

ОТЗЫВ

официального оппонента – доктора медицинских наук, профессора, профессора кафедры клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации Луговской Светланы Алексеевны на диссертационную работу Купцовой Дарьи Геннадьевны «Иммунологические критерии эффективности терапии псориаза генно-инженерными биологическими препаратами в детском возрасте» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.2.7. «Иммунология», 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика»

Актуальность темы диссертации

В настоящее время актуальной задачей развития клинической лабораторной диагностики является поиск биомаркеров эффективности терапии при различных иммунозависимых заболеваниях. Псориаз является аутоиммунным хроническим воспалительным заболеванием кожи, которое обусловлено прямым участием клеток иммунной системы в развитии и поддержании характерных признаков заболевания. Учащение случаев развития тяжелого течения заболевания у детей, плохо поддающихся стандартным методам лечения, привело к необходимости использования генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП), направленных на блокаду провоспалительных цитокинов. Важным аспектом назначения биологической терапии является ее индивидуальный подбор в зависимости от состояния пациента. Неверно подобранная биологическая терапия приводит к ранней отмене препарата и ухудшению состояния пациентов с псориазом. Изучение данных научной литературы показывает, что не существует единых алгоритмов выбора первой линии биологической терапии псориаза у детей, тактики переключения биопрепаратов в случае их неэффективности, а также

отсутствуют четкие лабораторные маркеры мониторинга эффективности генно-инженерных биологических препаратов. В связи с этим, особую актуальность приобретает поиск и разработка информативных патогенетически значимых лабораторных показателей в оценке и прогнозе эффективности биологической терапии в детском возрасте. Несмотря на обилие научных данных по изучению иммунопатогенеза псориаза и выявленных в исследованиях возможных предикторов эффективности биологической терапии заболевания, ассоциированных с состоянием пациентов, по-прежнему отсутствуют данные об их прогностической и диагностической значимости. В связи с этим, необходима разработка и стандартизация диагностических лабораторных параметров оценки тяжести заболевания, а также создание алгоритмов ведения пациентов с псориазом на терапии ГИБП, что является актуальным и востребованным направлением научных исследований.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Тема диссертационного исследования посвящена изучению и поиску информативных иммунологических критериев прогноза эффективности применения генно-инженерных биологических препаратов у детей с псориазом. По своей тематике диссертационная работа полностью соответствует паспортам специальностей 3.2.7. «Иммунология», а именно пункту №2 - Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии, №5 - Изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний, №6 - Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов и 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика» - №3 Клинико-лабораторные методы исследования для определения тяжести, периода и срока болезни, прогноза, контроля за

лечением и его результатами, №9 - Разработка методов иммунологических исследований. Антигены эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, белков плазмы, HLA-системы. Оценка функциональной активности клеток иммунной системы. Антитела естественные, иммунные и аутоиммунные, иммунные комплексы. Медиаторы иммунитета. Оценка иммунного статуса организма. Мониторинг иммунокорректирующей терапии. Иммунофенотипическая характеристика клеток при заболеваниях крови. Онкоиммунология.

Основные результаты диссертации

В диссертации выполнен анализ широкого спектра иммунологических показателей, который включал: определение содержания основных и малых популяций лимфоцитов, содержания клеток-супрессоров миелоидного происхождения (MDSCs) и субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти периферической крови, определение активности митохондриальных дегидрогеназ (сукцинатдегидрогеназы - СДГ, глицерол-3-фосфатдегидрогеназы - ГФДГ) в популяциях лимфоцитов, определение уровня экспрессии ферментов пуринергической регуляции (экто-нуклеозидтрифосфатдифосфо-гидролазы 1 - CD39, экто-5'-нуклеотидазы - CD73), оценку комплекса про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов и определение уровня транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов. Проведение данного исследования позволило установить значимые лабораторные показатели для оценки тяжести заболевания и прогноза эффективности применения биологической терапии у детей с псориазом.

