

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Звонковой Светланы Геннадьевны на тему: «Особенности туберкулезной инфекции у детей с различными генетическими показателями», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.16 – фтизиатрия

Актуальность исследования сомнений не вызывает. В условиях повсеместного снижения заболеваемости туберкулезом всех возрастных групп населения, отмечающегося в последние годы, проблема туберкулеза не утратила своего значения, а показала свою многогранность, приобретая новые черты. К наиболее приоритетным направлениям фтизиатрии сегодня относят мероприятия, направленные на борьбу с множественно-лекарственно устойчивым туберкулезом и ко-инфекцией, туберкулез и ВИЧ.

Туберкулез – инфекционное заболевание, и наиболее приоритетным направлением по сдерживанию его дальнейшего распространения является выявление новых случаев заболевания с их полноценным излечением, что позволит избежать дальнейшего распространения инфекции. У детей наиболее остро стоит проблема профилактики туберкулеза, заключающейся в предотвращении инфицирования МБТ и перехода инфицирования в заболевание. Отечественных исследователей по проблеме детского туберкулеза всегда привлекал поиск факторов риска инфицирования и заболевания туберкулезом. Возможности современных исследований обуславливают необходимость поиска и генетических маркёров восприимчивости к туберкулёзной инфекции и неблагоприятного течения заболевания, что и нашло отражение в данной работе.

Диссертационная работа построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы по направлению исследования, описания материала и методов исследования, 2 глав собственных наблюдений, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Всего 160 страниц машинописного текста. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 51 таблицы и 18 рисунков. Указатель

литературы представлен 229 источниками, из которых 47 принадлежат зарубежным авторам.

Обзор литературы показывает, что автор хорошо ориентирован в проблеме, имеет собственное мнение по ряду позиций и обосновывает актуальность данного исследования. В первой части литературного обзора автор характеризует особенности эпидемиологической ситуации по туберкулезу в мире, в Российской Федерации, в Сибирском Федеральном округе и Иркутской области. Большое внимание уделяется повсеместной значимости проблемы туберкулеза с выделением ее приоритетов в области МЛУ и ВИЧ-ассоциированного туберкулеза, при этом автору сложно признать наметившееся в последние годы снижение заболеваемости и смертности от туберкулеза, ситуация в стране характеризуется просто как стабильная. Подчеркивая проблемы округа и региона, диссертант указывает на рост заболеваемости туберкулезом детей за период с 1990 года по 2014 год, не выделяя при этом пики максимальной заболеваемости, которые позволили бы заметить и тенденцию к снижению заболеваемости.

Во второй части литературного обзора диссертант анализирует факторы риска развития туберкулеза у детей, однако работа посвящена и повышенной восприимчивости к туберкулезной инфекции, что делает целесообразным в названии данного раздела указать на факторы риска развития инфицирования МБТ детского населения. В самом начале раздела дается деление всех факторов риска на эпидемиологические, эндогенные и экзогенные, без ссылок на литературные источники, но если данное деление предложено диссертантом лично, его следовало приводить в результатах собственных исследований.

Третья часть литературного обзора иллюстрирует накопленный материал по проблеме поиска генетических маркеров предрасположенности к туберкулезу. Данных исследований недостаточно, достаточно хорошо изучены полиморфизмы антигенов системы гистосовместимости первого и второго классов, интерлейкина 12, 10, интерферона- γ (T +874A и G +2109A), фактора некроза опухолей α (-308G > A TNFA), интерлейкина-1 β (-511C > T, 3953C > T IL1B) и его рецепторного антагониста (VNTR IL1RA), а также

генов детоксикации ксенобиотиков, цитохромов P450 (Ile462Val CYP1A1, Ins96 CYP2E1) и глутатион-S-трансферазы M1 (делеция GSTM1). В этой части литературного обзора обосновывается необходимость дальнейшего изучения полиморфизмов исследованных диссертантом генов.

Проблема детского туберкулеза с выделением факторов, включая генетические, оказывающих влияние на его возникновение и течение, отраженная в обзоре литературы, доказывает и актуальность, и практическую значимость проведенного диссертантом исследования.

