

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор

А.А. Свистунов



20 24 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

на основании решения заседания кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Диссертация «Исследование молекулярно-генетических особенностей врожденного иммунного ответа при первичной открытоугольной глаукоме» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Кинкулькина Алия Ряшидовна, 1990 года рождения, гражданство Российской Федерации, окончила государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова

Министерства здравоохранения Российской Федерации в 2014 году по специальности «Лечебное дело».

В 2019 году зачислена в число аспирантов 1-ого курса на заочную форму обучения по основной профессиональной образовательной программе подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению 32.06.01 Медико-профилактическое дело.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов №1865/Аз выдана в ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

С 2012 года работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории молекулярной иммунологии в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.М. Мечникова» по настоящее время.

С 2019 года работает в должности старшего ординатора отделения врачебно-летней экспертизы филиала №1 федерального государственного бюджетного учреждения «Главный военный клинический госпиталь имени Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации по настоящее время.

Научные руководители:

Свитич Оксана Анатольевна - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Гаврилова Татьяна Валерьевна - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующая кафедрой офтальмологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Текст диссертации был проверен в системе «Антиплагиат» и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

По итогам обсуждения диссертационного исследования «Исследование молекулярно-генетических особенностей врожденного иммунного ответа при первичной открытоугольной глаукоме», представленного на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.2.7. Иммунология и 3.1.5. Офтальмология, принято следующее заключение:

- **Оценка выполненной соискателем работы**

Диссертация представляет собой законченное, самостоятельное исследование указанной темы и соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Проведена экспериментальная работа с целью изучения локальной экспрессии генов на модели дегенерации сетчатки на кроликах и ассоциации полиморфных маркеров генов *NLRP3*, *CASP1*, *eNOS*, *EDNRB* с риском развития глаукомы в сыворотке крови пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. Особое внимание привлекло сохранение локального ответа со стороны изучаемых компонентов инфламмосомного комплекса *NLRP3* и было показано, что полиморфные маркеры генов *NLRP3*, *CASP1*, *eNOS*, *EDNRB* могут рассматриваться как факторы, влияющие на вероятность развития глаукомы, а некоторые из них ассоциированы с определенной стадией заболевания. Таким образом, проведенная работа является научно-квалификационной работой, в которой определены прогностические маркеры первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ), являющиеся необходимыми для ранней диагностики заболевания и развития различных стадий.

- **Актуальность темы диссертационного исследования**

Глаукома является прогрессирующим заболеванием, в результате которого развивается оптическая нейропатия, приводящим к дисфункции и селективной потере ганглиозных клеток сетчатки, являющимся основной причиной снижения зрительных функций. Это сложное полиэтиологическое заболевание, где повышенное внутриглазное давление является основным фактором риска.

Показано, что механическое повреждение аксонов зрительного нерва, окислительный стресс и гипоксия способствуют патогенезу глаукомы, вызывая

митохондриальную дисфункцию в ганглиозных клетках сетчатки, активацию глии и нейровоспаление.

В последние годы наблюдается неуклонный рост заболеваемости первичной открытоугольной глаукомой, в том числе среди пациентов трудоспособного возраста. Несмотря на многочисленные исследования, заболевание считается практически неизлечимым, выявляется чаще всего на поздних стадиях и приводит к инвалидизации в результате снижения или полной утраты зрительных функций.

Современные данные об иммунопатогенезе ПОУГ расширили представление о значении окислительного стресса в нарушении регуляции иммунной активности при глаукоматозной дегенерации и роли оксида азота (NO) в регуляции кровообращения микроциркуляторного русла внутренних оболочек глаза и диска зрительного нерва (ДЗН). В научной литературе описана важная роль воспаления в развитии глаукомы. Среди факторов воспаления особое внимание уделяется инфламмасоме. До сих пор, однако, не проводились исследования, направленные на изучение взаимосвязи процессов окислительного стресса, эндотелиальной дисфункции и патогенетических механизмов воспаления, обусловленного факторами врожденного иммунитета, при глаукоме. Помимо этого, остаются не до конца изученными вопросы этиопатогенеза и факторов риска, обуславливающие течение и тяжесть заболевания. А выявление прогностических маркеров с целью осуществления ранней диагностики и профилактики ПОУГ является одним из актуальных направлений в медицине.