Исследование показателей клеточного иммунитета в зависимости от клинических характеристик детей (возраст, длительность заболевания псориазом, тяжесть состояния пациентов по индексам PASI и BSA), показало, что возрастная динамика содержания основных популяций лимфоцитов у детей с псориазом соответствует основным закономерностям у здоровых

детей. Для детей с псориазом выявлено характерное повышение относительного содержания Т-лимфоцитов, Th17-лимфоцитов, активированных Т-хелперов и снижение абсолютного количества регуляторных Т-клеток с возрастом. У детей с псориазом, как и в группе сравнения, содержание центральных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти и эффекторных CD4⁺-Т-клеток памяти увеличивается с возрастом, а наивных CD4⁺-Т-клеток памяти - снижается.

Выявлено значимое увеличение содержания популяции активированных Т-хелперов и популяции клеток-супрессоров миелоидного происхождения у детей с псориазом относительно группы сравнения. Установлено увеличение содержания Th17-лимфоцитов, регуляторных Т-клеток, активированных Т-хелперов, MDSCs и моноцитарной популяции MDSCs в периферической крови, напрямую зависящие от тяжести псориаза по индексам PASI и BSA.

Показано наличие митохондриальной дисфункции в лимфоцитах у детей с псориазом, которая выражается в снижении активности сукцинатдегидрогеназы и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы. Степень снижения активности митохондриальных дегидрогеназ определялась популяцией лимфоцитов. Установлено повышение функции клеток-супрессоров миелоидного происхождения у детей с псориазом за счет увеличения уровня экспрессии фермента аргиназы-1. Тяжесть псориазического воспаления у детей сопровождалась выраженным снижением активности СДГ в регуляторных Т-клетках и аргиназы-1 в MDSCs.

Изучение ферментов пуринергической регуляции, ответственных за баланс между внеклеточным провоспалительным АТФ и противовоспалительным аденозином, показало, что наибольшее содержание клеток, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу, характерно для популяции регуляторных Т-клеток. Выявлено, что снижение индекса тяжести псориаза по PASI у пациентов сопровождается изменением содержания регуляторных Т-клеток, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу, и приближением данного показателя к уровню здоровых детей.

Примененный в работе метод проточной цитометрии с визуализацией позволил автору оценить количество клеток с транслокацией ядерного фактора транскрипции NF-κB и показать, что процент активированных клеток зависел от популяции клеток, максимальное количество выявлено в В-лимфоцитах, как у детей с псориазом, как и в группе сравнения.

Для детей с псориазом установлено увеличение процента клеток с транслокацией NF-κB в популяциях Т-хелперов, активированных Т-хелперов, регуляторных Т-клетках, Т-хелперах 17 типа и цитотоксических Th17-лимфоцитах относительно показателей здоровых детей. У пациентов с псориазом и в группе здоровых детей показана обратная корреляционная зависимость уровня транслокации NF-κB и активности сукцинатдегидрогеназы в популяциях Т-лимфоцитов и НК-клеток.

Определение уровня циркулирующих цитокинов и хемокинов в сыворотке крови детей с псориазом позволило подтвердить патогенетическую роль провоспалительных цитокинов (IL-12p70, IL-22, IL-23, IL-17, TNFα) в развитии воспалительной реакции при данной патологии. У детей с псориазом показана прямая зависимость уровня провоспалительных цитокинов и индекса PASI, который отражает тяжесть псориазического поражения. Установлено, что для детей с хорошим эффектом ГИБП к году лечения характерен повышенный уровень цитокинов IFNγ, IL-12p70, IL-1β, IL-21, IL-23, IL-27, IL-31, TNFα до назначения биологической терапии.

Анализ иммунологических показателей у детей с разной эффективностью ГИБП проводили до назначения биологической терапии, к концу индукционного курса и к году лечения. Показано, что прогноз эффективности применения биопрепаратов у детей с псориазом к году терапии возможен по содержанию активированных Т-хелперов, соотношению Th17/Treg, содержанию наивных и эффекторных Т-клеток памяти в периферической крови, уровню цитокинов IFNγ, IL-12p70, IL-21, IL-23, IL-27, IL-31, TNFα в сыворотке крови до назначения биологической терапии. У детей с псориазом установлены пороговые значения содержания клеток с транслокацией NF-κB

в популяциях NK-клеток, Th17-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов к окончанию индукционного курса терапии ГИБП, позволяющие прогнозировать эффект биопрепаратов к году лечения. Лабораторными критериями потери эффекта терапии ГИБП у детей с псориазом после индукционного курса терапии является снижение активности СДГ в Treg и снижение относительного содержания Treg, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу.

