

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора, профессора кафедры химии и естественнонаучного образования Учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова» Чиркина Александра Александровича о диссертации Кадушкина Алексея Геннадьевича «Молекулярные механизмы, прогнозирование и обоснование путей коррекции стероидорезистентности при хронической обструктивной болезни легких», представленной в Совет по защите диссертаций Д 03.18.02 при Учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» 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

Диссертация Кадушкина А.Г. соответствует специальности 03.01.04 – биохимия, так как данное исследование посвящено изучению биохимических механизмов на клеточном уровне при формировании устойчивости к кортикостероидам при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), что соответствует паспорту специальности по пунктам 3.1, 3.6, 3.8, 3.13 и 3.14. Диссертация разграничена со смежными специальностями: 02.00.10 – биоорганическая химия; 03.01.07 – молекулярная генетика; 03.03.01 – физиология; 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология; 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология; 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика. Диссертация выполнена в рамках отрасли «медицинские науки», потому что объект исследования (здоровые курящие и некурящие люди, пациенты с ХОБЛ, периферическая кровь и бронхоальвеолярная лаважная жидкость) и предмет исследования (анализ анамнеза и лабораторного обследования пациентов с ХОБЛ; специальные морфологические и биохимические исследования иммуноглобулинов, гормонов и цитокинов при экспериментах *in vitro* по исследованию механизмов лекарственной терапии на уровне лимфоцитов и моноцитов) соответствуют этой отрасли науки. Работа выполнена в рамках приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2021-2025 годы, утвержденных Указом Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. № 156, в соответствии с разделом 2 «биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: подраздел – диагностика, медицинская профилактика и лечение инфекционных, включая вирусной этиологии, и неинфекционных заболеваний, экспертиза качества медицинской помощи». На протяжении последних 10 лет работа выполнялась в рамках четырех научных программ с

номерами государственной регистрации ГР20142201, ГР20170252, ГР20171158, ГР20181624.

### **Актуальность темы диссертации**

1. Диссертация Кадушкина А.Г. посвящена биохимическим аспектам формирования устойчивости к кортикостероидам при ХОБЛ вследствие окислительного стресса, что приводит к нарушениям взаимодействия глюкокортикостероидов с рецепторами клеток-мишеней. В результате не подавляется продукция медиаторов воспаления. Клинически это проявляется в формировании двух основных групп пациентов - стероидочувствительных и стероидорезистентных. Однако надежных прогностических критериев отнесения пациентов с обострением ХОБЛ к той либо иной группе нет из-за чрезвычайного разнообразия вариантов метаболического профиля пациентов.

2. Отсутствие действенных подходов к повышению чувствительности клеток пациентов с ХОБЛ к глюкокортикостероидам определяет актуальность поиска новых препаратов, способных потенцировать действие этой группы стероидных гормонов, например, представителей группы макролидов/фторкетolidов. Обнадеживающие результаты были получены при инкубации клеток пациентов с ХОБЛ в присутствии солитромицина, но, к сожалению, с развитием серьезных побочных эффектов. Поэтому актуальным является научное направление исследований в рецензируемой диссертации: биохимические и молекулярно-клеточные критерии прогнозирования и биохимическое обоснование терапии ХОБЛ.

3. Для объективной оценки реактивности пациентов с ХОБЛ требуется создать доступный и информативный спектр биохимических исследований биологических жидкостей и циркулирующих клеток, позволяющий объективно оценивать особенности метаболизма на этапе гормон – рецептор – экспрессия генов – продукция биорегуляторов пептидной природы. Автор диссертации на стр. 74 привел перечень наиболее важных биохимических процессов, лежащих в основе стероидорезистентности: нарушение связывания и транслокации глюкокортикоидного рецептора (ГР) в ядро, повышенная экспрессия изоформы ГРβ и фактора, ингибирующего миграцию макрофагов, нарушение ацетилирования гистонов вследствие снижения экспрессии гистон деацетилазы 2 и др. Это сложная научная задача, которая связана с 5 пунктами паспорта специальности, по которой защищается данная диссертация.

4. Учитывая «полиморфность» обследуемых групп пациентов с ХОБЛ, актуальным является наукометрическая характеристика каждого из используемых способов лабораторного анализа биологических жидкостей, тканей и клеток, в частности ROC-анализ полученных результатов.

5. Работа посвящена актуальной международной проблеме – поиску способов борьбы со стероидорезистентностью у пациентов с ХОБЛ, о чем свидетельствуют цитирования публикаций автора диссертации в международных специализированных научных изданиях.

