

## ОТЗЫВ

официального оппонента, профессора кафедры кожных и венерических болезней с курсом косметологи и медицинского института непрерывного образования Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», доктора медицинских наук, профессора Масюковой Светланы Андреевны на диссертацию Тарасовой Маргариты Валерьевны «Медиаторы иммунной системы и активность нейтрофилов при atopическом дерматите», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – «Патологическая физиология»

### Актуальность темы выполненной работы

В последние годы наблюдается широкое распространение atopического дерматита. Работа Тарасовой М.В. посвящена изучению разных аспектов патогенеза atopического дерматита: проблеме изучения функциональной активности нейтрофилов и влиянию медиаторов иммунной системы на развитие и течение atopического дерматита. Патогенез atopического дерматита связан с патологическими иммунными реакциями, медиаторами которых являются цитокины, инициирующие и поддерживающие воспалительный процесс в коже. При atopическом дерматите в патологический процесс вовлечены как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины. Важным звеном в патогенезе этого заболевания является сдвиг Th1/Th2-цитокинного профиля в сторону Th2-реакций, который сопровождается повышенной секрецией IgE. Имеющиеся в литературе данные о содержании различных цитокинов в сыворотке крови больных atopическим дерматитом в зависимости от тяжести течения достаточно противоречивы.

Большое внимание исследователей сейчас уделяется изучению лейкоцитарных сериновых протеаз в целом, и эластазы в частности, при различных кожных заболеваниях. Воспалительный процесс при atopическом дерматите также связан с активацией сериновых протеаз нейтрофильных

лейкоцитов, в частности лейкоцитарной эластазы. Процесс замедления восстановления тканей и в целом усиление иммунной реакции также связывают с уменьшением количества ее ингибиторов.

Все это определяет актуальность исследования Маргаритой Валерьевной содержания эластазы и ее ингибиторов, в частности  $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора ( $\alpha 1$ -ПИ) у больных atopическим дерматитом. Проведенное определение критериев оценки активности сериновой протеазы нейтрофилов – эластазы и активности  $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора в зависимости от тяжести течения является научно и практически значимым.

Нет единой точки зрения, касающейся функциональной активности нейтрофилов при atopическом дерматите. Недостаточно данных по уровню активности нейтрофилов в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей грибковой или бактериальной контаминации. Все это свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения роли нейтрофилов в развитии и хроническом течении atopического дерматита.

Изучение содержания противовоспалительных и провоспалительных цитокинов, функциональной активности нейтрофилов, лейкоцитарной эластазы и ее  $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора представляется актуальным для понимания патогенеза atopического дерматита. Представленное исследование является важным и своевременным, так как может решить проблему аллергического воспаления при atopическом дерматите, открывая путь разработке стратегии диагностики, лечения и профилактики данного заболевания.

### **Достоверность и новизна результатов**

Все исследования в представленной работе были проведены с достаточным количеством повторов, в контролируемых и стандартных условиях *in vitro* с проведением статистического анализа полученных

данных, что может свидетельствовать о высокой степени достоверности полученных результатов.

Для анализа измерения содержания в сыворотке крови ряда провоспалительных и противовоспалительных цитокинов Тарасова М.В. в диссертационной работе применяет иммуноферментные тест-системы. При этом наглядно показывает уровень цитокинов у пациентов с различной тяжестью течения атопического дерматита во время обострения и ремиссии.

Весьма удачный эксперимент с определением активности лейкоцитарной эластазы и  $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора проводили спектрофотометрическим энзиматическим методом с помощью двулучевого спектрофотометра позволил получить новые данные о сравнительной активности человеческой лейкоцитарной эластазы сыворотки крови и сравнительную антитриптическую активность при различных формах атопического дерматита в стадиях обострения и ремиссии. Кроме того, автором представлены корреляционные связи между активностью эластазы,  $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора и SCORAD при обострении атопического дерматита разной степени тяжести.

Автор проводит оценку спонтанной и индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции клеток крови больных атопическим дерматитом и анализ полученных данных в зависимости от стадии заболевания и тяжести клинической картины. В качестве индуктора хемилюминесценции автор использовал фактор некроза опухолей альфа, дрожжи *Candida tropicalis* и опсонизированный зимозан.

Проводит количественное измерение уровня генерации супероксидного аниона нейтрофилами при стимуляции fmlp и форболовым эфиром. Сравнивает результаты исследования нейтрофилов крови, взятой натощак и при физиологическом состоянии, после приема пищи. У больных атопическим дерматитом изменена кинетика активности нейтрофилов в ответ на физиологические стимулы (приём стандартного завтрака) при

почасовом измерении генерации супероксидного аниона, автор подтверждает это результатами научного исследования.

Методом проточной цитометрии Маргарита Валерьевна определяла фагоцитарную активность нейтрофилов в присутствии тестовых штаммов дрожжей *Rhodotorula spp.* и проводила изучение экспрессии рецептора TREM-1 в генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови доноров и больных атопическим дерматитом при стимуляции бактериальным пептидом fmlp.

