

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Тьерри Ингабаре
на тему: «Клинико-лабораторная характеристика первично диагностированной
ВИЧ-инфекции с учетом молекулярно-генетической характеристики вируса
и оптимизация антиретровирусной терапии»,
представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальностям 3.1.22 – инфекционные болезни и 1.5.10 – вирусология

Диссертационное исследование Т. Ингабаре посвящено изучению важнейшей темы, связанной с вопросами оптимизации антиретровирусной терапии (АРТ) и индивидуализации лечения ВИЧ-инфицированных лиц. Для решения этой задачи автором был произведен набор группы впервые диагностированных пациентов КИБ им. С. П. Боткина с ВИЧ-инфекцией, ранее не получавших антиретровирусные препараты (АРВП), и выполнен целый комплекс научных работ, включая многочисленные клинические инструментальные и лабораторные исследования, генотипирование ВИЧ-1, определение вирусной нагрузки, анализ числа иммунных клеток, скрининг других инфекционных заболеваний и др. Используемые автором методы и полученные им результаты исследования однозначно позволяют утверждать, что работа полностью **соответствует** паспортам специальностей 3.1.22 – инфекционные болезни и 1.5.10 – вирусология и относится к **отрасли** медицинские науки.

Актуальность избранной темы

Инфекция, вызываемая вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), относится к группе социально значимых инфекционных заболеваний, находящихся в центре внимания медицины во всех странах мира, в том числе и в России. Значительное число инфицированных людей, опасность заболеваний для их жизни, существенная экономическая нагрузка для бюджета страны, связанная с лечением этих инфекций, требуют создания и внедрения эффективной стратегии противодействия их распространению и прекращения смертности инфицированных

людей, восстановления качества и продолжительности их жизни.

Одним из наиболее мощных средств борьбы с ВИЧ-инфекцией является специфическая антиретровирусная терапия, и на этом пути в последние десятилетия достигнуты грандиозные успехи. Расширение программ АРТ, привлечение все большего числа инфицированных людей к получению лекарственных препаратов существенно повышает качество и продолжительность их жизни, ограничивает передачу вируса и таким образом сокращает число новых случаев инфекции.

Очевидным требованием к современной АРТ стала необходимость разработки индивидуализированных подходов к лечению ВИЧ-инфекции. Важнейшей причиной необходимости таких исследований является недостаточная эффективность лечения заболевания, связанная с возникновением лекарственно-устойчивых вариантов ВИЧ. Значительное число пациентов, испытывающих неуспех АРТ, и возможность передачи резистентных штаммов в популяции (первичная резистентность) в условиях расширения программ лечения ВИЧ-инфекции обостряют проблему лекарственной резистентности ВИЧ, ставя ее на государственный уровень.

Именно поэтому **актуальность** темы диссертационной работы Т. Ингаби-ре, посвященной изучению распространенности лекарственно-устойчивых вариантов ВИЧ и возможностям оптимизации АРТ на основе данных изучения генома вируса, не вызывает ни малейших сомнений.

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

Пути достижения сформулированной **цели** четко определены пятью основными **задачами** исследования, которые, в свою очередь, детализируют способы реализации плана автора по оптимизации подбора терапевтических схем АРТ у пациентов с первичным диагнозом «ВИЧ-инфекция». Выбор методов полностью оправдан и включает в себя комплекс современных клинико-лабораторных исследований, таких как определение процентного и абсолютного числа иммунных клеток CD4⁺ методом проточной цитометрии, качественное и количе-

ственное определение РНК ВИЧ методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, секвенирование генома ВИЧ, биоинформационный анализ и анализ мутаций лекарственной резистентности ВИЧ, а также статистические методы. Объем исследования (102 первично диагностированных пациента с ВИЧ-инфекцией) достаточен для статистически надежных выводов.

Аргументированные научные данные, представленные в диссертации Т. Ингабаре, обосновываются на адекватном дизайне исследования, использовании современных диагностических методов, высоким уровне методов статистического и математического анализа, позволивших автору сделать обоснованные выводы и разработать практические рекомендации. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций убедительно подтверждается сопоставлением полученных результатов с данными отечественной и зарубежной литературы, комплексным подходом к исследованию проблемы, успешным внедрением результатов исследования в практическое здравоохранение и учебный процесс, широким обсуждением на всероссийских научных конференциях.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором **впервые** поставлена и решена задача анализа распространенности мутаций вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в Санкт-Петербурге в период 2018-2021 гг., у первично выявленных в стационаре пациентов с диагнозом ВИЧ-инфекция.

