

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора кафедри клінічної, лабораторної імунології та алергології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика
Кузнецової Лариси Володимирівни на дисертацію
Лядової Тетяни Іванівни «Характеристика імуно-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.

Проблема специфічної діагностики Епштейна-Барр вірусної інфекції (ВЕБ-інфекції), незважаючи на тривалу історію вивчення, надзвичайно актуальна через недостатнє використання в практичній охороні здоров'я сучасних лабораторних методів дослідження. ВЕБ-інфекція характеризується глобальним поширенням (до 18 років більше 90% населення земної кулі інфіковано ВЕБ), але в більшості випадків вона носить персистуючий характер і не потребує противірусної терапії. У той же час, агресивні фактори навколишнього середовища, збільшення випадків придбаного та вродженого імунодефіциту, зумовлюють наростання числа важких випадків інфекційного мононуклеозу (ІМ), реактивації цієї інфекції з поліорганною патологією. Найбільш перспективним є застосування на практиці молекулярно-генетичних методів діагностики і, перш за все полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яка дозволяє виявляти присутність ДНК ВЕБ у різні періоди захворювання.

Кількість досліджень, присвячених вивченню характеру клініко-лабораторних проявів ІМ залежно від стадії та форми інфекційного процесу у дорослих пацієнтів в нашій країні, дуже обмежена. Актуальність теми пов'язана з пошуками ефективних схем терапії щодо елімінації ВЕБ у хворих з хронічними формами ВЕБ-інфекції, спрямованих на реабілітацію імунної системи та профілактику рецидивів, що 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).

Ступінь достовірності та обґрунтованості положень, наукових висновків та рекомендацій.

Основні положення, сформульовані дисертантом грамотно побудовані з методологічної точки зору, науково обґрунтовані і представлені на підставі поглибленого аналізу джерел літератури та результатів власних досліджень. Автором комплексно, із застосуванням загально-клінічних, біохімічних, серологічних, молекулярно-генетичних методів обстежено 321 пацієнта з ВЕБ-інфекцією, (з них 138 – хворих на інфекційний мононуклеоз та 183 з хронічними формами ВЕБ-інфекції). Застосовані дисертантом методи сучасні, високоінформативні, адекватні поставленій меті та завданням дослідження. Значний обсяг проведених досліджень, використані методи статистичного аналізу забезпечують достовірність отриманих результатів. Матеріали дисертаційної роботи достатньо висвітлені в наукових публікаціях, впроваджені в практику охорони здоров'я та навчальний процес. Висновки роботи аргументовані, витікають з матеріалів дисертації.

Наукова новизна положень і висновків, сформульованих у дисертації.

Генотипування ВЕБ встановило переважне поширення генотипу ВЕБ-1 серед хворих з різними формами ВЕБ-інфекції. Встановлено, що клінічний перебіг захворювання, розвиток ускладнень та характер імунних порушень не відрізнялися вірогідністю у хворих з різними генотипами ВЕБ.

Дисертантом 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 пост-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.

Автором 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.

В роботі представлено комплексне та порівняльне дослідження вмісту про- та протизапальних ЦК у пацієнтів з ВЕБ-інфекцією, що дозволило доповнити дані щодо характеру та участі цитокинової регуляторної мережі в імуногенезі ВЕБ-інфекції, встановити їх диференційно-діагностичне значення для прогнозування перебігу та наслідків хвороби. За результатами дослідження встановлено різноспрямовані зміни синтезу ЦК, що дозволило виявити чотири типи їх продукції: нормореактивний, дисоціативний, гіпореактивний та гіперреактивний.

Дисертантом розширено наукові дані щодо ролі аутоімуних маркерів 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.

