

ОТЗЫВ

официального оппонента, академика РАН, доктора медицинских наук, профессора, директора ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, заведующего лабораторией молекулярной иммунологии Тотоляна Арега Артемовича на диссертационную работу Авдеевой Анастасии Сергеевны на тему: «Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 14.01.22 – ревматология и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Актуальность темы выполненной работы

Ревматоидный артрит относится к наиболее часто встречающимся аутоиммунным заболеваниям, распространенность которого в популяции составляет около 1%. Ключевую роль в развитии синовиального воспаления и суставной деструкции при ревматоидном артрите играют активированные Т-лимфоциты, вызывающие активацию В-лимфоцитов и макрофагов, усиление продукции цитокинов. Негативную регуляцию Th1-, Th2- и Th17-типов осуществляют регуляторные Т-клетки, играющие основную роль в поддержании периферической толерантности к собственным антигенам, благодаря подавлению гипериммунного ответа в отношении аутоантигенов. Во многих исследованиях было показано, что дефекты регуляторных Т-клеток способствуют развитию аутоиммунных заболеваний. Развитие иммунопатологического процесса при ревматоидном артрите сопровождается дефектом В-клеточной толерантности. В-лимфоциты принимают участие в развитии аутоиммунных нарушений не только в качестве эффекторных клеток, являясь предшественниками аутоантитело-продуцирующих плазматических клеток, но и как иммунорегуляторные клетки, способные презентировать антигены Т-лимфоцитам, индуцировать активацию Т-клеток, дифференцировку фолликулярных дендритных клеток, а также осуществлять синтез цитокинов.

В сыворотке крови и синовиальной жидкости больных РА выявляют широкий спектр аутоантител с различной специфичностью, в том числе ревматоидные факторы классов IgM, IgA и IgG; антитела к цитруллинсодержащим белкам: антиперинуклеарный фактор, антикератиновые антитела, антифиллагриновые антитела, антитела к цитруллинированному фибриногену, антитела к циклическому цитруллинированному пептиду, антитела к модифицированному цитруллинированному виментину, антитела к цитруллинированной α -энолазе и ряд других. Основными диагностическими лабораторными маркерами РА служат ревматоидный фактор класса IgM и антитела к циклическому цитруллинированному пептиду. Показано, что антитела к модифицированному цитруллинированному виментину могут лучше, нежели антитела к циклическому цитруллинированному пептиду, предсказывать прогрессирование суставной деструкции. При этом данные о взаимосвязи ревматоидного фактора и антител к цитруллинсодержащим белкам с активностью заболевания и развитием деструктивных изменений в суставах неоднозначны. В последние годы накоплено много данных, свидетельствующих о том, что эти факторы имеют патогенетическое значение, выступая в роли дополнительных медиаторов воспаления и деструкции костной ткани, которая является одним из основных проявлений РА. Ключевым медиатором суставной деструкции считается матриксная металлопротеиназа-3 (ММП-3). Уровень ММП-3 в сыворотке крови положительно коррелирует с синтезом данного фермента в синовиальной оболочке суставов и непосредственно отражает степень активности синовита, что позволяет рассматривать ММП-3 в качестве перспективного биомаркера для более точной оценки активности заболевания и прогнозирования суставной деструкции.

Современные принципы фармакотерапии РА основаны на ранней агрессивной терапии базисными противовоспалительными препаратами, среди которых основным является метотрексат. Также широко применяются различные

классы генноинженерных биологических препаратов, что позволяет в ряде случаев добиться стойкой ремиссии. Внедрение инновационных генноинженерных биологических препаратов в клиническую практику, с одной стороны, позволило повысить эффективность терапии и улучшить прогноз, но с другой — привело к удорожанию лечения. Эта проблема частично решена благодаря разработке и внедрению в клиническую практику их биоаналогов, однако необходимо более подробно изучить иммунологические эффекты данных препаратов, оценить эффективность различных доз, а также провести сравнение с оригинальными препаратами.

