

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора, завідувача кафедри дитячих інфекційних хвороб Харківської медичної академії післядипломної освіти Ходек Лариси Анатоліївни на дисертацію **Лядової Тетяни Іванівни «Характеристика імунно-генетичних порушень у патогенезі, клінічних проявах та наслідках ВЕБ-інфекції та їх корекція»**, поданої до захисту в спеціалізовану вчену раду Д 64.61.618.01 при ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України» на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.08 – імунологія та алергологія.

Актуальність обраної теми полягає у широкому розповсюдженні Епштейна-Барр вірусної інфекції (ВЕБ), оскільки при досягненні повноліття більше 90% населення є інфікованими цим вірусом. Неухильне зростання числа групи захворювань, спричинених цим вірусом, як серед дорослих, так і дітей, обумовлює необхідність всебічного його вивчення і розробки ефективних методів профілактики і лікування.

Поліморфізм клінічних проявів ВЕБ-інфекції характеризується широким різноманіттям. Прогнозування результатів ВЕБ-інфекції залежить від наявності та ступеня виразності імунної дисфункції, генетичної схильності до тих чи інших ВЕБ-асоційованих захворювань, а також від ряду зовнішніх чинників, які пошкоджують імунну систему. У ряді досліджень вивчається роль поліморфізму окремих генів у розвитку і перебігу запального процесу та його асоціація з характером імунної відповіді та наслідками.

Відкритим є питання щодо можливості розгляду персистенції ВЕБ в організмі людини та вивчення її асоціації з імунодефіцитними станами, механізми яких вивчаються по теперішній час. В останні роки збільшується кількість публікацій, які свідчать про провідну роль імунних механізмів в патогенезі ВЕБ-інфекції, активну участь цитокінів (ЦК) при формуванні регуляторних захисних реакцій, однак фактори, що призводять до тривалої персистенції ВЕБ, частих рецидивів і прогресування захворювання вивчені ще недостатньо.

Актуальність проведення зазначених досліджень також визначається необхідністю пошуку ефективних схем терапії, спрямованих на реабілітацію імунної системи, сприянню регресії порушень та профілактику рецидивів при різних формах ВЕБ-інфекції, що має безсумнівний інтерес для науки та клінічної практики та обґрунтовує актуальність теми дисертації.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках наукової діяльності кафедри загальної та клінічної імунології та алергології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна: «Вивчення ролі імунних, аутоімунних та метаболічних розладів у патогенезі та наслідках інфекційного процесу, що викликаний герпесвірусами» (№ держреєстрації №0112U005911).

Дисертантом проведено дослідження та вивчення ролі низки показників імунної системи, вмісту ЦК, аутоімунних маркерів у хворих з різними формами ВЕБ-інфекції, проведено оцінку ефективності імуноотропних препаратів.

Наукова новизна отриманих результатів та практичне значення. Підсумком комплексних імунологічних, серологічних та молекулярно-генетичних досліджень стали нові уявлення про участь та роль імунної системи у патогенезі та наслідках ВЕБ-інфекції.

За результатами генотипування ДНК ВЕБ у Харківському регіоні виявлено переважне поширення генотипу ВЕБ-1 як серед хворих на ІМ, так і при ХВЕБ-інфекції. Встановлено, що клінічний перебіг захворювання, розвиток ускладнень та характер імунних порушень не мали вірогідних відмінностей у хворих з різними генотипами ВЕБ.

Вперше надано комплексну всебічну характеристику імунних показників, про- та протизапальних ЦК, аутоімунних, генетичних маркерів та встановлено їх роль як предикторів перебігу та наслідків захворювання при ВЕБ-інфекції. Визначено імунні показники, типи продукції ЦК, генетичні маркери, які сприяють формуванню ІМ у паст-інфекцію та з якими асоційований розвиток ХВЕБ-інфекції. Досліджено імунний статус хворих на ХВЕБ-інфекцію, визначено характер імунних порушень в клітинній, гуморальній та фагоцитарній ланках імунної системи.

