

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Анны Александровны Барило «Сравнительная клиничко-иммунологическая и генетическая характеристика псориаза и псориатического артрита», представленной на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Актуальность работы. Представленное диссертационное исследование посвящено актуальной теме – изучению вопросов иммунопатогенеза псориаза и псориатического артрита и оценке диагностических маркеров патологии. Псориаз (ПС) является одним из наиболее распространенных заболеваний кожи, популяционная частота которого в мире, по данным различных авторов, составляет 57,6–60,4 случаев на 100 000 населения. Не смотря на успехи диагностики и современные подходы к лечению ПС, продолжает иметь место рост частоты встречаемости данной патологии на фоне отсутствия понимания мер по ранней профилактике и ограничению прогрессирования процесса. Среди молодого населения отмечается увеличение случаев заболевания псориатическим артритом (ПсА), также частоты возникновения тяжелых и резистентных к проводимой терапии случаев у пациентов среднего возраста.

В настоящее время принято считать, что ПС и ПсА– системные иммуноассоциированные заболевания мультифакториальной природы с доминирующим значением в развитии генетических факторов, характеризующиеся гиперпролиферацией эпидермоцитов, нарушением их дифференцировки, иммунными реакциями в дерме и синовиальных оболочках, частыми патологическими изменениями опорно-двигательного аппарата. При этом в иммунологическом и ревматологическом сообществах с 2015г появляются дискуссии о том, что ПС, ПсА и связанные с ними коморбидные нозологии (заболевания гепатобилиарной системы, ожирение, метаболический синдром) являются примером сочетанного аутовоспалительного и аутоиммунного континуума, связанного с ролью врожденного иммунитета, полиморфизмом генов цитокинов семейства ИЛ-1 и далее, с опосредованной этими цитокинами, нарушениями в иммунно-нейроэндокринной регуляции хронического воспаления.

Но так как на сегодняшний день в механизмах, приводящих к развитию и особенностях течения псориатического процесса, окончательного понимания нет, это указывает на необходимость продолжения научных поисков в данном направлении.

Проведенный автором сравнительный анализ клинико-иммунологических и генетических показателей имеет научную новизну и представляет большой интерес, как для фундаментальной, так и прикладной медицины.

Объём и структура диссертации. Диссертация написана по общепринятому плану и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», собственных данных, отраженных в четырех главах, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Объем работы составляет 129 страниц машинописного текста. В список литературы включено 254 источника (66 отечественных и 188 иностранных). Работа содержит 30 таблиц, 10 рисунков.

Во введении автор обосновывает целесообразность проведения диссертационного исследования, ссылаясь на недостаточную изученность данного вопроса. Поставлена конкретная цель исследования – сравнительная клинико-anamnestическая, иммуногенетическая характеристика псориаза и псориатического артрита с выделением маркеров патологии. Определенные автором задачи позволяют раскрыть поставленную цель.

Научная новизна диссертационной работы Барило А.А. состоит в том, что с использованием современных методов исследования получены новые данные, касающиеся иммуногенетических особенностей псориаза и псориатического артрита. Автором определены особенности содержания субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, фагоцитирующих клеток, иммуноглобулинов, состава циркулирующих иммунных комплексов, концентрации цитокинов при ПС и ПсА в зависимости от степени тяжести заболевания. Автором изучена частота распределения однонуклеотидных полиморфизмов в промоторных регионах генов цитокинов (*C-590T IL4*, *C-597A IL10*) и их ассоциация с клиническим течением ПС и ПсА. Аргументирована роль иммуногенетических показателей в патогенезе псориатического

воспаления, выделены дифференциально-диагностические маркеры патологии. Вынесенные на защиту положения можно считать доказанными и обоснованными.

