

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Зубченко Світлани Олександрівни «Алергічні хвороби та хронічна Епштейна-Барр вірусна інфекція: патогенез, діагностичні підходи і терапевтична тактика ведення хворих», поданої до спеціалізованої вченої ради Д 64.051.33 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.08 - імунологія та алергологія.

Актуальність обраної теми. Дисертаційна робота Зубченко Світлани Олександрівни «Алергічні хвороби та хронічна Епштейна-Барр вірусна інфекція: патогенез, діагностичні підходи і терапевтична тактика ведення хворих» присвячена актуальній проблемі - вивченню впливу вірусу Епштейна-Барр на імунні та імунозалежні механізми перебігу АХ, оптимізації діагностичної та терапевтичної тактики ведення хворих на АХ на тлі хронічної EBV-інфекції.

В останні десятиліття у всьому світі спостерігається прогресуючий ріст частоти алергічних хвороб (АХ), природа маніфестації яких є багатогранною. Найпоширенішими тригерними чинниками АХ є вірусні інфекції: респіраторно-синцитіальний вірус, риновіруси, аденовіруси, віруси грипу і парагрипу та інші. Проте щодо вірусу Епштейна-Барр (EBV) з родини *Herpesviridae* - питання є недостатньо вивченим. EBV - імунотропний вірус і має здатність до пожиттєвої персистенції в організмі людини. При порушенні клітинної та гуморальної ланок імунної відповіді EBV реактивується з різними патологічними наслідками для організму.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрі клінічної імунології та алергології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького відповідно до

НДР № 0118U0001110 «Прогнозування розвитку вірус-індукованих фенотипів імунозалежних хвороб з персоніфікацією їх діагностики та лікування».

2. Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, наукових висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Відповідно до поставлених завдань - розроблений дизайн дослідження, який складався з 5 послідовних етапів. Дослідження базувалось на результатах клінічного огляду, аналізу первинної документації та анамнестичних даних 858 пацієнтів (мешканців Львівської, Волинської, Тернопільської та Івано-Франківської областей) із попередньою стратифікацією за скаргами, характерними для АХ. Групу дослідження склали 365 осіб, з них 150 (41,1%) жінок і 215 (58,9%) чоловіків, віком $32,4 \pm 7,5$ років. Усім пацієнтам проведено клінічні (анамнез життя (анкетування), дані клінічного огляду), загально-лабораторні (загальний аналіз крові), цитологічні (цитологічне дослідження мазку-відбитку слизової оболонки порожнини носа), інструментальні (спірометрія, визначення NO в повітрі, що видихається), алергологічні (постановка шкірних прик-тестів), імунологічні (ІФА для визначення загального сироваткового IgE) дослідження на підставі яких верифіковано різні типи АХ. Поширеність хронічної EBV-інфекції визначено за даними серологічних - EBV (VCA IgG, VCA IgM і EBNA-IgG) і молекулярно-генетичних досліджень – ПЦР у трьох біологічних середовищах.

Пацієнтам проведено мультиплексне дослідження sIgE за ALEX-тестом з визначенням профілю сенсibilізації причинними алергенами. Проводився порівняльний аналіз результатів діагностики респіраторних алергенів in vivo (ШПТ) та мультиплексного визначення sIgE.

Вивчення впливу EBV на імунні та імунозалежні механізми перебігу АХ проводилось шляхом дослідження рівнів вірусних microRNA (miR-BART-13, miR-BART-15) та microRNA хворих (miR-155, miR-146a), цитокінів і кінцевих продуктів глікації у хворих з АР інтермітуючим (APi) та БА, які були поділені на підгрупи залежно від фаз хронічної EBV-інфекції та EBV-серонегативні

хворі на АРі та БА. На етапі вивчення рівнів кінцевих продуктів глікації у хворих на АХ, додатково була сформована група контролю з 20 практично здорових осіб. На останньому етапі 52 пацієнтів з АРі та БА на тлі активної фази EBV-інфекції проходили курс імуномодуючої терапії інозин пранобексом у дозі 50 мг/кг маси тіла на 3-4 прийоми. Оцінку ефективності противірусного курсу визначали за клінічними даними, результатами молекулярно-генетичних та імунологічних досліджень. АСІТ приймали впродовж 3-х років 82 хворих на АРі (n=44), БА (n=38) лише з латентною фазою хронічної EBV-інфекції та EBV-серонегативні хворі, які були поділені на групи залежно від способу введення алерговакцини: хворі на АРі (23 осіб) та БА (22 осіб), які отримували СЛІТ, хворі на АРі (21 осіб) та БА (16 осіб) - отримували СКІТ. Контрольну групу склали 28 відповідних пацієнтів з АРі (n=20) та БА (n=8) на тлі латентної фази EBV-інфекції, які отримували лише медикаментозну терапію (контроль). Ефективність АСІТ оцінювали за клінічними та імунологічними показниками.