Вперше встановлено, що реактивація ВЕБ-інфекції, головним чином,

пов'язана із зниженням в периферичній крові ІФН- α та ІФН- γ ; зниженою здатністю імунокомпетентних клітин до їх продукції; з низькою противірусною активністю цитотоксичних Т-лімфоцитів та натуральних кілерів; зі зниженням продукції ІЛ-2 та ІЛ-12 мононуклеарами крові; нездатністю специфічних ІgM та ІgG ефективно нейтралізувати вірус.

Проведене комплексне та порівняльне дослідження вмісту про- та протизапальних ЦК у пацієнтів з різними формами захворювання дозволило доповнити дані щодо характеру та участі складових цитокинової ланки в імуногенезі ВЕБ-інфекції, встановити їх диференційно-діагностичне значення для прогнозування перебігу та наслідків хвороби. Вперше встановлено різноспрямовані зміни синтезу ЦК, що дозволило виявити чотири типи реагування на ВЕБ-інфекцію: нормореактивний, дисоціативний, гіпореактивний та гіперреактивний.

Розширено наукові дані щодо ролі аутоімуних процесів при різних формах ВЕБ-інфекції. В періоді реактивації ХВЕБ виявлено достовірне збільшення вмісту аутоантитіл до нативної ДНК, рівнів антифосфоліпідних антитіл та антитіл до мікросом печінки і нирок порівняно з показниками групи контролю з тенденцією до зменшення рівнів у періоді реконвалесценції та ремісії.

Вперше при ВЕБ-інфекції проведено визначення поліморфізму -1486T/C гену TLR-9, яке дозволило з'ясувати, асоціацію окремих генотипів з клінічними формами ВЕБ-інфекції.

Доведено ефективність застосування препарату, який містить алоферон та рекомбінантного інтерферону- $\alpha 2\beta$ в комплексній корекції імуних порушень у хворих при хронічних формах ВЕБ-інфекції, що спричиняє достовірний позитивний вплив на динаміку основних клінічних симптомів, показників імунограми та цитокинового профілю.

За результатами проведених досліджень рекомендовано систему моніторингу перебігу та наслідків гострої ВЕБ-інфекції на підставі дослідження рівнів ЦК з метою визначення типу їх реагування (патент на корисну модель №120402).

У хворих на ХВЕБ при виявленні дисоціативного типу реагування визначається низька продукція прозапальних ЦК, тоді як рівні протизапальних ЦК виявляються вірогідно підвищеними і перевищують контрольні в середньому в 5,7 та в 6 разів. Гіпореактивний тип характеризується низькими концентраціями рівнів ЦК, які статистично не відрізняються від контрольних значень, що відзначається затяжним перебігом та частими реактиваціями (патент на корисну модель №121021).

З метою прогнозування ризиків можливих ускладнень при ВЕБ-інфекції рекомендовано спосіб, що полягає у визначенні рівнів специфічних антитіл до фосфоліпідів (IgM і IgG), антитіл до нативної ДНК IgG (ADNA 2) і антитіл IgG до мікосом печінки і нирок (anti-LKM-1) (патент на корисну модель №123507).

На підставі визначення поліморфізму -1486Т/С гену TLR-9 при виявленні гомозиготної алелі СС -1486Т/С у хворих на ІМ визначають високий ризик дисоціативного типу реагування, який асоційовано із затяжним перебігом хвороби та реконвалесценції та розвитком ускладнень. При визначенні генотипів ТС та ТТ можливе прогнозування гладкого перебігу ІМ.

Основні матеріали й положення дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес і наукову роботу кафедри інфекційних хвороб Харківської медичної академії післядипломної освіти, кафедри інфекційних хвороб Харківського національного медичного університету, кафедри інфекційних хвороб Одеського національного медичного університету, кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією Української медичної стоматологічної академії, кафедри мікробіології, вірусології та імунології імені проф. Д. П. Гриньова Харківського національного медичного університету, кафедри загальної гігієни та епідеміології Харківської медичної академії післядипломної освіти.