Научно-практическая значимость работы вытекает из полученных результатов и заключается в обосновании целесообразности дифференцированного подхода к ПС и ПсА, с применением клинических, иммунологических и генетических исследований. Разработаны методические рекомендации «Алгоритм диагностики псориаза и псориатического артрита: клинические и иммуногенетические предикторы». Получена приоритетная справка на выдачу патентов «Способ диагностики псориаза» и «Способ диагностики псориатического артрита». Разработанные автором подходы к диагностике ПС и ПсА внедрены в практическую работу врачей дерматологов, иммунологов, терапевтов, гастроэнтерологов «НИИ медицинских проблем Севера», КГБУЗ «Красноярского краевого кожно-венерологического диспансера №1» (г. Красноярск), ООО «Доктор», а также используются в учебном процессе кафедр клинической иммунологии, дерматовенерологии с курсом косметологии и ПО КрасГМУ им. проф. Войно-Ясенецкого.

Первая глава посвящена аналитическому обзору литературы. В ней автор, используя отечественные и зарубежные публикации, освещает современные представления о факторах риска, клинико-anamnestических особенностях изучаемых нозологий, функциональном состоянии гепатобилиарной системы, рассматривает различные факторы претендующие на роль предикторов хронического воспаления, проводит оценку известных фактов иммунореактивности и цитокиновой регуляции межклеточных взаимодействий, полиморфизма генов провоспалительных цитокинов, включая опубликованные данные исследований по ИЛ-4 и ИЛ-10 при ПС и ПсА. Обзор литературы показывает достаточную эрудицию автора и глубокое знание изучаемой проблемы. Обзор литературы написан в полемическом стиле. Автор не только цитирует, но и высказывает свой взгляд на проблему.

Глава вторая посвящена материалам и методам исследования. Автором было обследовано 288 человек, в том числе 185 больных (псориазом, псориатическим артритом) и 103 практически здоровых лиц. Все группы сопоставимы по возрасту и полу. Для диагностики заболеваний автор использовала современные лабораторные методы исследования, в частности твердофазный иммуноферментный анализ для определения уровня цитокинов в сыворотке крови, генотипирование аллельных вариантов осуществлялось методом рестрикционного анализа продуктов амплификации (ПДРФ - анализ) специфических участков генома.

Полученные результаты исследования подвергнуты статистической обработке на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 с использованием следующих методик: непараметрического критерия Манна-Уитни; расчёта обобщающих коэффициентов (средняя величина M , ошибка средней m , критерий Стьюдента), метода непараметрического корреляционного анализа Спирмена, дискриминантного анализа. Достаточный фактический материал, современные методы исследования и серьезный статистический анализ убеждают в достоверности полученных данных и в правомерности изложенных в диссертации положений и выводов.

Результаты собственных исследований и их обсуждение представлены в 3-й, 4-й, 5-й, 6-й главах диссертации и в заключении.

Глава третья состоит из подразделов и посвящена клинико-анамнестической характеристике ПС и ПсА и факторам риска у обследованных пациентов. Автор рассматривает различные факторы риска в их связи с особенностями клинического течения Пса и Пса, уделяя большее внимание ПсА. Автор, как традиционно принято в медицине, уделяет внимание гендерным различиям (при этом вкладывая в это понятие только различия по полу пациентов), анамнестическим, возрастным и клиническим параметрам. Проводится исследование дебюта заболеваний от возраста пациентов. На странице 58 автором вероятно допускается ошибка, в которой указан возраст

дебюта ПС: «обследованной группы больных варьировал от 4 до 57 лет». В работе детский возраст не изучался. Автором выделены и проиллюстрированы анамнестические факторы возрастного риска дебюта суставного синдрома ПсА (рисунок №1).

К триггерам старта у пациентов клинических проявлений ПС и ПсА автором отнесены: стресс, алиментарный фактор (особенности питания), курение, а также проведена оригинальная оценка особенностей клинического течения процессов от метеозависимости.

Автором детально исследованы особенности течения ПС и ПсА от клинических стандартных факторов риска: зуд кожи, обострение процесса, площадь поражения и т.д. Все данные факторов риска ранжированы по частоте выявленной встречаемости и представлены на рисунке 3 на котором комплексно представлены значимые маркеры формирования псориатического поражения кожи и костно-суставной системы.

При этом, в этой части хочется указать, что обозначение автором понятие «гендерные» особенности, не является точным, так как последнее обозначает совокупность специфических психологических и физиологических особенностей мужчин и женщин, при этом ошибочно используется для замены понятия «пол» и в дальнейшем по тексту диссертации.