Вперше при ВЕБ-інфекції проведено визначення поліморфізму -1486T/C гену TLR-9, яке дозволило з'ясувати, що присутність у геномі хворих на ІМ генотипу СС є специфічним для хворих на ІМ, що дозволяє оцінювати його як позитивну асоціацію, порівняно з отриманими показниками для гомозиготного типу ТТ, який оцінюється як негативна асоціація та відсутність асоціації з ІМ для гетерозиготного генотипу ТС. При виявленні гомозиготної алелі СС -1486T/C гену TLR-9 вірогідність дисоціативного типу 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 поширеності окремих генотипів виявило домінування генотипу ТС, порівняно з генотипами ТТ та СС. Розподіл частот поліморфізму -1486T/C гену TLR-9

продемонстрував асоціацію для генотипу ТС при ХВЕБ та відсутність таких для генотипів ТТ та СС.

Автором доведено ефективність застосування препарату, який містить алоферон та рекомбінантного інтерферону- $\alpha 2\beta$ в комплексній корекції імунних порушень у хворих з хронічною ВЕБ-інфекцією. Запропонована схема характеризувалася позитивною динамікою щодо інверсії основних клінічних симптомів, нормалізацією показників імунограми та цитокінів.

Теоретичне і практичне значення дослідження.

За результатами проведених досліджень автором рекомендовано систему моніторингу перебігу та наслідків гострої ВЕБ-інфекції на підставі дослідження рівнів ЦК з метою визначення типу їх реагування. При виявленні достовірних підвищень ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-2, ІФН- γ , ІФН- α , ІЛ-12 ІЛ-4, ІЛ-10 та ТФР β 1 може бути діагностовано нормореактивний тип реагування, що характеризує гладкий перебіг ІМ без ускладнень. Гіперреактивний тип діагностується на підставі достовірно високих рівнів досліджуваних ЦК порівняно з показниками пацієнтів з нормореактивним типом (в середньому в 1,5-2 рази) і даними контрольної групи (в середньому у 8-10 разів). Виявлення достовірно підвищених рівнів прозапальних ЦК на фоні низьких рівнів ІЛ-2, ІФН- γ , ІФН- α і протизапальних ІЛ-4, ІЛ-10 та ТФР β 1 дозволяють діагностувати дисоціативний тип відповіді (патент на корисну модель №120402).

При виявленні дисоціативного типу реагування у хворих на ХВЕБ 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).

Дисертантом 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 мікросом печінки і нирок (anti-LKM-1) з метою

прогнозування ризиків можливих ускладнень у хворих на ВЕБ-інфекцію (патент на корисну модель №123507).

На підставі визначення поліморфізму -1486Т/С гену TLR-9 при виявленні гомозиготної алелі СС -1486Т/С визначають високий ризик дисоціативного типу імунного реагування, що асоційований із затяжним перебігом хвороби та реконвалесценції, розвитком ускладнень. При визначенні генотипів ТС та ТТ можливе прогнозування гладкого перебігу ІМ. У хворих на ХВЕБ при виявленні гомозиготної алелі ТТ -1486Т/С визначають високий ризик гіпореактивного типу імунного реагування який асоційований з високою частотою реактивації протягом року.

Повнота викладення результатів дослідження.

Результати дисертаційної роботи Лядової Тетяни Іванівни знайшли відображення у 39 наукових працях (11 одноосібно), які відповідають темі дисертації і висвітлюють положення внесені на захист. Серед них 2 навчальних посібниках, 26 статей (з них 18 - у наукових фахових виданнях України, 8 – у міжнародних виданнях, 16 – включено до наукометричних баз), 3 патенти України на корисну модель; 8 тезах доповідей на наукових конференціях.

Оцінка змісту дисертації.

Дисертаційна робота побудована за традиційним принципом, викладена на 303 сторінках і включає анотацію, вступ, огляд літератури, загальну характеристику обстежених осіб та методів досліджень, 7 розділів власних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів, висновки, практичні рекомендації. Список використаної літератури містить 402 джерела, в тому числі 185 кирилицею і 217 латиницею. Робота ілюстрована 48 таблицями і 52 рисунками.

