

ВІДГУК

офіційного опонента – доктора медичних наук, професора, проректора з наукової роботи Української медичної стоматологічної академії, Кайдашева Ігора Петровича на дисертаційну роботу Ломіковської Марти Павлівни «Імунопатогенез інфекційного реактивного артрити на тлі активованих облігатних інфекцій (*Chlamydia trachomatis* та Епштейна-Барр вірус), тактика ведення хворих», подану у спеціалізовану вчену раду Д 64.051.33 Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08 – імунологія та алергологія.

Актуальність обраної теми дисертації. На сьогоднішній день реактивний артрит вважається важливою медико-соціальною проблемою у зв'язку з високою розповсюдженістю серед людей працездатного віку і розвивається внаслідок хламідійної або (значно рідше) іншої інфекції (García-Kutzbach A, Chacón-Súchite J, García-Ferrer H, Iraheta I., 2018). При цьому у розвитку реактивних артритів відіграють важливу роль безпосереднє ураження органа-мішені інфекційним збудником і неадекватна імунна відповідь. В останні роки особлива увага науковців приділялася ролі вірусної інфекції в розвитку та перебігу реактивних артритів, проте недооцінені наслідки дії реактивації Епштейна-Барр вірусу (ЕБВ) у хворих на дану патологію (Franssila R, Hedman K., 2006). Імунопатогенетичні аспекти реактивних артритів активно вивчаються і становлять значний науково-практичний інтерес, проте нез'ясованими залишаються критерії оцінки ступеню імунорегуляторних порушень у таких пацієнтів. Існують суперечливі дані щодо механізмів регуляції імунної відповіді у пацієнтів з імунозалежними інфекціями, зокрема у комбінації хламідійної та Епштейна-барр вірусної інфекцій та не вивчено ризики трансформації в більш тяжкі системні аутоімунні хвороби (Niller HH, Wolf H, Minarovits J., 2008). Протягом останнього десятиліття мало уваги

приділялось цьому питанню, відкрились нові імунологічні феномени, тому дисертаційна робота Ломіковської Марти Павлівни має високу актуальність.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота є фрагментом планової науково-дослідної роботи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (ЛНМУ) «Прогнозування розвитку вірус-індукованих фенотипів імунозалежних хвороб з персоніфікацією їх діагностики та лікування» (ДР № 0118U000110).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Використання сучасних методів дослідження, достатня кількість обстежених хворих, поглиблений аналіз, статистична обробка дозволили Ломіковській М.П. у дисертаційній роботі обґрунтувати і узагальнити наукові положення, висновки та практичні рекомендації.

Міра обґрунтованості та достовірності наукових положень, результатів і висновків дисертації забезпечена коректним використанням загальнонаукових та науково-практичних методів дослідження, теоретико-методологічних підходів, які ґрунтувались на засадах консенсусу з медичної біоетики та принципах доказової медицини. Запропоновані автором практичні рекомендації ґрунтуються на об'єктивних даних результатів досліджень і відображають доцільність їх подальшого застосування у медичній, науковій, практичній та навчально-освітній сфері.

Структура дисертаційної роботи логічна, зміст розділів відповідає меті та завданням, а також відображає суть та предмет дослідження. Представлені в роботі наукові положення, висновки і рекомендації ґрунтуються на фактичних матеріалах дисертаційного дослідження. Проведений аналіз та узагальнення даних при оцінці отриманих результатів власних досліджень логічні та обґрунтовані, висновки відповідають завданням, які поставив дисертант.

Опублікована анотація роботи повною мірою відповідає основним положенням, що викладені в тексті дисертації та не містить даних, які були б відсутні в дисертації.

3. Наукова новизна отриманих результатів та достовірність положень, сформульованих у дисертації. Достовірність основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих в дисертаційній роботі Ломіковської М.П. ґрунтується на: достатній кількості обстежених хворих; достатньому обсязі виконаних клініко-імунологічних досліджень; використанні адекватних і загальноновизнаних методів дослідження. Цифрові результати досліджень оброблено у відповідності із правилами альтернативної і рядової варіаційної статистики.