- **Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации**

Автору принадлежит ведущая роль в получении исходных данных и проведении научных экспериментов, личное участие в апробации результатов исследования, обобщении данных литературы, обработке полученных результатов и написании основных публикаций по выполненной работе. Личный вклад автора состоит в самостоятельном дизайне диссертационного исследования и выполнении всех лабораторных исследований, обработке и

статистическом анализе полученных результатов, а также непосредственном написании самой работы. Проведён подбор мРНК для определения экспрессии генов *NLRP3*, *CASP1* у кроликов и полиморфизма генов *NLRP3*, *CASP1*, *eNOS*, *EDNRB*. Подобраны условия для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала и проведения ПЦР-РВ. Выполнена оценка уровня экспрессии генов *NLRP3*, *CASP1* на модели *in vivo* (кролики с дегенерацией сетчатки). Полученные результаты сопоставлены с данными полиморфизма тех же генов у пациентов с ПОУГ. Также изучены ассоциативные связи полиморфизма генов *eNOS*, *EDNRB* у пациентов с ПОУГ.

- **Степень достоверности результатов проведенных исследований**

Результаты проведенных исследований получены с помощью иммунологических и статистических методик. Результаты исследования получены на сертифицированном оборудовании, обоснованы калибровки и показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях. Полученные результаты согласуются с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации. Обнаружен высокий уровень локальной экспрессии генов, кодирующих белки инфламмосомного комплекса *NLRP3* (*NLRP3*, *CASP-1*) в экспериментальной модели дегенерации сетчатки на кроликах, что указывает на важную роль инфламмосомного комплекса в иммунопатогенезе ПОУГ. В полиморфных маркерах *rs7525979* гена *NLRP3* и *rs530537* гена *CASP1* выявлены протективные генотипы и генотипы, ассоциированные с риском развития ПОУГ. Показано, что окислительный стресс является одним из ключевых звеньев в процессе дегенеративно-дистрофических изменений при ПОУГ. Выявлены аллели и генотипы полиморфных маркеров *T786C* (*rs 2070744*), *C774T* (*rs 1549758*), *Glu 298Asp* (*rs 1799983*) в гене *eNOS*, ассоциированных с развитием ПОУГ. Иммунопатогенетические механизмы эндотелиальной дисфункции опосредуют возникновение и тяжесть течения ПОУГ. Показаны статистически значимые ассоциации полиморфного маркера *rs 5351* гена *EDNRB* с развитием ПОУГ.

- **Научная новизна результатов проведенных исследований**

В работе сопоставлены данные результатов исследования уровня экспрессии маркеров инфламмосомного комплекса NLRP3, изученных на образцах сетчатки кролика с дегенерацией сетчатки, с распределением аллелей и генотипов полиморфных маркеров инфламмосомного комплекса у пациентов с ПОУГ. На основании результатов исследования пациентов с ПОУГ различных стадий и группы сравнения (пациенты без глаукомы) дана сравнительная оценка распределения аллелей и генотипов полиморфных маркеров в генах *eNOS*, *EDNRB*, *NLRP3*, *CASP-1*, белковые продукты которых участвуют в патогенетических механизмах ПОУГ, в том числе в зависимости от стадии заболевания ПОУГ. Представлены данные об ассоциации гаплотипов гена *eNOS* с риском развития ПОУГ, а также в зависимости от тяжести патологии. Определены прогностические маркеры в генах эффекторных молекул врожденного иммунитета, в том числе генов *eNOS*, *EDNRB*, инфламмосомного комплекса, ассоциированные с риском и с отсутствием риска развития ПОУГ и в зависимости тяжести заболевания.

- **Практическая значимость проведенных исследований**

В результате проведенного анализа определены гипотетические молекулярные механизмы патогенеза ПОУГ, которые могут найти применение при поиске новых предикторов других нейродегенеративных заболеваний глаз.

Полученные данные по ассоциации полиморфизма генов *eNOS*, *EDNRB*, *NLRP3*, *CASP1* с риском или отсутствием риска развития ПОУГ могут быть использованы в качестве прогностических маркеров развития данной патологии.