Ступінь достовірності та обґрунтованості положень, наукових висновків та рекомендацій. Високий ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та практичних рекомендацій обумовлено достатньою кількістю обстежених хворих. Робота відрізняється різноманітністю використання методів і прийомів дослідження і в цілому є прикладом мультидисциплінарного підходу до вирішення поставлених завдань. Поряд з традиційними клініко-

лабораторними методами досліджень використовувалися також сучасні молекулярно-генетичні, імунологічні та біохімічні методи дослідження.

Повнота викладення результатів дослідження. Автором дисертаційної роботи запропоновано нове вирішення та теоретичне узагальнення актуальної науково-практичної проблеми, яке полягає у визначенні складових ланок імуногенезу, питань діагностики, прогнозування наслідків ВЕБ-інфекції. Кількість досліджень, методологічна та методична характеристика роботи дає змогу підтвердити достовірність результатів, які опрацьовані з використанням методів математичної статистики та представлені у 39 наукових працях (11 одноосібно), у тому числі 2 навчальних посібниках, 26 статтях (з них 18 - у наукових фахових виданнях України, 8 – у міжнародних виданнях, 16 – включено до наукометричних баз), 3 патентах України на корисну модель; 8 тезах доповідей на наукових конференціях. Матеріали дисертації повно викладені в друкованих роботах автора. Автореферат відповідає змісту дисертації та відображує її основні положення.

Особистий внесок здобувача. Матеріали, представлені у роботі, є особистим внеском здобувача у вирішення проблеми визначення імунологічних порушень, генетичних маркерів та клінічних проявів у хворих на ВЕБ-інфекцію, що дозволило оптимізувати діагностику, розробити схему моніторингу можливих порушень та ускладнень і провести корекцію виявлених розладів. Мета та завдання дослідження запропоновані дисертантом та скореговані науковим консультантом. Дисертантом самостійно проведено аналіз сучасних наукових літературних даних, інформаційно-патентний пошук за темою дисертації, самостійно проводилися консультації та лікування хворих на базі кафедри, особисто проведено дослідження, статистичну обробку, узагальнення та інтерпретацію отриманих даних, сформульовано висновки та практичні рекомендації.

Персональний внесок автора у всіх опублікованих із співавторами працях наводиться за текстом дисертації та в авторефераті у списку наукових праць.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота побудована та викладена традиційно, згідно вимогам ДАК України. Дисертація викладена на 303 сторінках і включає анотацію, вступ, огляд літератури, об'єкт та методи

досліджень, сім розділів власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, висновки і практичні рекомендації. Список використаних джерел складають 402 джерела, в тому числі 185 кирилицею і 217 латиницею. Матеріали дисертації ілюстровані 48 таблицями і 52 рисунками.

Огляд літератури написаний детально, послідовно, побудований на підставі нових літературних джерел, присвячений сучасним уявленням про етіопатогенез ВЕБ-інфекції, клініку, діагностику та напрямки лікування. Значна увага приділяється характеру імунологічних розладів у пацієнтів з ВЕБ-інфекцією. Вивчена та проаналізована достатня кількість публікацій.

Розділ об'єкт та методи дослідження наведено докладно, що дає можливість відтворити хід дослідження. Методи, що використані автором, сучасні, високоінформативні й адекватні поставленій меті та задачам дослідження. Отримані результати оброблені за допомогою сучасних методів статистики, які обґрунтовують вірогідність отриманих результатів та висновків.

