

В диссертационный совет 21.1.025.01,
при ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии
и иммунологии имени Дмитрия Рогачева»
Министерства Здравоохранения Российской Федерации

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Скоробогатовой Елены Владимировны на диссертационную работу Першина Дмитрия Евгеньевича на тему «Разработка и оценка значимости метода определения экспрессии внутриклеточных белков в диагностике и мониторинге пациентов с врожденными дефектами иммунитета», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.28. Гематология и переливание крови, 3.2.7. Аллергология и иммунология.

Актуальность темы диссертационной темы

Область изучения врожденных дефектов иммунитета (ВДИ) или как было принято называть ее ранее первичные иммунодефицитные состояния - с каждым годом становится все более и более актуальной - углубляются знания об иммунологии в целом, выявляются новые гены, совершенствуются методы диагностики и терапии. Ключом успешного выявления пациента с ВДИ является тщательный сбор анамнеза, физикальный осмотр, а также грамотный подход к назначению и интерпретации различных лабораторных исследований. Крайне важным по-прежнему остается вопрос лабораторной диагностики этой группы пациентов, так как число вновь верифицированных ВДИ неуклонно растет с каждым годом, а вместе с ним и уникальный спектр иммунологических дефектов. Количество новых ВДИ увеличивается на 10-15 генов ежегодно благодаря все большему внедрению в клиническую практику современных геномных технологий. На фоне столь стремительного темпа развития молекулярно-генетической диагностики, перечень доступных лабораторных

методов для отдельно взятых нозологий сильно отстает. Несмотря на то, что на настоящий момент золотым стандартом верификации диагноза является обнаружение молекулярно-генетического дефекта в гене-кандидате, наличие вспомогательных методов является актуальной проблемой. Разработка новых быстрых и надежных лабораторных методов, позволит не только своевременно установить диагноз, но и ускорить назначение корректной патогенетической терапии и перейти к дальнейшему рассмотрению необходимости выполнения процедуры трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Данный терапевтический подход является единственным излечивающим для большинства пациентов с ВДИ.

Одним из надежных и давно зарекомендовавших себя методов диагностики пациентов с ВДИ является многоцветная проточная цитофлуориметрия (ПЦ). При помощи использования моноклональных антител специфичных к различным клеточным структурам, а также внутриклеточным белкам, данный лабораторный метод позволяет в течении суток сформировать заключение о наличии или отсутствии какой-либо популяции, рецептора на поверхности мембраны или экспрессии белка. Значительная часть ВДИ относится к моногенным заболеваниям, а это значит, что в основе этих состояний лежит дефект одного гена, ответственного за экспрессию конкретного белка. К ВДИ, имеющим моногенный характер и наиболее часто встречающимся в практике врача-гематолога и иммунолога, относятся синдром Вискотт-Олдрича (СВО) и X-сцепленный лимфопролиферативный синдром 1 и 2 типов (ХЛП 1 и ХЛП 2). В связи с этим, данные заболевания были выбраны как актуальные модели для разработки диагностических лабораторных протоколов, основанных на анализе экспрессии ключевых, для этих состояний, белков.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа Першина Д.Е. соответствует шифрам научных специальностей 3.1.28. Гематология и переливание крови, 3.2.7. Аллергология и

иммунология и имеет непосредственную связь с одним из важных направлений отечественной гематологии и иммунологии - улучшение диагностики и лечения пациентов с врожденными дефектами иммунной системы.

Новизна исследования и полученных результатов

В настоящем исследовании впервые в РФ разработаны и описаны методы лабораторной диагностики пациентов с СВО и ХЛП 1 и 2 типов при помощи оценки уровней экспрессии белков WASP, SAP и XIAP, соответственно.

Впервые в мире рассмотрено применения метода оценки экспрессии белка WASP в качестве инструмента определения линейного химеризма у крупной когорты пациентов СВО после процедуры ТГСК.

Впервые для российской когорты пациентов с СВО описан феномен реверсивного соматического мозаицизма, с особым акцентом на природу его возникновения.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Полученные диагностические протоколы позволят улучшить работу профильных медицинских учреждений, непосредственно ускорив диагностику СВО и ХЛП 1/2 типа. Что в свое время, приведет к улучшению качества жизни данных пациентов, благодаря скорейшему назначению патогенетической терапии и рассмотрению вопроса о необходимости выполнения ТГСК.

Применение предложенного протокола оценки экспрессии белка WASP, при определении уровня донорского химеризма у пациентов с СВО после ТГСК, может быть использовано в качестве дополнительного быстрого и точного метода.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом, замечания по оформлению

Работа Першина Д.Е. оформлена в соответствии со стандартными требованиями к диссертациям. Содержит классические разделы: введение, обзор

литературы, описание используемых в работе материалов и методов исследований, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы и практические рекомендации, а также список литературы, состоящий из 190 источников. Объем работы составляет 123 страницы машинописного текста, 14 рисунков и 12 таблиц. В введении продемонстрирована актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость применения имеющихся диагностических алгоритмов у пациентов с СВО и ХЛП 1 и 2 типов.