Робота виконана на сучасному науково-методичному рівні, що надало змогу отримати достовірні результати та зробити комплексні висновки. Під час виконання роботи дисертантом були застосовані сучасні імунологічні, молекулярно-генетичні методи, мультиплексний колориметричний аналіз для визначення sIgE, а також сучасні методи статистичної обробки первинної інформації. Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації підтверджується наявністю чітко сформульованих задач дослідження, чималим обсягом проведених досліджень, що свідчить про доцільність їх подальшого застосування у медичній, науковій, практичній і навчально-освітній сфері.

3. Наукова новизна та достовірність положень, сформульованих у дисертації. Дисертаційна робота має наукову новизну, оскільки в роботі: отримані нові дані щодо впливу EBV, особливо в активній фазі вірусної персистенції, на імунні та імунозалежні механізми розвитку та перебігу АРі та БА, що вказувало на необхідність оптимізації ведення таких пацієнтів, в т.ч. –

корекції терапевтичної тактики. Вперше встановлена поширеність хронічної EBV-інфекції (89,6%), у тому числі - в активній (48,9%) фазі серед пацієнтів з різними нозологіями АХ з детальною клініко-імунологічною характеристикою цих хворих залежно від фази вірусної персистенції. Вперше з використанням мультиплексного визначення sIgE проведено детальний аналіз особливостей регіонального сенсibilізуючого профілю алергенів у пацієнтів з АХ західних областей України, виокремлені молекулярні ендотипи різних нозологій АХ; розроблені молекулярно-прогностичні моделі персоніфікованого ризику формування АР інтермітуючого, АР персистуючого та БА в пацієнтів з активною фазою хронічної EBV-інфекції. Вперше досліджена верифікативність методів алергодіагностики *in vivo* з використанням високостандартизованих екстрактів респіраторних алергенів та *iv vitro* мультиплексного визначення sIgE, доведена значущість ШПТ для скринінгових досліджень сенсibilізації до респіраторних алергенів (чутливість - 95,4% і специфічність 98,8%). На підставі результатів уперше проведених досліджень рівнів вірусних microRNA (miR-BART-13, miR-BART-15) та microRNA хворих (miR-155, miR-146a) доведена роль EBV, особливо в активній фазі вірусної персистенції, в імунозалежних механізмах перебігу АХ і показана діагностична значущість цих показників для виявлення ознак ремоделювання імунної відповіді при АРі та БА на тлі хронічної EBV-інфекції. Завдяки розширенню панелі цитокінів у хворих на АРі та БА на тлі хронічної EBV-інфекції встановлена ключова роль підвищених рівнів IL-1 β , IL-33, IL-17 і знижених рівнів IL-12, IL-10 в імунопатогенезі АРі та БА на тлі активної фази вірусної персистенції, що дозволяє розширити покази для імуномодуючої протівірусної терапії таких хворих. Визначено, що в сироватці крові хворих на АРі та БА незалежно від фази вірусної персистенції рівні AGEs були нижчі порівняно зі здоровими особами, що опосередковано вказувало на наявність «стресу AGE-RAGE» і тяжкість тканинних порушень при алергічному запальному процесі. Доведено, що імунокомпрометованим пацієнтам з АРі та БА на тлі активної фази EBV-інфекції перед проведенням АСІТ рекомендовано проводити курс протівірусної терапії для покращення

ефективності алерген-специфічної терапії. Вперше проаналізовано різні підходи до оцінки ефективності та безпечності СЛІТ і СКІТ і запропоновано найбільш оптимальні з використанням суб'єктивних критеріїв і визначенням імунологічних та алергологічних показників.

4. Повнота викладення сформованих у дисертації наукових положень, висновків і рекомендацій.