Все отмеченное выше указывает на высокий уровень актуальности диссертационной работы Авдеевой А.С., целью которой явилось изучение молекулярных и клеточных биомаркеров эффективности терапии ревматоидного артрита в сопоставлении с клиническими и инструментальными данными, а также определение места лабораторных иммунологических показателей в оценке активности и прогноза заболевания. С точки зрения как науки, так и практической медицины цель исследования А.С.Авдеевой, а также поставленные ей задачи, несомненно являются актуальными, современными и перспективными.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа Авдеевой Анастасии Сергеевны «Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита» выполнена в рамках научно-исследовательской работы ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой «Разработка концепции персонифицированной медицины на основе инновационных технологий диагностики, лечения и профилактики аутоиммунных ревматических заболеваний» (государственный регистрационный номер 01200900996) и представляет собой комплексное исследование молекулярных и клеточных биомаркеров эффективности терапии ревматоидного

артрита и определение места этих показателей в оценке активности и прогноза заболевания.

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

Представленная Авдеевой А.С. диссертационная работа содержит результаты клинико-иммунологических исследований с использованием значительного количества молекулярных и клеточных биомаркеров у большого числа пациентов с ранней и развернутой стадией ревматоидного артрита в сопоставлении с показателями клинической активности заболевания и данными инструментальных методов исследования. Оценка влияния генноинженерных биологических препаратов, селективно блокирующих ведущие звенья патогенеза ревматоидного артрита, на широкий спектр лабораторных показателей проводилось в течение 7 лет в формате проспективного исследования больных в реальной клинической практике на базе ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой, и позволила изучить вклад различных иммунологических нарушений в течение и прогноз заболевания.

Сформулированная автором цель исследования достигнута решением соответствующих задач, которые отражены в выводах, базирующихся на полученном обширном фактическом материале.

Основные положения, выносимые автором на защиту, четко сформулированы, отражают наиболее значимые установленные теоретические закономерности, а также логически подтверждены в тексте диссертации данными собственных исследований. Обоснованными и логичными также представляются выводы и практические рекомендации диссертационной работы, которые основаны на полученном автором значительном экспериментальном и клиническом материале и хорошо согласуются с современными научными представлениями по данной тематике. Содержание представленных материалов

свидетельствует о полной завершенности данной диссертационной работы.

Указанные обстоятельства позволяют считать изложенные в диссертации научные положения, выводы и рекомендации достаточно обоснованными.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Диссертационное исследование Авдеевой А.С. и полученные ей результаты обладают несомненной научной новизной. Автором проведен широкий анализ клеточных и молекулярных биомаркеров — острофазовых показателей, широкого спектра аутоантител, маркеров деструкции костной ткани, показателей цитокинового профиля и регуляторных Т-клеток для мониторинга активности и тяжести заболевания, прогнозирования эффективности терапии у пациентов с ранним и развернутым ревматоидным артритом. При этом диссертантом убедительно доказано, что снижение уровня и функциональной активности регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов как с ранней, так и с развернутой стадией заболевания ассоциируется с более высокой воспалительной активностью, наличием системных проявлений болезни и гиперпродукцией аутоантител. Установлено позитивное влияние метотрексата и ритуксимаба на уровень и функциональную активность регуляторных Т-клеток у пациентов с ревматоидным артритом.

При изучении роли аутоантител впервые была выявлена связь антител к модифицированному цитруллинированному виментину с развитием деструктивных изменений в суставах, индексами воспалительной активности и уровнем острофазовых показателей по сравнению с антителами к циклическому цитруллинированному пептиду и ревматоидным фактором. Продемонстрирована возможность достижения иммунологической ремиссии ревматоидного артрита у пациентов на фоне терапии метотрексатом, ритуксимабом и тоцилизумабом, что проявлялось в развитии отрицательной сероконверсии по ревматоидному фактору и антителам к циклическому цитруллинированному пептиду.

Впервые показана роль ММП-3 в оценке воспалительной активности и прогнозировании развития деструктивных изменений в суставах, продемонстрировано предсказательное значение ММП-3 для оценки эффективности терапии МТ у пациентов с ранним РА, а также возможности сохранения ремиссии заболевания после отмены терапии ТЦЗ.