Цель исследования, сформулированная автором, корректна и заключается в оценке влияния генетических факторов, соматотипа и генов CD209 –336A/G DC-SIGN (CD209 рецептор), CCL2 –2518A/G (MCP-1 - моноцитарного хемоаттрактивного белка 1 типа) и INF γ +874A/T (интерферона- γ), на восприимчивость к туберкулёзу и течение туберкулёзного процесса у детей, для совершенствования профилактики и лечения данного заболевания.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, основывается на адекватной постановке задач исследования, которые позволили раскрыть все необходимые аспекты цели исследования. Задачи логично вытекают из цели исследования и последовательно дополняют одна другую. В начале автор анализирует течение туберкулёза и эффективность его лечения у детей, затем определяет и сравнивает соматотипы здоровых, инфицированных, не инфицированных МБТ, и больных туберкулёзом детей и оценивает влияние соматотипов на восприимчивость и течение туберкулёзной инфекции у детей, далее путем изучения полиморфизма генов CD209 –336 A/G DC-SIGN (CD 209 рецептор), CCL2 –2518A/G (MCP-1 моноцитарного хемоаттрактивного белка 1 типа), INF γ +874A/T (интерферона- γ) у детей, включенных в исследование, делает попытку выделить генетические маркеры восприимчивости к туберкулёзу и течение заболевания у детей.

Методология выполнения работы соответствует современным требованиям, решение каждой задачи основано на анализе достаточно

объемной выборки и адекватных методах исследования, которые позволяют сделать соответствующие выводы.

Во 2-й главе представлены схемы решения всех задач исследования, изложены методики проведения клинических, иммунологических, генетических, лабораторных исследований. Для решения каждой задачи исследования автором представлен определенный дизайн исследования, в каких-то случаях разбитый на этапы. Материалы и методы исследования также группируются по задачам исследования, восприятие дизайна облегчается размещением данных не только в тексте, но и в сводных таблицах и блок-схемах.

Автором использованы разнообразные методы статистической обработки, с использованием параметрических и непараметрических методов. Распределение соматотипов между группами сравнивали с использованием критерия χ^2 и t-критерия Стьюдента. Равновесие генотипов по Харди-Вайнбергу между сравниваемыми группами вычисляли с использованием Hardy-Weinberg Equilibrium Calculator (ХВ калькулятор). Статистический анализ ассоциации полиморфизма генов выполнен с использованием метода χ^2 в программе BIOSTAT. Анализ изменения в динамике гематологических показателей (общего числа лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, СОЭ) выполнен с использованием непараметрического критерия Вилкоксона в программе Statistica 6.0.

Значительный научный и практический интерес представляют результаты собственных наблюдений автора. В 3 главе диссертации отражены клиническая характеристика, динамика течения и исходы туберкулеза у включенных в исследование детей. Клиническая структура туберкулеза у детей Иркутской области в условиях напряженной эпидемиологической ситуации характеризовалась значительным удельным весом осложненных (35,0%) и генерализованных (5%) форм. У 75,0% больных отмечалась замедленная динамика туберкулезного процесса на фоне противотуберкулезной терапии. Исходами основного курса химиотерапии часто являлось формирование необратимых изменений в лёгких в виде

единичных, мелких (39,0%) или множественных, крупных кальцинатов (20,0%).

Четвертая глава диссертационного исследования раскрывает связь отдельных вариантов течения и исходов туберкулеза у детей с выявленными генетическими полиморфизмами трех генов кандидатов (–336A/G промотора гена DC-SIGN, +874A/T гена $INF\gamma$, –2518A/G промотора гена MCP-1) и конституциональными типами.

Автором установлено, что среди больных туберкулёзом детей, получивших в интенсивной фазе лечения 60 доз химиотерапии, выявлено достоверное преобладание аллеля –336A DC-SIGN гена за счёт числа AA гомозигот в сравнении с детьми, получившими в интенсивной фазе 120 доз. Предложено для определения оптимальных сроков интенсивной фазы лечения основного курса химиотерапии, наряду с ранее используемыми клинико-рентгенологическими показателями, учитывать полиморфизм CD209 –336 A/G (DC-SIGN) гена.

В диссертационном исследовании показано, что здоровые, инфицированные и больные туберкулёзом дети не различались по генетическому полиморфизму генов: CD209 –336 A/G DC-SIGN (CD 209 рецептор), CCL2 –2518A/G (MCP-1 моноцитарного хемоаттрактивного белка 1 типа), $INF\gamma$ +874A/T (интерферона- γ).