Результати дисертації повністю висвітлені в наукових фахових виданнях. За темою дисертаційного дослідження опубліковано 63 наукові праці, серед яких 20 статей в наукових фахових виданнях України, 12 - у провідних наукових виданнях інших держав (у т.ч. 8 статей у виданнях, що мають імпакт-фактор і входять до наукометричних баз даних Web of Science та Scopus, 3 одноосібні роботи), 5-х статтях, що додатково відображають зміст дисертації, 1 методичні рекомендації та 1 інформаційний лист, 24 тез доповідей на фахових вітчизняних і міжнародних наукових конференціях (з них 6 тез у наукових виданнях, що мають імпакт-фактор і входять до наукометричних баз даних Web of Science).

Дисертаційна робота Зубченко С.О. пройшла апробацію на достатньому рівні (основні положення дисертації докладалися та обговорювалися): основні положення дисертації та результати досліджень оприлюднені та обговорені на конференціях: EAACI Congress (Vienna, Austria, 2016); 4-th European Congress of Immunology (Vienna, Austria, 2016); 1-st EFIS-EJI Caucasian School in Allergy and Immunology (Zagreb, Croatia, 2016); EAACI Congress (Helsinki, Finland, 2017); 11-th Intern. Conference Allergy, Asthma and Clinical Immunology (Edinburgh, Scotland, 2017); 9-th EFIS-EJI South East European Immunology School (Lviv, Ukraine, 2017); 5 years INUNIMAI and 4th Training for Trainers of International Network of Universities for Molecular Allergology and Immunology (Vienna, Austria, 2018); XIV days of pollen allergy in Krakow (Krakow, Poland, 2018); EAACI Congress (Munich, Germany, 2018); FAAM (Copenhagen, Denmark, 2018); 4th GA2LEN Global Urticaria Forum (Berlin, Germany, 2018); EAACI SAM (Munich, Germany, 2019); 2nd Euro Global Summit on Allergy

(Prague, Czech Republic, 2019); EAACI Congress (Lisbou, Portugise, 2019); EAACI ISMA (November, Amsterdam, 2019); конференціях з міжнародною участю: «Актуальні питання респіраторної та алергічної патології у дітей: національний консенсус» (Київ, 2016); «Нові досягнення в імунології та алергології» (Київ, 2016); «Епідеміологія, імунопатогенез, діагностика та лікування хламідіозу і TORCH-інфекцій» (Київ, 2016); «Нові досягнення в імунології та алергології» (Київ, 2017); «Актуальні питання діагностики і лікування алергічних хвороб та автоімунних станів у дітей» (Київ, 2018); «Дискусійні питання в практиці дитячого алерголога» (Львів, 2018); «Львівські Різдвяні читання з імунології та алергології: практичні та наукові напрямки» (Львів, 2017); III національний конгрес з імунології, алергології та імунореабілітації (Дніпро, 2018); «Сучасні питання алергології» (Дніпро, 2019); «Аутоімунні, алергічні, імунодефіцитні хвороби: сучасні діагностика та лікування» (Львів, 2018); «Актуальні питання та практичні аспекти дитячої пульмонології та алергології: стандарти медичної допомоги» (Київ 2019); 3-й міжнародний симпозіум імунотехнологій у медицині SMART LION 2019 (Львів-Київ, 2019); «Актуальні питання виявлення і лікування алергічних захворювань» (Харків, 2019); «DniproAllergoSummit» (Дніпро, 2020); «Інновації в алергології та імунології» (Львів, 2020); «Актуальні питання виявлення і лікування алергічних захворювань» (Харків, 2020); Міжнародні різдвяні читання «Виклики сьогодення: COVID 19 та імунокомпрометовані пацієнти» (Львів, 2020).

5. Структура, зміст і завершеність дисертаційної роботи. Дисертаційна робота викладена на 334 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 23 таблицями та 75 рисунками, складається зі вступу, огляду літератури, характеристики хворих і методів дослідження, семи підрозділів власних досліджень, узагальнення результатів дослідження, загальних висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, який налічує 360

найменувань, у тому числі 281 зарубіжних, що займають 41 сторінку, та додатків.

Вступ містить актуальність теми, мету та завдання дослідження, наукову новизну та практичне значення роботи, які викладені чітко та логічно.

Огляд літератури «Алергічні хвороби: причини розвитку, імунні та імунозалежні механізми формування під впливом вірусних інфекцій. Сучасні діагностичні можливості та підходи до лікування хворих на алергічні хвороби» складається з п'яти підрозділів, в яких дисертантом було опрацьовано велику кількість літературних джерел, в т.ч. сучасних, які всесторонньо висвітлюють основні питання і невирішені проблеми за темою роботи, що вивчається. Огляд літератури закінчується логічним висновком.

