

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель НИИКЭЛ –
филиала ИЦиГ СО РАН
д.м.н., профессор

А. Ю. Летягин

«01» октября 2020 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН) о научно-практической значимости диссертационной работы **Авдеевой Анастасии Сергеевны** «Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита», представленной к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук в диссертационный совет при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой» (ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой) по специальности 14.01.22 – ревматология и 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология.

Актуальность темы исследования

Ревматоидный артрит является одной из самых распространенных воспалительных артропатий и поражает преимущественно лиц трудоспособного возраста, что определяет высокую социальную значимость данного заболевания. Ключевую роль в патогенезе РА играют как активированные CD4⁺ Т лимфоциты, так и CD19⁺ В лимфоциты. CD4⁺ Т лимфоциты распознают аутоантигены, что способствует активации В-лимфоцитов и макрофагов, а также усиливает продукцию цитокинов. Для РА характерна поляризация иммунного ответа по Th1 типу с преобладанием продукции провоспалительных цитокинов, над противовоспалительными. В последнее время в патогенезе аутоиммунных заболеваний большое внимание уделяется нарушениям в работе Т регуляторных клеток, основная роль которых заключается в поддержание периферической толерантности к собственным антигенам. Во многих исследованиях было

показано, что дефекты в CD4+CD25+FOXP3+Трег клетках способствуют развитию аутоиммунных заболеваний, и что эти процессы можно предотвратить путем адаптивного переноса функциональных Трег клеток от здоровых животных. Данные литературы, касающиеся оценки уровня и фенотипа Трег весьма противоречивы. В подавляющем большинстве работ выявляется увеличение содержания Т-рег в синовиальной жидкости пациентов с РА, что касается периферического кровотока, то большинство исследователей наблюдали уменьшение процентного числа циркулирующих Т-рег, в то время как в других работах выявлено увеличение или отсутствие отличий в уровне Т-рег от здоровых доноров.

Важная роль в патогенезе РА уделяется и нарушениям функционирования CD19+ В лимфоцитов. В лимфоциты рассматриваются не только в качестве эффекторных клеток, являющихся предшественниками антитело-продуцирующих плазматических клеток, но и в качестве иммунорегуляторных клеток, обеспечивающих презентацию антигенов Т лимфоцитам и продукцию широкого спектра цитокинов. В сыворотке и синовиальной жидкости больных РА выявляют широкий спектр аутоантител с различной специфичностью, в том числе ревматоидные факторы (РФ) классов IgM, IgA и IgG; антитела к цитруллинированным белкам (АЦБ). В литературе приводятся противоречивые данные о взаимосвязи РФ и АЦБ с активностью заболевания и развитием деструктивных изменений в суставах. В настоящее время накоплено много данных, свидетельствующих о том, что АЦБ (и РФ) не только являются чувствительными и специфичными биомаркерами РА, но и имеют патогенетическое значение, выступая в роли дополнительных медиаторов воспаления и деструкции костной ткани.

В последние годы подходы к терапии ревматоидного артрита значительно изменились: помимо традиционных базисных противовоспалительных препаратов (БПВП) в схему лечения были включены генно-инженерные биологические препараты (ГИБП), специфически воздействующие на

определенные компоненты каскада воспалительных реакций. Внедрение инновационных ГИБП в клиническую практику, с одной стороны, позволило повысить эффективность терапии и улучшить прогноз, но, с другой стороны, привело к удорожанию лечения. Снижение стоимости лечения и, как следствие, увеличение доступности инновационной терапии для пациентов, живущих в странах с ограниченными экономическими ресурсами, является приоритетной задачей здравоохранения всех стран мира. Эта проблема частично решена благодаря разработке и внедрению в клиническую практику биоаналогов (biosimilars) ГИБП, однако необходимо более подробно изучить иммунологические эффекты данных препаратов, оценить эффективность различных доз, а также провести сравнение с оригинальными ГИБП.

С разработкой и широким внедрением в клиническую практику ГИБП, стал более активно обсуждаться вопрос объективной оценки активности заболевания и выявления «субклинического» воспаления суставов. Полагают, что использование УЗИ суставов, совместно с клиническими данными и анализом уровня лабораторных показателей может позволить более точно оценить активность и тяжесть заболевания, эффективность проводимой терапии. Таким образом, изучение роли молекулярных и клеточных биомаркеров в патогенезе заболевания, оценке активности и тяжести РА, прогнозировании эффективности терапии БПВП и ГИБП имеет важное значение для практической медицины и определяет актуальность темы данного диссертационного исследования.