Достоверность результатов исследования

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных иммунологических методов (проточная цитометрия, мультиплексный анализ, проточная цитометрия с визуализацией). Достоверность результатов исследования подтверждается качественно спланированным дизайном работы, достаточным объемом проведенных исследований и адекватным статистическим анализом полученных данных. Выводы проведенного исследования корректны, аргументированы и соответствуют полученным результатам.

Научная новизна

Работа обладает несомненной научной новизной – определены новые иммунологические показатели, которые отражают тяжесть течения псориаза у детей и могут быть использованы для прогноза эффективности терапии генно-инженерными биологическими препаратами. Впервые описана возрастная динамика популяций лимфоцитов у детей с псориазом, включая содержание CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти в периферической крови. Определена значимость показателей клеточного иммунитета (Th17, Thact, Treg, MDSCs) в качестве дополнительных лабораторных критериев, отражающих активность заболевания. Установлены пороговые значения содержания Th17-

лимфоцитов, регуляторных Т-клеток, активированных Т-хелперов и Т-клеток памяти, позволяющие прогнозировать эффект биологической терапии у детей с псориазом на разных этапах лечения. Методом проточной цитометрии на большой выборке пациентов с псориазом впервые проведена оценка содержания клеток-супрессоров миелоидного происхождения, которая выявила увеличение содержания данной популяции клеток, их функциональной активности по уровню экспрессии аргиназы-1.

Используемый в работе иммуноцитохимический метод, впервые в педиатрической практике у детей с псориазом позволил установить наличие митохондриальной дисфункции, которая выражается в снижении активности митохондриальных дегидрогеназ (сукцинатдегидрогеназы - СДГ, глицерол-3-фосфатдегидрогеназы - ГФДГ) в популяциях лимфоцитов. Показана информативность определения активности СДГ в регуляторных Т-клетках и ГФДГ в НК-клетках в качестве дополнительных показателей оценки тяжести псориаза и прогноза эффективности проводимого лечения ГИБП.

Методом проточной цитометрии впервые у детей с псориазом и условно здоровых детей проведена оценка ферментов пуринергической регуляции – CD39⁻ и CD73⁺-эктонуклеотидаз – в популяциях CD4⁺-Т-клеток (Th17, Thact, Treg). Показана информативность определения содержания регуляторных Т-клеток, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу, для контроля активности воспалительного процесса в коже при псориазе у детей и оценки эффективности терапии блокаторами TNF α и IL-12/23.

Установлено увеличение уровня провоспалительных цитокинов (IL-23, IL-22, IL-12p70, IL-27, IL-17E, IL-17F, TNF α) в сыворотке крови, которое подтверждает целесообразность назначения антицитокиновой терапии у пациентов с псориазом. Показано увеличение цитокинов IL-23, IL-22, IL-12p70, IL-27, IL-17E, IL-17F, TNF α в сыворотке крови коррелирующее с индексом PASI, которое подтверждает важную роль данных цитокинов в поддержании воспалительной реакции кожи у детей с псориазом. Определены наиболее информативные цитокины и их пороговые значения, позволяющие

прогнозировать эффективность биологической терапии псориаза у детей.

Впервые у детей с псориазом проведена оценка количества клеток с транслокацией ядерного фактора транскрипции NF-κB в популяциях лимфоцитов методом проточной цитометрии с визуализацией. Показано повышение активности NF-κB в Т-хелперах, активированных Т-хелперах, регуляторных Т-клетках, Th17 и цитотоксических Th17-лимфоцитах у детей с псориазом относительно группы сравнения. Определены пороговые значения уровня транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов для прогноза эффективности биологической терапии.

Теоретическая значимость диссертации

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что диссертационная работа Купцовой Д.Г. расширяет представления об иммунологических механизмах системного воспаления при псориазе у детей.

Автором раскрыты особенности иммунометаболизма популяций лимфоцитов и функциональной активности клеток-супрессоров миелоидного происхождения у детей с псориазом в зависимости от тяжести патологического процесса. Показан вклад ферментов пуринергической регуляции и участие сигнального пути ядерного фактора транскрипции κB в поддержании хронического воспаления при псориазе. Автором продемонстрированы взаимосвязи между уровнями циркулирующих цитокинов и координированность цитокиновой сети в развитии псориазического воспаления.