В **огляді літератури** висвітлена сучасна епідеміологічна ситуація, особливості маніфестації ВЕБ-інфекції, представлені сучасні уявлення про імунопатогенез ВЕБ-інфекції, обґрунтовані патогенетичні механізми, охарактеризовано зміни, що спостерігаються з боку імунної системи, висвітлено роль цитокінової регуляторної мережі у патогенезі ВЕБ-інфекції. Автором представлено сучасний погляд на роль TLR-рецепторів у функціонуванні імунної системи при інфекційній патології загалом при

вірусних інфекціях. Огляд літератури чітко обґрунтовує доцільність обраного напряму досліджень.

У другому розділі **«Об'єкт та методи дослідження»** дисертант наводить відомості про загальну кількість обстежених хворих, критерії постановки діагнозу, характеризує застосовані при обстеженні хворих загальноклінічні, біохімічні, серологічні, молекулярно-генетичні методи обстеження. Застосовані методи адекватні меті і завданням дисертаційної роботи. Методи статистичної обробки матеріалу описані детально, є сучасними, високоінформативними та цілком відповідають розкриттю поставленої мети та завдань дослідження.

Третій розділ **«Клініко-лабораторна, серологічна та вірусологічна характеристика форм ВЕБ-інфекції»** містить детальну клініко-лабораторну характеристику гострих та хронічних форм ВЕБ-інфекції, дослідження продукції антитіл та ДНК ВЕБ. Автором представлені дані щодо проведеного генотипування ВЕБ, де встановлено, що домінуючим генотипом при різних формах ВЕБ-інфекції є ВЕБ-1. Дисертантом наведені встановлені відмінності між клінічними проявами у хворих з різними генотипами ВЕБ при ІМ.

Четвертий розділ **«Показники імунної відповіді у хворих на ВЕБ-інфекцію»** містить детальну структуру та динаміку імунологічних показників у хворих на ІМ та ХВЕБ. Автором виявлено, що гладкий перебіг ІМ з подальшим переходом у паст-інфекцію характеризується активацією клітинної ланки імунітету, підвищенням вмісту Th1-клітин; збільшенням співвідношення Th1/Th2 за рахунок підвищення відносного вмісту Th1-клітин, що підтверджує ефективний захист та елімінацію збудника при формуванні 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⁺, що були нижчими за значення групи хворих з гладким перебігом. При даному варіанті перебігу ІМ відзначалось підвищення вмісту CD8⁺CD28⁻; вірогідне підвищення вмісту Th2; 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 дослідженні імунного статусу хворих на 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; дисбаланс у співвідношенні вмісту Th1/Th2 за рахунок підвищення відносного вмісту Th2-клітин. Зміни з боку гуморальної ланки характеризувалися вірогідним збільшенням вмісту IgG та ЦК та порушенням фагоцитарної активності.

У п'ятому розділі **«Особливості динаміки основних регуляторних цитокінів при різних формах ВЕБ-інфекції»** наведена детальна характеристика вмісту основних ЦК у хворих з різними формами ВЕБ-інфекції. За результатами досліджень встановлено вірогідне підвищення концентрацій як прозапальних і протизапальних ЦК у хворих на ІМ з подальшою тенденцією до нормалізації в періоді реконвалесценції. Схожа динаміка характеризувала показники ЦК при ХВЕБ з вірогідним підвищенням у стадії реактивації з подальшим зниженням в періоді ремісії.

На підставі досліджених рівнів ЦК встановлено чотири типи реагування, які характеризували перебіг ВЕБ-інфекції. У хворих на ІМ при нормореактивному та гіперреактивному типі реагування встановлено гладкий перебіг з переходом у паст-інфекцію, при дисоціативному типі спостерігається перехід в хронічну форму ВЕБ-інфекції. При хронічному перебігу хвороби встановлено два типи реагування: дисоціативний та гіпореактивний, які можуть бути використані як прогностичні критерії.

У шостому розділі **«Аутоімунні маркери при різних формах ВЕБ-інфекції»** проаналізовано рівні окремих аутоімунних показників у хворих на гострі та хронічні форми ВЕБ-інфекції. Аналіз отриманих даних при ХВЕБ дозволив дисертанту встановити, що реактивація ВЕБ-інфекції характеризується підвищенням вмісту аутоімунних показників порівняно з показниками контрольної групи, що відзначається вірогідністю стосовно рівнів ADNA-2 та anti-LKM-1. Виявлені зміни дають автору підставу вважати, що у пацієнтів з різними варіантами ВЕБ-інфекції діагностуються аутоімунні

порушення, які потрібно враховувати при визначенні тактики лікування з метою підвищення ефективності проведеної терапії.

