

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Назарова Петра Григорьевича
на диссертацию Басиной Валентины Владимировны

«Клинико-иммунологические критерии оценки эффективности
противовирусной терапии хронического гепатита С», представленную к
защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по
специальностям: 14.01.09 – инфекционные болезни и 14.03.09 – клиническая
иммунология, аллергология

Актуальность исследования

Основной причиной инфекционных заболеваний печени является широко распространенный среди населения РНК-содержащий вирус гепатита С (ВГС). Он поражает гепатоциты и вызывает бессимптомную хроническую инфекцию. Длительное бессимптомное течение заболевания приводит к формированию цирроза печени или гепатоцеллюлярной карциномы в 20-40% случаев, что становится причиной смерти. В настоящее время меры по специфической профилактике хронического гепатита С (ХГС) не разработаны, борьба с заболеванием возможна лишь с помощью этиотропной терапии. Последняя представлена утвержденными к применению схемами: используются комбинации препаратов с включением интерферона и комбинации препаратов прямого противовирусного действия (ПППД). Каждая из тактик противовирусной терапии (ПВТ) имеет свои положительные и отрицательные стороны (эффективность терапии, характер и выраженность нежелательных явлений (НЯ) и экономическая составляющая). Исходя из этого, важным является прогноз результата лечения перед назначением той или иной схемы. Прогноз успешности ПВТ зависит от ряда факторов, в частности: от пациента – его пола, возраста, сопутствующих заболеваний, наличия вредных привычек); от свойств вируса – генотипа, величины вирусной нагрузки, наличия мутаций; от особенностей заболевания – стадии фиброза печени. Ведется поиск новых предикторов, в частности, клинико-генетических. Уже используется в клинической практике анализ полиморфизма гена *IL28B*. Важным направлением поиска являются клинико-иммунологические предикторы эффективности терапии. В качестве потенциальных биомаркеров фиброза печени, а также предикторов эффективности ПВТ, могут рассматриваться отдельные цитокины/хемокины и определенные субпопуляции иммунокомпетентных клеток. Изучению именно этого перспективного аспекта патогенеза ХГС посвящено диссертационное исследование Басиной В.В.

В связи с этим анализируемая работа, безусловно, является своевременной и актуальной.

Целью исследования явилась оптимизация тактики выбора схемы противовирусной терапии хронического гепатита С с учетом оценки иммунологических биомаркеров из системы цитокинов/хемокинов.

Задачи исследования конкретны, их решение позволяет раскрыть цель поставленную автором.

Научная новизна исследования

Автором впервые представлена комплексная оценка клинической и прогностической значимости актуальных хемокинов и хемокиновых рецепторов лимфоцитов у пациентов с ХГС в зависимости от стадии фиброза печени и различных режимов ПБТ.

Исходные уровни хемокина CCL20/MIP-3 α и цитокина TNF α в плазме крови пациентов с ХГС впервые предложены в качестве прогностических биомаркеров, позволяющих уточнить выбор терапии перед ее проведением.

С использованием указанных ранее цитокинов/хемокинов разработан высокоинформативный алгоритм подбора режима этиотропной терапии для пациентов с ХГС, инфицированных ВГС 1-го генотипа.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Работа В.В. Басиной выполнена на достаточном количестве ретроспективного и проспективного материала (123 чел.). Диагностика ХГС, определение концентраций комплекса цитокинов/хемокинов и содержания иммунокомпетентных клеток получены на основе использования современных лабораторных методов исследования и высокочувствительных тест-систем. Для оценки сравнения комплекса цитокинов/хемокинов (TNF α , IFN α 2, IFN γ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC) и Т- и В-лимфоцитов с CXCR3 и CCR6 рецепторами диссертантом были отобраны группы из 84 и 26 человек (опытная и сравнения). Также были проведены сравнения изучаемых цитокинов/хемокинов и Т- и В-лимфоцитов с CXCR3 и CCR6 рецепторами во время ПБТ у 55 пациентов.

Статистическая обработка полученных в ходе исследования результатов проводилась адекватными и чувствительными математическими методами, что позволяет считать представленные результаты высоко достоверными.

Объем клинического материала и проанализированной информации достаточен для получения репрезентативных результатов, математической обработки данных и получения обоснованных выводов. Достоверность результатов исследования не вызывает сомнений. Положения, выдвинутые автором, выводы и рекомендации полностью основаны на результатах проведенных исследований и вытекают из материалов диссертации.