Впервые установлено сходное влияние метотрексата, ритуксимаба и тоцилизумаба на показатели цитокинового профиля, проявляющееся в снижении уровня цитокинов, участвующих в патогенезе РА: ИЛ-6, ИЛ-17, ФНО- α , IP-10, IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF. Также установлено, что лечение ингибиторами ФНО- α приводит к снижению уровня хемокинов (IP-10, MCP-1, MIP-1 β) и сосудистого эндотелиального фактора роста. Впервые было продемонстрировано достоверное снижение уровня IP-10 при использовании метотрексата, что является одним из важных противовоспалительных эффектов препарата.

Достоверность полученных в ходе работы данных обеспечена применением общепринятых в мировой и российской практике и адекватным сформулированным задачам диссертационного исследования дизайном исследования, формированием клинических групп с достаточным числом наблюдений. Положительно судить о достоверности представленных результатов, сформулированных выводов и положений, которые отражают научную новизну и практическую значимость выполненного исследования, позволяет корректное применение автором широкого спектра адекватных методов статистической обработки данных, полученных в ходе проведенной работы.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Изложенные в диссертационной работе результаты исследования Авдеевой А.С. значительно расширяют существующие представления о наиболее

информативных биомаркерах, ассоциирующихся с активностью и тяжестью заболевания, развитием деструктивных изменений в суставах. Ревматоидный фактор и антитела к модифицированному цитрулинированному виментину коррелируют с активностью заболевания, подвергаются динамике на фоне терапии. Антитела к модифицированному цитрулинированному виментину в большей степени, чем антитела к циклическому цитруллинированному пептиду, связаны с развитием деструкции костной ткани, мониторинг их уровня информативен для выявления групп пациентов с потенциально более тяжелым течением заболевания. В отличие от ревматоидного фактора, динамика антител к циклическому цитруллинированному пептиду на фоне терапии отсутствует.

Важное практическое значение предоставляет возможность определения уровня ММП-3 в сыворотке крови для более точной оценки выраженности синовиального воспаления, прогнозирования развития деструктивных изменений в суставах. Мониторинг концентрации ММП-3 на фоне терапии позволит прогнозировать эффективность метотрексата при раннем ревматоидном артрите, оценить возможность его отмены при достижении ремиссии заболевания. Измерение сывороточной концентрации ИЛ-6, IP-10 и VEGF позволяет более точно оценить как клиническую активность ревматоидного артрита, так и выраженность воспаления в суставах.

Отдельный теоретический интерес представляет выявленное диссертантом снижение уровня и функциональной активности регуляторных Т-клеток при раннем и развернутом ревматоидном артрите, свидетельствующее о существенном вкладе данной клеточной субпопуляции в иммунопатогенез заболевания, что создает предпосылки для разработки новых методов терапии.

Личный вклад автора

Ведущая роль Авдеевой А.С. в выполнении диссертационного исследования прослеживается на всех этапах работы. Автором произведен выбор направления

исследования, для которого сформулированы цели и задачи, разработан дизайн исследования, осуществлен поиск, анализ и обобщение отечественных и зарубежных источников литературы по изучаемой тематике. Автор принимал участие в формировании клинических групп, самостоятельно проводил анкетирование, обследование и наблюдение пациентов, взятие биологического материала. Диссертантом была разработана специальная электронная база для хранения и статистической обработки данных. Проведен статистический анализ с использованием пакета программ Statistica 8.0 (StatSoft, США), включая методы параметрического и непараметрического анализа. Автором лично произведена трактовка, интерпретация и обобщение полученных клинических, лабораторных, иммунологических данных, подготовка публикаций и докладов, сформулированы выводы и практические рекомендации, позволяющие решить поставленные в работе задачи и достичь заявленной цели. Все это указывает на то, что диссертационная работа и автореферат являются самостоятельным научным трудом автора, написанными им лично.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты исследования Авдеевой А.С. способствуют расширению существующих представлений о роли клеточных и молекулярных биомаркеров активности и прогноза ревматоидного артрита и эффективности его терапии. Полученные данные представляют значительный интерес для ревматологов и клинических иммунологов, а также для специалистов по клинической лабораторной диагностике. Результаты диссертационного исследования А.С.Авдеевой внедрены в практику ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой и ревматологической службы в большинстве регионов Российской Федерации, используются для оценки активности и тяжести заболевания, мониторинга проводимого лечения и выявления потенциальных предикторов эффективного

ответа на терапию ГИБП. Материалы работы использованы в написании монографии «Генно-инженерные биологические препараты в лечении ревматоидного артрита» (под. ред. акад. Е.Л. Насонова, 2013). Полученные данные используются в лекционном материале последипломного образования для практических врачей в рамках постоянно проводимой «Школы ревматологов».