Розділ 3. Клініко-лабораторна, серологічна та вірусологічна характеристика форм ВЕБ-інфекції. В даному розділі представлена клініко-лабораторна характеристика гострих та хронічних форм ВЕБ-інфекції, дослідження продукції антитіл та ДНК ВЕБ. В розділ включено дані щодо проведеного генотипування ВЕБ, де визначено, що генотип ВЕБ-1 є домінуючим як при гострому, так і при ХВЕБ у Харківському регіоні. Представлені відмінності між клінічними проявами ІМ і генотипом вірусу ВЕБ, де встановлено, що серед хворих з верифікованим генотипом ВЕБ-1 та ВЕБ-2 виявлені відмінності у клінічних проявах захворювання, розвитку ускладнень та характері імунних порушень не відзначалися статистичною вірогідністю.

Розділ 4. Показники імунної відповіді у хворих на ВЕБ-інфекцію. В даному розділі представлена структура та динаміка імунологічних показників у хворих на ІМ та ХВЕБ. Досліджена динаміка вмісту імунних показників, що характеризують різний перебіг ВЕБ-інфекції. Дисертантом виявлено, що гладкий перебіг ІМ з подальшим переходом у паст-інфекцію без хронізації інфекційного процесу характеризується активацією клітинної ланки імунітету, що характеризувалося збільшенням вмісту CD3⁺; CD4⁺; CD8⁺; CD16⁺; CD20⁺; CD8⁺CD28⁺; CD25⁺; підвищенням вмісту Th1; збільшенням співвідношення

Th1/Th2, за рахунок підвищення відносного вмісту Th1-клітин. Такий характер змін підтверджує, що ефективний захист та елімінація збудника формуються при трансформації Т-хелперної відповіді в бік Th1-клітин. Зміни з боку гуморальної ланки імунітету характеризувалися вірогідним збільшенням IgA та IgM; незначним зменшенням функціональної активності фагоцитів: ФІ (%) та ФЧ.

Затяжний перебіг ІМ з хронізацією характеризується помірним підвищенням вмісту Т-лімфоцитів: CD3⁺; CD4⁺; CD8⁺, які були нижчими за значеннями порівняно з групою хворих з гладким перебігом. При даному варіанті перебігу ІМ відзначалось підвищення вмісту CD8⁺CD28⁻; вірогідне підвищення вмісту Th2 та вмісту Th3; відношення Th1/Th2 за рахунок Th2-клітин. Виявлені зміни у гуморальній ланці імунної відповіді характеризувалися вірогідним підвищенням вмісту IgG, ЦК та значним зменшенням ФІ (%) та ФЧ на тлі довготривалої реплікативної активності ВЕБ.

При ХВЕБ встановлена тенденція до зменшення вмісту CD3⁺; CD4⁺ та CD25⁺; вірогідне зменшення CD16⁺; тенденція до підвищення вмісту CD8⁺; підвищення CD8⁺CD28⁻ та CD20⁺; підвищення вмісту Th2 та вмісту Th3; дисбаланс у співвідношенні вмісту Th1/Th2 за рахунок підвищення відносного вмісту Th2-клітин, що підтверджує наявність імунної дисфункції. Зміни з боку гуморальної ланки характеризувалися вірогідним збільшенням вмісту IgG та ЦК; порушенням фагоцитарної активності: ФІ (%) та ФЧ (p<0,05).

Розділ 5. Особливості динаміки основних регуляторних цитокінів при різних формах ВЕБ-інфекції. В розділі детально охарактеризований вміст та порівняльна характеристика рівнів основних ЦК залежно від форми ВЕБ-інфекції. На підставі проведених досліджень встановлено вірогідне підвищення концентрацій як прозапальних і протизапальних ЦК у хворих на ІМ з подальшою тенденцією до нормалізації в періоді реконвалесценції. Аналогічна динаміка характеризувала показники ЦК при ХВЕБ з вірогідним підвищенням у стадії реактивації з подальшим зниженням в періоді ремісії. Встановлено, що нормалізації рівня ЦК до контрольних значень не відбувалося в жодній з груп порівняння, що свідчить про затяжний перебіг реконвалесценції.