Теоретическое и практическое значение результатов исследования, внедрение в практику

Бесспорная ценность для науки и практики выводов и рекомендаций, вытекающих из диссертационного исследования, заключается в том, что установлена связь между исходными концентрациями хемокина CCL20/MIP3 α и цитокина TNF α и исходом терапии, что может быть использовано в клинической практике для предсказания эффективности терапии ХГС (ВГС 1-го генотипа).

Подана заявка на получение патента на изобретение «Способ прогнозирования результата ПВТ ХГС (ВГС 1-го генотипа) в интерферон-содержащем режиме и выбора альтернативной схемы терапии с помощью лабораторной диагностики плазмы крови пациентов» 12.12.2019г. Входящий № 081285. Регистрационный № 2019141708.

Основные положения диссертации доложены на 4 научных форумах международного, всероссийского и регионального уровня, внедрены в работу практических учреждений города – СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина», используются в педагогическом процессе кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России.

По результатам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 10 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень, рекомендованных ВАК для публикации основных научных результатов диссертации.

Общая характеристика структуры и содержания диссертации

Диссертационное исследование В.В. Басиной оформлено в традиционном стиле, изложено на 149 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, а также 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 169 литературных источников, из них 34 отечественных и 135 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 35 рисунками.

Глава 1 – Обзор литературы. Содержит 3 раздела. Первый посвящен этапам совершенствования этиотропной терапии и предикторам ее эффективности. В этом разделе диссертант представила различные комбинации препаратов ПВТ в порядке их появления в клинической практике и охарактеризовала степень их эффективность и безопасности применения. Также описала предикторы результата терапии как со стороны макроорганизма (пол, возраст, ожирение, заболевания ССС и т.д.), так и со стороны вируса ГС (генотип, субтип, различные мутации) и стадии заболевания (стадия фибротических изменений в тканях печени).

Второй раздел, посвященный динамике иммунологических показателей у пациентов с хроническим гепатитом С на фоне этиотропной терапии, читается с большим интересом. В нем представлены современные достижения иммунологии касающиеся биологических молекул из системы цитокинов/хемокинов, а также Т- и В-лимфоцитарного звена иммунитета. В обзоре представлены данные об изменении некоторых цитокинов/хемокинов в зависимости от прогрессии фибротических изменений в тканях печени. Имеются современные представления об иммунопатогенезе ХГС во время этиотропной терапии с использованием препаратов интерферона и с использованием для лечения различных комбинаций препаратов прямого противовирусного действия. Особо интересными являются данные о роли

цитокинов/хемокинов и лимфоидных клеток как предикторов эффективности ПВТ.

В третьем разделе обзора освещены проблемы пациентов с ХГС, имеющих иммунодепрессивное состояние, в основном представлены данные иммунологических изменений у пациентов с HCV-возвратной инфекцией, которые вынуждены постоянно принимать иммуносупрессивные препараты. В ходе ПВТ, несмотря на иммуносупрессию, происходит достоверное снижение концентраций ряда цитокинов/хемокинов, играющих роль в иммунопатогенезе ХГС. Работ, посвященных изучению иммунологических предикторов эффективности ПВТ с использованием различных ее режимов, недостаточно, а противоречивость имеющихся результатов указывает на необходимость продолжения данных исследований.

Глава 2 – «Материалы и методы исследований». Автором выполнен ретроспективный анализ медицинских карт и проспективное наблюдение пациентов, получавших лечение в СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина» в 2012-2017гг. с диагнозом хронический гепатит С, – всего в исследование было включено 123 пациента.

Диагноз ХГС выставлялся на основании клинико-эпидемиологических, лабораторных и инструментальных данных. В работе были использованы как рутинные биохимические, иммуноферментные методы исследования, так и самые современные молекулярно-биологические, молекулярно-генетические и иммунологические. В ходе иммунологического исследования были выполнены: определение концентраций ряда цитокинов/хемокинов в плазме крови методом мультиплексного анализа и также определен состав субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR6 и CXCR3 в периферической крови пациентов методом проточной цитофлюориметрии.

Этиотропную терапию получали 55 пациентов. Для 41 из них были применены схемы, включающие в себя препарат интерферона с курсом лечения от 24 до 48 недель. Для 14 пациентов было возможно использование схем терапии, представленных комбинацией препаратов ППД (дасабувир, омбитасвир, паритапревир и ританавир + рибавирин или даклатасвир и асунапревир). Представлен порядок обследования этих пациентов. Мониторинг результатов лабораторно-иммунологических показателей пациентов получавших ПВТ осуществлялся в начале, середине и по окончании ее (на 0-12-24/48; 0-8-12 неделе).

Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью пакета программ R, автором использованы универсальные методы статистической обработки данных с определением средних значений и стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$), непараметрические методы – критерий Манна-Уитни, Фридмана, Краскела-Уоллиса с уровнем значимости $p < 0,05$, для определения степени корреляции клинических, биохимических, лабораторных, иммунологических показателей пациентов с ХГС использовали двухсторонний ранговый корреляционный анализ Спирмена. Для прогноза эффективности терапии на основе анализа концентраций

выбранных цитокинов/хемокинов использовался ROC-анализ. Адекватность выбранного метода классификации оценивалась по площади под ROC-кривой. Пороговое значение концентрации выбранных параметров для предсказания результата терапии определялось по значению, соответствующему максимуму суммы чувствительности и специфичности.

В пакете R было построено дерево решений, на основании которого был разработан алгоритм выбора эффективной схемы противовирусной терапии ХГС.

Главы 3, 4, 5 собственных данных исследования. В главе 3 представлена клинико-лабораторная характеристика обследованных пациентов с ХГС, в ходе которой выявлена зависимость между длительностью инфекционного процесса и возрастом пациентов и гепатомегалией, данные свидетельствовали о бессимптомности или малосимптомности течения ХГС, выявлении умеренно выраженного цитолитического и экскреторно-билиарного синдромов. ВН не зависела от генотипа ВГС. В результате иммунологического исследования крови пациентов наблюдались значительные различия концентраций хемокинов CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL11/ITAC у пациентов с ХГС и у контрольной группы. При анализе клеточного состава было обнаружено угнетение субпопуляций Т-лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3 и CCR6 хемокиновые рецепторы, что является результатом взаимодействия ВГС и гепатоцита, в результате которого ВГС подавляет клеточное цитотоксическое звено иммунитета и перераспределение основных субпопуляций лимфоцитов у пациентов с ХГС возникло за счет увеличения процентного содержания CTL и NK-клеток как результат ответной реакции организма на репликацию ВГС в гепатоцитах. Также выявлена корреляционная зависимость между хемокином CXCL9/MIG в плазме крови пациентов с ХГС и степенью фибротических изменений в печени, что свидетельствует о его значимости в иммунопатогенезе ХГС и, в частности, в процессах фиброгенеза печени.

В главе 4 представлены результаты терапии пациентов с ХГС и наблюдение изменений концентраций цитокинов/хемокинов и содержания субпопуляций лимфоцитов с рецепторами CXCR3 и CCR6 в ходе лечения. НВО и УВО в ходе лечения развили 41 пациент и пятеро не ответили на терапию. Во время ПВТ происходила нормализация биохимических показателей крови вслед за исчезновением ВН ВГС в группе пациентов, достигших НВО. Наиболее значимыми были снижение концентрации хемокина CXCL11/ITAC и увеличение концентрации TNF α в группе пациентов без фиброза печени. В группе пациентов с различными стадиями фиброза было обнаружено достоверно значимое увеличение концентрации CCL2/MCP-1 во время терапии. У пациентов без фиброза печени выявлено в ходе терапии снижение относительного содержания CXCR3+ CTL, CXCR3+ NK, и уменьшение содержания CXCR3+ В-лимфоцитов, что говорит об активации Т-киллерного звена иммунитета и нормализации гуморального. В группе пациентов с различными стадиями фиброза печени выявлено резкое увеличение содержания CXCR3+ NK, CCR6+ NKT-клеток. Анализ

содержания цитокинов/хемокинов TNF α , IFN α 2, IFN γ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC в периферической крови больных перед началом терапии с использованием интерферонов в группах пациентов, развивших и не развивших вирусологический ответ, даёт возможность предложить хемокин CCL20/MIP3 α на роль предиктора результата терапии. Концентрация этого хемокина в плазме крови пациентов, не ответивших на терапию, была более чем в 4 раза выше, чем у пациентов, ответивших на нее.

Глава 5 посвящена иммунологическим изменениям в крови пациентов, получивших терапию с помощью ГППД. Наблюдалось снижение концентрации CXCL10/IP-10 во время терапии вне зависимости от наличия или отсутствия фиброза печени. Наблюдалось повышение содержания CCR6+ NKT-клеток у пациентов с выраженным фиброзом печени и тенденция к повышению относительного содержания Т-лимфоцитов, что, возможно, объясняется основной ролью этих клеток в борьбе с ВГС.

