

О Т З Ы В

официального оппонента, академика РАН, д.м.н., профессора Тотоляна Арега Артемовича на диссертационную работу Саркисян Нарине Гришаевны на тему: «Молекулярно-генетический анализ факторов врожденного иммунитета как обоснование локальной иммунотерапии пародонтита», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Актуальность избранной темы.

Актуальность исследования не вызывает сомнения и обусловлена неуклонной тенденцией роста заболеваний челюстно-лицевой области в современном мире, высоким процентом потери зубов, физическим и эстетическим ухудшением качества жизни, что подтверждает необходимость данной научной работы для решения одной из важнейших медико-социальных проблем – сохранения целостности организма.

Болезни пародонта, в т.ч. пародонтит, являются одними из распространенных заболеваний челюстно-лицевой области. Многочисленные попытки решения терапии воспалительных заболеваний пародонта приводили лишь к временной ремиссии. Повторные обострения возникают спонтанно и практически не поддаются контролю со стороны пародонтологов.

Несмотря на значительное количество исследований, направленных на изучение этиологии и патогенеза пародонтита, до сих пор не выделены значимые маркеры развития заболевания.

Прогрессирование хронического пародонтита рассмотрено автором диссертационного исследования в контексте молекулярно-генетического анализа, дисрегуляции иммунной системы и формирования на этом фоне необратимого патологического процесса, повлекшего за собой потерю зубов. Обоснована роль нарушения функций иммунной системы в формировании и прогрессировании хронического пародонтита.

Показателем молекулярно-генетического состояния макроорганизма является его ответная реакция, проявляющаяся в характере воспалительного процесса. Именно этими факторами может определяться прогноз заболевания, длительность ремиссии, латентного течения пародонтита, вероятность потери зубов.

Недостаточная выработка противомикробных пептидов может быть важнейшим фактором, определяющим хроническое персистирование инфекции на

слизистых оболочках. Диссертационная работа, выполненная с акцентом на обеспечение первой линии защиты против первичного инфицирования и рецидивирования болезни путем ограничения распространения микроорганизмов и активации адаптивного иммунитета, является актуальной и значимой.

Особое внимание обращает на себя раздел исследования, связанный с поиском генетических маркеров-предикторов в генах врожденного иммунитета (TLR, дефенсинов, цитокинов). Полученные данные могут позволить прогнозировать развитие и тяжесть воспалительных болезней пародонта.

Поэтому предлагаемые методы диагностики и лечения пародонтита, применяемые до клинического манифестирования патологии в русле комплексного молекулярно-генетического анализа, перспективны и для дальнейших исследований.

При этом наиболее перспективными методами в силу их патогенетической универсальности и гомеостатической направленности терапевтического эффекта является применение локальных иммуномодулирующих препаратов.

Одним из терапевтических направлений при пародонтите является коррекция микробиоты в полости рта, но активное использование антисептических средств приводит к нарушению микрофлоры. Саркисян Н.Г. подошла к данной проблеме с учетом механизмов патогенеза и предложила физический метод снижения количества микроорганизмов в пародонтальных карманах путем локального воздействия ультрафиолета на ткани пародонта, тем самым предотвратить запуск воспалительного процесса. Данная методика действительно целесообразна, т.к. позволяет снизить риск побочных явлений, связанных с реакциями гиперчувствительности. В работе доказана актуальность применения гибкого световода для ультрафиолетового облучения, позволяющего воздействовать на труднодоступные участки пародонта.

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

Диссертационное исследование проведено с четкой логичной последовательностью изучения проблемы, цель отвечает рассматриваемой теме работы, а поставленные при ее выполнении задачи помогают в достижении цели.

Полученные в работе результаты позволяют считать поставленные задачи решенными, а цель достигнутой.

Используемые в исследовании методы современны, объем проведенных исследований достаточен для диссертационной работы.

В соответствии с поставленной целью обоснована необходимость иммунотерапии пародонтита на основании оценки молекулярно-генетических механизмов врожденного иммунитета и разработаны методы локальных терапевтических воздействий на ткани пародонта.

Научная новизна.

В работе автором впервые выявлен дисбаланс параметров врожденного иммунитета в тканях пародонта у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом, проявляющийся в повышении экспрессии гена паттерн-распознающего рецептора TLR-2 и в снижении экспрессии гена противомикробного пептида HBD-1, что является причиной нарушения защиты от патогенов.

Убедительно доказана роль молекулярно-генетических маркеров-предикторов (полиморфные аллели генов *TLR-2*, *HBD-1* и *TNFA*), ассоциированных с пародонтитом, которые позволяют до клинической манифестации заболевания проводить профилактические мероприятия.

