

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора медицинских наук, профессора, заведующего отделом иммунологии  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Институт экспериментальной медицины» Назарова Петра Григорьевича  
на диссертационную работу Некрасовой Анны Сергеевны на тему  
«Иммунные механизмы патогенеза хронических диффузных заболеваний  
печени и их коррекция сукцинатсодержащими лекарственными  
препаратами», представленную на соискание ученой степени кандидата  
медицинских наук по специальностям: 14.01.04 – внутренние болезни,  
14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

### **Актуальность темы исследования**

Хронические диффузные заболевания печени, включая неалкогольную жировую болезнь печени (НЖБП) и хронический гепатит С (ХГС), широко распространены. По данным эпидемиологического анализа, НЖБП страдает до 33% человеческой популяции, а доля ХГС среди диффузной патологии печени составляет не менее 70%. НЖБП тесно ассоциирована с метаболическим синдромом. Одновременное наличие ожирения и хронической HCV-инфекции резко усиливает прогрессию патологии печени и ускоряет её трансформацию до цирротической стадии.

В настоящее время при диффузных заболеваниях печени все большее значение в патогенезе стадийной трансформации печеночной паренхимы отводится иммунным факторам как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Считается, что факторы и механизмы иммунного воспаления имеют существенное значение в патогенезе альтерации печеночной паренхимы, однако роль этих механизмов до сих пор не детализирована применительно к стадиям конкретных заболеваний. Крайне мало данных о взаимосвязи воспаления и фиброзирования ткани печени (региональный уровень иммунных нарушений) с параметрами иммунного статуса

(системный уровень иммунных расстройств) пациентов, в частности у пациентов с жировым гепатозом, пациентов с жировым гепатитом, неотягощенным и отягощенным хронической HCV-инфекцией. Не изучена возможность использования параметров иммунного статуса в целях диагностики стадий хронических диффузных заболеваний печени или же прогнозирования вероятности развития осложнений.

При хронической диффузной патологии печени не разработаны также стратегия и алгоритмы оптимизации патогенетической терапии путем включения в комплексное лечение этой категории пациентов иммуноориентированных лекарственных препаратов, в том числе лекарственных средств, иммунокорригирующий эффект которых обеспечивается их цитопротективной активностью и позитивным влиянием на метаболизм иммунцитов.

Со всем вышеизложенным связана актуальность темы диссертационного исследования Некрасовой А.С. «Иммунные механизмы патогенеза хронических диффузных заболеваний печени и их коррекция сукцинатсодержащими лекарственными препаратами».

**Методологический уровень диссертационного исследования,  
достоверность полученных результатов, обоснованность выводов и  
практических рекомендаций**

Достоверность результатов диссертационного исследования сомнений не вызывает, так как диссертантом использован современный дизайн клинического исследования на достаточных по количеству пациентов клинических группах и подгруппах, а именно – дизайн проспективного контролируемого сравнительного исследования с включением в исследование 177 пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени (неалкогольная жировая болезнь печени без или в сочетании с хроническим вирусным гепатитом С на фоне метаболического синдрома). Критерии включения и исключения пациентов в сравниваемых клинических



подгруппах также хорошо обоснованы. В процессе исследования состояние пациентов и развитие заболевания контролировалось в динамике, что увеличивает достоверность полученных в результате исследования клинических данных.

Диагностика и мониторинг осуществлялись с использованием большого количества современных клинических и инструментальных, а также иммунологических, вирусологических, молекулярно-биологических, серологических и биохимических методов, которые соответствуют поставленной цели и задачам исследования.

Хотелось бы отметить, что в процессе выполнения диссертационного исследования при проведении иммунологического обследования пациентов и динамического наблюдения за их состоянием был реализован принцип так называемого экспертного уровня оценки иммунного статуса обследуемых: 1) многократное определение параметров иммунного статуса (обследование в динамике); 2) комплексная оценка не только структурно-морфологических, но и функциональных иммунологических показателей (достижение не только более высокой чувствительности, но и большей диагностической ценности проводимого иммунологического анализа); 3) оценка иммунных показателей, характеризующих разные уровни иммунной системы: уровень системный – по анализу периферической крови, и уровень местный, региональный – по анализу фиброзированию паренхимы печени.

При этом были использованы самые современные иммунологические методы: лазерная проточная цитофлуориметрия, культуральные методы с оценкой функциональной активности фагоцитов, оценка цитокинового статуса с определением содержания цитокинов в плазме крови и в культурах активированных *in vitro* мононуклеаров, иммуногистохимические методы исследования биоптатов печени больных.

