

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Доценко Эдуарда Анатольевича на диссертацию Кадушкина Алексея Геннадьевича «Молекулярные механизмы, прогнозирование и обоснование путей коррекции стероидорезистентности при хронической обструктивной болезни легких», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которым она представлена к защите

Название работы, цель и задачи диссертационного исследования, а также выносимые на защиту положения и выводы, публикации, содержащие результаты исследований, представленные в диссертации, отражают актуальную проблему биохимии патологических процессов - выявление молекулярных механизмов стероидрезистентности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких.

Исходя из вышеизложенного, диссертационная работа Кадушкина Алексея Геннадьевича «Молекулярные механизмы, прогнозирование и обоснование путей коррекции стероидорезистентности при хронической обструктивной болезни легких», по своему содержанию и профилю решаемых задач соответствует отрасли науки «медицина» и специальности 03.01.04 - биохимия.

Актуальность темы диссертации определяется тем, что хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является социально значимым заболеванием, что связано с ее высокой распространенностью (более 10%), высокой инвалидизацией и смертностью пациентов. Особенность ХОБЛ, ведущая к прогрессу заболевания - персистирующее воспаление, которое характеризуется участием клеток иммунной системы: моноциты/альвеолярные макрофаги (АМ), лимфоциты и нейтрофилы, которые, по современным представлениям, секретируют хемокины, цитокины, факторы роста, протеазы и другие биологически активные вещества, участвующие в регуляции легочного и системного воспаления. В связи с этим контроль воспаления - основа базисной терапии пациента с ХОБЛ, в которой главное место отводят глюкокортикостероидам, наиболее мощным противовоспалительным препаратам.

Однако часть пациентов с ХОБЛ (до 30%) демонстрируют низкий клинический ответ к ГКС. Среди причин стероидрезистентности рассматривают повышение экспрессии глюкокортикоидного рецептора, фактора, ингибирующего миграцию макрофагов, снижение активности и экспрессии фермента гистон деацетилазы 2, однако, в целом, молекулярные механизмы стероидрезистентности до конца не изучены.

Таким образом, изучение состояния иммунной системы у пациентов с ХОБЛ и поиск прогностических маркеров резистентности к стероидам безусловно актуальны.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность и достоверность изложенных в диссертационной работе научных результатов определяется огромным объемом полученного и обобщенного автором фактического материала при проведении экспериментальных исследований на клетках крови и легких пациентов с ХОБЛ и лиц, включенных в группы сравнения.

Глава 1 представляет собой обзор литературы, посвящена характеристике современного состояния проблемы. Даны общая характеристика и социально-экономическая значимость ХОБЛ, описаны патогенетические аспекты развития ХОБЛ. Автор обсуждает характер воспалительной реакции при ХОБЛ, участие провоспалительных цитокинов (ИЛ-1(3), ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-23, ФНО α , ИФН) и хемокинов (CXCL1, CXCL3, CXCL5 и др.). Автор детально обсуждает молекулярные механизмы действия глюкокортикоидов, известные механизмы формирования устойчивости к глюкокортикоидам. Описаны современные взгляды на роль иммунокомпетентных клеток и их субпопуляций в формировании воспаления. Глава написана достаточно четко, последовательно и обосновывает необходимость оценки иммунологических параметров для прогноза формирования стероидрезистентности у пациентов ХОБЛ.

Глава 2 характеризует материалы и методы исследования. Интерес представляет раздел «Методология исследования», в котором описана общая структура исследования, что приближает данный раздел к классическому разделу «Дизайн». Подробно охарактеризованы пациенты с ХОБЛ (196 пациентов).