Впервые доказано ключевое значение новой топической композиции для лечения пародонтита, включающая иммуностропные препараты. Проведена достоверная оценка эффективности разработанных композиций на модели хронического воспаления пародонта у лабораторных животных.

Наглядно продемонстрирована высокая клиническая эффективность применения разработанных терапевтических композиций топического применения у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом на основе глицерогидрогеля кремния с иммуностропами, позволяющая удлинить сроки ремиссии заболевания.

Важным достижением является разработка и апробация нового способа ультрафиолетового воздействия на ткани пародонта в труднодоступных местах с применением гибкого световода.

Усовершенствованные традиционные методы терапии пародонтита, включающие топические мероприятия с иммуномодулирующими средствами, и обоснованные показания их применения в различных стадиях патогенетического процесса являются важным вкладом в практическое здравоохранение.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Несомненно, данное исследование имеет как теоретическую, так и практическую значимость.

Разработанные и внедренные в практику усовершенствованные методы топической терапии пародонтита с использованием иммуномодулирующих препаратов – рекомбинантного IL-1 β и азоксимера бромид в композиции с глицерогидрогелем кремния – позволят повысить эффективность лечения у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. Использование терапевтических композиций приведет к увеличению продолжительности ремиссии.

Разработанный метод ультрафиолетового воздействия для антисептической обработки пародонтальных карманов с использованием усовершенствованного проводника для портативного прибора эффективен при использовании в труднодоступных участках тканей пародонта и заменяет химические антисептические растворы, не нарушая микробиоты полости рта.

Полученные автором результаты могут быть использованы в практической работе врачей-стоматологов, пародонтологов, врачей-стоматологов общей практики, клинических иммунологов, а также в преподавании соответствующих разделов на теоретических и клинических кафедрах медицинских вузов.

Публикации.

Соискатель имеет по теме диссертации 41 публикацию, в том числе: 22 – в изданиях, рецензируемых ВАК, 13 – в других изданиях, из них зарубежных – 5; монография – 1, получено 5 патентов РФ на изобретения. Общий объем публикаций – 20,39 печатных листа, авторский вклад – 80,13%.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора.

Достоверность полученных результатов исследования обеспечена обоснованностью исходных теоретических позиций, достаточным объемом материала, использованием широкого спектра адекватных клинических методов (проанализировано 1036 анкет, обследовано 360 пациентов), апробированных лабораторных тестов и сертифицированных наборов реагентов (проведен генетический анализ, определены иммунологические, микробиологические и вирусологические параметры), воспроизводимостью результатов доклинических и клинических исследований, применением современных методов и компьютерных программ статистического анализа полученных данных. Достоверность результатов подтверждена актом проверки первичной документации от 26 ноября 2017 года.

Доклиническое исследование безопасности и эффективности разработанных терапевтических композиций, включающее анализ гистологических срезов тканей пародонта у 75 лабораторных крыс линии Вистар, проводилось в соответствии с рекомендациями и этическими нормами, указанными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1985), с учетом положений Хельсинкской декларации, Всемирная медицинская ассоциация, 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине, 1999 г. Для использования биологического материала в научных целях и участия пациентов в исследовании подписано информированное добровольное согласие. Работа одобрена локальным этическим комитетом Уральского государственного медицинского университета (г. Екатеринбург).

Основные положения работы доложены и обсуждены на: 2 международной научно-практической конференции «Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий» (Екатеринбург, 2011); Всероссийских конгрессах «Стоматология Большого Урала» (Екатеринбург, 2012-2016); 67 и 68 Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (Екатеринбург, 2012, 2013); Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013); 15 международном конгрессе по иммунологии (Милан, Италия, 2013); Юбилейной научно-практической конференции,