### **Степень новизны результатов диссертации и научных положений, выносимых на защиту**

1. Автор диссертации впервые показал возможность использования величины отношения абсолютного количества тромбоцитов к абсолютному количеству лимфоцитов и отношения абсолютного количества нейтрофилов к абсолютному количеству лимфоцитов в качестве предикторов сниженного ответа на глюкокортикостероиды у пациентов с обострением ХОБЛ. Соискатель впервые сконструировал диагностическую модель, основанную на рутинных тестах общего анализа крови (относительном количестве эозинофилов крови, отношении абсолютного количества тромбоцитов крови к абсолютному количеству лимфоцитов крови и отношении абсолютного количества нейтрофилов крови к абсолютному количеству лимфоцитов крови), для прогнозирования эффективности назначения глюкокортикостероидов пациентам, страдающим обострением ХОБЛ, которая обладает лучшей диагностической эффективностью (80,0%), чем использование этих тестов в отдельности (71,1%).

2. Соискатель первым обнаружил и опубликовал возможность сочетанного использования трех предикторов (относительного количества эозинофилов крови, отношения абсолютного количества тромбоцитов крови к абсолютному количеству лимфоцитов крови и уровня в плазме крови цитокина MIF (фактора, ингибирующего миграцию макрофагов)) для повышения эффективности (до 86,7%) прогнозирования сниженного ответа на глюкокортикостероиды у пациентов, страдающих обострением ХОБЛ.

3. Уникальными являются результаты, свидетельствующие о более низкой степени связывания глюкокортикоида дексаметазона со своими рецепторами в лимфоцитарных субпопуляциях (Т-хелперах, цитотоксических Т-лимфоцитах, регуляторных Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах, НК и НКТ-подобных клетках) и моноцитах крови пациентов с ХОБЛ, чем у курящих и некурящих лиц без нарушения функции внешнего дыхания, включенных в группы сравнения.

4. Новыми являются данные, полученные в результате инкубации мононуклеарных клеток крови пациентов с ХОБЛ с макролидным антибиотиком азитромицином и глюкокортикостероидом будесонидом, характеризующиеся (по сравнению с клетками, контактировавшими с одним будесонидом) снижением внутриклеточной продукции в Т-хелперах,

цитотоксических Т-лимфоцитах, НК и НКТ-подобных клетках крови цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-8, подавлением образования и секреции из мононуклеарных клеток крови цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-17А, TSLP (тимического стромального лимфопоэтина), замедлением движения лимфоцитов крови в направлении хемокинов CXCL10 и CCL5.

5. Автор диссертационной работы первым в мире обосновал возможность использования нортриптилина для повышения чувствительности клеток пациентов с ХОБЛ к глюкокортикостероидам, показав способность этого препарата в сочетании с глюкокортикостероидом будесонидом превосходить один будесонид по силе ингибирующего воздействия на продукцию мононуклеарными клетками крови цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, TSLP, выработке Т-хелперами, цитотоксическими Т-лимфоцитами, НК и НКТ-подобными клетками крови цитокинов ИЛ-4, ИЛ-8, интерферона  $\gamma$ , продукции НК и НКТ-подобными клетками крови цитокина фактора некроза опухоли  $\alpha$ .

6. Впервые показано, что комбинация нортриптилин+будесонид превосходила по силе действия один будесонид в отношении ингибирования миграции субпопуляций лимфоцитов и активации миграции моноцитов крови. Раскрыты генетические и эпигенетические механизмы противовоспалительного и потенцирующего эффектов будесонида в комбинации нортриптилин+будесонид на внутриклеточные молекулы: ацетилирование лизина гистона H4, действие на гистон деацетилазу 2, глюкокортикоидный рецептор  $\beta$ , p38 митоген-активируемую протеинкиназу, фактор транскрипции p65 NF- $\kappa$ B. Полученные данные по действию нортриптилина защищены патентом на изобретение, выданным соискателю Евразийским патентным ведомством (№ 044546 от 31.08.2023).

7. Неоспоримой научной новизной также обладают результаты инкубации мононуклеарных клеток крови с ацетилцистеином (АЦЦ), демонстрирующие низкую способность этого лекарственного средства потенцировать действие глюкокортикостероидов, что выражается в отсутствии различий между комбинацией АЦЦ+будесонид и одним будесонидом в секреции цитокинов ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-13, ИЛ-17А, ИЛ-33, TSLP, MIF мононуклеарными клетками крови и образовании цитокинов ИЛ-8, фактора некроза опухоли  $\alpha$  и интерферона  $\gamma$  Т-хелперами, цитотоксическими Т-лимфоцитами, НК и НКТ-подобными клетками крови пациентов с ХОБЛ.