Методологически анализировали способность иммунокомпетентных клеток к синтезу и секреции цитокинов воспалительного ответа после или в результате контакта с ГКС. Детально описаны методики выделения мононуклеарных клеток периферической крови, определения секреции цитокинов мононуклеарными клетками, оценки внутриклеточной продукции цитокинов, лимфоцитов крови, экспрессирующих гистон деацетилазу 2, оценки содержания глюкокортикоидного рецептора, его изоформы R; оценки хемотаксиса лимфоцитов и моноцитов крови под влиянием лекарственных средств, миграции лимфоцитов и моноцитов крови к CCL5 и CXCL10. Показатели исследованы как в периферической крови, так и в бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ).

Для анализа цитокин-секретирующей функции клеток легких под влиянием ГКС из БАЛЖ пациентов с обострением ХОБЛ выделяли АМ, инкубировали их с ГКС в различных концентрациях в присутствии стимулятора ЛПС в течение 1 суток. Затем в клеточных супернатантах измеряли уровень цитокинов методом иммуноферментного анализа.

На следующем этапе анализировали показатели общего анализа крови, уровни цитокинов, гормонов, иммуноглобулина Е, субпопуляции лимфоцитов периферической крови пациентов с ХОБЛ в зависимости от чувствительности АМ к ГКС.

На заключительном этапе автор пытался найти способ преодоления стероидрезистентности. Для этого оценивали выработку и секрецию цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови (МПК-клетками), внутриклеточную продукцию цитокинов лимфоцитами крови, миграцию лимфоцитов и моноцитов (хемокины) при совместном использовании лекарственных средств (ГКС в сочетании с нортриптилином, теофиллином, азитромицином, АЦЦ).

Статистические методы современны: классические методы параметрической и непараметрической статистики с расчетом чувствительности и специфичности, кластерный анализ.

Глава 3 посвящена прогнозированию устойчивости к глюкокортикоидной терапии у пациентов с обострением хронической обструктивной болезни легких. Автором показано, что лимфоциты периферической крови имеют различную плотность глюкокортикостероидных рецепторов как в различных субпопуляциях, так и, что особенно важно с точки зрения ХОБЛ, у курящих и некурящих людей. Показано, что инкубация АМ, стимулированных ЛПС, с дексаметазоном сопровождалась снижением секреции ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО α этими клетками.

С учетом того, что уровень ИЛ-8 выше в крови курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими здоровыми людьми, а концентрация ФНО α и ИЛ-6 не различается, а также того, что ИЛ-8 является главным хемоаттрактантом нейтрофилов, которые, оказавшись в легких, продуцируют ферменты и АФК, автор закономерно отводит последнему ведущую роль в прогрессировании заболевания и отводит ключевую роль в прогрессировании заболевания способности дексаметазона подавлять продукцию ИЛ-8. Это, в свою очередь, позволило выделить признак кортикоидрезистентности *in vitro*: подавление продукции ИЛ-8 менее 50% под влиянием терапевтических концентраций дексаметазона.

Автором проанализирован ряд лабораторных показателей, среди которых самую высокую чувствительность (83,3%) для определения устойчивости к ГКС имели абсолютное и относительное количество эозинофилов крови; то есть, у чувствительных пациентов уровень эозинофилов был выше.

Автором построена математическая модель прогнозирования устойчивости к глюкокортикоидной терапии при обострении ХОБЛ с использованием рутинных тестов общего анализа крови, которая одновременно учитывает результаты определения относительного количества эозинофилов, отношения нейтрофилы/лимфоциты, тромбоциты/лимфоциты. Созданная модель имеет чувствительность 83,3%, специфичность 77,8%, диагностическую эффективность **80,0%**.

В главе 4 автором рассмотрены различные аспекты продукции провоспалительных цитокинов клетками крови *in vitro* под влиянием теофиллина и N-ацетил-Ь-цистеина в сочетании с глюкокортикоидами.

Показано, что преинкубация МПК-клеток пациентов с ХОБЛ с будесонидом приводит к снижению фитогемагглютинин (ФГА)-индуцированной секреции провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8 и ИЛ-13, но не влияет на синтез ИЛ-17А, ИЛ-33, ФИММ и ТСЛП. Будесонид подавляет синтез ИФНу ЦТЛ, НК клетками и продукцию ФНОа Т-хелперами, НК клетками, НКТ-подобными клетками.