Обзор литературы ёмок по содержанию, содержит ссылки на последние профильные публикации по излагаемой проблематике.

Во второй главе изложены материал и методы исследования. Детально охарактеризованы когорты исследуемых: пациенты с подтвержденными диагнозами СВО и ХЛП 1 и 2 типов, родственники женского пола, пациенты с СВО, перенесших ТГСК и условно здоровые доноры компонентов крови (оценка должествующий экспрессии белков SAP, XIAP и WASP). Главные исследуемы группы пациентов с СВО и ХЛП 1 и 2 типов охарактеризованы по полу, диагнозу, клиническому фенотипу и его тяжести (для пациентов с СВО приведена подробная таблица с балльной оценкой клинической тяжести), уровню экспрессии белков, наличию генетического варианта, лежащего в основе иммунодефицитного состояния, с указанием его типа, положения, и клинической значимости. Подробно описаны особенности преаналитического этапа работы с биологическим материалом, стратегии гейтирования, перечень антител, варианты оценки уровней экспрессии. Также приведена детальная информация по тому, как был проведен молекулярно-генетический анализ и анализ селектированных популяций, частично восстановивших экспрессию белка.

В третьей главе отражены основные результаты исследования уровней экспрессии белков SAP, XIAP, WASP среди когорты условно-здоровой популяции доноров, а также изучены условия хранения образцов и время их

транспортировки с целью получения данных об оптимальных условиях проведения анализа. Далее изучены варианты экспрессии у пациентов с подтвержденными диагнозами СВО и ХЛП 1 и 2 типов. Детально рассмотрены пациенты, имеющие частично восстановленную экспрессию, исследованы популяции, несущие данный феномен, и произведена их клеточная селекция. На основании полученных данных об уровнях экспрессии пациентов с СВО и ХЛП 1 и 2 типов, проведен ROC-анализ, по результатам которого были получены оптимизированные пороговые значения, имеющие высокие уровни чувствительности и специфичности. Также автор описывает обнаруженную корреляцию между тяжестью клинического фенотипа пациентов с СВО и уровнем экспрессии белка WASP. Отдельно рассмотрена возможность применения разработанного протокола оценки WASP у пациентов перенесших процедуру ТГСК с целью определения уровня донорского химеризма в популяции Т лимфоцитов. Рассмотрена возможность применения разработанных протоколов оценки SAP, XIAP, WASP на материале матерей пациентов, являющихся носителями мутантного аллеля.

В заключении диссертант подводит итоги, полученные в ходе работы, рассуждая о возможностях и ограничениях полученных протоколов, в контексте опыта опубликованных современных литературных данных, логически обосновывая выводы, которые полностью коррелируют с поставленными задачами.

В результатах данной диссертационной работы продемонстрировано, что внедрение разработанных лабораторных методов приведет к улучшению диагностики пациентов с СВО и ХЛП 1 и 2 типа, позволяя в течение суток подтвердить или исключить диагноз. Вместе с тем, позволив либо продолжить поиск причин состояния пациента, либо перейти к вопросу о необходимости выполнения ТГСК. В тоже время, предложенный метод, может быть использован при рассмотрении потенциального родственного донора женского пола, который может являться носителем мутантного аллеля, для пациентов с диагнозами СВО и ХЛП 1 типа. Данные об уровне линейного химеризма в Т лимфоцитах,

полученные при сравнении двух методов у пациентов с СВО получивших ТГСК, позволяют уверенно судить о том, что предлагаемый подход может быть использован в качестве дополнительного. Оптимистичным видится дальнейшее изучение возможности применения аналогичных лабораторных методов при других видах моногенных ВДИ.

Личный вклад автора

Вклад автора заключается в непосредственном участии во всех этапах выполненной работы - в анализе литературных данных, посвященных эпидемиологии, патогенезу, лабораторным особенностям, молекулярно-генетическим изменениям у пациентов с СВО и ХЛП 1 и 2 типов. Также в работе подробно изучены различные лабораторные алгоритмы используемых на настоящий момент для диагностики этих состояний. Автором был определен дизайн исследования, согласно которому производилась разработка и валидация описанных диагностических методов. Автор лично принимал участие в процессировании образцов от пациентов с ХЛП 1 и 2 типов и СВО, отработке лабораторных методик, а также осуществлял оценку клинического статуса, посредством анализа медицинской документации пациентов, включенных в данное исследование.

Результатом работы является подробное описание лабораторных методов, нацеленных на оценку экспрессии белков WASP, SAP и XIAP, на основании чего сформулированы выводы и практические рекомендации.

Рекомендации по использованию результатов работы и выводов диссертации

Результаты диссертации Першина Д.Е. могут быть применены в практическом здравоохранении, в лабораторных подразделениях специализированных онкогематологических и общепедиатрических лечебных учреждениях. Представленные результаты работы могут способствовать

улучшению диагностики СВО и ХЛП 1 и 2 типов и направлению данных пациентов к профильному специалисту.