Выявлено достоверное преобладание аллеля –2518A гена MCP-1 у больных детей с хроническим течением туберкулёза за счёт числа детей с гомозиготным вариантом AA –2518A/G промотора гена MCP-1 ($p < 0,05$), предложено наличие AA генотипа CCL2 –2518A/G (MCP1) гена у детей рассматривать как фактор риска хронизации туберкулёзного процесса, что требует обязательного стационарного лечения противотуберкулезными препаратами, учёта сведений о спектре лекарственной чувствительности у больного в очаге, если ребёнок из контакта, а при отсутствии положительной динамики через 2 месяца возможна коррекция лечения.

Выявлено, что астеноидный и астеноидно-торакальный соматотипы определяют предрасположенность к туберкулёзу.

Установлено, что у детей с абсолютным количеством лимфоцитов выше среднего к концу лечения достоверно преобладала аллель –336A DC-SIGN гена за счёт гомозиготных (AA) носителей, что ещё раз указывает на его благоприятное влияние на течение заболевания. Аллель +874A гена INF γ преобладала у детей с содержанием лимфоцитов выше среднего в начале лечения. Аллель +874A гена INF γ чаще выявлялась у детей с содержанием моноцитов выше среднего через 4 месяца от начала лечения. Выше перечисленные ассоциации объяснимы с точки зрения функциональной значимости генов при туберкулёзной инфекции и их влияния на иммунный ответ.

Заключение в полной мере отражает суть работы, содержит обсуждение полученных результатов исследования. Выводы и положения, выносимые на защиту, логичны, последовательны, отражают цель и задачи диссертации. Использование современных методов статистической обработки анализа данных, иллюстративность работы дают основание считать результаты исследования и выводы, полученные на основании этих результатов, достоверными.

Научная новизна результатов исследования, представленных в диссертации, очевидна. Впервые установлена зависимость клинического течения туберкулёза от определенных аллелей изучаемых генов: положительная клинико-рентгенологическая динамика на ранних сроках лечения ассоциируется с наличием аллеля –336A CD209 (DC-SIGN) гена; склонность к хроническому течению туберкулёза – с наличием аллеля – 2518A CCL2 (MCP-1) гена. Впервые определена связь полиморфизма генов CD209 (DC-SIGN) и гена INF γ с характеристикой показателей периферической крови в процессе лечения туберкулеза.

Практическая значимость работы заключается в выявлении влияния полиморфизма вышеперечисленных генов на характер клинического течения туберкулёза, что даёт возможность индивидуального подхода к лечению туберкулёза у детей и прогнозированию течения заболевания. Учет полиморфизма CD209 –336 A/G (DC-SIGN) гена позволит определить оптимальную продолжительность интенсивной фазы химиотерапии у детей.

Выделение АА генотипа CCL2 -2518A/G (MCP1) гена у детей может рассматриваться как фактор риска хронизации туберкулёзного процесса, выявление подобного генотипа требует применения комплекса мер, направленных на предупреждение хронического течения туберкулеза у ребенка, а именно, обязательного стационарного лечения, своевременного выявления риска МЛУ возбудителя и использования соответствующих режимов химиотерапии.

Практическое значение имеет возможность формирования групп риска предрасположенности к развитию туберкулеза на основе конституциональных типов. На основе результатов проведенного исследования в группу риска по туберкулёзу следует включать инфицированных МБТ детей астеноидного и астеноидно-торакального типов конституции, проведение им индивидуальных профилактических мероприятий позволит предотвратить у них переход инфицирования в локальный туберкулёз.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедрах туберкулеза Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования и Иркутского государственного медицинского университета. Рекомендации по формированию групп риска среди детей в зависимости от типа конституции внедрены в работу детского диспансерного отделения Иркутской областной клинической туберкулёзной больницы и Областной детской туберкулезной больницы. Опубликованы методические рекомендации «Некоторые генетические механизмы предрасположенности к туберкулёзу».

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Результаты исследования должны найти дальнейшее широкое применение в работе детских противотуберкулезных стационаров, так как позволяют повысить эффективность лечения туберкулеза у несовершеннолетних пациентов. Полученные в ходе исследования данные о генетических маркерах, связанных с вариантами течения туберкулеза у детей, носят, в том числе, фундаментальный характер и могут быть положены в основу дальнейших научных исследований по

проблеме детского туберкулеза и широко использоваться в преподавании фтизиатрии на профильных кафедрах в темах клинические формы туберкулеза у детей, лечение, профилактика туберкулеза.