Кроме того, больные диффузной патологией печени также были обследованы на наличие и степень выраженности аутосенсibilизации – по титрам антител к митохондриям (АМА), к микросомам печени и почек

(LKM-1), к гладким мышцам (ASMA), к растворимому печеночному антигену (SLA), антинуклеарных антител (ANA). Этот подход использовался для дифференциальной диагностики и исключения из исследования больных с аутоиммунными заболеваниями гепатобилиарной системы.

Для оценки результатов исследования были использованы современные статистические методы параметрической и непараметрической статистики и корреляционного анализа.

Высокий общеметодологический уровень диссертационного исследования, более чем достаточное количество клинических наблюдений, использование при его выполнении современных клинических, инструментальных, лабораторных и математических методов анализа и обработки клинических данных позволили диссертанту получить наиболее значимые результаты исследования, четко сформулировать выносимые на защиту положения диссертации и основные теоретические обобщения, предложить значимые для клинической практики алгоритмы диагностики и лечения.

Выводы диссертационного исследования и сформулированные диссертантом практические рекомендации закономерно вытекают из результатов проведенного исследования, логически обоснованы и сомнений не вызывают.

### **Научная новизна диссертационного исследования, оценка теоретической и практической значимости**

В диссертационном исследовании Некрасовой А.С. впервые комплексно и детально на обширном клиническом материале изучен иммунопатогенез диффузных заболеваний печени, ассоциированных с метаболическим синдромом и жировой трансформацией и последующим фиброзированием печеночной паренхимы, в их взаимосвязи с клинко-патогенетическими синдромами, основными биохимическими показателями углеводного и липидного обменов; показателями, характеризующими



состояние субстратного и ферментного звеньев антиоксидантной защиты сыворотки крови; критериями, характеризующими процессы перекисного окисления липидов мембран моноклеарных клеток крови, и параметрами иммунного статуса пациентов.

Впервые установлено, что системные иммунные нарушения при неалкогольной жировой болезни печени на фоне метаболического синдрома, неотягощенной и отягощенной хроническим гепатитом С, разнонаправлены, а их характер и выраженность зависят от этиологического фактора и стадии заболевания. В частности, установлено, что при этих хронических диффузных заболеваниях печени у абсолютного большинства пациентов (94% больных неалкогольным стеатогепатитом и 100% больных неалкогольной жировой болезнью печени в сочетании с хроническим гепатитом С) факторами, инициирующим развитие иммунных расстройств, являются: в паренхиме печени: активационная дисфункция системы моноклеарных фагоцитов печени, инициированная жировым перерождением гепатоцитов и усугубляемая их инфицированием HCV в условиях местной воспалительной реакции, а на системном уровне – факторы оксидативного стресса, в условиях которого формируется недостаточность субстратного и ферментного звеньев антиоксидантной защиты сыворотки крови. При этом в моноклеарах периферической крови накапливаются продукты ПОЛ, что приводит к снижению функциональной активности моноклеаров, компенсаторному фенотипическому дисбалансу субпопуляций лейкоцитов активационного типа, а при углублении системной иммунной дисфункции в условиях прогрессирующего фиброзирования печеночной паренхимы – к инициации апоптоза моноклеаров периферической крови с развитием субпопуляционного дисбаланса лейкоцитов периферической крови иммунодепрессивного типа и анергии моноклеаров.

Сопутствующая HCV-инфекция, сопровождаемая инфицированием вирусом не только гепатоцитов, но и моноклеарных клеток, усугубляет



формирование иммунных нарушений как на региональном (в ткани печени), так и системном уровнях. У этих пациентов дисфункция системы мононуклеарных фагоцитов печени более выражена, что сопровождается процессом активного фиброзирования печеночной паренхимы. Впервые установлено, что у 67% обследованных пациентов с доцирротическими стадиями фиброзирования ткани печени (фиброз I. II. III) дисфункция иммунной системы, оцениваемая на системном уровне, имеет активационный характер, однако признаки системной иммунодепрессии у большинства этих пациентов констатируются вне зависимости от стадии заболевания. В частности, у этих пациентов отмечено уменьшение функциональной активности мононуклеаров периферической крови (анергия мононуклеаров с уменьшением индуцированной продукции цитокинов /ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИФН $\gamma$ / и уменьшение функциональной активности лейкоцитов в НСТ-тесте). Установлено также, что на цирротической стадии (фиброз IV) диффузной патологии печени у 44% пациентов формируется вторичная иммунная недостаточность с явными признаками системной иммунодепрессии (абсолютная лимфопения, снижение численности большинства субпопуляций лимфоцитов периферической крови, анергия мононуклеаров).