В свою очередь, предложенные методы исследования уровней экспрессии белков, могут быть использованы при рассмотрении потенциальных доноров родственников пациентов с СВО и ХЛП 1 и 2 типов.

Разработанные методы могут быть использованы при семейном консультировании родственников пациентов с подтвержденными диагнозами СВО и ХЛП 1 типа на этапе планирования беременности.

Печатные работы автора, в т. ч. в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ

По теме диссертации опубликованы 3 печатные работы в отечественных журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к написанию диссертаций и авторефератов (ГОСТ Р 7.0.11-2011). Диссертационная работа выполнена на хорошем научно-методическом уровне и представляет собой объемное, целостное и полезное с научной и практической точки зрения научное исследование. Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием современных статистических методов. Выводы в целом отражают цель и задачи. Практические рекомендации построены четко и являются адресными. Недостатков в содержании и оформлении работы не выявлено.

Диссертационная работа написана литературным языком, наглядно иллюстрирована. Принципиальных замечаний по выполненной работе нет, возникшие вопросы имеют дискуссионный характер.

Заключение

Таким образом, диссертация Першина Дмитрия Евгеньевича на тему «Разработка и оценка значимости метода определения экспрессии внутриклеточных белков в диагностике и мониторинге пациентов с врожденными дефектами иммунитета» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи по улучшению диагностики пациентов с СВО и ХЛП 1 и 2 типов. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов диссертационная работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в ред. Постановления Правительства РФ, от 28.08.2017 №1024), а ее автор, Першин Д.Е., заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.28. Гематология и переливание крови, 3.2.7. Аллергология и иммунология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук,

заведующая отделением трансплантации костного мозга

РДКБ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

Скоробогатова Елена Владимировна

« 15 » марта 2023 г.

Адрес организации: 119571, Российская Федерация,

г. Москва, Ленинский проспект, д. 117.

РДКБ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Тел. 8 800 555-04-94

E-mail: skorobog.e@mail.ru

Сайт: <https://rdkb.ru>



Подпись д.м.н. Скоробогатовой Е.В.

убоимверлю.

Иванович отдел кадров ОСП РДКБ Тел / Камарова И.И.

СВЕДЕНИЯ
об официальном оппоненте

по защите диссертации Першина Дмитрий Евгеньевича на тему: «Разработка и оценка значимости метода определения экспрессии внутриклеточных белков в диагностике и мониторинге пациентов с врожденными дефектами иммунитета», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови, 3.2.7. Аллергология и иммунология.

№ п/п	Ф.И.О.	Год рождения, гражданств	Место основной работы, должность	Ученая степень (с указанием шифра специальности, по которой защищена диссертация)	Основные работы, опубликованные в рецензируемых журналах за последние 5 лет
1.	Скоробогатова Елена Владимировна	1968, РФ	Российская детская клиническая больница федерального Государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Заведующая	Доктор медицинских наук, специальности 14.00.29 - «Гематология и переливание крови», 14.00.09 - «Педиатрия»	1. Вторичные солидные опухоли у детей после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (клинические случаи и обзор литературы) / Скворцова Ю.В., Багашов Д.Н., Скоробогатова Е.В., и др. // Онкогематология. 2017. - Т. 12, №2. - С. 39-53. 2. Роль хирургического лечения в терапии пациентов с нейробластомой сложной анатомической локализации / Сухов М.Н., Соколов С.В., Скоробогатова Е.В., и др. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2019, - Т. 18, № 4. - С. 30-38. 3. Генерализованный остеопетроз: показания, эффективность и особенности трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (собственный опыт) / А. Е. Бура, К. И. Киргизов, З. А. Кондрашова, Е. А. Пристанскова, С. В. Михайлова, Е. В. Скоробогатова // РЖДГиО. 2018. №1.

	<p>отделением трансплантации костного мозга</p>		<p>4. Клинический случай излечения генерализованной аденовирусной инфекции на фоне реакции «трансплантат против хозяина» у ребенка после трансплантации костного мозга от галлоидентичного донора / А. В. Мезенцева, Е. В. Скоробогатова, А. Е. Буря, К. И. Киргизов, В. В. Константинова, Е. В. Мачнева, Е. А. Пристанскова // РЖДГ и О. 2019. №1.</p> <p>5. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей в России: краткий обзор активности в 2015-2018 гг. / Масчан М.А., Скоробогатова Е.В., и др. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. -2020. - Т. 19, № 2. - С. 22-29.</p>
--	---	--	--

Не являюсь членом экспертного совета ВАК. На обработку персональных данных согласна.

доктор медицинских наук,

заведующая отделением трансплантации костного мозга

РДКБ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрова России

(14.00.29 - «Гематология и переливание крови», 14.00.09 - «Педиатрия»)



Скоробогатова Елена Владимировна

Подпись д.м.н., профессора ФИО удостоверяю

Подпись д.м.н., Скоробогатовой Елены Владимировны заверяю

Начальник отдела кадров РДКБ ФГАОУ ВО РНИМУ им Н.И. Пирогова Минздрова России



Комарова Инна Николаевна



«15» ИЮН 2023 г.