Личный вклад автора заключается в планировании, организации и проведении исследования, формировании цели и задач, определении объема и методов исследований, создании электронных баз данных, проведении статистической обработки.

Результаты исследования представлены в виде 11 печатных работ, в том числе 2 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикаций основных положений диссертаций на соискание учёных степеней. Материалы диссертации достаточно широко апробированы, в том числе на научно-практической конференции «Актуальные проблемы противотуберкулёзной помощи и перспективы её совершенствования» (Улан-Удэ, 2011), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы профилактики, диагностики и лечения туберкулеза у детей и подростков» (Москва, 2013).

Автореферат соответствует тексту диссертации, содержит основные положения, выводы и практические рекомендации.

В целом диссертация С.Г. Звонковой оценивается положительно, имеются следующие вопросы, не умаляющие значение диссертации:

1. Как производился расчет выборки детей, необходимой для получения достоверных результатов? Можно ли полученные в ходе исследования результаты экстраполировать в целом на детскую популяцию или они приемлемы только для определенного круга детей?

2. Классификация учитываемых в диссертации конституциональных типов, на которые были разделены, включенные в исследование дети, является общепринятой? Какому автору или группе авторов она принадлежит? Как часто данная классификация используется в публикациях по проблемам педиатрии?

3. Насколько корректным является подчеркивание, что в исследование включены дети славянской национальности? Возможно, с учетом

особенностей Иркутской области, в исследование следовало включить детей разных национальностей?

4. В обзоре литературы и в обосновании актуальности проведения данного исследования много внимания уделяется ВИЧ-инфекции, в том числе и как фактору риска возникновения и неблагоприятного течения заболевания. Какова доля среди заболевших туберкулезом детей в Иркутской области пациентов с ВИЧ-инфекцией, исключаемых из данного исследования?

5. Полиморфизм заявленных генов изучался у заболевших туберкулезом, здоровых инфицированных МБТ и не инфицированных МБТ детей, при этом не инфицированные МБТ дети были разного возраста. Как известно, генетические полиморфизмы не изменяются в течении жизни индивида. У здоровых не инфицированных МБТ детей разных возрастных групп, включенных в исследование, есть шанс инфицироваться МБТ и заболеть туберкулезом до достижения ими возраста 18 лет. На мой взгляд, было бы корректным включать в исследование по поиску генетических предикторов предрасположенности к туберкулезу лиц, достигших 18-летнего возраста, инфицированных МБТ и не заболевших туберкулезом и не инфицированных МБТ. Как Вы можете пояснить выявленное противоречие?

6. Насколько необходимым было включение в исследование малого числа детей с вторичными формами туберкулеза, изолированным внелегочным туберкулезом? Возможно, правильнее было бы ограничиться детьми с туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов, в том числе при наличии этой формы в составе генерализованного туберкулеза?

7. В исследовании учитывалась интенсивная фаза химиотерапии, со средней продолжительностью 90 доз, указано, что по завершении интенсивной фазы дети могли быть выписаны из стационара под наблюдение участкового фтизиатра. Как в территории осуществляется посещение детских школьных учреждений детьми с туберкулезом, находившимися на фазе продолжения лечения? Какие существуют условия по допуску больных туберкулезом детей в организованные детские коллективы?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Звонковой Светланы Геннадьевны на тему: «Особенности туберкулёзной инфекции у детей с различными генетическими показателями», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.16 - фтизиатрия, является завершённой научной квалификационной работой. В этой работе, на основании выполненных автором исследований, решена научная задача выявления влияния полиморфизма заявленных генов (CD209 –336 A/G DC-SIGN, CCL2 –2518A/G, INF γ +874A/T) на характер клинического течения туберкулёза, что даёт возможность индивидуального подхода к лечению туберкулёза у детей, определению продолжительности интенсивной фазы химиотерапии и прогнозированию течения заболевания.

Диссертация соответствует требованиям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней (Постановление правительства РФ от 24.09.2013 года № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.16. – фтизиатрия.

Официальный оппонент:

заведующий кафедрой фтизиатрии и фтизиохирургии
ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский
университет» Минздрава России

доктор медицинских наук (14.01.16 – фтизиатрия),
доцент

почтовый адрес: 644099, г. Омск, ул. Ленина, 12,
ОмГМУ, кафедра фтизиатрии и фтизиохирургии
телефон: 8-3812-40-45-15

адрес электронной почты: amordik@mail.ru

04.03.2016

 А.В. Мордык