Также, следует отметить, что автор упустил возможность включить в анализ факторов риска антропометрические показатели исследованных пациентов (рост, вес, окружность талии, ИМТ). Хотя такие факторы, как абдоминальное ожирение, нарушение ИМТ и связанные с ними признаки инсулин резистентности, гипогонадизма - являются несомненно факторами риска в развитие ПС и ПсА, что было отмечено самим же автором в литературном обзоре. Остается сожалеть о потерянных возможностях в этой главе.

В разделе 3.2 главы дана оценка функционального состояния гепатобилиарной системы, показателей липидного спектра периферической

крови при ПС и ПсА. Автор конкретно разбирает клинические признаки функционального состояния ГБС: диспепсические жалобы, пузырьные симптомы, диагностированные признаки по данным УЗИ органов брюшной полости. Проведен анализ биохимических маркеров липидного спектра с расчетом индекса атерогенности. При этом получены убедительные статистические различия в межгрупповом сравнении по ЛПНП, ЛПВП, показателям холестерина и ТГ, индекса атерогенности.

Важно отметить, что актуальным для сибирского региона является проведенный автором анализ коморбидности поражения ЖКТ в сочетании с диагностированными региональными гельминтозами, а также вирусными гепатитами В и С. Автором получены доказательства диагностированного бессимптомного или латентного носительства гепатита С в качестве предиктора или триггера развития поражения кожи для пациентов с ПС. Для пациентов с ПсА показана корреляционная зависимость тяжести проявлений с патологией ГБС, диффузных изменений печени, жирового гепатоза, что позволяет автору сделать заключение о том, что болезни печени являются ведущим маркером артропатического псориаза.

В **четвертой главе** подробно обсуждаются показатели иммунологической реактивности: популяционный и субпопуляционный состав Т и В-лимфоцитов крови, содержание фагоцитирующих клеток, концентрации сывороточных иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, качественные количественные характеристики циркулирующих иммунных комплексов при ПС и ПсА в зависимости от степени клинической тяжести заболевания.

Автором описаны не только количественные изменения при каждом варианте заболевания, но и наличие однонаправленных изменений, дисбаланс изучаемых показателей. Так полученные данные о пониженном содержании всех классов иммуноглобулинов в сыворотке крови пациентов, автор объясняет эффектом их депонирования в шоковых зонах воспаления. Автор отмечает у пациентов в обеих группах устойчивое повышение количества CD16+ лф,

объясняя это активностью клеточного иммунитета, связанное с обширностью повреждения кожи. Однако, в силу того, что не проводится корреляция количества CD16⁺ с индексом повреждения кожи по PASI, данное утверждение является не совсем корректным, также принимая во внимание, что тканевые натуральные киллеры экспрессируют другой рецептор.

Повышение CD8⁺лф при средней степени тяжести ПсА автор объясняет преобладанием цитотоксических реакций в хроническом воспалении, что допустимо предположить.

Интересным является раздел, посвященный роли циркулирующих иммунных комплексов в патологии. Установлены особенности показатель иммунного воспаления с качественной характеристикой ЦИК, в частности обнаружения ЦИК C1q, которые характеризуются большей патогенностью, связанными с особенностями активации классического пути комплемента и их особенностями элиминации. В группе больных среднетяжелой степени тяжести ПС выявлены ЦИК-C3d с иной характеристикой патогенности и элиминации. Вероятно, в процессе прогрессирования ПС при среднетяжелых формах заболевания важную патогенетическую роль приобретает активация альтернативного пути комплемента, способствующая развитию риска патологического иммунокомплексного синдрома с более обширным повреждением кератиноцитов и различных органов-мишеней. Данный подход позволил автору дифференцировать вклад особенностей иммунокомплексного воспаления, выделить данный показатель как маркер патологии для оценки тяжести и системности клинических проявлений, прогрессирования и прогноза.

В **пятой главе** автор представляет результаты исследования анализируя концентрации цитокинов в сыворотке крови при ПС и ПсА в зависимости от степени тяжести заболевания. Выявлены общие изменения цитокинового профиля: преобладание провоспалительного IL-6 и сниженная концентрация IL-10. Автор отмечает, что при ПсА независимо от степени тяжести

заболевания установлен смешанный тип иммунного реагирования с повышенной концентрацией TNF- α , IL-4 в сыворотке крови пациентов.

