

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора
Бондаренко Аллы Львовны
на диссертационную работу Шакировой Венеры Гусмановны
на тему «Клинико-эпидемиологические и молекулярно-генетические
особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом»,
представленную на соискание ученой степени доктора наук по
специальности 3.1.22. Инфекционные болезни. Медицинские науки.

Актуальность темы диссертации

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, как одна из форм хантавирусной инфекции, представляет серьезную проблему для здравоохранения многих стран мира, в том числе Российской Федерации. Это обусловлено широким распространением природных очагов инфекции, тяжестью течения с развитием осложнений. Летальность от ГЛПС на территории РФ в зависимости от серотипа возбудителя составляет от 0,5% до 8,5%. Следует отметить, что в России ГЛПС по уровню заболеваемости занимает первое место среди всех природно-очаговых инфекций. Заболевание характеризуется циклическим течением с интоксикацией, лихорадкой, поражением почек и геморрагическими проявлениями. В последние годы часто выявляется атипичное течение инфекции с поражением бронхолегочной и сердечно-сосудистой систем. Широкое распространение, высокие показатели заболеваемости людей, значительная частота тяжелых форм болезни, сопровождающихся длительным периодом снижения трудоспособности, отсутствие специфических средств лечения и профилактики обуславливают высокую социальную и медицинскую значимость проблемы ГЛПС в России. На основании вышеизложенного актуальность диссертационной работы В.Г. Шакировой не вызывает сомнений.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, доказываются адекватным объемом и использованием современных методов исследования. Так, в соответствии с задачами, обследовано 417 пациентов с ГЛПС, поступивших в РКИБ в 2015 - 2019 годы, 56 практически здоровых человека (контрольная группа). Кроме того, проведено обследование тканей 303 грызунов на выявление хантавирусов методом ПЦР. Обращает внимание большой спектр лабораторных исследований: ИФА на антитела к хантавирусам IgM и IgG, ПЦР детекция РНК хантавируса, секвенирование РНК PUUV, проточная флуориметрия с определением сывороточных цитокинов, ферментативный метод с определением сывороточного холестерина, триглицеридов, ЛПВП, мультиплексный анализ образцов мочи с использованием панели нефротоксичности.

Важно отметить, что Венера Гусмановна Шакирова прекрасно ориентируется как в современных, так и в самых ранних работах, посвященных изучаемой проблеме, о чем говорит внушительный список источников, большая часть которых - на английском языке.

Данные полученные в ходе исследований подвергнуты тщательной математической обработке с использованием пакета прикладных программ «Statistica-version 10.0», что позволяет говорить о высоком методическом уровне работы и достоверности представленных в диссертации материалов.

Научная новизна исследований, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором впервые изучено генетическое разнообразие популяций вируса Пуумала, циркулирующих среди людей и грызунов на территории Республики Татарстан с помощью применения молекулярно-генетических методов (на основе ПЦР-анализа и секвенирования фрагментов генома). Это

позволило установить циркуляцию на территории Республики Татарстан только PUUV, причем двух генетических линий – «Россия» и «Финляндия», а также то, что единственным переносчиком вируса является рыжая полевка (*Myodes glareolus*).

Показаны возможности использования ПЦР-анализа для оптимизации решения задач, связанных с верификацией клинического диагноза ГЛПС, выявлением основных источников инфекции. Дана клинико-лабораторная характеристика ГЛПС в зависимости от серотипов вируса Пуумала.

На основании определения цитокинового, липидного профиля и серотипов PUUV определены факторы формирования тяжести течения заболевания у больных ГЛПС.

Выявлены патологические изменения в почечной ткани на основании исследования 12 биомаркеров в моче больных ГЛПС, указывающие на разные уровни повреждения нефрона.

Сформулированные выводы имеют большое значение для понимания патогенетических механизмов геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Полученные автором данные являются приоритетными и представляют несомненно научную новизну.

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации

Результаты проведенного исследования имеют очевидное научное и практическое значение. Основные положения и выводы диссертационной работы с учетом комплексного клинико-лабораторного и инструментального обследования на достаточном числе пациентов вносят значительный вклад в понимание формирования тяжести геморрагической лихорадки с почечным синдромом в начальный период заболевания и как следствие, необходимость раннего прогноза заболевания.

Предложена научная идея генотипирования и филогенетического анализа хантавирусов, циркулирующих на территории Республики

Татарстан, которая позволяет построить прогноз тяжести течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом и разработать персонализированный подход к выбору тактики ведения пациентов.