Викладене вище засвідчує те, що сформульовані у дисертаційній роботі Ломіковської М.П. основні наукові положення і висновки є достовірними, а практичні рекомендації – обґрунтованими.

Наукова новизна полягає в тому, що дисертантом проведено комплексну оцінку стану фагоцитарних, лімфоцитарних, цитокінових та метаболічних механізмів імунної системи хворих на реактивний артрит в залежності від етіологічного чинника. Вперше досліджено рівень молекул BART-13, BART-15 вірусу Епштейна-Барр та регуляторних молекул miR155 та miR146a у хворих на реактивний артрит на тлі *C. trachomatis* і Епштейна-Барр вірусу. Вперше у хворих на РеА на тлі *C. trachomatis* і Епштейна-Барр вірусної інфекції досліджено рівень продуктів глікації AGE в сироватці крові. Автор на підставі комплексного вивчення імунологічних та молекулярно-генетичних параметрів запропонувала математичну модель прогнозування ризиків трансформації реактивного артриту тлі комбінованої інфекції (*C. trachomatis*+ВЕБ) в ревматоїдний артрит.

4. Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях. Результати досліджень, основні наукові положення, висновки і практичні рекомендації, що висвітлюють основні аспекти кандидатської дисертації Ломіковської М.П. оприлюднено і обговорено на науково-практичних конференціях. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 20 праць: 9 статей у вітчизняних та зарубіжних наукових фахових виданнях, з них 3 статті у журналах, включених до наукометричної баз даних Scopus та

Web of Science та 11 тез доповідей на наукових конференціях, з них 4 – у матеріалах міжнародних конгресів.

Вказане вище, дозволяє визначити, що опубліковані праці автора повною мірою розкривають основні наукові положення, висновки і рекомендації дисертаційної роботи.

5. Структура, зміст і завершеність дисертаційної роботи. Дисертаційна робота Ломіковської М.П. викладена на 176 сторінках машинописного тексту, містить 19 таблиць, 23 рисунка і складається із основної частини: вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, власних результатів, їх аналізу та узагальнення, висновків, списку використаних джерел та додатків.

У вступі лаконічно і переконливо обґрунтовано актуальність для медичної галузі вирішення задачі підвищення ефективності лікування та раннього прогнозування ризиків трансформації реактивного артрити в ревматоїдний артрит шляхом вивчення особливостей імунопатогенезу інфекційного реактивного артрити на тлі колонізації хламідійної і реактивації ЕБВ-інфекції. Висвітлено зв'язок роботи з науковими програмами, сформульовано мету, визначено завдання дослідження для її досягнення (всього 8), окреслено об'єкт та предмет дослідження, наведені наукова новизна, теоретичне та практичне значення отриманих результатів, приведені дані, щодо апробації і опублікування останніх, а також відомості про обсяг та структуру дисертації.

Розділ 1 є огляд літератури і складається з восьми підрозділів, які характеризують сучасний стан вивчення патогенезу реактивних артритів. Автором детально описані етіологічні чинники реактивних артритів. Детально розглянуті молекулярні-генетичні, клітинні та цитокінові механізми розвитку цього захворювання. Звертають увагу нові дані щодо ролі мікроРНК та Толл-рецепторів у патогенезі реактивного артрити. Окремо проаналізовані особливості продукції кінцевих продуктів глікації AGE при захворюваннях суглобів. В цілому, огляд літератури засвідчує добру обізнаність автора з переліченими проблемами і справляє позитивне враження. Перелік

використаних літературних джерел налічує 173 найменування, з них кирилицею - 35, латиницею — 138.

Зауваження до розділу: розділ перевантажений загальновідомими даними щодо реактивного артрит, викликаного хламідійною інфекцією, ролі ЕБВ в індукції аутоімунних захворювань взагалі та ревматоїдного артрит, зокрема, ролі цитокінів в цих процесах. Висновки до розділу 1 не повністю обґрунтовують мету дослідження.