Сьомий розділ **«Діагностична значимість поліморфізму гену TLR 9 типу, що характеризує гострий та хронічний перебіг ВЕБ-інфекції»** містить детальний аналіз розподілу частот поліморфізму -1486 Т/С гену TLR-9 у хворих з ІМ та ХВЕБ. На підставі визначення поліморфізму -1486Т/С гену TLR-9 при виявленні гомозиготної алелі СС -1486Т/С визначають високий ризик дисоціативного типу імунного реагування, який асоційований із затяжним перебігом хвороби та реконвалесценції, розвитком ускладнень. При визначенні генотипів ТС та ТТ можливе прогнозування гладкого перебігу ІМ. При виявленні гомозиготної алелі ТТ -1486Т/С визначають високий ризик гіпореактивного типу імунного реагування у хворих на ХВЕБ, який асоційований з високою частотою реактивації протягом року.

У матеріалах восьмого розділу **«Аналіз кореляційних зв'язків між рівнями основних цитокінів та імунологічними, клініко-лабораторними показниками у хворих на ВЕБ-інфекцію»** надана ґрунтовна загальна характеристика кореляційних зв'язків та структур у різні періоди ВЕБ-інфекції. На підставі аналізу міжсистемних та внутрішньосистемних зв'язків встановлено, що у розпалі ІМ напруженість імунної системи характеризується за типом гіперкомпенсації, а в періоді реконвалесценції – напруженість у режимі гіперкомпенсації за відсутності явищ декомпенсації. При хронічному перебігу ХВЕБ відзначається різко виражена диспропорція між зв'язками, що свідчить про перебування імунної системи в кризовому режимі функціонування з явищами виснаження в періоді реактивації інфекції.

Дев'ятий розділ **«Оцінка ефективності застосування алоферону (алокін-альфа) та рекомбінантного інтерферону- α 2b (віферон) у хворих на ВЕБ-інфекцію»** присвячений вивченню ефективності алоферону (алокін-альфа) та рекомбінантного інтерферону α 2b (віферон) в корекції імунних порушень у хворих на хронічну ВЕБ-інфекцію. Запропонована схема сприяє достовірній позитивній динаміці клінічних симптомів, має виражений вплив на імунні показники, нормалізацію вмісту ЦК, порівняно з монотерапією

валацикловіром, сприяє більш швидкій елімінації ДНК ВЕБ, зменшенню частоти рецидивів захворювання протягом року.

Обговорення результатів написано на основі ретельного аналізу результатів проведеного дослідження і даних літератури. Автором проведено співставлення отриманих результатів із сучасними літературними даними. Сформульовані висновки і практичні рекомендації, які мають безперечну наукову та практичну цінність. Висновки зроблені на підставі отриманих результатів, обґрунтовані, містять фактичний матеріал, відповідають завданням дослідження.

При детальному знайомстві з положеннями дисертації виникли деякі запитання:

1. Чи спостерігали Ви побічні ефекти у хворих з ХВЕБ при застосуванні комбінованої терапії?
2. Поясніть, будь-ласка, чому у якості препарату етіотропної терапії ВЕБ-інфекції у досліджуваних хворих було обрано саме валацикловір?
3. Чим пояснюється вибір віферону для лікування досліджуваного контингенту хворих?

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.

Дисертаційна робота Лядової Т.І. за актуальністю, науковою новизною отриманих результатів, теоретичною та практичною цінністю 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 року) щодо докторських дисертацій, а її автор - Лядова Тетяна Іванівна заслуговує присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.08 – імунологія та алергологія.

Професор кафедри
клінічної, лабораторної
імунології та алергології
Національної медичної
академії післядипломної
освіти імені П. Л. Шупика
доктор медичних наук
професор

Л. В. Кузнецова