Теофиллин и АЦЦ демонстрируют противовоспалительные эффекты *in vitro*, снижают продукцию цитокинов клетками крови пациентов с ХОБЛ: ИЛ-4 и ИЛ-1А МПК-клетками, синтез ИЛ-4 НК и НКТ-подобными клетками.

Сочетание теофиллина и будесонида оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на продукцию ИЛ-4 и ИЛ-8 МПК-клетками, а также на синтез ИЛ-4 CD4⁺ Т-клетками, НК клетками, НКТ-подобными клетками и ИЛ-8 CD8⁺ Т-лимфоцитами, НК клетками, НКТ-подобными клетками, чем действие одного будесонида.

Глава 5 посвящена изучению синтеза провоспалительных цитокинов клетками крови под влиянием нортриптилина и азитромицина в комбинации с глюкокортикоидами.

Показано, что азитромицин и нортриптилин самостоятельно демонстрируют противовоспалительные эффекты в отношении выработки цитокинов МПК-клетками пациентов с ХОБЛ. Они подавляют секрецию ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-1А МПК-клетками, продукцию ИЛ-4 и ИЛ-8 Тх-клетками, ЦТЛ, НК и НКТ-подобными клетками, а также синтез ФНОа Тх-клетками. Комбинация азитромицина (или нортриптилина) и будесонида оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на синтез ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-1А, ТСЛП МПК-клетками, а также выработку ИЛ-4 и ИЛ-8 Тх-клетками, ЦТЛ, НК и НКТ-подобными клетками, чем один будесонид.

В главе 6 приведены результаты оценки хемотаксиса моноцитов и субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов с ХОБЛ под влиянием нортриптилина, азитромицина и их комбинации с ГКС будесонидом.

Показано, что у курящих пациентов с ХОБЛ, по сравнению со здоровыми курящими и некурящими людьми, как в крови, так и в БАЛЖ увеличено процентное содержание Т-лимфоцитов, НК клеток и НКТ-подобных клеток, обладающих хемокиновыми рецепторами CXCR3 и CCR5; значимые различия доли Т-лимфоцитов, НК клеток и НКТ-подобных клеток, содержащих хемокиновые рецепторы CXCR4, CXCR6, CCR6 и CCR7 отсутствуют. Большинство В-лимфоцитов в крови и БАЛЖ как пациентов с ХОБЛ, так и здоровых людей содержат хемокиновые рецепторы CXCR4, CXCR5, CCR6 и CCR7.

Будесонид подавляет миграцию к CCL5 ЦТЛ, НК клеток и В-лимфоцитов крови, а к CXCL10 - НК клеток и В-лимфоцитов крови, но не влияет на

перемещение ЦТЛ к CXCL10 и Т-хелперов крови к CCL5 и CXCL10. Кроме того, будесонид стимулирует миграцию моноцитов в направлении хемокинов CCL5 и CXCL10.

В минимальной концентрации нортриптилин снижает хемотаксис к CXCL10 Т-хелперов, НК клеток и В-лимфоцитов, к CCL5 - Т-хелперов, ЦТЛ, НК клеток и В-лимфоцитов, но не изменяет перемещение ЦТЛ к CXCL10 и моноцитов к обоим хемокинам. Комбинация этого препарата в низкой концентрации с будесонидом индуцирует хемотаксис моноцитов к CCL5 и CXCL10 и более существенно, чем один будесонид, супрессирует миграцию к CXCL10 субпопуляций лимфоцитов.

Интересно, что в высокой концентрации нортриптилин, самостоятельно и в сочетании с будесонидом, ингибирует миграцию к CCL5 и CXCL10 Т-хелперов, ЦТЛ, НК клеток и В-лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ, а также ускоряет перемещение к этим хемокинам моноцитов крови, причем комбинация нортриптилина и будесонида обладает более выраженным действием на миграцию клеток крови пациентов с ХОБЛ к CCL5 и CXCL10, чем один будесонид.