В розділі 5 також представлені дані щодо встановлених типів синтезу досліджуваних ЦК, які характеризувалися різноспрямованістю, що було підставою для встановлення чотирьох типів реагування: нормореактивний тип, дисоціативний, гіпореактивний і гіперреактивний. Наведені приклади історій хвороб, що ілюструють характер перебігу інфекційного процесу при різних варіантах цитокінового реагування.

У розділі 6. Аутоімунні маркери при різних формах ВЕБ-інфекції висвітлено дані щодо дослідження рівнів окремих аутоімунних маркерів у різних періодах ІМ. За результатами дослідження виявлено тенденцію до підвищення вивчаємих показників у гострому періоді з тенденцією до зниження у періоді реконвалесценції. Встановлено, що високі рівні аутоімунних антитіл у розпалі ІМ можуть бути маркером ускладнень при ІМ.

Аналіз отриманих даних при ХВЕБ дозволив дисертанту встановити, що в періоді реактивації захворювання виявляється достовірне підвищення титрів аутоімунних маркерів порівняно з показниками контрольної групи стосовно рівнів ADNA-2 та anti-LKM-1, тоді як рівні антитіл до фосфоліпідів достовірно не відрізняються від контрольних даних. Дослідження у періоді ремісії ХВЕБ дозволило констатувати їх зменшення порівняно з даними періоду реактивації, однак вони не досягали рівнів контрольних значень. Такі зміни дають автору підставу вважати, що у пацієнтів з різними варіантами ВЕБ-інфекції виявляються аутоімунні порушення, які необхідно враховувати при визначенні тактики лікування з метою підвищення ефективності проведеної медикаментозної терапії та профілактики можливих ускладнень.

Розділ 7. Діагностична значимість поліморфізму гену TLR 9 типу, що характеризує гострий та хронічний перебіг ВЕБ-інфекції представлений результатами дослідження аналізу поліморфізму -1486 T/C гену TLR-9 у хворих з інфекційним мононуклеозом та хронічними формами ВЕБ-інфекції. Аналіз поліморфізму -1486T/C гену TLR-9 дозволив встановити, що у хворих на ІМ дослідження частоти зустрічаємості виявило домінування генотипів СС та ТТ, порівняно з гетерозиготним генотипом ТС. Розподіл частот зустрічаємості поліморфізму -1486T/C гену TLR-9 для різних генотипів продемонстрував асоціацію для генотипу СС з ІМ та відсутність такої для генотипів ТТ та ТС.

Автором встановлено, що при виявленні гомозиготної алелі СС -1486Т/С гену TLR-9 достовірність дисоціативного типу імунного реагування є прогнозованою, що асоційовано із затяжним перебігом хвороби та реконвалесценції та розвитком можливих ускладнень, на відміну від генотипів ТС та ТТ, для яких є типовим гладкий перебіг ІМ. При ХВЕБ дослідження виявило домінування генотипу ТС порівняно з гомозиготним генотипами ТТ та СС. Розподіл частот поліморфізму -1486Т/С гену TLR-9 продемонстрував асоціацію для генотипу ТС з ХВЕБ та відсутність такої для генотипів ТТ та СС. Частота виявлення генотипу ТС складала 71,4% при дисоціативному типі та 75% при гіпореактивному типі реагування.

Розділ 8. Аналіз кореляційних зв'язків між рівнями основних цитокінів та імунологічними, клініко-лабораторними показниками у хворих на ВЕБ-інфекцію. В розділі представлено дослідження характеру кореляційних зв'язків та структур у різні періоди інфекційного процесу. Автором встановлено, що у розпалі ІМ виявляється напруженість імунної системи за типом гіперкомпенсації, а в періоді реконвалесценції режим функціонування системи ЦК та імунних показників знаходиться в режимі гіперкомпенсації за відсутності явищ декомпенсації. У хворих на ХВЕБ відзначається різко виражена диспропорція між внутрішньосистемними і міжсистемними зв'язками з домінуванням останніх, що свідчить про перебування імунної системи в кризовому режимі функціонування з явищами виснаження в періоді реактивації інфекції.