Розділ 2. «Матеріали і методи дослідження». У даному розділі представлена загальна характеристика обстежених пацієнтів, основні лабораторні, імунологічні та статистичні методи дослідження. Визначено клінічні критерії включення в дослідження хворих на реактивний артрит, розподіл їх за групами. Було виділено 45 хворих на реактивний артрит з *Chlamydia trachomatis* та 43 хворих на РеА з комбінованою інфекцією *C. trachomatis* та ЕБВ. Додатково було обстежено 31 хворий на ревматоїдний артрит для побудови математичної моделі ризиків трансформування реактивного артрит в ревматоїдний. Методи дослідження, які використовував автор в своїй дисертаційній роботі охоплюють молекулярно-генетичні, імунологічні та статистичні. Наведені основні лабораторні методи, якими дисертантка користувалася: 1) визначення імуноглобулінів G, M, A до *Chlamydia trachomatis*, імуноглобулінів G, M до нуклеарного та до капсидного антигенів Епштейна-Барр вірусу методом імуноферментного аналізу; 2) визначення ДНК *Chlamydia trachomatis* та Епштейна-барр вірусу в різних середовищах методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР); 3) визначення рівня BART-13, BART-15, miR146a, miR155 методом ПЛР; 4) визначення експресії TLR9 на клітинах крові, оцінка фагоцитарної та оксидативної активності, фенотипування лімфоцитів та їх активізаційних маркерів методом проточної цитофлюориметрії; 5) оцінка рівня цитокінів у крові за допомогою платформи BioPlex 200; 6) визначення кінцевих продуктів глікації (AGE) проводили методом ІФА. Повнота викладення автором методів досліджень є цілком достатньою для оцінки їх сучасності, обґрунтованості вибору цих методів з точки зору виконання поставлених завдань, забезпечення якості

проведення експериментів, можливості їх відтворення та статистичної обробки отриманих результатів.

Зауваження до розділу: Перші два висновка розділу 2 не є суттєвими, не віддзеркалюють що групи пацієнтів та методи дослідження відбиралися для вирішення конкретних завдань дослідження.

Розділ 3. «Характеристика змін при реактивному артриті, який спричинений *Chlamydia Trachomatis* та Епштейна-Барр вірусною інфекцією». У цей розділ входить сім підрозділів, які нам дають можливість детальніше вивчити імунорегуляторні порушення у хворих на реактивний артрит залежно від етіологічного чинника. В перших двох підрозділах визначено клінічні особливості перебігу, серологічні та молекулярно-генетичні маркери інфекційних збудників, а саме *C. trachomatis* та ЕБВ. Оригінальним матеріалом представленим в третьому підрозділі є визначення рівня мікроРНК ЕБВ BART-13, BART-15 та рівня регуляторних мікроРНК miR146a, miR155. При цьому у хворих на РеА з комбінованою інфекцією спостерігалось достовірне збільшення цих показників порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis*. Окрім цього цікавим виявився факт виявлення позитивної кореляції у хворих на РеА з комбінованою інфекцією між BART-13, BART-15 та miR146a, miR155. В четвертому підрозділі дисертатка вивчала експресію TLR9 на імунокомпетентних клітинах та оцінювала фагоцитарну активність нейтрофілів та моноцитів. Рівень експресії TLR9⁺CD123⁺ на моноцитах та лімфоцитах був більш виражений у групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією *C. trachomatis* та ЕБВ порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis*. У всіх групах хворих відзначалось збільшення спонтанної та зменшення резервної здатності поглинальної та оксидантної здатності фагоцитів. В п'ятому підрозділі при оцінці фенотипічних властивостей лімфоцитів визначено зниження кількості NK-клітин та Т-цитотоксичих лімфоцитів, що може свідчити про послаблення противірусного захисту, та збільшення кількості В-лімфоцитів, що може бути ознакою формування аутоагресії. В шостому підрозділі автор оцінила цитокінпродукуючу здатність імунокомпетентних клітин, де було визначено рівень шести цитокінів: TNF- α , IL-17, IL-22, IL-23,

IFN- γ та IL-10. При цьому виявлено особливе збільшення IFN- γ та зниження IL-10 у хворих на ReA з комбінованою інфекцією. В цьому розділі автор визначала рівень кінцевих продуктів глікації AGE, де було виявлено суттєве збільшення цих показників у хворих на ReA з комбінованою інфекцією.