Получены данные о циркуляции нескольких штаммов PUUV среди грызунов и людей на территории Республики Татарстан. Сиквенсы штаммов PUUV, выделенные от больных ГЛПС, могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров для определения территории заражения и применены в практике работы Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) с целью оптимизации прогнозирования и профилактики заболеваемости ГЛПС.

Выявленная генетическая неоднородность PUUV вирусов определяет различные клинические варианты течения ГЛПС.

Установлено, что тяжелое течение ГЛПС сопровождается повышением активности хемокинов CCL3, CCL4, CCL5 в сочетании с активацией Th17 иммунного ответа с увеличением IL-17, активацией Th2 с увеличением уровней IL-4, IL-5 и IL-13 и выраженной эндотелиальной дисфункцией с повышением ростовых факторов FGF-b, VEGF, PDGF-bb, GM-CSF. Наиболее значимыми маркерами формирования тяжелого течения ГЛПС в начальном периоде заболевания могут служить хемокины CCL5 и CCL4.

Выявлены особенности липидного профиля у больных ГЛПС в динамике инфекционного процесса. Показано, что ГЛПС сопровождается повышением уровня холестерина, триглицеридов и снижением ЛПВП. Повышение уровня триглицеридов и снижение ЛПВП в начале заболевания могут служить прогностическими маркерами тяжелого течения ГЛПС.

Дана характеристика биомаркеров токсического поражения почек, указывающих на повреждение различных отделов нефрона у больных ГЛПС. Повышение активности уренальных маркеров: кластерина, КИМ-1, NGAL, IL-18, цистатина С свидетельствуют о поражении проксимальных, а GST-π - дистальных отделов канальцев нефрона. Определение кластерина, КИМ-1 в

моче может служить маркером острого почечного повреждения у больных ГЛПС.

На основании полученных результатов разработаны практические рекомендации по совершенствованию клинико-эпидемиологической и иммунологической диагностики ГЛПС, рекомендован индивидуализированный подход в тактике ведения больного с учетом оценки иммуновоспалительных нарушений.

Следовательно, проведенное автором исследование, несомненно, имеет как теоретическую так и практическую значимость и может быть также рекомендовано для использования в практике не только врачей инфекционистов, но и терапевтов, нефрологов и врачей общей практики.

Работа заслуживает положительной оценки. Содержательные таблицы, достаточное количество рисунков отражают результаты проведенного автором исследования. По теме диссертации опубликовано 53 печатные работы, в том числе 23 печатные работы в ведущих рецензируемых научных журналах, из них включенных в перечень ВАК при Минобрнауки России - 7 и 16 – в иностранных журналах из перечней Scopus и Web of Science, а также 3 учебно-методических пособия и 1 патент на изобретение.

Общая оценка структуры и содержания диссертации

Диссертация оформлена по традиционному плану, изложена на 228 страницах компьютерного текста, состоит из введения, литературного обзора, 4 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы, включающего 129 отечественных и 323 зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 28 таблицами и 27 рисунками.

В разделе «Введение» обоснована актуальность диссертационной работы, отражена степень разработанности темы, сформулированы цель, задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость

результатов исследования, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности, внедрения и апробация результатов исследования.

В главе 1 (обзор литературы) автор использовал большой литературный материал, позволяющий в полной мере оценить современные представления об эпидемиологии, клинике, иммунопатогенезе и подходы к диагностике почечного повреждения.

В главе 2 описаны материалы и методы научного исследования. Работа выполнена в дизайне открытого контролируемого типа клинического исследования с учетом применения современной статистической обработки результатов. Дизайн исследования адекватен поставленной цели и задачам, соответствует принципам доказательной медицины. Методы статистического анализа соответствуют стандартам, принятым для медико-биологических исследований. Количество больных достаточно для качественного статистического анализа и обоснования выводов.

Глава третья посвящена клинико-эпидемиологической характеристике ГЛПС в республике Татарстан. Проведен подробный эпидемиологический анализ заболеваемости в РТ за период с 2005 по 2019 годы. Исследована циркуляция хантавирусов в популяции грызунов и у больных ГЛПС на территории РТ методом ПЦР с последующим секвенированием участка S сегмента и филогенетическим анализом сиквенсов PUUV, на основании которого построено филогенетическое дерево. Автором показано, что на территории РТ циркулирует только PUUV двух генетических линий PUUV – «Россия» и «Финляндия», единственным природным резервуаром является рыжая полёвка (*Myodes glareolus*), Описана клиническая картина 417 пациентов с ГЛПС, проходивших стационарное лечение в ГАУ РКИБ им. А.Ф. Агафонова с 2015 по 2019 годы. Проведен сравнительный анализ клинической картины и лабораторных данных больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, вызванных штаммами PUUV линиями «Финляндия» и «Россия». Автором показано, что штаммы PUUV линии «Россия» вызывают заболевание, которое чаще сопровождается болью в