У **другому розділі** роботи дисертант дає опис пацієнтів групи дослідження та методів дослідження у послідовності до поставлених завдань: клінічні (анкетування, дані об'єктивних методів дослідження), загально-лабораторні (загальний аналіз крові), цитологічні (цитологічне дослідження мазку-відбитку слизової оболонки порожнини носа), інструментальні (спірометрія, визначення NO в повітрі, що видихається), алергологічні (постановка шкірних прик-тестів), імунологічні (імуноферментний аналіз для визначення VCA IgG, VCA IgM і EBNA-IgG, загального сироваткового IgE; метод флуоресцентної спектроскопії для визначення AGEs; багатокомпонентний колориметричний аналіз для визначення sIgE), молекулярно-генетичні (полімеразна ланцюгова реакція для виявлення ДНК EBV, цитокінового профілю, miRNAs), соціологічні (опитувальники), статистичні (параметричні та непараметричні). Для кращого сприйняття інформації з 2 розділу, дисертант представляє рисунки та схеми.

Третій розділ «Результати власних досліджень» складається з семи підрозділів: підрозділ 3.1 «Вивчення поширеності хронічної EBV-інфекції серед хворих на АХ і їх клініко-діагностичні особливості залежно від фаз вірусної персистенції»; підрозділ 3.2 «Дослідження особливостей

сенсифікуючого профілю з використанням мультиплексного визначення специфічних IgE»; 3.3 «Вивчення верифікативності діагностичних методів АХ»; 3.4 «Дослідження впливу EBV на імунні та імунозалежні механізми розвитку та перебігу АХ залежно від фаз вірусної персистенції»; підрозділ 3.5 «Аналіз особливостей цитокінового профілю у хворих на АХ залежно від фаз вірусної персистенції»; підрозділ 3.6 «Оцінка особливостей синтезу AGEs і їх взаємозв'язку з цитокіновим профілем у пацієнтів з АРі та БА залежно від фаз вірусної персистенції»; підрозділ 3.7 «Аналіз ефективності та безпечності АСІТ з урахуванням імуномодуючої терапії у хворих з активною фазою EBV-інфекції». Розділ закінчується логічними висновками і переліком публікацій, де матеріали розділу висвітлені.

У наступному **четвертому** розділі «Аналіз та обговорення результатів» дисертант узагальнює результати проведеного дослідження у порівнянні з результатами інших досліджень, поданими в огляді літератури. Розділ закінчується розробленим автором алгоритмом ведення пацієнтів з АХ на тлі хронічної EBV-інфекції.

Висновки та практичні рекомендації логічно виходять із викладеного матеріалу та з достатньою повнотою його відображають. Усі положення дисертації та висновки обґрунтовані. Основні положення дисертації ідентичні змісту автореферату.

Практичне значення отриманих результатів

Основні результати роботи мають безпосереднє відношення до практичної діяльності сімейних лікарів, лікарів-алергологів, клінічних імунологів, пульмонологів, інфекціоністів, отоларингологів, дерматологів і спрямовані на підвищення ефективності діагностичних і лікувально-профілактичних заходів у пацієнтів з різними АХ, в т.ч. на тлі активної фази хронічної EBV-інфекції.

Для оптимізації діагностичних заходів і надання персоніфікованої медичної допомоги хворим на АХ запропоновано включати в план обстеження пацієнтів дослідження вмісту специфічних антитіл до VCA IgG, VCA IgM і EBNA IgG і

визначення ДНК EBV методом ПЛР одночасно в трьох біологічних середовищах.

У рутинній клінічній практиці для діагностики АХ рекомендовано проведення проб *in vivo* за допомогою високостандартизованих екстрактів для проведення ШПТ, що є якісним, швидким і, в першу чергу – соціально-спроможним для пацієнтів з проявами алергічних порушень.

Для вдосконалення діагностики АХ аргументовано проведення мультиплексного визначення sIgE, що дозволяє оцінити сенсibilізацію до компонентів алергенів (мажорних і мінорних), виявити латентні алергени і маркерні алергени перехресної реактивності, особливо у полісенсibilізованих осіб. Використання даного методу дозволить персоніфікувати елімінаційні та профілактичні рекомендації, покращить підходи до вибору необхідної алерговакцини з прогнозом ефективності АСІТ.