посвященной 40-летию ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России «Современные проблемы иммунофармакологии, биотехнологии и цитокиновой регуляции» (Санкт-Петербург, 2014); 1 выездной университетской научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы стоматологии» (Санкт-Петербург, 2014); 9 Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г.Челябинске» (Челябинск, 2014); объединенном иммунологическом форуме (Екатеринбург, 2014); Российской научно-практической конференции «Актуальные вопросы стоматологии» (Челябинск, 2014); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы стоматологии» (Уфа, 2014, 2015); IV Европейском конгрессе по иммунологии (Вена, 2015); 9 окружной научно-практической конференции «Актуальные аспекты вирусных инфекций» (Екатеринбург, 2015); 33 научно-практической конференции «Актуальные проблемы стоматологии» (Москва, 2015); Евразийском форуме «Национальное здравоохранение: международный диалог» (Екатеринбург, 2015); Пермском научном форуме (Пермь, 2015); 70, 71 Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (Екатеринбург, 2015, 2016); Всероссийской конференции с международным участием «Экспериментальная и вычислительная биомедицина» (Екатеринбург, 2016); Московском международном форуме по костно-суставной патологии (Москва, 2016); 11 Сибирском конгрессе по челюстно-лицевой хирургии и стоматологии; Всероссийском симпозиуме «Новые технологии в стоматологии», (Новосибирск, 2016); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы стоматологии» (Санкт Петербург, 2017); 16 Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (2017); 14 конференции иммунологов Урала с международным участием (Челябинск, 2017); на совместном заседании сотрудников стоматологического факультета Уральского государственного медицинского университета 2 июня 2017.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, определение методологии и общей концепции

диссертационного исследования, основной идеи, цели и задач осуществлялось совместно с научными консультантами: д.м.н., проф., ЗДН РФ, г.н.с. лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН Тузанкиной И.А., зав. кафедрой терапевтической стоматологии Уральского государственного медицинского университета, д.м.н., проф. Ронь Г.И.

Автором лично разработан план и программа исследования, проведен анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, осуществлена статистическая обработка первичных данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на различных конгрессах, конференциях и форумах.

Характеристика работы.

Диссертация изложена на 270 страницах компьютерного текста. Иллюстрации представлены 16 таблицами и 60 рисунками. Диссертация включает: введение, главу обзора литературы, главу материалов и методов исследования, три главы результатов собственных экспериментальных и клинико-лабораторных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы. Обзор литературы включает 530 источников (337 отечественных и 193 зарубежных авторов).

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук: № гос. регистрации 01201352044 «Иммунологические механизмы онтогенеза человека и их роль в формировании патологических состояний» Института иммунологии и физиологии УрО РАН и программы научных исследований Уральского государственного медицинского университета, регистрационный номер 116033110047-9 «Теоретическое и клиническое обоснование новых диагностических, лечебных, профилактических, реабилитационных технологий в стоматологии».

Во «Введении» автор приводит актуальность и обоснование выбора темы, формулирует цель исследования, задачи для ее реализации и положения, выносимые на защиту. В обзоре литературы подробно освещаются данные о стоматологических

аспектах пародонтита, эпидемиологии, этиологии, патогенезе, клинических проявлениях хронического пародонтита, молекулярно-генетических механизмов патогенеза заболевания, роли противомикробных пептидов в развитии патологического воспалительного процесса в тканях пародонта.

В главе «Материалы и методы» представлены современные методы клинического, инструментального, лабораторного обследования пациентов. Для достижения цели и решения поставленных задач проведено исследование, которое состояло из экспериментального и клинического этапов, включало разработку новых иммуностропных композиций и терапевтического метода, основанного на использовании модернизированного устройства ультрафиолетового облучателя для воздействия в труднодоступных местах. В целом, автор использовал достаточный набор современных методов, обеспечивших надежность полученных результатов. Результаты исследований адекватно обработаны математически с использованием современных статистических программ.

Результаты собственных исследований описаны с 3 по 6 главы. Глава 3 посвящена клинико-иммунологической характеристике исследуемых пациентов, в ней подробно дана анамнестическая, клиническая, иммуногенетическая, вирусологическая оценка изучаемой патологии, определены уровни продукции цитокинов.

В главе 4 подробно описан поиск ассоциации маркеров в генах врожденного иммунитета с риском развития пародонтита, который является значимым для решения поставленных задач. Детально раскрыты ассоциации частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров в генах цитокинов TNFA (-308 G/A) и IL10 (-1082 A/G) с риском развития пародонтита, а также гена TLR-2 и DEFB1. При этом надо отметить, что автором использованы высокотехнологичные методы исследований, включая метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Глава 5 посвящена экспериментальному исследованию тканей пародонта при иммуностропных воздействиях на модели хронического воспаления пародонта у лабораторных животных. Структурные изменения в тканях пародонта у экспериментальных животных с моделированным пародонтитом без применения топических композиций, а также с применением рекомбинантного IL-1 β и с азоксимера бромидом подтверждены достаточным количеством гистологического

материала, характеризующегося функциональными и морфологическими изменениями в тканях пародонта у лабораторных животных.