В заключении диссертантом суммированы, обобщены и обсуждены все результаты исследования, обоснованы выводы и положения, выносимые на защиту.

Выводы, которые делает диссертант, логично завершают обсуждение результатов, полностью отражают суть проделанной работы, соответствуют поставленным задачам и позволяют достичь цели исследования.

Автореферат Басиной В.В. составлен в классической форме, текст его написан хорошим литературным языком, полностью отражает материал, изложенный в диссертационной работе, и соответствует требованиям ВАК.

Личное участие автора в проведении исследования. В.В. Басиной, совместно с научными руководителями была определена тема данного исследования. Самостоятельно Валентиной Владимировной проведен подбор и анализ данных отечественной и зарубежной научно-медицинской литературы по изучаемой проблеме. Ею проводилось клиническое обследование и наблюдение пациентов, включенных в исследование, сформированы группы исследования, проведен ретроспективный анализ медицинских карт, создана клиничко-лабораторная электронная база больных, а также выполнена статистическая обработка и анализ результатов, написана и оформлена в полном объеме диссертационная работа.

Считаю, что автору удалось убедительно выделить патогенетически значимые хемокиновые звенья (или узлы) с участием определенных хемокинов, индуцирующих их цитокинов и лимфоидных клеток, несущих рецепторы этих хемокинов. Удалось показать согласованный баланс изменений связанных друг с другом факторов. Важные патогенетические находки диссертации являются в высшей степени интересными, являются безусловной заслугой автора.

Принципиальных замечаний к диссертации нет. Есть лишь вопросы, касающиеся материалов и трактовок, оставшихся за кадром и не озвученных в диссертации.

1) Так, автор указывает, что 44% пациентов (т.е. почти половина обследованных) не предъявляла каких-либо жалоб. В связи с этим возникает вопрос: какими могли бы быть результаты цитокинового и цитометрического исследования при разделении больных на группы по этому клиническому признаку? Если их разделить на группы с жалобами и без, как выглядели бы иммунологические показатели у второй группы (без жалоб), отличалась бы эта группа от здоровых людей?

2) Второй вопрос касается влияния противовирусной терапии на концентрации хемокинов и количество лимфоидных клеток с рецепторами для этих хемокинов. Когда концентрация хемокина (например, CXCL11 (ITAC) снижалась, то содержание CXCR-несущих клеток, наоборот, возрастало, и до лечения отношения между ними были реципрокными. Является ли согласованное изменение числа рецепторов результатом генетической регуляции? Или рецепторы фенотипически экранируются избытком хемокина в плазме до лечения (перегружены хемокином) и освобождаются от экранирования при уменьшении числа молекул хемокина в результате лечения?

3) Третий вопрос относится к причинам так называемой неответчаемости части больных гепатитом С на ПВТ. Не связана ли податливость к терапии одних и устойчивость других с разным порогом чувствительности к препаратам противовирусного комплекса? Можно ли рассчитывать на получение терапевтического эффекта у всех без исключения путем подбора дозировок?

Эти вопросы не являются принципиальными и не умаляют достоинства работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все вышеизложенное позволяет сделать заключение, что диссертационная работа Валентины Владимировны Басиной «Клинико-иммунологические критерии оценки эффективности противовирусной терапии хронического гепатита С», выполненная под научным руководством доктора медицинских наук, профессора Эсауленко Елены Владимировны и доктора медицинских наук, академика РАН, профессора Тотоляна Арега Артемовича, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи – выявлен предиктор результата противовирусной терапии с использованием интерферона и на основании этого разработан алгоритм подбора эффективной схемы ПВТ для пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) и имеет важное значение для клинической иммунологии, аллергологии и инфекционных болезней.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертация соответствует требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 01 октября 2018 г. № 1168, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сама автор заслуживает присуждения ей искомой

степени кандидата медицинских наук по специальностям: 14.01.09 –
инфекционные болезни и 14.03.09 – клиническая иммунология,
аллергология.

Официальный оппонент:
доктор медицинских наук,
профессор, ведущий научный сотрудник отдела иммунологии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Институт экспериментальной медицины»
Назаров Петр Григорьевич

Адрес: 197376, Санкт-Петербург,
улица Академика Павлова, 12
Телефон : 8(812)234-68-68
Факс: 8(812)234-94-89
e-mail: iem@iems.spb.ru



Дата « 27 » __ апреля 2020 г.