Сведения о влиянии единичных нуклеотидных замен в генах *eNOS*, *EDNRB*, *NLRP3*, *CASP1* смогут помочь врачу-офтальмологу выявить ранние изменения органа зрения и скорректировать тактику дальнейшего ведения пациента.

- **Ценность научных работ соискателя ученой степени**

Продемонстрировано сохранение локального ответа со стороны изучаемых компонентов NLRP3: высокая экспрессионная активность генов белков (NLRP3 и CASP-1) определялась во всех образцах тканевого комплекса

сетчатки и ретинального пигментного эпителия опытных глаз на поздних сроках (3 и 6 мес.) эксперимента. Кроме того, при исследовании полиморфных маркеров генов *NLRP3* и *CASP1* в венозной крови пациентов с ПОУГ также были выявлены значимые ассоциативные связи. Все это указывает на большую роль *NLRP3* и *CASP1* в иммунопатогенезе нейровоспаления и усилении нейродегенеративных процессов при ПОУГ. Показана роль окислительного стресса и эндотелиальной дисфункции при ПОУГ. Полученные в работе данные могут использоваться в дальнейшем в качестве прогностических маркеров при ПОУГ, а также для ранней диагностики развития различных стадий заболевания. Кроме этого, результаты исследования могут быть теоретической основой в вопросах фармакотерапии глаукомы.

- **Внедрение результатов диссертационного исследования в практику**

Основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации на тему: «Исследование молекулярно-генетических особенностей врожденного иммунного ответа при первичной открытоугольной глаукоме» внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Акт № 341 от 09.01.2024 г.

- **Этическая экспертиза научного исследования в Локальном этическом комитете (по медицинским и фармацевтическим наукам)**

Постановили: одобрить исследование в рамках диссертационной работы «Исследование молекулярно-генетических особенностей врожденного иммунного ответа при открытоугольной глаукоме» (исполнитель – Кинкулькина Алия Ряшидовна). Исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 15-24 от 06.06.2024 г.

- **Научная специальность, которой соответствует диссертация**

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 3.2.7. Иммунология. Результаты проведенного исследования соответствуют пункту паспорта специальности 3.2.7. Иммунология №1: «фундаментальные исследования, посвященные изучению строения, и функционирования иммунной системы, ее онто- и филогенеза», пункту №2: «изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии» и пункту №6: «разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов». Диссертационная работа соответствует специальности 3.1.5. Офтальмология. Результаты проведенного исследования соответствуют пункту паспорта специальности 3.1.5. Офтальмология №1: «изучение патогенеза, разработка и экспериментальное моделирование глазной патологии», пункту №2: «усовершенствование известных и разработка новых методов диагностики органа зрения и его придаточного аппарата» и пункту №3 «разработка методов профилактики заболеваний глаза и его придаточного аппарата».

- **Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем**

По результатам исследования автором опубликовано 10 работ, в том числе 3 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer), 2 иные публикации по теме диссертационного исследования, 5 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Научные статьи в научных изданиях, включенных в международные, индексируемые базы данных Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer:

- 1) Роль полиморфизма гена *eNOS* в иммунопатогенезе Первичной открытоугольной глаукомы / Свитич О.А., Кинкулькина А.Р., Авагян А.С., Гаврилова Т.В.// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2022. - Т. 99. № 1. - С. 54-62.

2) Ассоциация полиморфных маркеров в гене *eNOS* с риском развития Первичной открытоугольной глаукомы у жителей пермского края / Гаврилова Т.В., Кинкулькина А.Р., Авагян А.С., Свитич О.А. // Российский иммунологический журнал. - 2022. - Т. 25. № 1. - С. 83-92.

3) Исследование ассоциации аллелей и генотипов полиморфного маркера *T786C* гена *eNOS* при различных стадиях Первичной открытоугольной глаукомы / Гаврилова Т.В., Кинкулькина А.Р., Авагян А.С., Свитич О.А. // Российский офтальмологический журнал. - 2024. - Т. 17. № 1. - С. 28-31.