В главе 6 в полном объеме отражены результаты применения новой комплексной терапии, дан сравнительный анализ клинико-микробиологической оценки эффективности ультрафиолетового облучения на ткани пародонта пациентов с различной степенью тяжести хронического пародонтита, а также проанализированы клинико-рентгенологические данные у пациентов с различной степенью тяжести хронического пародонтита при использовании комплексных методов терапии в стадии обострения и ремиссии.

Все это позволило автору разработать новые подходы комплексной терапии пародонтита, обосновать применение новых иммуностропных композиций.

Результаты исследований обобщены в главе «Заключение». Семь выводов диссертации четко сформулированы и непосредственно вытекают из собственных данных автора.

Автореферат диссертации полностью отражает материалы диссертационной работы.

Внедрение результатов исследования в практику.

Результаты исследования нашли применение при обучении в аспирантуре Института иммунологии и физиологии УрО РАН по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, по медицинским и биологическим наукам; в учебном процессе на кафедре терапевтической стоматологии Уральского государственного медицинского университета для студентов и слушателей факультета последипломого образования, а также Южно-Уральского и Тюменского государственных медицинских университетов. Полученная модель хронического пародонтита у животных используется в научных исследованиях при разработке новых лекарственных средств в лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН. Метод локального применения композиций с иммуностропными препаратами при хроническом генерализованном пародонтите внедрена в практику сети стоматологических клиник «Дента ОС» (г. Екатеринбург); терапевтического отделения ГАУЗ СО «Полевская стоматологическая поликлиника (г. Полевской, Свердловская обл.).

Замечания и вопросы.

Несомненным достоинством рассматриваемой диссертационной работы является четкое изложение представленного материала, однако в ходе изучения содержания работы возникли некоторые вопросы, носящие в целом дискуссионный характер, но требующие разъяснения:

1. Почему объем иммунологического обследования в основном заключался в определении иммунологических показателей периферической крови, а не в иммунологическом ротовой жидкости, в которой автор определяла только секреторный иммуноглобулин А? Почему в ротовой жидкости не стали определять другие, доступные для иммунологического анализа, показатели (например, цитокины, лизоцим, иммуноглобулины и т.д.)?
2. При проведении терапии пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом в стадии обострения пародонтальные карманы дополнительно обрабатывали ультрафиолетовым облучением, а только затем наносилась композиция с иммуностропным препаратом рекомбинантного IL-1 β или азоксимера бромидом. В то же время у пациентов группы сравнения ультрафиолетовое облучение при лечении хронического генерализованного пародонтита легкой, средней и тяжелой степени в стадии обострения не использовалось. По какой причине автор не сформировал группу сравнения, в которой пациенты получали бы только ультрафиолетовое облучение или ультрафиолетовое облучение в сочетании с последующей стандартной терапией?
3. При лечении больных генерализованным пародонтитом в каких случаях целесообразно назначить композицию с рекомбинантным IL-1 β , а в каких – композицию с азоксимера бромидом?

Указанные замечания и вопросы не влияют на позитивную оценку диссертационной работы.

Заключение.

Диссертационная работа Саркисян Нарине Гришаевны на тему «Молекулярно-генетический анализ факторов врожденного иммунитета как обоснование локальной иммунотерапии пародонтита», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология,

аллергология, представляет собой законченную квалификационную научно-исследовательскую работу, содержащую решение конкретной научной проблемы, важной для специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, медицинские науки, заключающейся в аналитической оценке молекулярно-генетических факторов врожденного иммунитета и фенотипических проявлений пародонтита с разработкой методов терапевтических воздействий на ткани пародонта с применением локальной иммунотерапии.

Работа по своей актуальности, научной новизне, научной и практической значимости, объему исследований отвечает требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям согласно раздела II «Положения о присуждении ученых степеней» (в ред. Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изм., утв. 21.04.2016 г. № 335, 02.08.2016 № 748) и может быть представлена к защите по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, медицинские науки. Автор диссертации заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент,
Академик РАН, доктор медицинских наук, профессор,
директор ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера, заведующий
лабораторией молекулярной иммунологии

А.А. Тотолян

Подпись д.м.н., проф., академика РАН Тотоляна А.А. заверяю
Ученый секретарь ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера, к.м.н.

Г.Ф. Трифонова

«06» ноября 2018 года



Тотолян Арег Артемович, академик РАН, д.м.н., профессор, директор Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии. Адрес: г. Санкт-Петербург, 197101, ул. Мира, д. 14. Телефоны: (812) 233-20-92, 233-08-56. e-mail: pasteur@pasteurorg.ru