Диссертантом впервые предложен новый способ диагностики цирротической стадии хронической HCV-инфекции с использованием дополнительного иммунологического параметра (патент РФ № 2563129 «Способ диагностики цирротической стадии хронического вирусного гепатита С»).

У пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени в сочетании или без хронического вирусного гепатита С впервые проведен комплексный анализ влияния терапии сукцинатсодержащими лекарственными препаратами на функциональное состояние печени, показатели липидного и углеводного обмена, показатели антиоксидантной защиты организма и иммунный статус. Установлена патогенетическая направленность этой терапии, её позитивное влияние на критерии клинико-патогенетических



синдромов, характеризующих патологию печени, продемонстрирован иммунокорригирующий эффект от использования сукцинатсодержащих лекарственных препаратов, что позволило диссертанту предложить новый способ лечения пациентов с метаболическим синдромом и неалкогольной жировой болезнью печени на стадии стеатогепатита (патент РФ № 2595815 «Способ лечения больных неалкогольным стеатогепатитом на фоне метаболического синдрома»). Таким образом, научная новизна выполненного диссертационного исследования, а также его теоретическая и практическая значимость сомнений не вызывают.

#### **Апробация работы и оценка полноты опубликованных материалов диссертационного исследования**

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, получено 2 патента РФ на изобретения (патент РФ № 2563129 «Способ диагностики цирротической стадии хронического вирусного гепатита С», патент РФ № 2595815 «Способ лечения больных неалкогольным стеатогепатитом на фоне метаболического синдрома»). В других научных изданиях опубликованы 1 статья и 16 тезисов докладов.

По результатам диссертационного исследования разработаны и изданы методические рекомендации для врачей «Энерготропная патогенетически ориентированная терапия сукцинатсодержащими препаратами при неалкогольной жировой болезни печени: перспективы клинического применения».

Основные положения и результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на многочисленных научных конференциях, симпозиумах, конгрессах и форумах, в том числе с международным участием:



X научно-практической конференции «Передовые научные разработки 2014» (Прага, 2014 г.), Славяно-Балтийских научных форумах «Санкт-Петербург – Гастро-2014» и «Санкт-Петербург – Гастро-2015», XV Юбилейном съезде научного общества гастроэнтерологов России (Санкт-Петербург, 2015 г.), научном форуме «Многопрофильная клиника XXI века. Экстремальная медицина» (Санкт-Петербург, 2015 г.), X Юбилейном Санкт-Петербургском гепатологическом конгрессе /2016 г./, Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Профилактическая медицина-2015» и «Профилактическая медицина-2016», а также на заседании Санкт-Петербургского научного общества иммунологов (Санкт-Петербург, 2018 г.).

### **Оценка содержания диссертационного исследования**

Диссертация изложена на 178 страницах текста и состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка принятых сокращений, списка используемой литературы, содержащего 260 источников (из них 154 – отечественных и 106 – зарубежных авторов), двух приложений. Диссертация иллюстрирована 47 таблицами и 23 рисунками.

Диссертационная работа построена по традиционному типу и включает введение, обзор литературы, описание используемых материалов и методов, 3 глав результатов собственных исследований, обсуждения полученных данных, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка использованных диссертантом научных источников.

Во введении автором обоснована актуальность темы выполняемого исследования, дана оценка степени разработанности выбранной диссертантом темы, определены цель исследования и сформулированы решаемые исследованием задачи, представлена научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов работы, методология исследования, изложены основные положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы проводится анализ имеющихся на сегодняшний день результатов научных исследований, посвященных изучению роли



метаболических и иммунных расстройств в патогенезе хронических диффузных заболеваний печени. В обзоре отражены как общие механизмы патогенеза этих заболеваний, так и описаны звенья патогенеза, в которых значимы иммунные факторы. Дан анализ значимости иммунных факторов и механизмов в патогенетической прогрессии диффузной патологии печени на клеточном и региональном уровнях. Детально проанализирована роль механизмов гипоксии и оксидативного стресса в формировании митохондриальной дисфункции клеток, формирующих паренхиму печени, а также роль этих механизмов в развитии ПОЛ клеточных мембран и повреждении клеток. Далее при диффузной патологии печени, в частности при ее жировом перерождении и при хроническом вирусном гепатите С, описываются механизмы развития иммунных расстройств как на уровне популяций иммунореактивных клеток с разным фенотипом, так и в зонах воспаления печеночной паренхимы, анализируется роль цитокинов различных функциональных групп в основных процессах, обеспечивающих перерождение печеночной паренхимы на разных стадиях рассматриваемых заболеваний.