Представленные в диссертационной работе результаты экспериментальных исследований написаны четко, хорошо иллюстрированы, данные являются достоверными и оригинальными, не вызывая сомнений.

#### **Общая структура и содержание диссертационной работы**

Диссертация Тарасовой М.В. написана по общепринятому плану, логично построена, изложена на 145 страницах машинописного текста, представлены все необходимые по требованиям ВАК разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Диссертационная работа аккуратно оформлена и хорошо иллюстрирована, содержит 13 рисунков и 16 таблиц. В списке цитируемой литературы приведено 184 источника, из которых 35 написаны на русском языке и 149 - на английском.

Во введении четко сформулированы общая характеристика работы, цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Эта часть диссертации дает ясное представление о теме работы и существенно облегчает восприятие дальнейшего материала.

Обзор литературы органично разбит на главы, написан хорошим научным языком. Автором рассмотрены экзогенные и генетические факторы в развитии атопического дерматита, проанализирована иммунологическая концепция патогенеза атопического дерматита, описана роль цитокинов в

обеспечении согласованного действия иммунной системы. В обзоре освещено современное состояние проблемы в недостаточно изученной роли нейтрофилов и их сериновых протеаз в патогенезе atopического дерматита. Детально рассмотрено современное представление о роли протеаз нейтрофилов, их содержании гранулах, высвобождении при активации нейтрофилов и роль в регуляции воспаления и иммунного ответа в месте воспаления. Таким образом, обзор литературы дает детальное представление о современном состоянии научной проблемы, материал преподносится последовательно и грамотно.

В главе «Клиническая характеристика больных» представлены результаты клинических методов исследования. Диагноз atopический дерматит поставлен на основании обязательных и дополнительных критериев. Выявлены основные жалобы пациентов. Представлено распределение больных atopическим дерматитом по клиническим формам: эритематозно-сквамозная, эритематозно-сквамозная с лихенизацией, лихеноидная и пруригинозная. По распространенности кожного процесса больные atopическим дерматитом были распределены следующим образом: локализованный, распространенный и диффузный. По степени тяжести больные atopическим дерматитом были распределены с учетом значения индекса SCORAD. Подробно описана клиническая картина у больных с разной степенью тяжести. Приведены данные показателей клеточного иммунитета у больных atopическим дерматитом.

Все протоколы четко и грамотно изложены, используемые автором методы соответствуют поставленным задачам и достаточны для их решения.

#### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Собственные исследования состоят из трех глав, в каждой из которых автор детально описывает и подробно обсуждает полученные результаты,

подтверждает их данными в виде рисунков и таблиц, заканчивая каждую небольшим заключением.

В главе «Изучение системы цитокинов у больных атопическим дерматитом» автор дает подробное описание проведенного комплексного исследования содержания в сыворотке крови ряда различных цитокинов у пациентов с атопическим дерматитом. Анализируя полученные результаты, что во время обострения атопического дерматита наблюдается повышение уровня противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, -6, -10, -13, а во время ремиссии повышение уровня провоспалительных цитокинов ИНФ $\gamma$ , ФНО $\alpha$ , ИЛ-12 автор свидетельствует о дизрегуляции реципрокных отношений Th1- и Th2-субпопуляций лимфоцитов.

Во главе «Исследование интенсивности деструктивных процессов и активности антидеструктивной системы у больных атопическим дерматитом» Маргарита Валерьевна описывает активность лейкоцитарной эластазы в зависимости от тяжести течения атопического дерматита. Показано, что активность протеолитического фермента лейкоцитарной эластазы коррелирует с тяжестью течения атопического дерматита. Поскольку активность лейкоцитарной эластазы регулируется с помощью  $\alpha$ 1-протеиназного ингибитора, автор определяла его содержание у больных атопическим дерматитом. Полученные результаты свидетельствуют, что у пациентов с легкой степенью тяжести атопического дерматита наблюдается положительная корреляция между индексом SCORAD и активностью  $\alpha$ 1-протеиназного ингибитора в сыворотке крови, отражающего активацию антипротеолитического потенциала, направленного на ограничение деструктивных процессов. У пациентов с тяжёлым течением атопического дерматита наблюдается отрицательная корреляционная связь между индексом SCORAD и активностью  $\alpha$ 1-протеиназного ингибитора, что свидетельствует об истощении компенсаторного потенциала.