8. Проведение исследований, позволивших получить новые научные результаты, были одобрены Комитетом по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

## **Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

1. Для выполнения различных экспериментов, приведенных в диссертации, использовалась периферическая кровь, полученная от 116 пациентов с ХОБЛ, 41 курящего человека и 40 некурящих людей без нарушения функции внешнего дыхания, включенных в группы сравнения. Для проведения экспериментов с культурой клеток легких у 80 пациентов с ХОБЛ и 7 курильщиков, не имеющих нарушения функции легких, проводился забор бронхоальвеолярной лаважной жидкости. Пациенты с ХОБЛ и группы сравнения в рамках отдельных исследований были сопоставимы между собой по возрасту и полу. Для решения поставленных задач объем и количество исследований являются достаточными.

2. В работе были использованы стандартизированные методы исследований и современное оборудование специализированных лабораторий с указанием фамилий специалистов, участвовавших в экспериментах. Влияние лекарственных средств на продукцию цитокинов и выработку внутриклеточных белков оценивали после длительной инкубации клеток крови и легких в стерильных условиях. Абсолютное и относительное количество клеток крови подсчитывали с помощью автоматического гематологического анализатора «Sysmex 5000i» (Sysmex Corporation, Япония). Измерение концентрации цитокинов в клеточных супернатантах (после инкубации альвеолярных макрофагов и мононуклеарных клеток крови) и плазме крови, уровня гормонов (кортизола и прогестерона) и иммуноглобулина Е в плазме крови проводилось методом иммуноферментного анализа на спектрофотометре «StatFax 3200» (Awareness Technology, США) либо с помощью автоматического иммуноферментного анализатора «Brio» (Seac, Италия) и планшетного фотометра «Sirio» (Seac, Италия). Определение процентного содержания лимфоцитарных популяций и субпопуляций, экспрессирующих хемокиновые и глюкокортикоидные рецепторы, цитокины, ферменты, аминокислоту лизин гистона H4, фактор транскрипции NF-κB, осуществлялось методом проточной цитометрии на цитометре «Navios» с последующим анализом в программе «Kaluzza» (Beckman Coulter, США).

3. Для статистического анализа данных диссертант правомерно использовал параметрические и непараметрические методы исследований, воспользовавшись специализированными программами «Statistica for Windows 10.0» (StatSoft Inc., США), «GraphPad Prism» (GraphPad Software Inc., США).

4. После обнаружения статистически достоверных отличий в уровнях лабораторных параметров в периферической крови пациентов с ХОБЛ в

стадии обострения соискателем применены методы математического моделирования и ROC-анализа («MedCalc», MedCalc Software, Бельгия).

Таким образом, основываясь на достаточном количестве исследуемого материала, высоком методическом уровне реализации экспериментов и корректной статистической обработке полученных данных, можно сделать заключение о достоверности и обоснованности выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

### **Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию**

1. Научная ценность результатов диссертации состоит в обнаружении низкой связывающей способности глюкокортикоидов с соответствующими рецепторами в моноцитах и лимфоцитах крови пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими и некурящими людьми, не имеющими нарушений функции дыхания, что дополняет патогенетические аспекты развития стероидорезистентности при ХОБЛ.

2. На основании анализа цитокин-секретирующей функции альвеолярных макрофагов под влиянием глюкокортикостероидов диссертант разделил пациентов с обострением ХОБЛ на резистентных и чувствительных к кортикостероидам и установил ряд параметров периферической крови, которые различаются у этих двух групп пациентов.

3. Соискатель получил новые данные об ответе мононуклеарных клеток крови, выражающемся в изменении выработки медиаторов воспаления, на действие лекарственных средств – будесонида, АЦЦ, теофиллина, нортриптилина, азитромицина при их различных комбинациях. Результаты исследований позволили выявить выраженный противовоспалительный потенцирующий эффект, возникающий при совместном использовании нортриптилина и будесонида либо азитромицина и будесонида.