В обзоре литературы также рассматриваются основные направления используемой при комплексном лечении пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени на фоне метаболического синдрома и хронического вирусного гепатита С патогенетической терапии и дается теоретическое обоснование возможности эффективного применения сукцинатсодержащих лекарственных препаратов как средств патогенетической терапии хронических диффузных заболеваний печени.

Обзор литературы позволяет полностью составить представление о необходимости дальнейшего изучения патогенетических механизмов рассматриваемых хронических диффузных заболеваний печени, в частности иммунопатогенеза этих заболеваний. Обоснована и необходимость поиска эффективных лекарственных средств их лечения.



Вторая глава посвящена общей характеристике обследованных пациентов. В этой главе описываются использованные диссертантом при проведении исследования клинические, лабораторно-инструментальные методы обследования и применяемые статистические методы обработки полученных данных.

Третья и четвертая главы содержат результаты собственного исследования. В этих главах описываются особенности клинического течения неалкогольной жировой болезни печени в сочетании или без хронического вирусного гепатита С у пациентов с метаболическим синдромом, а также патогенетические составляющие и проявления метаболического синдрома у данных категорий пациентов. Далее детально проанализированы результаты инструментального обследования и критерии основных клинико-патогенетических синдромов, полученные с использованием технологий лабораторного анализа (включая антиоксидантный профиль пациентов, показатели перекисного окисления липидов, критерии иммунного статуса). На основании полученных результатов диссертантом определяются параметры, характеризующие прогрессию неалкогольной жировой болезни печени до стадии стеатогепатита, по стадиям описывается процесс фибротических изменений печеночной паренхимы вплоть до развития цирроза печени и верифицируется иммунологический критерий как дополнительный способ диагностики цирротической стадии хронического вирусного гепатита С. Далее в главах приводятся и анализируются результаты комплексного изучения иммунного статуса пациентов с метаболическим синдромом и неалкогольной жировой болезнью печени, не отягощенной и отягощенной хронической HCV-инфекцией. Причем в детальный анализ включены критерии, характеризующие разные уровни организации иммунной системы пациентов, а именно критерии регуляторного, функционального, структурно-морфологического уровней организации клеточного звена, а также гуморального звена иммунной системы. Полученные в результате



выполнения этой части работы весьма многочисленные научные данные диссертантом обобщены и наглядно представлены в виде рисунков, диаграмм и таблиц в определенной логической последовательности, что облегчает их восприятие. В большинстве случаев при представлении полученных результатов иммунологического обследования пациентов указана значимость различий между группами и приводятся данные статистического анализа.

Пятая глава посвящена исследованию влияния проводимого лечения на течение неалкогольной жировой болезни печени в сочетании или без хронического вирусного гепатита С на фоне метаболического синдрома. В этой главе подробно описываются использованные при лечении пациентов способы комплексного лечения, приводятся сведения о соответствующих лекарственных препаратах и анализируются результаты применения в качестве средств патогенетической терапии у пациентов данных категорий сукцинатсодержащих лекарственных препаратов и препарата сравнения (лекарственный препарат на основе адеметионина).

В шестой главе автором осуществлен подробный и последовательный анализ всей совокупности полученных результатов диссертационного исследования и произведено сопоставление собственных данных с литературными источниками. Диссертант особо выделяет и описывает особенности антиоксидантных нарушений, исследует показатели оксидативного стресса и параметры иммунных нарушений, как значимые механизмы патогенеза развития и прогрессирования неалкогольной жировой болезни печени в сочетании или без хронического вирусного гепатита С. Исследуются также взаимосвязи проявлений оксидативного стресса и иммунных расстройств с клиническим течением хронических диффузных заболеваний печени. Детально описана патогенетическая направленность предлагаемых технологий патогенетической терапии и преимущества применения сукцинатсодержащих лекарственных препаратов в составе комплексной терапии изучаемой патологии.



В заключении по диссертационному исследованию подводятся итоги выполненной работы, кратко суммируются полученные результаты и проводится их обсуждение, формулируются основные теоретические положения выполненного исследования и описываются возможности использования его результатов в клинической практике.