Зауваження до розділу 3: В підрозділі 3.1 дисертантка розраховує коефіцієнт кореляції Пірсона (єдиний який наведено в розділі матеріали і методи) між показниками експресії miRNA та BART. Але як зрозуміло з наведених даних показники експресії miRNA та BART не підлягають нормальному розподілу. Якщо розглядати рисунок 3.8 видно, що окремі значення не вкладаються на розраховану криву.

Щодо даних проточної цитометрії – не наведені регіони, з яких розраховувалися показники що досліджувалися (наприклад, рисунок 3.10). На рисунках 3.12 та 3.13 різна кількість клітин, тому важко наочно порівнювати рівні забарвлення. На рис. 3.15 не промарковані гістограми, які наведені у легенді до нього. В підрозділі 3.4 дисертант застосовує термін локалізації TLR 9 “на клітинах”, але, як правильно наведено в розділі 2, ці рецептори локалізовані внутрішньоклітинно.

Розділ 4. Прогностична модель на основі молекулярно-генетичних та імунологічних досліджень ризику трансформації реактивного артрити, який спричинений комбінованою інфекцією *Chlamydia trachomatis* та Епштейна-Барр вірусом в ревматоїдний артрит. В четвертому розділі дисертантка запропонувала прогностичну математичну модель ризиків трансформації реактивного артрити з комбінованою інфекцією в ревматоїдний артрит. Факторами ризику є кількість копій ДНК ВЕБ в різних середовищах одночасно, відносне число CD19⁺ -лімфоцитів, рівні молекул BART-13, BART-15, miR146, в сироватці крові. Отримані дані дозволяють більш глибоко зрозуміти імунопатогенез реактивного артрити та впливати на визначення тактики лікування.

Зауваження до розділу: Як зрозуміло з дизайну дослідження, перевірка роботи запропонованої моделі проводилася на тих самих пацієнтах, показники яких використовували для розрахунку моделі.

Розділ 5. Лікування хворих на реактивний артрит на тлі комбінованої інфекції *Chlamydia trachomatis* та Епштейна-Барр вірусу присвячений оцінці впливу імуномодуючої терапії препаратом Імодин разом з протизапальним та етіологічним лікуванням на клінічний перебіг та імунні показники хворих на реактивний артрит з комбінованою інфекцією. Доведено клінічну ефективність на основі індексу DAREА та імунологічну ефективність на основі збільшення Т-цитотоксичних лімфоцитів, зменшення кількості В-лімфоцитів та збільшення NK-клітин на тлі зниження Т-хелперів.

Зауваження до розділу: Виходячи із дизайну дослідження було б доцільним вивчити рівні цитокінів для визначення змін типу запалення Т1 чи Т2 при застосуванні імодину і при дії базисного лікування.

В розділі «Аналіз та узагальнення отриманих результатів» дисертантка навела результати проведеного дослідження та комплексного лікування хворих на реактивний артрит.

Зауваження до розділу: Фактично цей розділ в скороченому вигляді повторює основні частини розділів 3, 4, 5. Було б доцільним структурувати цей розділ у відповідності до завдань із логічно доведеними висновками. Під час аналізу власних результатів та їх узагальнення дисертант не порівнював своїх даних та висновків із сучасною літературою. Розділ не містить в кінці узагальнення.

Висновки. Основні положення дисертаційної роботи представлені вісьмома висновками, які відображають отримані автором результати, дають відповідь на поставлені в роботі питання і є науково обґрунтовані. Висновки логічно витікають із результатів проведених досліджень та дають вирішення поставленим завданням. Можна відмітити певні невдалі формулювання, які в цілому не впливають на фактичне значення висновків.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Теоретичне значення роботи полягає в дослідженні взаємодії факторів вірулентних збудників — вірусу Епштейн-Барр та хламидии трахоматіс — із компонентами імунної системи макроорганізма, функційних змін в регуляції

стану клітинного та гуморального імунітету. Підкреслена роль miRNA та BART в імунопатогенезі реактивних артритів, ініційованих наведеними чинниками. Важливим є показана трансформація реактивних артритів, ініційованих збудниками, в ревматоїдний артрит.