Азитромицин, как самостоятельно, так и в сочетании с будесонидом, ингибирует миграцию в направлении CCL5 и CXCL10 Т-хелперов, ЦТЛ, НК клеток, В-лимфоцитов крови, и ускоряет перемещение к этим хемокинам моноцитов крови. При этом способность азитромицина подавлять миграцию перечисленных субпопуляций лимфоцитов, в комбинации с будесонидом и без него, превосходит эффективность одного будесонида.

В главе 7 исследованы молекулярные механизмы повышения стероидочувствительности клеток под влиянием нортриптилина.

Нортриптилин способен проявлять противовоспалительное действие и потенцировать действие кортикостероидов. В отличие от высоких концентраций будесонида и нортриптилина, показано, что в низких концентрациях будесонид и нортриптилин не влияют на фосфорилирование p38 MAPK и p65 NF-kB, синтез ГР, ГР(3, ГДА2 и ацетилирование лизина гистона H4 в Т-хелперах, ЦТЛ, НК и НКТ-подобных клетках крови пациентов с ХОБЛ, стимулированных форбол-миристан-ацетатом (ФМА) и иономицином. В тоже время сочетание будесонида (10 нМ) и нортриптилина (1 мкМ) подавляет выработку ГР(3, фосфорилирование p38 MAPK и p65 NF-kB, ацетилирование лизина гистона H4 и индуцирует синтез ГДА2 в вышеперечисленных клетках крови пациентов с ХОБЛ.

Полученные автором результаты закономерно определяют перспективы дальнейших исследований: была ли связь между лабораторной стероидрезистентностью и клинической резистентностью; были ли различия между применением системных и топических кортикостероидов?

Степень новизны результатов диссертации и научных положений, выносимых на защиту

Научная новизна состоит в том, что установлены взаимосвязь отношения абсолютных количеств нейтрофилов к лимфоцитам (ОНЛ) и тромбоцитов к

лимфоцитам (ОТЛ) в периферической крови, уровня ФИММ в плазме крови с устойчивостью клеток к ГКС у пациентов с обострением ХОБЛ.

Разработана математическая модель прогнозирования эффективности ГКС у пациентов с обострением ХОБЛ на основе оценки клеточной чувствительности к кортикостероидам при обострении ХОБЛ, которая включает параметры общего анализа крови и результаты определения уровня ФИММ в плазме крови (диагностическая эффективность составила 86,7%).

Получены новые данные об интенсивности связывания ГКС в субпопуляциях лимфоцитов и моноцитах крови пациентов с ХОБЛ, которая оказалась ниже у пациентов с ХОБЛ, чем у здоровых курящих и некурящих людей.

Получены данные о синергичности сочетанного влияния азитромицина и будесонида на выработку провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови пациентов с ХОБЛ. Впервые установлена способность комбинации азитромицина и будесонида снижать миграцию основных субпопуляций лимфоцитов пациентов с ХОБЛ к CCL5 и CXCL10.

Проведена комплексная оценка содержания основных субпопуляций лимфоцитов, снабженных хемокиновыми рецепторами в периферической крови и БАЛЖ. У пациентов с ХОБЛ имеет место повышение доли лимфоцитарных субпопуляций с несущих на своей поверхности хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR5 по сравнению со здоровыми людьми.

Новыми являются данные, позволяющие обосновать совместное применение нортриптилина и ГКС, что у пациентов с ХОБЛ повышает чувствительность клеток к стероидам.

Оценка научной и практической значимости, социальной и экономической ценности основных результатов диссертации.

Научная значимость исследования состоит в том, что автор предлагает новые пути для исследования стероидрезистентности. Разработка теоретических представлений может служить фундаментом преодоления стероидрезистентности в клинической практике.