поясничной области, нарушением зрения, значительным повышением уровня креатинина, АСТ, снижением тромбоцитов, в отличие от штаммов PUUV линии «Финляндия», которые вызывают более легкую форму ГЛПС. Приведен клинический случай больного ГЛПС с летальным исходом с подробным описанием клинической картины и большим набором лабораторных исследований, проведенных прижизненно и посмертно.

Глава четвертая посвящена патогенетическим аспектам геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Дана характеристика цитокинового статуса у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в зависимости от тяжести, периода заболевания и пола больного. Автором показано, что тяжелое течение ГЛПС сопровождается высокой активацией хемокинов CCL3 CCL4 CCL5, активацией Th17 иммунного ответа с повышением IL-17, активацией Th2 иммунного ответа с повышением IL-4, IL-5 и IL-13, тогда как легкое течение ГЛПС характеризуется повышенной активацией цитокинов TRAIL, CCL7, IL-16, IL-3, IL-12p40, IFN α 2. У мужчин ГЛПС протекает с более выраженной активацией IL-17, хемокинов CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, а также IL-8, а у женщин заболевание сопровождается более выраженной активацией CCL-7, IL-12p40.

Исследование изменений в липидном профиле у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом показало, что профиль липидов плазмы отличается в зависимости от стадии и тяжести ГЛПС и что уровни триглицеридов и ЛПВП могут быть использованы в качестве потенциальных предикторов тяжелого течения заболевания. Тяжелое течение хантавирусной инфекции характеризовалось значительным повышением уровня триглицеридов, холестерина, ЛПНП, снижением уровня ЛПВП уже в начале заболевания по сравнению с контрольной группой. Причем, повышение уровня холестерина, ЛПНП и снижение уровня ЛПВП у больных тяжелой формой ГЛПС было значительно больше по сравнению с больными среднетяжелой и легкой формой болезни.

Анализ маркеров почечного повреждения у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом выявил повреждение эпителия проксимальных канальцев нефрона в начальном периоде заболевания, в то время как повреждение эпителия проксимальных и дистальный канальцев происходит на поздних стадиях. Маркёрами повреждения почек может быть выявление КИМ-1 и кластерина в моче.

В главе "Обсуждение" приведено обобщение полученных результатов выполненного исследования в сопоставлении с данными литературных источников.

Выводы диссертационной работы вытекают из результатов исследования и полностью соответствуют поставленным задачам.

Автореферат изложен на 48 страницах, соответствует основным положениям диссертации, написан четко, ясно, включает основные результаты работы и выводы.

Апробация работы и внедрение результатов

Материалы диссертации представлены в виде научных докладов на VII Международной научно-практической конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (г. Казань, 2017), VII Ежегодной Республиканской научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии» (г. Казань, 2017), Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в 21 веке» (г. Казань, 2018), Республиканской научно-практической конференции «Методы традиционной медицины в решении актуальных вопросов практического здравоохранения» (г. Казань, 2018), Первом Всероссийском конгрессе с международным участием им. С.П. Зимницкого (г. Казань, 2018), Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии» (г. Благовещенск, 2018), Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в 21 веке» (г. Казань, 2019), Российской научно-практической конференции

«Здоровье человека в 21 веке» (г. Казань, 2020), X Ежегодной Республиканской научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии» (г. Казань 2020), Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в 21 веке» (г. Казань, 2021).

Внедрение результатов диссертационного исследования

Результаты работы используются в практической деятельности ГАУЗ «Республиканская клиническая инфекционная больница им. проф. А.Ф. Агафонова» Министерства здравоохранения Республики Татарстан (акт внедрения от 18.05.2021 года).

Новые научные данные, касающиеся этиологии, патогенеза, клиники и диагностики ГЛПС, включены в программу ординатуры по специальности «Инфекционные болезни» и в учебные планы циклов дополнительного профессионального образования и профессиональной переподготовки, проводимых кафедрой инфекционных болезней КГМА – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (акт внедрения от 11.05.2021 года).

Изучение рецензируемой работы убеждает в профессиональной подготовке автора, умении анализировать и систематизировать литературные данные, обобщать и оценивать собственные результаты. Тем не менее, есть ряд замечаний и вопросов.