На основании определения широкого спектра иммунологических показателей у детей с псориазом разработаны информативные лабораторные критерии, которые позволяют проводить дополнительную оценку тяжести заболевания и прогнозировать эффект терапии генно-инженерными биологическими препаратами. Мониторинг тяжести воспалительного процесса у детей с псориазом возможен по оценке содержания

активированных Т-хелперов, Th17-лимфоцитов, CD5⁺ В-клеток и NK-клеток в периферической крови.

В качестве дополнительных лабораторных критериев оценки тяжести заболевания и эффективности проводимой биологической терапии у детей с псориазом показано определение активности митохондриальных дегидрогеназ (СДГ, ГФДГ) в популяциях лимфоцитов и уровня экспрессии аргиназы-1 в клетках-супрессорах миелоидного происхождения.

Результаты диссертационной работы Купцовой Д.Г. подтверждают важную роль иммунной системы в патогенезе псориаза и обосновывают целесообразность применения терапии блокаторами цитокинов для лечения псориаза у детей.

Научно-практическая значимость диссертации

Научно-практическая значимость проведенного исследования заключается в выявлении информативных иммунологических показателей, а именно: содержание активированных Т-хелперов, соотношение Th17/Treg, содержание наивных и эффекторных Т-клеток памяти, уровень циркулирующих цитокинов в сыворотке крови, активность сукцинатдегидрогеназы в регуляторных Т-клетках, уровень транслокации ядерного фактора транскрипции κВ в NK-клетках, Th17-лимфоцитах и цитотоксических Т-лимфоцитах, которые могут быть использованы в качестве лабораторных критериев, отражающих тяжесть псориаза у детей и прогноз эффективности биологической терапии.

Показана прямая зависимость тяжести заболевания псориазом по индексам PASI, BSA и содержания Th17-лимфоцитов, активированных Т-хелперов, регуляторных Т-клеток, клеток-супрессоров миелоидного происхождения и моноцитарной субпопуляции MDSCs в периферической крови, которые могут быть использованы как дополнительные лабораторные маркеры оценки тяжести псориаза у детей.

В работе подтверждена роль клеток-супрессоров в контроле воспалительной реакции у детей с псориазом и выявлено увеличение содержания популяции MDSCs в периферической крови и уровня экспрессии фермента аргиназы-1 в них. Изменения данных параметров соотносятся с тяжестью заболевания псориазом у детей и эффективностью проводимой терапии ГИБП.

Установлено, что тяжелое течение псориаза у детей сопровождается снижением активности сукцинатдегидрогеназы в регуляторных Т-клетках и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы в общей популяции CD45⁺-лимфоцитов.

Выявлена значимость оценки уровня экспрессии ферментов пуринергической регуляции Т-клеток для контроля активности воспалительного процесса в коже при псориазе у детей и эффективности биологической терапии. Показано, что наибольшее количество клеток с экспрессией CD39 выявлено в популяции регуляторных Т-клеток, а с экспрессией CD73 – в популяции активированных Т-хелперов, как у детей с псориазом и в группе здоровых детей. При снижении тяжести псориаза у детей содержание регуляторных Т-клеток, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу, соответствует уровню здоровых детей. Показана информативность определения содержания регуляторных Т-клеток, экспрессирующих CD39⁺-эктонуклеотидазу, в качестве дополнительного лабораторного маркера прогноза эффективности ГИБП.

Отработан и описан новый подход к исследованию уровня транскрипции NF-κB в популяциях лимфоцитов методом проточной цитометрии с визуализацией (технология AMNIS). Для детей с псориазом установлено повышение уровня транслокации NF-κB в Т-хелперах, активированных Т-хелперах, регуляторных Т-клетках, Th17 и цитотоксических Th17-лимфоцитах относительно показателей здоровых детей. У пациентов с псориазом уровень транслокации NF-κB в НК-клетках, Th17-лимфоцитах и цитотоксических Т-лимфоцитах к окончанию индукционного курса позволяет прогнозировать эффект терапии ГИБП к году. При содержании НК-клеток с транслокацией

NF-κB выше 32%, Th17 более 22% и CD8⁺-Т-клеток более 19% к окончанию индукционного курса можно прогнозировать неэффективность применения ГИБП у детей с псориазом.