Практическое использование результатов исследования

В работе *in vitro* обоснована целесообразность применения нортриптилина и азитромицина для коррекции стероидной устойчивости, а также *in vitro* обоснована сниженная способность N-ацетилцистеина повышать чувствительность клеток к стероидам, что свидетельствует об отсутствии пользы от совместного использования N-ацетилцистеина и ГКС.

Автор диссертации построил две математические модели, решение которых позволяет определить вероятность сниженного ответа на ГКС с высокой диагностической точностью (80,0% и 86,7%). Оба уравнения легли в основу утвержденных Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкций по применению (№135-1118 от 30.11.2018 и №022-0323 от 15.05.2023) и были внедрены в работу 11 учреждений здравоохранения г. Минска, г. Бреста, г. Гродно,

г. Гомеля, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим от обострения ХОБЛ. Использование инструкций по применению подтверждено 13 оформленными в надлежащем порядке актами о внедрении.

Результаты исследования используются при обучении студентов медицинских университетов Республики Беларусь, о чем свидетельствуют 6 актов о внедрении. Полученные диссертантом данные, в частности о способности нортриптилина к коррекции стероидной устойчивости, рекомендуется использовать при проведении новых научных исследований, направленных на поиск подходов к восстановлению чувствительности к стероидам при заболеваниях внутренних органов.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

По теме диссертации опубликовано 8 статей в научных изданиях, включенных в перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертаций, 16 статей в иностранных научных изданиях, что отвечает требованиям пункта 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий. Соискателем опубликованы 18 тезисов докладов и материалов конференций, из них 12 - за рубежом.

По материалам диссертации разработаны и утверждены в Министерстве здравоохранения Республики Беларусь 2 инструкции по применению (№ 135-1118 от 30.11.2018 и № 022-0323 от 15.05.2023), в Евразийской патентной организации получен патент на изобретение (№ 044546 от 31.08.2023).

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Диссертация Кадушкина Алексея Геннадьевича «Молекулярные механизмы, прогнозирование и обоснование путей коррекции стероидорезистентности при хронической обструктивной болезни легких», написана в традиционном стиле, оформлена в соответствии с требованиями ВАК Республики Беларусь. Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК, а его содержание полностью соответствует основным положениям, полученным результатам и выводам, изложенным в диссертационной работе.

Диссертация изложена на 309 страницах, состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, главы общая концепция работы, характеристика пациентов, материалов и методов исследования, 5 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, библиографического списка, включающего 625 (из которых 608 — на английском языке, 17 — на русском языке) наименований, а также списка публикаций автора и приложений. Диссертация содержит 31 таблицу (18 страниц), 49 рисунков (44 страницы), 20 приложений (30 страниц).

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Автор продемонстрировал глубокие познания в области синтеза и функциональной активности белков, в том числе провоспалительных цитокинов, внутриклеточной передачи гормонального сигнала, поверхностных и внутриклеточных рецепторов и т.д. Соискатель владеет современными методами исследований, умеет работать на высокотехнологичном оборудовании (спектрофотометр, проточный цитометр, культивирование клеток). Автор способен ставить и решать сложные задачи в области клинической биохимии, анализировать полученные результаты и делать выводы. Автор прекрасно владеет методами статистического анализа.

Анализируя новизну научных результатов, их актуальность и обоснованность, теоретическую и практическую значимость, опубликованность результатов и подтвержденную достоверность выносимых на защиту положений и выводов, можно прийти к заключению, что научная квалификация А.Г. Кадушкина соответствует требованиям ВАК к соискателям ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

Конкретные научные результаты, за которые соискателю может быть присуждена искомая ученая степень.