Количество печатных работ

Результаты настоящей диссертации изложены в 87 публикациях в центральной и региональной печати, из них 43 статьи – в ведущих российских рецензируемых журналах, входящих в Перечень Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации, в которых содержится полный объем информации, касающейся темы диссертации.

Содержание диссертации и ее завершенность

Диссертация Авдеевой А.С. изложена в традиционном стиле. Во введении автор обосновывает актуальность избранной темы на основе краткого аналитического обзора литературы, исходя из которого диссертант логично переходит к формулировке цели и четко соответствующих ей задач исследования, раскрывает научную новизну и практическую значимость работы. Приведены сведения о личном вкладе автора, апробации основных результатов исследования и полноте представления в публикациях. Теоретические и практические рекомендации описаны в соответствующем разделе работы, выполнимы и могут быть использованы профильными специалистами.

Первая глава представляет собой обзор актуальных источников литературы с глубоким и подробным описанием основных звеньев патогенеза ревматоидного артрита, роли В и Т-лимфоцитов и особенно регуляторных Т-клеток в иммунопатогенезе ревматоидного артрита, роли молекулярных биомаркеров в

оценке активности и тяжести ревматоидного артрита. В заключении обсуждается современная концепция терапии ревматоидного артрита и место в ней генноинженерных биологических препаратов.

Во второй главе автор подробно представляет информацию об используемых в работе клинических, инструментальных и лабораторных методах исследования, приводит подробную характеристику особенностей клинических наблюдений, а также способы введения и дозировки использованных препаратов, раскрывает сущность проведенных лабораторных методов исследования, способов получения искомым данных и их статистической обработки.

Далее в третьей главе приводятся непосредственно результаты собственных исследований, а четвертая глава посвящена обсуждению полученных результатов, рассмотрены возможные причины и механизмы выявленных изменений с использованием данных современной литературы. Автор показывает, что у пациентов с ранним и развернутым ревматоидным артритом наблюдается снижение уровня и функциональной активности FOXP3+ регуляторных Т-лимфоцитов, коррелирующее с активностью заболевания, гиперпродукцией аутоантител. Автор последовательно доказывает, что изучение уровня сывороточных биомаркеров (аутоантител, белков острой фазы воспаления, показателей костного метаболизма, цитокинов, хемокинов, факторов роста) является важным инструментом оценки активности заболевания, суставной деструкции и эффективности проводимой терапии базисными противовоспалительными препаратами и генно-инженерными биологическими препаратами. Показано, что уровни С-реактивного белка, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли- α в сыворотке крови коррелируют с воспалительными изменениями суставов. Результаты, отраженные в данной главе, убедительно демонстрируют перспективность использования матриксной металлопротеиназы-3 для оценки активности заболевания, прогнозирования эффективности терапии, оценки возможности отмены генно-инженерных биологических препаратов при

достижении ремиссии заболевания. Автор обоснованно приходит к выводу, что применение метотрексата и ритуксимаба позитивно влияет на гомеостаз T-регуляторных клеток при ревматоидном артрите.

Девять выводов и 4 практические рекомендации, представленные в работе, логично вытекают из отраженной в предыдущих главах информации, имеют достаточную аргументацию, четко сформулированы, основаны на достоверных статистических данных и полностью отражают решение поставленных задач. В представленной работе обозначены связи с достаточным количеством литературных источников, которых насчитывается более 515. Диссертация изложена на 311 страницах машинописного текста и содержит 59 таблиц и 38 рисунков.

Четыре основных положения, выносимые автором на защиту, адекватно формулируют наиболее значимые закономерности, установленные автором, имеют логическое подтверждение в тексте. Все полученные данные статистически корректно обработаны, что позволяет сделать заключение об обоснованности и достоверности представленных результатов, сформулированных выводов и положений, которые отражают научную новизну и практическую значимость выполненного исследования.

