что использование предложенных растворов ведет к различной степени пропитывания стромы рибофлавином и изменению линейных размеров роговицы. Выявлена протекторная роль прекорнеальной рибофлавиновой пленки. Рекомендована площадь дезэпителизации роговицы (8-9 мм) при проведении процедуры УФ кросслинкинга. Предложен дифференцированный подход к использованию разработанных растворов рибофлавина в зависимости от исходной корнеальной толщины. Предлагаемая автором точка зрения приоритетна, базируется на аргументированных фактах, открывает перспективы для дальнейших исследований.

В 4-ой главе изучено влияние УФ сшивания на динамику процессов свободно-радикального окисления в тканях глаза, приведены результаты морфологического и электронномикроскопического исследований роговицы экспериментальных животных. Показательны прижизненные

морфологические исследования роговицы, проведенные методом конфокальной микроскопии.

Процесс сшивания коллагеновых фибрилл, опосредованный активными формами кислорода, может иметь и продолжительные патологические последствия, что было доказано посредством гистологического и ультраструктурного анализа. Установлена наиболее активная фаза патогенетического воздействия УФ сшивания на 3-7 сутки после процедуры, после чего выраженность процесса постепенно снижалась, однако последствия кросслинкинга в виде отека стромы отмечались до 90 суток наблюдений.

Глава 5 посвящена изучению динамики локального и системного уровней цитокинов и антиоксидантного статуса пациентов с кератоконусом после стандартного и трансэпителиального УФ кросслинкинга роговицы. Показано, что в раннем послеоперационном периоде иммунные реакции носили более выраженный местный характер, в целом не вызывая значимых системных сдвигов, что свидетельствует о безопасности как стандартной, так и менее травматичной трансэпителиальной техники УФ сшивания. При этом установлено, что УФ воздействие на роговицу с рибофлавином приводит к дальнейшему транзиторному истощению локальной антиоксидантной системы.

В 6-ой главе автор проводит обсуждение результатов исследования, привлекая данные современной литературы. Научные положения работы, которые автор затрагивает в этом разделе диссертации, грамотно аргументированы и согласованы как с результатами собственных исследований, так и многочисленными литературными данными.

Практические рекомендации и приложения диссертации подчеркивают ценность работы, в частности, в ее внедрении в медицинскую практику новых отечественных средств для лечения заболеваний роговицы.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе А.Р. Халимова нет. К числу недостатков работы можно отнести следующее: в обзоре литературы излишне подробно описываются патогенетические механизмы кератоконуса, некоторые графики дублируют содержание таблиц. Указанные

комментарии ни коим образом не умаляют научно-практической значимости работы.

Автореферат диссертации полностью соответствует требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011 и характеризует суть работы.

Вместе с тем, в порядке дискуссии и уточнения общей концепции работы хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

1. В связи с чем были предприняты исследования системного оксидантного и иммунного статуса у пациентов с кератоконусом поскольку известно, что процедура УФ кросслинкинга ограничивается локальным воздействием на роговицу?

2. Какова сравнительная эффективность методик насыщения стромы рибофлавином – с дезэпителизацией (Epi-Off) и трансэпителиальной (Epi-On)?

Заключение.

Таким образом, диссертация Халимова Азата Рашидовича «Молекулярные и клеточные механизмы ультрафиолетового сшивания роговицы» на соискание ученой степени доктора биологических наук является законченной научно-квалификационной работой, в которой автором на основании полученных фундаментальных знаний осуществлено решение проблемы исследования молекулярных и клеточных механизмов формирования функционально-метаболических изменений, развивающихся в результате ультрафиолет- и кросслинкинг- индуцированных воздействий на роговицу.

Совокупность полученных автором результатов можно квалифицировать как значимое достижение в области патологической физиологии, биофизики, офтальмологии, имеющее большое научно-практическое значение. Разработанные и внедренные новые медизделия, предложенные подходы к фототерапии заболеваний роговицы направлены на повышение ее эффективности и безопасности.

По своей актуальности, методическому уровню, новизне, научно-практической значимости полученных результатов диссертационная работа Халимова А.Р. полностью удовлетворяет требованиям, предъявляемым Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук и соответствует предписаниям п. 9

«Положения о присуждении ученых степеней» от 24 сентября 2013г. № 842 (в редакциях постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016г. № 335; от 02.08.2016г. № 748), а ее автор заслуживает присуждения ему искомой ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.02 - биофизика и 14.03.03 - патологическая физиология.

Профессор кафедры глазных болезней
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
медико-стоматологический университет
им. А.И. Евдокимова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук, доцент

 Анисимов Сергей Игоревич

Подпись д.м.н., профессора Анисимова С.И. заверяю:

Ученый секретарь
ФГБОУ ВО «Московский государственный
медико-стоматологический университет
им. А.И. Евдокимова» МЗ РФ
доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный врач РФ



Ю.А.Васюк

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный медико-
стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
Адрес организации: 127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1.
Телефон: 8-916-676-66-01, 8 (495) 609-67-00. E-mail: xen3744@yandex.ru