Научная и практическая значимость результатов

Научная значимость диссертационной работы Авдеевой А.С. заключается в выявлении наиболее информативных биомаркеров, ассоциирующихся с активностью и тяжестью заболевания, развитием деструктивных изменений в суставах. В работе было продемонстрировано снижение уровня и функциональной активности Т рег при раннем и развернутом РА,

коррелирующее с активностью заболевания, наличием системных проявлений болезни, гиперпродукцией аутоантител, что может свидетельствовать о существенном вкладе данной клеточной субпопуляции в патогенез РА. Было установлено позитивное влияние терапии МТ на функциональную активность Т-рег при раннем РА, что проявлялось в увеличении пропорции и числа Т-рег с высоким уровнем маркеров активации, свидетельствующее о их повышенной супрессорной активности. Этот эффект был более выражен в группе пациентов, достигших ремиссии/низкой активности заболевания на фоне лечения. Более благоприятный ответ на МТ ассоциировался с исходно более высоким уровнем CD152surface, а также с меньшей длительностью заболевания и более низким уровнем СРБ, что, вероятно, было связано с менее выраженными изменениями функциональной активности Т-рег при меньшей длительности заболевания и назначение МТ именно в этот временной интервал является максимально эффективным.

В работе была продемонстрирована взаимосвязь IgM/IgA РФ и АМЦВ с активностью и тяжестью заболевания. Уровень данных антител подвергался изменениям на фоне терапии и оказывал существенное влияние на развитие деструкции костной ткани. В отличие от IgMРФ, динамика АЦЦП на фоне терапии отсутствовала. Таким образом, мониторинг уровня РФ и АМЦВ является информативным для выявления групп пациентов с потенциально более тяжелым течением заболевания. Концентрация АЦЦП в сыворотке крови являлась стабильным показателем, как правило не изменялась на фоне лечения и не требовала мониторинга. В работе была продемонстрирована возможность достижения иммунологической ремиссии у части больных РА при использовании ГИБП.

Измерение уровня ММП-3 полезно для оценки активности заболевания, прогнозирования эффективности терапии и развития суставной деструкции. Уровень ММП-3 в сыворотке крови позитивно коррелирует с активностью заболевания, уровнем острофазовых показателей, выраженностью

деструктивных изменений в суставах. Было продемонстрировано снижение уровня данного маркера на фоне терапии БПВП и ГИБП. Оценка уровня ММП-3 на фоне терапии имеет важное практическое значение и может являться предиктором эффективности метотрексатом, а также позволить решить вопрос об отмене ГИБП при достижении клинической ремиссии заболевания.

В работе продемонстрирована тесная взаимосвязь между уровнем провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6), хемокинов (IP-10), факторов роста (VEGF) индексами активности (DAS 25, SDAI, CDAI); уровнем острофазовых показателей (СРБ) и содержанием IgM РФ в сыворотке крови. Развитие деструктивных изменений в суставах ассоциировалось с повышенным уровнем ИЛ-1 β и VEGF. Впервые было установлено, что Применение МТ, РТМ и ТЦЗ оказывает сходное влияние на показатели цитокинового профиля, приводя к снижению уровня практически всего спектра анализируемых параметров, что позволяет говорить о подавлении активации CD4+ Т лимфоцитов при использовании данных групп лекарственных препаратов; ингибиторы ФНО- α в большей степени влияли на содержание хемокинов (IP-10, MCP-1, MIP-1 β) и факторов роста (VEGF). В работе впервые получены данные о снижении уровня IP-10 на фоне терапии МТ. Оценка динамики показателей цитокинового профиля может быть полезна для прогнозирования эффективности терапии раннего РА и выявления пациентов с отсутствием эффекта препарата.

Проведение УЗИ суставов имеет важное практическое значение для оценки «субклинического» воспаления у пациентов. Так автором было показано, что сочетание клинической и УЗ – ремиссии через год терапии наблюдается только у 13,5% пациентов. В работе была выявлена ассоциация между повышенным уровнем СРБ, СОЭ, а также провоспалительных цитокинов, в основном ИЛ-6 и ФНО- α , и активностью синовиального воспаления по данным УЗИ. Для прогнозирования сохраняющейся воспалительной активности по данным ЭД наиболее перспективными маркерами являлись ММП-3 и ИЛ-6, другие анализируемые показатели имели худшие параметры чувствительности и

специфичности. Таким образом, для объективной оценки активности РА, мониторинга и прогнозирования эффективности терапии БПВП и ГИБП, автором было предложено наряду с индексами активности (DAS28, SDAI, CDAI) оценивать уровень острофазовых показателей (СРБ), аутоантител (IgMPФ, АМЦВ), маркеров деструкции костной ткани (ММП-3), показатели цитокинового профиля (ИЛ-6, ФНО- α , IP-10), уровень FoxP3+ регуляторных Т лимфоцитов; учитывать выраженность воспалительных изменений суставов по данным УЗИ.