Иные публикации по теме диссертационного исследования:

1) Роль *NLRP3* в иммунопатогенезе нейродегенеративных заболеваний глаз / Балацкая Н.В., Гаврилова Т.В., Кинкулькина А.Р., Авагян А.С., Свитич О.А. // Российский иммунологический журнал. - 2023. - Т. 26. № 4. - С. 485-490.

2) Investigation of local expression of *NLRP3* inflammasome complex genes in modeling retinal degeneration in vivo / Neroeva N.V., Svitich O.A., Neroev V.V., Kinkulkina A.R., Balatskaya N.V., Sorozhkina E.S. // Medical Immunology (Russia). - 2023. - Т. 25. № 3. - С. 631-636.

Материалы конференций по теме диссертационного исследования:

1) Ассоциация полиморфизма гена *eNOS* с риском развития открытоугольной глаукомы / Кинкулькина А.Р., Авагян А.С. // В книге: Санкт-Петербургские научные чтения-2019. Тезисы VIII международного молодежного медицинского конгресса. Санкт-Петербург. - 2019. - С. 216-217.

2) Ассоциация полиморфизма гена *eNOS* с риском развития первичной открытоугольной глаукомы / Свитич О.А., Гаврилова Т.В., Кинкулькина А.Р., Авагян А.С. // В книге: New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology. Сборник тезисов молодых ученых в рамках международных студенческих школ Сеченовского Университета. Москва. - 2020. - С. 18.

3) Association of the *eNOS* gene polymorphism with the risk of open-angle glaucoma development / Svitich O.A., Gavrilova T., Kinkulkina A., Avagyan A., Zverev V. // Allergy. - 2020. - Т. 75. № S109. - С. 342.

4) Ассоциация полиморфизма гена *NLRP3* с риском развития первичной открытоугольной глаукомы / Свитич О.А., Гаврилова Т.В., Кинкулькина А.Р.,

Авагян А.С. // В книге: *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Epidemiology and Immunology*. Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН. Москва. - 2022. - С. 28.

5) Роль полиморфизма гена *eNOS* в развитии Первичной открытоугольной глаукомы / Авагян А.С., Кинкулькина А.Р., Свитич О.А. // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. - 2022. - Т. 21. № S2. - С. 108.

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на научных конференциях:

- 1) Научная конференция молодых ученых с международным участием "New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology" в рамках международных студенческих школ Сеченовского Университета (Москва, 11-12 марта 2020 года);
- 2) Международная научная конференция экспертов, молодых ученых и специалистов, посвященная актуальным вопросам микробиологии, вирусологии, иммунологии и эпидемиологии в диагностике, лечении и профилактике инфекционных и неинфекционных заболеваний (Москва, 03-04 июня 2022 года);
- 3) Научно-практическая конференция офтальмологов Пермского края «Актуальные вопросы глаукомы» (Пермь, 31 марта 2023 г.);
- 4) Восьмая научно-практическая школа-конференция «Аллергология и клиническая иммунология для практикующих аллергологов-иммунологов, инфекционистов, педиатров, терапевтов и гинекологов» (Сочи, 2-8 октября 2022 года);
- 5) Девятая научно-практическая школа-конференция «Аллергология, клиническая иммунология и инфектология для практикующих врачей» (Сочи, 1-7 октября 2023 года).

Заключение

Диссертация соответствует требованиям п. 21 Положения о присуждении ученых степеней в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом от 06.06.2022 г. № 0692/Р, и не содержит заимствованного материала без ссылки на автора(ов).

Первичная документация проверена и соответствует материалам, включенным в диссертацию.

Диссертационная работа Кинкулькиной Алии Ряшидовны «Исследование молекулярно-генетических особенностей врожденного иммунного ответа при первичной открытоугольной глаукоме» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.2.7. Иммунология и 3.1.5. Офтальмология.

Заключение принято на заседании кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Присутствовало на заседании 20 чел.

Результаты голосования: «за» – 20 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 1 от 19 августа 2024 г.

Председательствующий на заседании

Доктор биологических наук, профессор,
академик РАН, заведующий кафедрой
микробиологии, вирусологии и иммунологии
имени академика А.А. Воробьева
Института общественного здоровья
имени Ф.Ф. Эрисмана
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
имени И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)



В.В. Зверев