Впервые выполнена оценка частоты встречаемости и спектра мутаций, приводящих к первичной резистентности ВИЧ-1 к антиретровирусным препаратам, с учетом их клинической значимости для эффективности терапии, на репрезентативной группе наивных пациентов, включая имеющих клинические проявления инфекции.

Результаты исследования представлены в убедительной форме, **достоверность** их очевидна и подтверждена публикациями. **Выводы** диссертационной работы полностью соответствуют ее содержанию. **Рекомендации** востребованы

на практике и обоснованы выводами работы.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность

Содержание диссертации полностью **соответствует** ее целям и задачам. Вводная часть диссертации содержит все традиционные и необходимые разделы, включая актуальность работы, степень разработанности темы исследования, цель исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, методологию и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробацию работы.

Обзор литературы (**глава 1**) написан на основании современных представлений о клиническом течении и диагностике ВИЧ-инфекции, антиретровирусной терапии, причинах и способах анализа лекарственной резистентности ВИЧ. Приводятся подробные сведения о таксономическом разделении ВИЧ-1 на генотипы, субтипы и характере их распространенности, в том числе на территории РФ.

Описаны причины неэффективности АРТ, механизмы и условия возникновения мутаций лекарственной резистентности, состояние вопроса о слежении за резистентностью в странах мира. Представлены детальные сведения о наиболее часто встречающихся мутациях и их роли в снижении чувствительности ВИЧ к стандартным препаратам АРТ, рекомендованным к применению в России. Обсуждается вопрос о генетических аллелях человека, способны влиять на возможность/эффективность заражения ВИЧ и характер течения инфекции, в частности, о протективных аллелях CCR5del32 и CCR2V64I.

Автором продемонстрировано уверенное владение данными научной литературы последних лет, на основании которых сформулированы **цели и задачи** исследования, связанного с изучением лекарственной резистентности ВИЧ, и **обоснована необходимость** глубокого изучения этой актуальной в практическом отношении проблемы.

Во **второй** главе диссертации рассмотрены основные методы и материалы, использованные автором в работе. Проведено обследование 102 впервые диагностированных пациентов с ВИЧ-инфекцией, госпитализированных в СПб

ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина» и под наблюдением в СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 107» Красногвардейского района

Комплексное клинико-лабораторное обследование пациентов включало сбор жалоб и анамнез заболевания, клинический осмотр по органам и системам, выполнение клинического и биохимического анализа крови. Диагноз ВИЧ-инфекции был подтвержден при лабораторном обследовании методами ИФА и иммуноблота (ИБ) с определением процентного и абсолютного числа иммунных клеток CD4+ методом проточной цитометрии.

Качественное и количественное определение РНК ВИЧ проведено методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Секвенирование проводилось с использованием наборов набора «АмплиСенс-HIV-Resist-Seq» при помощи автоматического секвенатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. Определение ВИЧ-протективных аллелей CCR5del32 и CCR2V64I проводили методом пиросеквенирования.

При статистической обработке данных использовали программы STATISTICA 10 и IBM SPSS Statistics 21.0 for Windows. Непрерывные переменные с нормальным распределением были представлены как средние величины ($M \pm SD$), а когда распределение значений не было нормальным - как «медиана». Для всех статистических тестов значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Выбор методов полностью адекватен поставленным в работе задачам, включает современные и соответствующие национальным рекомендациям виды исследований.

Третья глава диссертации посвящена анализу результатов исследования клинической симптоматики пациентов с первично выявленной ВИЧ-инфекцией. Доля госпитализированных пациентов в обследованной группе составила 91,2%, а наблюдавшихся амбулаторно – 9,8%. Наибольшее число пациентов (86,2%) с ВИЧ-инфекцией были первично диагностированы на поздней стадии заболевания, что подтверждается данными об измерениях вирусной

нагрузки и иммунологического статуса, а также результатами клинического обследования. Наличие коморбидности у ВИЧ-инфицированных пациентов и многообразие клинических проявлений инфекции приводят к длительному диагностическому процессу, ошибочным диагнозам с поздней диагностикой.