4. Практическая значимость результатов диссертации обоснована разработкой двух инструкций по применению, утвержденных в Министерстве здравоохранения Республики Беларусь (от 30.11.2018 № 135-1118 и от 15.05.2023 № 022-0323), которые посвящены прогнозированию эффективности глюкокортикостероидов у пациентов с обострением ХОБЛ. В инструкции от 15.05.2023 №022-0323 – помимо параметров общего анализа крови (относительного количества эозинофилов крови, отношения абсолютного количества тромбоцитов крови к абсолютному количеству лимфоцитов крови), дополнительно необходимо измерить концентрацию цитокина MIF в плазме крови, что достигается постановкой иммуноферментного анализа. Первый метод от 2018 года имеет диагностическую эффективность 80,0%, второй метод от 2023 года - 86,7%.

Первая инструкция внедрена и используется в 11 учреждениях здравоохранения, вторая инструкция – в 2 учреждениях здравоохранения, о чем свидетельствуют акты внедрения. Результаты исследований соискателя также внедрены и используются в учебном процессе кафедр биологической химии четырех медицинских университетов страны, а также 2-ой кафедры внутренних болезней и кафедры клинической фармакологии БГМУ (в разделе «Приложение» диссертации имеются соответствующие цветные сканированные копии).

5. Результаты диссертации имеют значимый экономический эффект, поскольку при учете фармакорезистентности заболевания и предложенных путей ее преодоления приводят к повышению эффективности проводимой терапии обострений ХОБЛ, и, как следствие, к снижению длительности госпитализации стероидорезистентных пациентов с обострением ХОБЛ (сокращению затрат системы здравоохранения на стационарное лечение таких пациентов). С социальной точки зрения это сопровождается предотвращением летальных исходов вследствие обострений ХОБЛ и более быстрым возвращением пациента к привычной жизни (после выписки из больницы).

#### **Опубликованность результатов диссертации в научной печати**

Результаты диссертационной работы Кадушкина А.Г. опубликованы в 45 печатных научных работах: 23 статьях в научных журналах и 1 статье в сборнике научных трудов, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий, утвержденного Указом Президента Республики Беларусь от 17 ноября 2004 г. № 560 (в редакции Указа Президента Республики Беларусь от 2 июня 2022 г. № 190 (далее – Положение о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий), 18 материалах конференций и тезисах докладов, 2 инструкциях по применению, утвержденных Министерством здравоохранения Республики Беларусь, и 1 патенте на изобретение, выданном Евразийским патентным ведомством. В 40 из 45 печатных работ соискатель является первым автором. Общее количество авторских листов публикаций по теме диссертации – 30,1. Важно отметить, что общее количество статей Кадушкина А.Г. (24) в изданиях, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий, превышает установленный порог в 15 статей для соискателей ученой степени доктора наук по медицинским наукам. При этом в иностранных научных изданиях опубликованы 16 статей и 12 материалов конференций и тезисов докладов, что значительно больше нормы для докторских диссертаций, составляющей 2 статьи в иностранных научных изданиях.

Печатные работы в полной мере отражают полученные результаты и содержание диссертации. Полный список публикаций соискателя представлен как в диссертации, так и автореферате.

### **Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК**

Оформление диссертации соответствует требованиям главы 3 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий и глав 2, 3 Инструкции о порядке оформления диссертации, диссертации в виде научного доклада, автореферата диссертации и публикаций по теме диссертации, утвержденной Постановлением ВАК Республики Беларусь от 28 февраля 2014 г. №3 (в редакции постановления ВАК Республики Беларусь от 22 августа 2022 г. №5) (далее – Инструкция о порядке оформления диссертации).

Диссертационная работа включает введение, общую характеристику работы, аналитический обзор литературы, главу, содержащую описание материалов и методов исследований, пять глав с результатами собственных исследований, заключение, библиографический список, насчитывающий 625 источников литературы и 45 публикаций соискателя, 20 приложений. Отношение диссертации к специальности 03.01.04 – биохимия определено в аналитическом обзоре литературы в разделах 1.4-1.6, в которых представлен анализ современных биохимических и молекулярно-генетических методов оценки биосигналинга в организме и клетках.

Работа занимает 309 страниц машинописного текста, иллюстрирована 49 рисунками. Цифровой материал оформлен в виде 31 таблицы.

Автореферат соответствует содержанию диссертации и полностью отражает основные результаты работы.

### **Замечания по диссертации**

При анализе работы не возникло **замечаний и вопросов**, касающихся текста диссертации и ее содержательной части. Можно лишь отметить несколько повышенный объем пунктов заключения, но рецензент оценивает это положительно, поскольку такая форма помогает быстро и объективно оценить результаты и перспективы развития научного направления диссертации.