На основании установленной обратной корреляционной зависимости уровня транслокации NF-κB и активности сукцинатдегидрогеназы в популяциях NK-клеток и Т-лимфоцитов можно рекомендовать использование доступного иммуноцитохимического метода для оценки активности фактора транскрипции NF-κB.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация Купцовой Дарьи Геннадьевны написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и списка цитируемой литературы, изложена на 240 страницах. Содержит достаточный наглядный материал – 85 рисунков и 40 таблиц. Список литературы включает 286 источников, в том числе 73 отечественных и 213 зарубежных.

Во введении убедительно обоснована актуальность исследования, четко сформулированы цель и задачи работы, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.

В обзоре литературы подробно описаны современные научные и клинические данные по изучаемой проблематике. Данная глава посвящена детальному описанию клинической картины псориаза в детском возрасте, актуальным методам лечения заболевания и значимости широкого спектра показателей иммунной системы в патогенезе псориаза. Приводятся современные сведения о лабораторных маркерах эффективности биологической терапии иммунозависимых заболеваний.

Глава вторая посвящена описанию материалов и методов исследования. Подробно описана характеристика исследуемых групп детей. Представлены

данные об использовании современных лабораторных методов с подробным описанием алгоритмов анализа. Заключительный подраздел главы содержит информацию об методах статистической обработки полученных данных.

В третьей главе приведены результаты собственных исследований, описанные в нескольких разделах. Первые три подраздела содержат описание количественных характеристик показателей клеточного иммунитета, активности митохондриальных дегидрогеназ и ферментов пуринергической регуляции функционирования Т-клеток, уровня циркулирующих цитокинов, уровня транслокации NF-κB в лимфоцитах в зависимости от возраста и клинических особенностей у детей с псориазом и в группе сравнения. Главу результатов исследования завершает подраздел, посвященный динамическому наблюдению детей с псориазом с разным эффектом ГИБП, до назначения биологической терапии, к концу индукционного курса и к году лечения, а также разработке прогностических иммунологических критериев эффективности терапии. Стоит отметить, что все представленные результаты собственных исследований выполнены на достаточной выборке пациентов и сопровождаются фактическим материалом в тексте, рисунками и таблицами.

Четвертая глава работы представляет собой развернутое обсуждение полученных автором результатов в сопоставлении с современными научными данными. В главе изложены аргументы, на основании которых автор обосновывает важность и информативность прогностических лабораторных критериев эффективности биологической терапии псориаза у детей, которые могут быть использованы в клинической практике.

В главе заключение автор обобщает полученные результаты, что характеризует работу законченным исследованием. Диссертацию завершают 8 выводов, которые сформулированы и аргументированы согласно результатам исследования.

Оформление диссертации выполнено в соответствии с установленными требованиями.

Основные результаты диссертационной работы Купцовой Д.Г. опубликованы в 23 печатных работах, из которых 14 статей в научных журналах, включенных в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций и 9 публикаций в материалах конгрессов. Результаты исследования представлены и обсуждены на Всероссийских и Международных научно-практических конференциях по изучаемой тематике.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Замечания и вопросы по диссертации

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет.

Заключение

Диссертационная работа Купцовой Дарьи Геннадьевны «Иммунологические критерии эффективности терапии псориаза генно-инженерными биологическими препаратами в детском возрасте» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.2.7. «Иммунология», 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научных задач, имеющих существенное значение для развития иммунологии и клинической лабораторной диагностики: разработаны диагностические и прогностические лабораторные критерии эффективности генно-инженерных биологических препаратов у детей с псориазом на основании информативных показателей клеточного иммунитета, метаболизма иммунных клеток, ферментов пуринергической регуляции, концентрации циркулирующих цитокинов и уровня транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов.

Диссертация Купцовой Д.Г. полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного

постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации №101 от 26.01.2023 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинский наук по специальностям 3.2.7. «Иммунология», 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика».

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

С.А. Луговская

Подпись д.м.н., профессора С.А. Луговской заверяю.

Ученый секретарь ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор

« 20 » 09 2023 года



Т.А. Чеботарева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д.2/1, стр.1,

E-mail: rmapo@rmapo.ru

Тел. +7 (495) 680-05-99 доб. 900