Запроваджено ранню діагностику реактивного артрити за допомогою молекулярно-генетичного дослідження ДНК причинного збудника у різних біологічних середовищах та специфічного антитілоутворення.

Показана перспективність створеної математичної моделі прогнозування ризиків трансформації реактивного артрити тлі комбінованої інфекції (*C. trachomatis*+ВЕБ) в ревматоїдний артрит, яка потребує подальшого випробування в проспективних дослідженнях.

Для зменшення ризиків трансформації реактивного артрити у ревматоїдний артрит розроблено схему лікування та доведено її ефективність із застосування ліофілізованого діалізату лейкоцитів "Імодин" у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) як терапії супроводу на тлі етіотропного та протизапального лікування. Теоретичні та практичні узагальнення викладені автором у актах впровадження, які використовуються у різних медичних закладах Львова.

Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації. Основні зауваження викладені під час аналізу розділів. Загалом позитивно оцінюючи дисертаційну роботу Ломіковської Марти Павлівни, варто запропонувати дисертантці такі дискусійні питання:

1. Якої фізіологічною та імунотропною активністю володіють BART-13 та BART-15, в чому полягають відмінності їх впливу?
2. Що включає в себе поняття "система miR" та чим визначена регуляторна роль miR155 та miR146 для цієї системи (висновок 2)?
3. Яким чином визначалась антигенпрезентуюча здатність TLR9-позитивних моноцитів, як зазначено у висновку 3?

4. Отримані результати демонструють, що імодин практично не впливав на кількість CD3+CD4+, CD4+CD25+ клітин у хворих на реактивний артрит, викликаний комбінованими інфекціями. В той же час, в інструкції для клінічного застосування препарату чітко вказано “Застосування лікарського засобу ІМОДИН спричиняє, зокрема, підвищення продукування інтерферону гамма і інтерлейкіну 1-2 і, таким чином, зміщення на користь субпопуляції Th 1 і спектра цитокінів, що продукуються цими клітинами”. Як пояснити отримані результати?

5. В інструкції для клінічного застосування препарату також зазначено в розділі протипоказання “стани, при яких підвищення клітинного імунітету є небажаним”. Враховуючи можливу трансформацію реактивних артритів, викликаних дослідженими інфекційними збудниками, чи доцільним є призначення імудону, не дивлячись на його ефективність на ранніх термінах спостережень?

6. Одним з механізмів дії імодину пропонується його дія на переміщення іонів кальцію через мембрани, яким чином цей механізм дії спостерігався в проведеному дослідженні?

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Ломіковської Марти Павлівни на тему **«Імунопатогенез інфекційного реактивного артриту на тлі активованих облігатних інфекцій (*Chlamydia trachomatis* та Епштейна-Барр вірус), тактика ведення хворих»**, представлена до захисту в спеціалізовану вчену раду Д 64.051.33 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук є самостійною завершеною науково-дослідною працею та містить наукові положення та науково обґрунтовані результати.

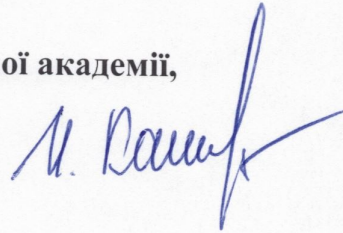
Дисертаційна робота Ломіковської М.П. за актуальністю, науковою новизною отриманих результатів, теоретичною та практичною цінністю відповідає вимогам п.11-13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого

постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року №567 (зі змінами) щодо кандидатських дисертацій, а її автор – Ломіковська Марта Павлівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08 – імунологія та алергологія.

Проректор з наукової роботи

Української медичної стоматологічної академії,

доктор медичних наук, професор



І.П. Кайдашев