### **Соответствие (несоответствие) научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует**

Научная квалификация соискателя полностью соответствует ученой степени доктора медицинских наук. Это подтверждается достаточным



количеством научных публикаций, представленных в рецензируемых отечественных и иностранных научных изданиях. Результаты исследования прошли широкое обсуждение на международных и республиканских научных конференциях и конгрессах. Участие в выполнении трех финансируемых научно-исследовательских, опытно-конструкторских и опытно-технологических работ и одной инициативной научно-исследовательской работы, грамотно спланированные и реализованные эксперименты, владение высокотехнологичными лабораторными и статистическими методами исследований, высокое качество анализа полученных результатов и нестандартное мышление при их обсуждении, личный вклад автора в проведенное исследование, широкое внедрение полученных результатов в практическое здравоохранение и учебный процесс также свидетельствуют о высокой научной квалификации Кадушкина А.Г.

### **Заключение**

Диссертация Кадушкина А.Г. «Молекулярные механизмы, прогнозирование и обоснование путей коррекции стероидорезистентности при хронической обструктивной болезни легких» является завершённой самостоятельно выполненной квалификационной научной работой, содержит принципиально новые научные результаты, которые признаны мировым научным сообществом и в совокупности являются крупным достижением в медицинской отрасли науки. Исследование позволило решить важную научную и медико-социальную проблему прогнозирования эффективности системных форм глюкокортикостероидов у пациентов с обострением ХОБЛ и научную проблему поиска лекарственных средств, обладающих способностью потенцировать действие глюкокортикостероидов при лечении ХОБЛ.

Диссертация отвечает требованиям, изложенным в главе 3 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий, соответствует отрасли «медицинские науки», специальности 03.01.04 – биохимия, а соискатель достоин искомой степени доктора медицинских наук. Она может быть присуждена за новые научно обоснованные результаты, включающие:

- разработку метода прогноза лечения глюкокортикоидами пациентов с обострениями ХОБЛ путем определения относительного количества эозинофилов и отношений абсолютных количеств нейтрофилов к лимфоцитам и тромбоцитам к лимфоцитам в периферической крови с диагностической эффективностью 80%, а при дополнительном измерении уровня фактора, ингибирующего миграцию макрофагов, с диагностической эффективностью 86,7%;

- установление более низкой связывающей способности глюкокортикоидов со своими рецепторами лимфоцитов и моноцитов у курящих пациентов с ХОБЛ, а также готовности к миграции этих клеток в дыхательные пути за счет наличия хемокиновых рецепторов, что следует рассматривать в качестве биохимического риска прогрессирования заболевания;

- выявление закономерностей ингибирования миграции лимфоцитов к хемокинам CCL5 и CXCL10, секреции провоспалительных цитокинов мононуклеарами, определение направленности и выраженности внутриклеточного синтеза ИЛ-4, ИЛ-8, фактора некроза опухоли  $\alpha$  и интерферона  $\gamma$  Т-хелперами, цитотоксическими Т-лимфоцитами, НК-клетками, НКТ-подобными клетками крови пациентов с ХОБЛ под влиянием лечебных препаратов в сочетании с глюкокортикоидами;

- открытие механизма лечения ХОБЛ введением нортриптилина, способного модулировать синтез в лимфоцитах крови пациентов молекул, причастных к проведению гормонального сигнала, индуцированного глюкокортикоидами, а также проявлениями эпигенетических механизмов (глюкокортикоидного рецептора  $\beta$ , ацетилированного лизина в составе гистона H4, ферментов гистон деацетилазы 2 и фосфорилированной p38 митоген-активируемой протеинкиназы, фосфорилированного фактора транскрипции p65 NF- $\kappa$ B);

- биохимическое обоснование возможности повышения эффективности проводимой противовоспалительной терапии обострений ХОБЛ при учете фармакорезистентности заболевания путем сочетанного использования нортриптилина и глюкокортикоидов, а также азитромицина и глюкокортикоидов.

Выражаю согласие на размещение отзыва на официальном сайте учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» в глобальной компьютерной сети Интернет.

Профессор кафедры химии и  
естественнонаучного образования  
УО «Витебский государственный  
университет имени П.М. Машерова»,  
кандидат медицинских наук,  
доктор биологических наук, профессор

А.А.Чиркин



Подпись удостоверяю  
И.П. Соловьёва  
Начальник отдела кадров