Автор также проводит анализ полученных синергичных показателей TNF- α и IL6 в изучаемых группах, отмечая известную роль и повышение значений IL6 при ожирении, инсулинорезистентности, СРБ.

Более детальная часть исследований касается анализа полученных в изучаемых группах сниженная продукция IL-10. Низкая концентрация IL-10 в сыворотке крови, обладающего иммуносупрессивными свойствами, по мнению автора, отражает подавление активации Т-регуляторных лимфоцитов, контролирующей силу и продолжительность иммунного ответа в патогенезе псориатической болезни.

Автором в этой главе оригинально проведено ранжирование степени значимости иммунологических маркеров с клиническими особенностями ПС и ПсА по количественным значениям иммунологических показателей. Иммунологическими предикторами ПсА предложены показатели концентрации в сыворотке крови TNF- α и IL-4, в сочетании с характеристиками ЦИК : ЦИК-С3d.

В разделе 5.2 пятой главы проводится анализ полиморфизмов регионов С-590Т (rs2243250) гена IL4 и С-597А (rs1800872) гена IL10 в изучаемых нозологиях. Определена ассоциация псориаза легкой степени тяжести с носительством генотипа С/С полиморфизма С-590Т (rs2243250) гена IL4 и С-597А (rs1800872) гена IL10, а псориаза среднетяжелой степени тяжести – с носительством генотипа А/А полиморфизма С-597А (rs1800872) гена IL10; псориатического артрита среднетяжелой степени тяжести – с носительством генотипа Т/Т полиморфизма С-590Т (rs2243250) гена IL4 и генотипом А/А полиморфизма С-597А (rs1800872) гена IL10, что свидетельствует о протективной роли генотипа С/С и взаимосвязи редких аллелей (А и Т) в процессе прогрессирования патологии. Установлена взаимосвязь наличия генотипа полиморфизма С-597А гена IL10 с низкой концентрацией IL-10 в

сыворотке крови независимо от степени тяжести заболевания: при псориазе – с генотипами *C/A* и *A/A*, при псориатическом артрите – с генотипом *C/C*, что свидетельствует как решил автор «о генетической детерминированности заболеваний». С этим мнением автора нельзя согласиться в связи с незначительностью клинической выборки как по составу, так и требуемым для данного заключения более значительных выборок сравнения нозологий с поражением кожи и суставов. Поэтому данный факт может быть представлен как результат генетической детерминированности, определяющей особенности регуляции иммунного ответа (иммунного воспаления) и так далее.

В **шестой главе** представлены результаты всех изучаемых параклинических и клинических параметров после проведения корреляционного и дискриминантного анализа межгрупповых сравнений ПС и ПсА. Составленные автором итоговые схемы наглядно представлены и подтверждают важную роль в иммунопатогенезе Пс и ПсА изменений клеточного, гуморального звеньев иммунитета, цитокинового и липидного профиля с учетом степени тяжести заболевания.

Полученные межгрупповые различия весьма наглядны. От ПС к ПсА появляются более разнообразные векторные связи между клеточным и гуморальным ИО. Так для ПсА получены убедительные доказательства, что развитие сопутствующих поражений сосудов и атеросклероза, объясняющих тяжесть основного заболевания связана с полученными корреляциями: концентрации IgM, количества В лф СД19, состава ЦИК-С1q и ЦИК-С3d (активации системы комплемента по классическому и альтернативному пути), значений IL-10 - TNF α - IL4 - показателей липидного обмена (ХЛ-ЛПНП-ТГ).

Глава заключение изложена реферативно. Автор не просто проводит суммирование полученных результатов, а органично синтезирует и соединяет факты в совокупный итог всей работы в целом.

Автор делает заключение, что определение приоритетного характера иммунного реагирования при ПС и ПсА в зависимости от степени тяжести

заболевания помогает установить маркеры прогрессирования патологии, что необходимо для клинического прогноза заболеваний. Изучение иммуногенетических особенностей ПС и ПсА в зависимости от степени тяжести заболевания позволяет выявить единые диагностические критерии формирования тяжелых форм заболевания, а значит, усовершенствовать профилактические меры.