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

Достоверность результатов обоснована, прежде всего, большой выборкой пациентов с различными стадиями РА: в исследование включено 90 больных с ранней и 142 пациента с развернутой стадией РА. Такое количество пациентов позволило провести качественный анализ и сделать корректные выводы. Обследование пациентов проводилось с использованием современных методов исследования. В работе использовался широкий спектр лабораторных методик, включая методы иммуноферментного анализа, иммунонефелометрический метод, электрохемилюминисцентный метод, мультиплексные технологии xMAP, метод проточной цитофлюориметрии. Специализированные исследования проведены с участием высококвалифицированных специалистов ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой и других ведущих учреждений России - лаборатории постгеномных технологий в медицине факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова. УЗ исследование проводилось с использованием мультисекторного линейного датчика (10-18МГц) с техникой энергетического Доплера. Оценка воспалительной активности РА и выраженности функциональных нарушений выполнена с применением валидированных опросников.

Обработка данных проведена с использованием адекватных методов статистического анализа. Все результаты сопоставлены между группами пациентов с оценкой достоверности различий и корреляций. При оценке клинической информативности лабораторного теста для прогнозирования эффективности терапии использовалась характеристическая кривая (ROC-кривая), отражающая зависимость частоты истинно положительных результатов (чувствительность) от частоты ложноположительных результатов (1-специфичность), с вычислением площади под кривой.

Все результаты исследования подробно иллюстрированы рисунками, что подчеркивает личный вклад автора в реализацию работы. Всего в диссертации 45 рисунков.

Все выводы диссертации научно обоснованы, полностью соответствуют поставленным задачам и отражают полученные результаты исследования.

Диссертационная работа хорошо структурирована, все разделы работы логически связаны между собой, соответствуют задачам исследования и усиливают доказательную базу выводов.

Практические рекомендации четко сформулированы, соответствуют потребностям практической медицины и доступны для внедрения в практику.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации, представляет всю необходимую информацию, а также основные положения и выводы диссертации.

Значимость полученных результатов для развития соответствующей отрасли науки

Результаты диссертационной работы Авдеевой Анастасии Сергеевны «Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита» вносят существенный вклад в развитие ревматологии. В результате систематизации и обобщения полученных результатов автором был сделан вывод о фундаментальном вкладе нарушений гомеостаза FoxP3+

регуляторных Т лимфоцитов с патогенез РА. У пациентов с РА было выявлено достоверное и значимое снижение уровня FoxP3+ регуляторных Т лимфоцитов, а также уменьшение пропорции клеток с высоким уровнем маркеров активации на поверхности по сравнению со здоровыми донорами, что говорит о выраженном снижении функциональной активности данной клеточной субпопуляции при РА. Снижение уровня и функциональной активности FoxP3+ регуляторных Т лимфоцитов у пациентов как с ранней, так и развернутой стадией заболевания ассоциировалось с более высокой воспалительной активностью, наличием системных проявлений болезни и гиперпродукцией аутоантител. Было установлено позитивное влияние терапии метотрексатом и ритуксимабом на уровень и функциональную активность Т рег при РА.

Автором дана оценка роли широкого спектра аутоантител (IgM/IgA РФ, АЦЦП, АМЦВ) для мониторинга активности и тяжести заболевания, прогнозирования эффективности терапии БПВП и ГИБП у пациентов с ранним и развернутым РА. При анализе полученных данных впервые был продемонстрирован существенный вклад АМЦВ в развитие деструктивных изменений в суставах и их более тесная взаимосвязь с индексами воспалительной активности и уровнем острофазовых показателей, по сравнению с АЦЦП и РФ. Впервые была продемонстрирована возможность достижения иммунологической ремиссии РА у пациентов на фоне терапии БПВП (МТ) и ГИБП (РТМ и ТЦЗ), что проявлялось в развитии отрицательной сероконверсии по IgM РФ и АЦЦП и сочеталось с достижением клинической ремиссии заболевания. Продemonстрировано отсутствие динамики уровня АЦЦП на фоне терапии, что говорит об отсутствии необходимости мониторинга уровня данных аутоантител.

Автором впервые была изучена роль маркера деструкции костной и хрящевой ткани - матриксной металлопротеиназы 3 у пациентов с РА. Содержание ММП-3 в сыворотке крови коррелировало с активностью заболевания, уровнем острофазовых показателей, выраженностью

деструктивных изменений в суставах. Применение БПВП и ГИБП позитивно влияло на уровень ММП-3 и приводило к его достоверному снижению. На основании анализа полученных данных, автором было высказано предположение о важной предиктивной роли ММП-3 при РА. Исходно повышенный уровень ММП-3 ассоциировался с отсутствием эффекта от терапии МТ у пациентов с ранним РА, а сохраняющийся повышенный уровень данного фермента через 24 недели терапии ТЦЗ коррелировал с обострением заболевания после отмены терапии. Все полученные в работе данные позволяют рассматривать ММП-3 в качестве перспективного лабораторного биомаркера оценки активности заболевания, прогнозирования эффективности терапии и развития суставной деструкции.