Розділ 9. Оцінка ефективності застосування алоферону (алокін-альфа) та рекомбінантного інтерферону- $\alpha 2b$ (віферон) у хворих на ВЕБ-інфекцію присвячений вивченню ефективності препарату алокін-альфа та віферону в комплексній корекції імунних порушень у хворих на ВЕБ-інфекцію, що сприяє достовірній позитивній динаміці основних клінічних симптомів. Запропонована комбінована схема імунокорекції при ХВЕБ-інфекції має виражений вплив на імунні показники, показники цитокінового профілю порівняно з монотерапією валацикловіром, призводить до зниження рівнів титрів IgG VCA та IgG NA та сприяє більш швидкій елімінації ДНК ВЕБ,

зменшенню частоти рецидивів захворювання протягом року, що є вельми актуальним при хронічних формах ВЕБ-інфекції.

В розділі аналіз та узагальнення результатів автором проведено комплексний аналіз та оцінка отриманих даних дослідження, вичерпно і повно надана остаточну оцінку результатів дослідження. Виділені найбільш значущі результати наукової новизни та перспективності впровадження в практичну охорону здоров'я. Висновки включають стисле формулювання Т. І. Лядовою основних теоретичних та практичних результатів роботи, де запропоновано вирішення та теоретичне узагальнення актуальної науково-практичної проблеми, яке полягає у визначенні складових ланок імуногенезу, питань діагностики, прогнозування наслідків ВЕБ-інфекції і розробку науково обґрунтованих підходів для підвищення ефективності лікування, запобігання хронічному рецидивуючому перебігу та ускладнень. Висновки сформульовані чітко та зрозуміло, їх зміст і послідовність логічно відображає завершеність дисертаційної роботи.

Поряд з позитивною оцінкою роботи, слід відзначити наступне:

У дисертаційній роботі є поодинокі орфографічні та стилістичні помилки, які не мають суттєвого впливу на значущість проведених досліджень. Розділ «Методи дослідження» містить детальну характеристику загальновідомих методик, що є доволі відомими та рутинними. Зазначені вище зауваження не є принциповими та не зменшують наукову та практичну цінність дисертації.

При детальному знайомстві з положеннями дисертації виникли деякі запитання:

1. При встановленні діагнозу інфекційний мононуклеоз чи проводили Ви диференційну діагностику з іншими інфекційними захворюваннями, що перебігають з клінічними проявами мононуклеозоподібного синдрому?

2. На підставі яких даних встановлено діагноз гостра форма ВЕБ-інфекції та реактивована форма?

3. Які клінічні прояви хронічної ВЕБ-інфекції зустрічалися найбільш частіше?

4. На вашу думку, чи можливо прогнозування тієї чи іншої форми ВЕБ-інфекції на підставі генетичних маркерів?

5. Чи проводили Ви катамнестичне спостереження пацієнтів?

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Лядової Тетяни Іванівни «Характеристика імунно-генетичних порушень у патогенезі, клінічних проявах та наслідках ВЕБ-інфекції та їх корекція», представлена до захисту в спеціалізовану вчену раду Д 64.61.618.01 при ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України» на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук є самостійною завершеною науково-дослідницькою працею та містить наукові положення та науково обґрунтовані результати.

За своєю актуальністю, науковою новизною отриманих результатів, теоретичною та практичною цінністю дисертаційна робота Лядової Т.І. відповідає вимогам п.11-13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року №567 (зі змінами внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 року та №1159 від 30.12.2015) щодо докторських дисертацій, а її автор – Лядова Тетяна Іванівна заслуговує присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.08 – імунологія та алергологія.

Завідувач кафедри дитячих інфекційних хвороб
Харківської медичної академії
післядипломної освіти
доктор медичних наук, професор



Ходак Л.А.