Логическим завершением диссертации являются выводы и практические рекомендации, которые вытекают из результатов работы и полностью соответствуют цели и задачам исследования.

В приложениях приведены клинические примеры, что уточняет основные результаты диссертационного исследования в плане их использования в клинической практике.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертационной работы и включает в себя актуальность исследования, его цели и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, сведения по методологии и используемым методам исследования, положения, выносимые на защиту, полученные результаты и их обсуждение, выводы, практические рекомендации, перечень публикаций по теме диссертационной работы. Автореферат написан доступным научным языком и практически не содержит ошибок. Принципиальных замечаний к автореферату нет.

Диссертация Некрасовой Анны Сергеевны в целом носит завершённый характер, написана доступным научным языком.

#### **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертационного исследования, дискуссионные вопросы**

Из достоинств диссертационного исследования можно отметить: многоплановость и высокий общий методологический уровень, разнообразие использованных диагностических технологий и методов, четкое обоснование необходимости проведения исследования по двум научным специальностям – внутренние болезни и клиническая иммунология, аллергология, обширность и хорошее качество иллюстративного материала.



Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению работы нет. В тексте диссертации имеются отдельные стилистические и орфографические ошибки. Отмеченные недостатки не умаляют теоретической и научно-практической значимости диссертационного исследования.

При ознакомлении с работой диссертанту хотелось бы задать следующие вопросы, которые носят уточняющий и дискуссионный характер:

1. Есть ли зависимость между выраженностью иммунных нарушений, выявляемых у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени на стадии стеатогепатита, и степенью ожирения этих пациентов?
2. Как объяснить наличие иммунокорригирующего эффекта у использованных сукцинатсодержащих лекарственных препаратов и есть ли перспективы использования этих лекарств при других заболеваниях, в патогенезе которых значим феномен воспаления?

### **Заключение**

В целом можно отметить высокий научный уровень выполненного диссертационного исследования, его междисциплинарный характер, широту охвата проблемы диффузной патологии печени на фоне метаболического синдрома без и в условиях отягощения хронической HCV-инфекцией, адекватность исследовательской методологии с привлечением весьма обширного перечня современных методов инструментальной диагностики и лабораторного анализа, включая технологии определения параметров иммунного статуса. Использованные для решения поставленных задач технологии и методы клинической, лабораторной и инструментальной диагностики, а также способы патогенетической терапии хронических диффузных заболеваний печени соответствуют методологии исследований, обычно проводимых по научным специальностям «внутренние болезни» и «клиническая иммунология, аллергология».

Диссертация Некрасовой Анны Сергеевны «Иммунные механизмы патогенеза хронических диффузных заболеваний печени и их коррекция



сукцинатсодержащими лекарственными препаратами», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 14.01.04. - внутренние болезни, 14.03.09. - клиническая иммунология, аллергология и выполненная в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования "Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова" Министерства здравоохранения Российской Федерации под руководством кандидата медицинских наук, доцента Стельмах Виктории Валерьевны и доктора медицинских наук, профессора Козлова Виктора Константиновича, является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение актуальной научно-практической задачи, а именно совершенствование подходов и методов диагностики и лечения диффузной патологии печени на основе представлений об иммунопатогенезе этих заболеваний. Рекомендуемые автором диссертационного исследования способы коррекции сопутствующих данной патологии иммунных расстройств посредством включения в комплексную терапию данной категории пациентов сукцинатсодержащих лекарственных препаратов имеют существенное значение для совершенствования методов лечения пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени и профилактики возможных осложнений.

По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов, обоснованности научных положений, выносимых на защиту, выводов и практических рекомендаций, диссертация Некрасовой Анны Сергеевны полностью соответствует требованиям, изложенным в пункте 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.13 г. № 842 (с изменениями от 21.04.2016г. № 335), предъявляемых к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата



медицинских наук по специальностям: 14.01.04. - внутренние болезни, 14.03.09. - клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунологии  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Институт экспериментальной медицины»

«12» ноября . 2018 г.



Назаров Петр Григорьевич

Адрес:

197376, г. Санкт-Петербург,

ул. Академика Павлова, д. 12

web-сайт: <https://iemspb.ru/>

телефон: 8(812)234-68-68

e-mail: [peter\\_nazarov@mail.ru](mailto:peter_nazarov@mail.ru)

Подпись доктора медицинских наук, профессора Петра Григорьевича Назарова  
заверяю:

Ученый секретарь, доктор биологических наук Пшенкина  
Надежда Николаевна

«12» ноября 2018 г.