Диссертантом проанализирован широкий спектр провоспалительных, цитокинов, противовоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста у пациентов с РА, а также изучена их динамика на фоне различных схем терапии у больных как ранним, так и развернутым РА. Концентрация провоспалительных цитокинов (ИЛ-6), хемокинов (IP-10), факторов роста (VEGF) позитивно коррелировала с индексами активности (DAS 28, SDAI, CDAI); острофазовыми показателями и уровнем аутоантител. Впервые в работе было установлено сходное влияние МТ, РТМ и ТЦЗ на показатели цитокинового профиля, проявляющееся в снижении уровня патогенетически значимых цитокинов, позволяющее говорить о подавлении активации CD4⁺ Т лимфоцитов при использовании данных групп лекарственных препаратов. Применение ингибиторов ФНО- α влияло в большей степени на уровень хемокинов (IP-10, MCP-1, MIP-1 β) и факторов роста (VEGF). Впервые было продемонстрировано достоверное снижение уровня IP-10 при использовании МТ, что является одним из важных противовоспалительных эффектов препарата.

Полученные в работе данные о взаимосвязи УЗИ суставов (показателей серой шкалы и энергетического доплера) с маркерами острой фазы воспаления, уровнем ММП-3 и провоспалительных цитокинов (ИЛ-6 и ФНО α) позволяют

рассматривать УЗИ в качестве важного метода диагностики «субклинического» воспаления суставов при РА.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты и выводы диссертационной работы Авдеевой Анастасии Сергеевны «Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита» рекомендовано использовать в работе ревматологических отделений при ведении пациентов с ранней и развернутой стадией РА, а также в работе отделений терапевтического профиля. Помимо внедрения в клиническую практику, результаты исследования целесообразно использовать в процессе обучения студентов на кафедрах ревматологии, терапии, общей врачебной практики высших учебных заведений медицинского профиля, а также на кафедрах повышения квалификации специалистов здравоохранения.

В настоящее время результаты работы активно используются ревматологами в клинике и научно-консультативном отделении ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой в процессе диагностики, обследования и лечения пациентов с РА. Полученные в работе данные о роли лабораторных маркеров в оценке активности и тяжести заболевания активно используются в работе профильных клиник. Результаты диссертации внедрены в практику Государственного учреждения здравоохранения «Тульская областная клиническая больница», Федерального государственного бюджетного учреждения «9 лечебно-диагностический центр» Министерства обороны Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тульский государственный университет».

Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати

Результаты работы доложены и обсуждены на ведущих всероссийских и зарубежных конгрессах, научно-практических конференциях, съездах, где они были представлены в виде устных и постерных докладов.

Программа исследования одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой (протокол №32 от 20.12.2018г.). Первичная экспертиза диссертации проведена на заседании ученого совета ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой 03 марта 2020г.

По материалам диссертации опубликовано 87 печатных работ: 2 главы в монографии, 46 статей (из них 38 оригинальных), в том числе 43 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России для публикации основных результатов диссертационных исследований, а также 39 тезисов в отечественной и иностранной печати.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Авдеевой Анастасии Сергеевны «Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита», выполненная при научном консультировании д.м.н., профессора, академика РАН Насонова Евгения Львовича, является законченной научно-квалификационной работой. В ней на основании проведенных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно рассматривать как важное научное достижение современной ревматологии, внедрение которого вносит значительный вклад в развитие современной медицины.

Существенных замечаний по содержанию к тексту диссертации нет.

По актуальности, методологическому уровню, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Авдеевой Анастасии Сергеевны «Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита» соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения

ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. №842 с изменениями, утвержденными в Постановлении Правительства РФ от 21.04.2016г. №335, от 02.08.2016г. №748, от 29.05.2017г. №650, от 28.08.2017г. №1024, от 01.10.2018г. №1168 в части требований, предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.22 «Ревматология» и по специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология.

Отзыв о диссертационной работе Авдеевой А.С. «Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита» обсужден и утвержден на заседании научно-медицинского совета НИИКЭЛ-филиала ИЦиГ СО РАН «09» июня 2020 г., протокол № 3.

Заведующий лабораторией
патологии соединительной ткани,
заместитель руководителя НИИКЭЛ –
филиала ИЦиГ СО РАН по научной
и клинической работе, к.м.н.



М.А. Королев

Подпись к.м.н. М.А. Королева подтверждаю

Ученый секретарь
НИИКЭЛ – филиала ИЦиГ СО РАН



Н.В. Власова

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский
центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Адрес: 630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

Тел. +7 (383) 333-64-09.

e-mail: <http://niikelsoramn.ru>