В целом, диссертационная работа Авдеевой А.С. представляет собой рационально спланированное научное исследование, выполненное с применением современных и адекватных методов исследования. Содержание представленных материалов свидетельствует о полной завершенности данного диссертационного исследования.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертационная работа Авдеевой А.С. имеет логичную структуру и выполнена на высоком научном и методическом уровне. Поставленные автором цель и задачи четко сформулированы, корректны и соответствуют объему

проведенных научных исследований. Используемые методы исследования современны, адекватны поставленным задачам. Объем выборки достаточен для адекватного статистического анализа. Все лабораторные исследования проведены на сертифицированном оборудовании. Выводы диссертации основаны на достаточном фактическом клиническом материале, обоснованы и в полной мере отражают результаты исследований. Основные научные положения, представленные на защиту, являются аргументированными и вполне доказанными. Диссертация не содержит некорректных заимствований без ссылок на авторов, прошла апробацию, а ее результаты были доложены и обсуждены на конференциях различного уровня.

Автореферат соответствует основному содержанию диссертации. Содержание диссертации соответствует указанной специальности и теме исследования. Автор последовательно решая поставленные задачи, в полной мере достигает сформулированную цель.

В порядке дискуссии по оппонируемой диссертации хотелось задать несколько вопросов:

1. На основании каких данных литературы автор относит эотаксин к противовоспалительным цитокинам?
2. Из числа изученных клеточных и молекулярных факторов какие показатели автор может предложить в качестве прогностических биомаркеров эффективности терапии ритуксимабом, тоцилизумабом или ингибиторами ФНО-альфа?
3. Как автор может объяснить сходное влияние различных препаратов (метотрексата, ритуксимаба и тоцилизумаба), применяемых при терапии ревматоидного артрита, на показатели цитокинового профиля?

Среди недостатков рассматриваемой диссертации можно указать на некоторые опечатки и стилистически неудачные выражения, орфографические и пунктуационные ошибки, однако они не носят принципиальный характер и не

снижают ценности диссертационного исследования в целом.

Рекомендации по использованию материалов диссертации в учебных целях

Результаты диссертационного исследования Авдеевой А.С. применяются в деятельности ревматологической службы страны и внедрены в учебные курсы для врачей-ревматологов. Кроме того, результаты проведенных автором исследований несомненно следует учитывать в программе курсов повышения квалификации врачей-ревматологов и клинических иммунологов в качестве примера современных и эффективных схем лечения ревматоидного артрита.

Полученные автором данные рекомендуется внедрить в учебные курсы при обучении врачей-иммунологов и врачей клинической лабораторной диагностики с целью более глубокого понимания диагностической и прогностической информативности клеточных и молекулярных биомаркеров при ревматоидном артрите.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Авдеевой Анастасии Сергеевны на тему: «Молекулярные и клеточные биомаркеры эффективности терапии ревматоидного артрита», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 14.01.22 – «Ревматология» и 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология», является законченной и самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная научная проблема в области клинической иммунологии и аллергологии – установление молекулярных и клеточных биомаркеров эффективности терапии ревматоидного артрита и определение места лабораторных иммунологических показателей в оценке активности и прогноза заболевания, что имеет большое значение для повышения качества диагностики и лечения больных с ревматоидным артритом. Полученные

результаты имеют важное научное и практическое значение.

По актуальности темы, объему выполненных исследований, научной новизне, теоретической и практической ценности, значимости полученных данных, обоснованности выводов представленная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г., № 842 (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Авдеева Анастасия Сергеевна, достойна присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 14.01.22 – «Ревматология» и 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология».

Официальный оппонент,
академик РАН, доктор медицинских наук
(шифр специальности: 14.00.36 – аллергология
и иммунология), профессор, директор
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии
имени Пастера, заведующий лабораторией
молекулярной иммунологии

Тотолян Арег Артемович

Подпись д.м.н., профессора, академика РАН Тотоляна А.А. заверяю

Ученый секретарь ФБУН НИИ
эпидемиологии и микробиологии
имени Пастера, к.м.н.



Трифонова Г.Ф.

«02» ноября 2020 г.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14;
телефон: +7 (812) 233-20-92, +7 (812) 233-08-56;
e-mail: pasteur@pasteurorg.ru, сайт: <http://www.pasteurorg.ru>