В главе «Исследование функциональной активности нейтрофилов» автор детально описывает определение уровня функциональной активности

нейтрофилов при атопическом дерматите изучая люминол-зависимую хемилюминесценцию клеток крови и анализ полученных данных в зависимости от стадии заболевания и тяжести клинической картины. Анализируя полученные данные, приходит к выводу, что функциональная активность нейтрофилов при изучении люминол-зависимой хемилюминесценции клеток крови больных атопическим дерматитом имеет тенденцию к снижению при тяжелом течении и при бактериальной и микотической контаминации кожи; при легком течении функциональная активность нейтрофилов возрастает. Во втором разделе этой главы автор по уровню генерации супероксидного аниона в ответ на рецептор-зависимые стимулы (fmlp) и в ответ на прямой активатор кислородного взрыва – форболовый эфир (PMA) определила зависимость от степени тяжести: у больных атопическим дерматитом легкой степени тяжести в начале периода обострения повышена генерация супероксидного аниона нейтрофилами в ответ на стимулы по сравнению со здоровыми донорами. У больных со средней степенью тяжести генерация супероксидного аниона нейтрофилами достоверно снижена. Методом проточной цитометрии автор определила снижение фагоцитарной активности нейтрофилов при наличии сопутствующей грибковой контаминации дрожжами *Rhodotorula spp.*, был установлен достоверно повышенный уровень продукции супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови при стимуляции бактериальным пептидом fmlp по сравнению со здоровыми донорами, а показатели генерации супероксидного аниона имели достоверно положительную корреляцию с изменением уровня экспрессии рецептора TREM-1 на нейтрофилах крови.

В заключительной части работы представлены выводы и практические рекомендации, в которых отражены основные результаты диссертации и их значение для фундаментальных исследований и клинической практики.

### **Ценность для науки и практики результатов работы**

Диссертационное исследование Тарасовой М.В. несомненно представляет теоретический и практический интерес для фундаментальных наук и расширяет знания по процессу функциональной активности нейтрофилов у больных atopическим дерматитом. Полученные автором результаты по снижению функциональной активности нейтрофилов при наличии грибковой или бактериальной контаминации у больных atopическим дерматитом могут быть использованы для разработки новых высокоэффективных комбинированных препаратов для терапии atopического дерматита, а также для тестирования различных препаратов, направленных на лечение atopического дерматита. Для определения качества состояния деструктивных процессов и антипротеолитической (антидеструктивной) системы у пациентов с atopическим дерматитом может быть использован новый метод измерения активности лейкоцитарной эластазы и  $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора.

### **Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Целесообразно измерять функциональную активность нейтрофилов в крови у пациентов с atopическим дерматитом для мониторинга патологического процесса и определения дальнейшей тактики лечения.

Можно рекомендовать определять сывороточное содержание комплекса противовоспалительных и провоспалительных цитокинов для выявления степени активности аллергического воспаления.

Учитывая, выявленное автором снижение фагоцитарной активности нейтрофилов при наличии сопутствующей грибковой контаминации дрожжами *Rhodotorula spp.*, можно рекомендовать использовать в лечении комбинированную топическую терапию, при выявлении микотической контаминации.

Учитывая то, что активность эластазы сыворотки крови коррелирует с тяжестью АД, определяя ее содержание в сыворотке крови больных atopическим дерматитом, можно оценить выраженность деструктивных процессов и качество лечения.

### **Сведения о полноте опубликованных научных результатов**

Полученные автором данные опубликованы в 23 печатных работах, включая 12 статей, в том числе 11 работ в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ и 11 тезисов докладов на международных конференциях.

### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат диссертации Тарасовой М.В. полностью соответствуют основным положениям диссертации, в нем отражены актуальность темы, научная новизна, практическая значимость, основные результаты и их обсуждение.

### **Замечания**

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Имеющиеся некоторые недочеты в оформлении диссертации не влияют на общее впечатление о проделанной работе.

### **Заключение**

Диссертация Тарасовой Маргариты Валерьевны «Медиаторы иммунной системы и активность нейтрофилов при atopическом дерматите» представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 - Патологическая физиология, является законченной и цельной научно-квалификационной работой. Все представленные выводы обоснованы и базируются на полученных автором материалах и результатах, их обработке и интерпретации. Оформление работы отвечает всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Исследование Тарасовой М.В. посвящено актуальной и важной проблеме для современного общества, проведено с использованием обширного набора современных методов, содержит уникальные результаты, исходя из которых, автор формулирует выводы и научно-практические рекомендации. По актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденным постановлением правительства РФ от 24.09.13 № 842 (с изменениями в редакции постановлений Российской Федерации № 335 от 21.04. 2016 г., № 1168 от 01.10.2018 г.), а ее автор, Тарасова Маргарита Валерьевна, заслуживает искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 - Патологическая физиология.

**Официальный оппонент:**

доктор медицинских наук (14.01.10 – кожные и венерические болезни), профессор, профессор кафедры кожных и венерических болезней с курсом косметологии  
Медицинского института непрерывного образования  
ФГБОУ ВО «МГУПП»  
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, дом 11  
Телефон: +7(499)750-01-11  
Электронная почта: [masyukovasa@mgupp](mailto:masyukovasa@mgupp)

Масюкова Светлана Андреевна

Подпись д.м.н. Масюковой Светланы Андреевны «ЗАВЕРЯЮ»

Ученый секретарь Ученого Совета

ФГБОУ ВО «МГУПП»

23.11.2020 г.



Ж.В. Новикова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств». Адрес: 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, дом 11, телефон: +7 (499) 750-01-11, адрес сайта: [mgupp.ru](http://mgupp.ru)