1. В главе 2.1 автором приведена только клиническая характеристика больных. Не указаны группы пациентов, у которых проведены иммунологические исследования, анализ эпитопов хантавирусных антител, иммуногистохимия и иммунофлуоресцентный анализ посмертных образцов тканей. Не представлены сроки специфического исследования сыворотки крови больных ГЛПС методом ИФА и ПЦР, а также определения сывороточных цитокинов, липидного профиля, маркёров почечного повреждения.

2. В главах, посвященных результатам собственных исследований, в заключении автор указывает, что «нами были проведены исследования по идентификации штаммов PUUV в популяциях рыжей полёвки». Однако во второй главе автор не указывает в материалах и методах информацию об обследовании грызунов.

3. В клиническом примере проведен анализ CD3+ CD4+ (CD4 Т-клетки), CD3+ CD8+ (CD8 Т-клетки), CD14+ (моноциты) и CD20+ (В-клетки) в крови пациента, умершего от ГЛПС. Вместе с тем, ни в задачах исследования, ни в материалах и методах не сказано об изучении субпопуляций лимфоцитов у обследованных больных. Возникает также вопрос о корректности сравнения субпопуляций лимфоцитов и титра специфических антител у одного больного с летальным исходом с 24 пациентами без указанного исхода в таблице 3.9. Необходимо отметить, что в работе приведён один клинический пример. В своём исследовании автор изучил цитокиновый и липидный профиль, а также маркеры почечного воспаления у больных ГЛПС. Несомненный интерес представляли бы клинические примеры, в которых отражены данные показатели.

4. Автор не изучал уровни цитокинов у больных ГЛПС мужчин и женщин в зависимости от степени тяжести болезни, вместе с тем, делает заключение о выраженной активации тех или иных цитокинов у мужчин и женщин, приводящих к более тяжелому или легкому течению заболевания. Возникает вопрос, насколько обоснованы и корректны данные выводы, приведённые автором в конце главы 4.2?

5. Автором проведено углубленное изучение патогенеза ГЛПС. Получены статистически значимые различия. Однако отсутствует многофакторный анализ клинико-патогенетических показателей, позволяющий установить наиболее выраженные иммунопатологические, биохимические, морфологические изменения, взаимосвязанные с различными клиническими проявлениями и особенностями течения ГЛПС, исходами заболевания.

6. В главах 3 и 4 автор достаточно подробно проводит обсуждение полученных результатов с литературными данными, которые следует привести в главе «Обсуждение».

7. В практических рекомендациях №№ 3, 4, 5 целесообразно было указать критериальные значения тех или иных показателей, которые помогут врачу выявлять прогностические лабораторные критерии тяжелого течения ГЛПС на ранних сроках заболевания.

Данные вопросы и замечания не снижают значимости работы и могут быть основой для проведения дальнейших исследований в этом направлении.

Заключение

Диссертация Шакировой Венеры Гусмановны «Клинико-эпидемиологические и молекулярно-генетические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом», выполненная при научном консультировании доктора медицинских наук, профессора И.М. Хаертыновой и доктора медицинских наук С.Ф. Хайбуллиной, по своей актуальности, научно-методическому уровню, новизне и значимости полученных результатов является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной проблемы инфектологии по изучению эпидемиологических и клинико-патогенетических аспектов геморрагической лихорадки с почечным синдромом с решением вопросов раннего прогнозирования степени тяжести, что имеет большое значение для практического здравоохранения, особенно эндемичных регионов России.

Работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г., 21.04.2016 г., 02.08.2016 г., 29.05.2017 г., 28.08.2017 г., 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, а её автор заслуживает присуждения искомой

учёной степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.22.
Инфекционные болезни. Медицинские науки.

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой инфекционных болезней
ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук,
профессор

Алла Львовна Бондаренко

« 7 » сентября 2022г

Бондаренко Алла Львовна доктор медицинских наук, (14.01.09), профессор.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Кировский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Адрес: 610998, Россия, Кировская область, г. Киров, ул. Карла Маркса, д.
112.

Телефон: 8(8332) 64-09-76, 8(8332) 64-07-34; факс: 8(8332) 64-07-34;
электронная почта: med@kirovgma.ru; официальный сайт:
<https://www.kirovgma.ru>
электронный адрес оппонента: al.bond@mail.ru

Подпись профессора А.Л. Бондаренко заверяю

« 7 » сентября 2022г.



Исполнитель: М.И. Мещеряков
(Мещеряков Е.И.)