Результаты лабораторного обследования показали выраженное снижение уровня CD4+ клеток - менее 200 кл/мкл крови (иммунологическая категория 3) у больных в острой стадии (2Б и 2В). Среди пациентов, относившихся к латентной стадии ВИЧ-инфекции (стадия 3), отмечалось выраженное и умеренное снижение количества CD4+ клеток (среднее количество CD4+ клеток составило 402 кл/мкл, а средний уровень вирусной нагрузки составлял 7899 копий/мл плазмы). У большинства пациентов, относившихся к стадиям 4 и 5, количество CD4+ клеток составляло менее 500 кл/мкл крови. Уровень вирусной нагрузки был выше почти в 5 раз у пациентов в стадии вторичных заболеваний, чем в подгруппе пациентов в субклинической стадии.

Распространенность вирусных гепатитов составила 57,8%, при этом в этиологической структуре доминировал вирусный гепатит С (ВГС) - у 76,3% пациентов (n=45), вирусный гепатит В (ВГВ) выявлен у 5% пациентов (n=3), сочетанная инфекция В+С - у 13.7% пациентов (n=8).

В четвертой главе диссертации приводятся приоритетные данные о частоте встречаемости и характере мутаций резистентности в обследованной группе пациентов. Прежде всего обращает на себя внимание показатель первичной резистентности (доля пациентов хотя бы с одной мутацией устойчивости), достигший 11%, что приближается к наиболее высоким показателям среди регионов России. На основании этого сделан верный вывод о необходимости непрерывного мониторинга первичной резистентности ВИЧ и, возможно, внедрения обязательного определения генотипа ВИЧ перед началом лечения всех пациентов.

Результаты проведенной оценки частоты возникновения мутаций, ассоциированных с резистентностью к АРВП, показали, что чаще всего обнаруживаются мутации к препаратам класса нуклеозидных ингибиторов обратной

транскриптазы (ННИОТ) (5% пациентов); мутации к препаратам класса ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) и ингибиторов протеазы (ИП) встречались реже и были обнаружены у 4% и 1% пациентов, соответственно. У 2% пациентов были обнаружены мутации, ассоциированные с устойчивостью к нескольким классам АРВ-препаратов. Приведенные показатели в целом соответствуют данным, полученным при лечении пациентов в других регионах, и отражают характер применяемых схем АРТ.

Анализ генотипа ВИЧ у обследованных пациентов позволил определить распределение субтипов вируса; как выяснилось, среди пациентов доминирует ВИЧ субтипа А6, составляющий 97%, встречается ВИЧ субтипа В – 2%, а также рекомбинантная форма CRF03_AB – 1%.

Раздел работы, посвященный анализу взаимосвязи между наличием разных мутаций ВИЧ с показателями, характеризующими тяжесть течения заболевания (вирусная нагрузка, количество CD4+), а также наличием ВИЧ-протективных аллелей генома человека (CCR5/CCR5del32 и CCR2/CCR2V64I) не выявил достоверных ассоциаций между указанными параметрами.

В **заключении** этого раздела автор кратко суммирует полученные данные и формулирует свое отношение к результатам проведенной работы.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

В ходе выполнения диссертационной работы автором получен ряд **важных научных сведений**, касающихся данных о распространенности мутаций, молекулярно-генетических особенностях и структуре лекарственной чувствительности штаммов ВИЧ-1 у первично диагностированных пациентов; указанные сведения способны расширить представление о структуре эпидемии ВИЧ-инфекции, характере изменчивости вируса, а также составить основу для оптимизации стратегии и тактики лечения ВИЧ-инфицированных пациентов.

Разработанные рекомендации по будущим исследованиям имеют важное значение для **практической медицины**. Обоснована необходимость разработки алгоритма выявления рисков, позволяющего с высокой точностью определять вероятность развития резистентности у пациентов, получающих АРТ, и прогно-

зировать его на этапе старта терапии для повышения эффективности и профилактики развития вторичной резистентности.

Основные положения и результаты исследования используются в **практической работе** Государственного казенного учреждения здравоохранения Ленинградской области «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», в учебном процессе кафедры микробиологии, иммунологии и инфекционных болезней федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новгородский государственный университет имени Ярослава Мудрого» и в педагогическом процессе кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России.