Ученая степень доктора медицинских наук Кадушкину Алексею Геннадьевичу может быть присвоена за решение актуальной проблемы на стыке клинической биохимии и пульмонологии: выявление особенностей продукции биологически активных белков иммунокомпетентными клетками пациентов с ХОБЛ, которые определяют развитие устойчивости к глюкокортикостероидной терапии, включающей:

1. Характеристику одного из молекулярных механизмов влияния табакокурения на формирование ХОБЛ, а именно: снижение степени связывания ГКС с рецепторами в субпопуляциях лимфоцитов - Т-хелперах (CD3+CD4+), цитотоксических Т-лимфоцитах (ЦТЛ, CD3+CD8+), регуляторных Т-лимфоцитах (CD4+CD25+CD127-), В-лимфоцитах (CD 19+), NK клетках (CD3-CD56+), NKT-подобных клетках (CD3+CD56+) и моноцитах (CD 14+) как у здоровых курящих по сравнению со здоровыми некурящими (в 1,20 - 1,26 раза), так и у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с некурящими (в 1,4-1,6 раз).
2. Доказательство различных эффектов ГКС в терапевтической концентрации на продукцию цитокинов клетками периферической крови и альвеолярными макрофагами и обоснование лабораторного критерия стероидрезистентности у пациентов с ХОБЛ: снижение секреции ИЛ-8 в АМ под влиянием ГКС менее, чем на 50%, в то время как у стероидочувствительных пациентов продукция ИЛ-8 в АМ в присутствии ГКС снижается более, чем на 50%.
3. Выявление рутинных лабораторных критериев стероидрезистентности пациентов с ХОБЛ, характеризующиеся повышением в крови абсолютного и относительного количества нейтрофилов, абсолютного количества тромбоцитов,

отношения абсолютных количеств нейтрофилов к лимфоцитам (ОНЛ) и тромбоцитов к лимфоцитам (ОТЛ), уровня фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (ФИММ), снижение в крови абсолютного и относительного количества эозинофилов, относительного количества лимфоцитов.

4. Доказательство подавления секреции провоспалительных цитокинов *in vitro* субстанциями различных классов, используемых при лечении ХОБЛ, а именно: N-ацетил-Ь-цистеин, теofilлин, азитромицин, нортриптилин: ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-33, ИЛ-17А МПК-клетками, стимулированными ФГА; продукцию ИЛ-4 и ИЛ-8 Т-хелперами, ЦТЛ, НК клетками и НКТ-подобными клетками крови, активированными ФМА и иономицином.

5. Доказательство факта, что сочетанное применение будесонида с АЦЦ или теofilлином или азитромицином или нортриптилином оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на синтез провоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-33, ТСПП и ФИММ МПК-клетками, продукцию ИЛ-4, ИЛ-8, ФНОа Т-хелперами, ЦТЛ, НК клетками и НКТ-подобными клетками, синтез ИФНу ЦТЛ, НК клетками и НКТ-подобными клетками, чем собственно будесонид.

6. Доказательство факта, что сочетанное применение будесонида с азитромицином или нортриптилином оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на миграцию к CCL5 и CXCL10 Т-хелперов, НК клеток и В-лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ, а также ускоряет перемещение к этим хемокинам моноцитов крови.

7. В отличие от будесонида и нортриптилина (1 мкМ), действующих по отдельности, их сочетание подавляет образование ГР3, ф-р38 МАПК, ф-р65 NF-kB, ацетилированного лизина гистона H4 и активирует продукцию ГДА2 в CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах, НК и НКТ-подобных клетках крови пациентов с ХОБЛ.

8. Разработку математической модели прогнозирования устойчивости к ГКС у пациентов с обострением ХОБЛ, которая включает относительное количество эозинофилов, ОТЛ и уровень ФИММ в плазме крови и позволяет прогнозировать резистентность к ГКС пациентов с ДЭ 86,7%, ДЧ 83,3%, ДС 88,9%, ПЦПР 83,3%, ПЦОР 88,9%, AUC 0,889.

Согласен на размещение настоящего отзыва в интернете на официальном сайте учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (<http://www.bsmu.by>).

Официальный оппонент,
д.м.н., профессор
Дата


Э.А.Доценко