На підставі визначення регіонального сенсibilізуючого профілю алергенів для виявлення персоніфікованого ризику формування АРп, АРі та БА на тлі активної фази хронічної EBV-інфекції запропоновано використання молекулярно-прогностичних моделей.

Хворим на АХ рекомендовано дослідження рівнів вірусних miR-BART-13 і miR-BART-15 як ранніх маркерів активної фази хронічної EBV-інфекції. У пацієнтів з БА на тлі активної фази EBV-інфекції з метою прогнозування тяжкості перебігу хвороби, вчасної корекції лікування показано дослідження динаміки рівнів miR-BART-13.

У хворих на АРі та БА на тлі активної фази хронічної EBV-інфекції для виявлення ознак порушення імунних та імунозалежних механізмів рекомендовано проводити визначення рівнів miR-155, miR-146a, IL-1 β , IL-17, IL-33, IL-10, IL-12 та AGEs, динаміка змін яких дозволяє розширити показання для проведення противірусної терапії перед проведенням АСІТ.

У пацієнтів з АРі та БА на тлі активної фази EBV-інфекції перед призначенням АСІТ рекомендовано проведення курсу імуномодулюючої

протівірусної терапії інозин пранобексом у дозі 50 мг/кг маси тіла для нормалізації клінічних та імунологічних показників.

На основі аналізу міжнародних рекомендацій і апробованих результатів власних досліджень розроблено комплексну систему оцінювання ефективності АСІТ (незалежно від способу введення алерговакцини), в яку входять суб'єктивні дані пацієнта: показники ВАШ чи комбіновані критерії (оцінка симптомів і медикаментозних потреб), критерії якості життя та sIgE до мажорних компонентів алергенів.

Результати роботи впроваджено в діяльність лікувальних закладів і науково-педагогічний процес навчальних закладів.

Із зауважень до роботи слід відзначити такі: у деяких розділах дисертації доцільно було б скорегувати стиль викладання матеріалу, а деякі із великих таблиць (наприклад, табл. 3.5) продублювати діаграмами або малюнками (графіками), а таблиці, що займають обсяг сторінки (табл. 3.35-3.36) – доцільно було б винести у додатки.

Разом з тим, висловлені зауваження не можуть суттєво вплинути на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи Зубченко С.О.

При ознайомленні з дисертацією виникли деякі питання:

1. Яка діагностична роль ПЛР-аналізу в ідентифікації EBV-інфекції?
2. Чому для вашого дослідження ви обрали miR-155 та miR-146a? Чи відомо вам інші miRs, які досліджують при АР та БА?
3. Чим Ви поясните різницю в результатах молекулярного профілю сенсibiliзації пацієнтів з АХ - мешканців міста і сільської місцевості?

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Зубченко Світлани Олександрівни «Алергічні хвороби та хронічна Епштейна-Барр вірусна інфекція: патогенез, діагностичні підходи і терапевтична тактика ведення хворих», що 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 доктора медичних наук, є завершеною працею, в якій отримані нові науково обґрунтовані результати, які в сукупності є суттєвими для розвитку імунології та алергології і вирішують наукову задачу - вивчення впливу вірусу Епштейна-Барр на імунні та імунозалежні механізми перебігу АХ, оптимізацію діагностичної та терапевтичної тактики ведення хворих на АХ на тлі хронічної EBV-інфекції. За своєю актуальністю, науковою та практичною значущістю, одержаними результатами та об'ємом досліджень, кількістю наукових публікацій та рівнем впровадження, дисертаційна робота Зубченко Світлани Олександрівни відповідає вимогам п. 9, 10, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року № 567 (зі змінами) щодо докторських дисертацій, а її автор – Зубченко Світлана Олександрівна заслуговує присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.08 - імунологія та алергологія.

Офіційний опонент

д.мед.н., професор, член-кореспондент
Національної академії медичних наук України,
керівник відділу нейроімунології Інституту нейрохірургії
імені академіка А. П. Ромоданова
Національної академії наук України

М.І. Лісяний

Підпис д.м.н., професора, член-кореспондента НАМН України М.І. Лісяний завіряю.

*В.о. директора
ДУ "Інститут нейрохірургії
ім. акад. А.П. Ромоданова
НАМН України",
тимчасовий лікар,
д.м.н., проф.*