По теме диссертационного исследования **опубликовано** 7 печатных работ, в том числе 3 в журналах, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Практические рекомендации составляют одну из важнейших частей самой диссертации; **выводы** диссертации легли в основу **рекомендаций** для практикующих специалистов в области лечения ВИЧ-инфекции, в частности, рекомендовано широкое внедрение экспресс-тестов на ВИЧ-инфекцию для улучшения ранней диагностики заболевания. С учетом роста эпидемии и значительного уровня распространенности лекарственной устойчивости ВИЧ в Санкт-Петербурге и РФ, выявленного в работе, рекомендуется при возможности проводить рутинное тестирование всех пациентов на устойчивость до начала лечения, а в отсутствие такой возможности в порядке мониторинга периодически проводить выборочное исследование первичной резистентности в разных группах и регионах. Для профилактики резистентности ВИЧ предпочтительными являются схемы на основе современных ингибиторов интегразы.

Представление и публикация результатов диссертации в научной печати

Результаты работы опубликованы в периодических научных изданиях по соответствующей теме диссертации тематике, неоднократно были доложены научному сообществу.

Перечень публикаций включает 7 статей, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации. Автор принимал активное участие в работе научных конференций как в России, так и в странах ближнего и дальнего зарубежья, при этом им было сделано значительное количество научных сообщений в форме доклада либо постерного сообщения.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Диссертационная работа оформлена в соответствии с традиционными подходами к оформлению диссертаций и включает введение, четыре главы (обзор литературы, материалы и методы, две главы результатов собственных исследований), заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы и библиографический список, включающий 170 ссылок на источники литературы. Работа иллюстрирована двумя рисунками и 23 таблицами. Объем диссертации соответствует требованиям инструкции по оформлению диссертации. Материал рационально и в логической последовательности распределен по главам. Заключение удачно подводит читателя к выводам диссертации.

Аннотация диссертации составлен в классической форме, текст его написан хорошим литературным языком, полностью отражает материал, изложенный в диссертации, и соответствует требованиям ВАК.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом

Работа в целом написана по стандартной форме, научное содержание не вызывает вопросов и возражений. Текст написан уверенно на общепринятом

научном языке. Оформление диссертации и автореферата, а также списка использованной литературы **полностью соответствует** требованиям к подобным работам.

Автор научно-квалификационной работы самостоятельно планировал и выполнил клиническое обследование и наблюдение пациентов, участвовал в разработке и заполнении формализованных индивидуальных регистрационных карт пациентов, создании электронной базы пациентов, экспериментальной части работы, самостоятельно провел анализ полученных результатов, участвовал в подготовке представленных в автореферате публикаций. **Личный вклад** автора можно оценить как **высокий**.

К незначительным недостаткам диссертации можно отнести некоторое количество опечаток и неудачных выражений, что несколько затрудняет восприятие, но не в малой степени не снижает ценности работы и ее выводов.

Заключение

Таким образом, диссертация Тьерри Ингабире «Клинико-лабораторная характеристика первично диагностированной ВИЧ- инфекции с учетом молекулярно-генетической характеристики вируса и оптимизация антиретровирусной терапии», выполненная под научным руководством доктора медицинских наук, профессора Елены Владимировны Эсауленко и доктора биологических наук Александра Владимировича Семенова , является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи – выявлены данные о распространенности мутаций, молекулярно-генетических особенностях и структуре лекарственной чувствительности штаммов ВИЧ у первично диагностированных пациентов , а также научно обоснована необходимость разработки алгоритма выявления рисков, позволяющего с высокой точностью определять вероятность развития резистентности у пациентов, получающих АРТ, и прогнозировать его на этапе старта терапии для повышения эффективности и профилактики развития вторичной резистентности, что имеет важное значение для инфекционных болезней и вирусологии.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов дис-

сертационная работа соответствует требованиям п. 9-14 Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 01 октября 2018. №1168), предъявляемым Министерством образования и науки Российской Федерации к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Ингабире Т. заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.22 – инфекционные болезни, 1.5.10 – вирусология.

Зав. лаб. вирусов лейкозов

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика им. Н.Ф. Гамалеи»

("НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи") Минздрава России,

доктор биологических наук

М.Р. Бобкова

123098, Москва, ул. Гамалеи, д.18

Тел/факс: +7 499 190 3063 моб +7 916 313 83 87

e-mail: mrbobkova@mail.ru

Подпись зав. лаб. вирусов лейкозов

ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России

Бобковой Марины Ридовны заверяю

Ученый секретарь

ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России,

кандидат биологических наук



Л.К. Коженникова

16 ноября 2021 года