Анализируя клинико-лабораторную оценку обсуждаемых полиморфизмов промоторных регионов генов цитокинов автор делает верное и важное уточнение, что данные генетические результаты относятся только к региональной популяции - жителям Красноярска (европеоидов в 3х поколениях).

В главе заключение автором допущена некорректность в интерпретации на странице 122 повышенного количество CD8+-лимфоцитов как «.....увеличении супрессорной активности лимфоцитов»

По результатам оценки фагоцитарных показателей активности и корреляцией с особенностями клинических форм течения псориатического процесса легкой и среднетяжелой степени тяжести, автор отмечает протективную роль моноцитарно-макрофагальной системы в процессе прогрессирования псориатического процесса с участием провосполительных цитокинов, цитокинового дисбаланса в регуляции иммунного воспаления. Описанные результаты совпадают с современным представлением патогенеза псориатического процесса как пример системной реализации аутовосполительного и аутоиммунного синдрома.

Выводы. Диссертацию завершают 5 выводов, основанных на фактическом выполненном материале и соответствуют поставленным задачам проведенного исследования. Выводы диссертации вытекают из результатов исследования.

После блестяще изложенной главы заключения, к сожалению по моему мнению, выводы перегружены формальными словосочетаниями при перечислении полученных фактов. Принимая во внимание, что вывод- это

лаконичное изложение только достоверных результатах использование словосочетаний «по сравнению с контролем» и «статистически значимо» не разумно к использованию, и нарушает целостное восприятие результатов. Это касается изложения выводов 1 и 2.

Вывод 4. «Отмечена взаимосвязь наличия генотипа полиморфизма *C-597A* гена *IL10* с низкой концентрацией IL-10 в сыворотке крови независимо от степени тяжести заболевания: при псориазе – с генотипами *C/A* и *A/A*, при псориатическом артрите – с генотипом *C/C*, что свидетельствует о генетической детерминированности данных заболеваний».

По моему мнению, установленные особенности полиморфизмов генов цитокинов в небольшой по численности исследованной популяции жителей г.Красноярска не могут свидетельствовать о генетической детерминированности исследованных заболеваний (ПС и ПсА). Вероятно предположить, что выявленная генетическая детерминированность определяет особенности регуляции иммунного ответа в развитии данных заболеваний.

Работа в целом написана в основном грамотно, хорошо иллюстрирована. Результаты проведенной работы внедрены в практическое здравоохранение и могут широко использоваться в медицинских учреждениях.

Замечаний по диссертации принципиального характера нет.

Основные результаты работы по теме диссертации представлялись на форумах различных уровней, опубликованы в 24 научных работах, в том числе в рецензируемых печатных изданиях. Публикации и автореферат дают полное представление о содержании выполненного исследования.

Вместе с тем напрашивается **вопрос**:

1. На основании собственного проведенного исследования и выявленных в работе маркеров псориаза и псориатического артрита можете ли автор предложить новые механизмы воздействия для препаратов генно-инженерной терапии в качестве контроля воспаления и возможной профилактики?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Анны Александровны Барило «Сравнительная клинико-иммунологическая и генетическая характеристика псориаза и псориатического артрита», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченным, самостоятельно выполненным научно-квалификационным трудом, содержит новое решение актуальной задачи, направленное на оптимизацию дифференциальной диагностики псориаза и псориатического артрита. Представленная к защите диссертация Анны Александровны Барило соответствует всем требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент

доцент кафедры иммунологии и аллергологии

ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России

доктор медицинских наук

(диссертация на соискание учёной степени

доктора медицинских наук защищена по специальностям

14.03.03 – патологическая физиология,

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология)

доцент

Наталья Анатольевна Черевко



Данные об авторе отзыва: Черевко Наталья Анатольевна – доктор медицинских наук, доцент, доцент кафедры иммунологии и аллергологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, адрес: 634050, г. Томск, ул. Московский тракт2, телефон: +7 (3822) 557-137, адрес электронной почты: kaf.immunologia@ssmu.ru