

## УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор -  
проректор по научной работе  
ФГАОУ ВО «Российский  
университет дружбы народов»  
д.м.н., профессор,  
член-корреспондент РАН

А.А. Костин



\_\_\_\_\_ марта 2023 г.

## ОТЗЫВ

ведущей организации - ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» о значимости диссертационной работы Першина Дмитрия Евгеньевича на тему «Разработка и оценка значимости метода определения экспрессии внутриклеточных белков в диагностике и мониторинге пациентов с врожденными дефектами иммунитета», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови, 3.2.7. Аллергология и иммунология.

### Актуальность темы диссертационной темы

Последние годы характеризуются бурным ростом успешного выявления различных генетически детерминированных нарушений иммунитета, что в первую очередь связано с широким внедрением методов молекулярной диагностики. Врожденные дефекты иммунитета (ВДИ) - обширная группа генетически детерминированных состояний в основе которых лежат различные дефекты иммунной системы. Определение генетического дефекта в группе ВДИ является, на сегодняшний день, золотым стандартом диагностики, однако выполнение молекулярных методик занимает длительный период времени. Экспресс метод, позволяющий постановить диагноз в первые дни после поступления пациента в стационар, существенно

облегчает выбор терапевтической тактики. Внедрение в практику таких методов позволит значительно улучшить результаты диагностики и лечения педиатрических пациентов с подозрением на ВДИ, так как своевременная точная постановка диагноза является залогом успешного лечения.

Не менее актуальным является также возможность подтверждения патогенности вновь выявленных и не описанных ранее мутаций, поскольку различить генетический полиморфизм и истинно патогенную мутацию не всегда представляется возможным. Метод, позволяющий дополнить, а в ряде случаев, определить клиническую значимость выявленного дефекта, позволяет грамотно скорректировать тактику диагностического поиска, что в конечном итоге способствует своевременному и эффективному подбору терапии.

Для ряда моногенных нарушений иммунной системы ключевым диагностическим маркером является нарушение экспрессии определенного белка в следствие наличия молекулярно-генетический дефекта. Выявить такого рода «поломку» можно эффективно и достоверно с помощью метода проточной цитофлюорометрии (ПЦ). Несмотря на то, что такие исследования существуют давно и нередко упоминаются в литературе, практически невозможно найти подробно описанный протокол диагностики какого-либо первичного иммунодефицита с помощью определения внутриклеточной экспрессии белка методом ПЦ. Существуют коммерческие моноклональные антитела, а также наборы пробоподготовки для оценки внутриклеточных структур, однако разработка и постановка достоверной и воспроизводимой методики – это долгий процесс, требующий анализа большого пласта данных. Синдром Вискотт-Олдрича (СВО) и X-сцепленные лимфопролиферативные синдромы 1 и 2 типов (ХЛП 1, ХЛП 2) являются тяжелыми и редкими иммунологическими состояниями, требующими скорейшей верификации диагноза и выполнения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). 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 диссертационной работе Першина Д.Е. впервые в РФ 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 сопоставлен спектр вариантов в генах *WAS*, *SH2D1A* и *XIAP*, дополненный информацией об уровнях экспрессии белков WASP, SAP и XIAP, соответственно. Что позволит разносторонне взглянуть на интерпретацию отдельных, ранее не описанных в научной литературе, вариантов.

Впервые для российской когорты пациентов с СВО описан феномен частичного восстановления нормального уровня белка WASP изолированными клеточными популяциями.

Впервые в мире рассмотрено применения метода оценки экспрессии белка WASP в качестве инструмента определения донорского химеризма среди пациентов СВО после процедуры ТГСК.

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Результатом данной работы явились лабораторные диагностические протоколы для пациентов с подозрением на СВО и ХЛП 1 и 2 типов. Внедрение данных протоколов в лаборатории медицинских центров онкогематологического и иммунологического профиля позволит в течении суток устанавливать диагноз по наличию или отсутствию ключевых, для вышеупомянутых состояний, белков. Это улучшит работу профильных медицинских учреждений, непосредственно ускорив диагностику СВО и ХЛП

1 и 2 типов, тем самым, повлияв на быстроту назначения патогенетической терапии и скорейшему рассмотрению вопроса о необходимости выполнения ТГСК.

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

Также, оценка экспрессии белков WASP и SAP может быть использована в качестве метода определения носительства мутантного аллеля у родственниц пациентов с подтвержденными диагнозами СВО и ХЛП 1 типа.

### **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.

В первой главе произведен качественный обзор литературы, отражающий глубину содержания работы. Всесторонне рассмотрены современные возможности и особенности лабораторной диагностики пациентов с СВО и ХЛП 1 и 2 типов.

Вторая глава излагает материалы и методы исследования, примененные в данном исследовании. 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 долженствующий

экспрессии белков SAP, XIAP и WASP). Главные исследуемые 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. Детально охарактеризован преаналитический этап для каждого из предложенных методов: стратегии гейтирования, перечень антител, варианты подхода к оценке уровней экспрессии. Также в этой главе приведена информация по тому, как был проведен молекулярно-генетический анализ селектированных популяций, имеющих частично восстановленную экспрессию белка. Охарактеризована группа пациентов с СВО на различных сроках после процедуры ТГСК.

Третья глава представлена основными результатами исследования уровней экспрессии белков WASP, SAP, XIAP среди когорты условно-здоровой популяции доноров и пациентов с подтвержденными диагнозами СВО и ХЛП 1 и 2 типов. В дополнении были исследованы должествующие уровни экспрессии белков среди условно здоровой когорты индивидуумов. По результатам полученных данных об уровнях экспрессии пациентов с СВО и ХЛП 1 и 2 типов, проведен ROC-анализ и были получены оптимизированные пороговые значения, с высокими значениями чувствительности и специфичности. Отдельно рассмотрены пациенты, имеющие частично восстановленную экспрессию, для ряда из которых проведено динамическое наблюдение за данной популяцией клеток. Также автор описывает обнаруженную обратную 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 у 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.

#### **Личный вклад автора**

Автор применил современные методы статистики для анализа результатов исследования в процессе разработки новых методов и успешно сформировал научно обоснованные и достоверные выводы, а также практические рекомендации по использованию проточной цитометрии в диагностике нескольких врожденных нарушений иммунитета. Результаты данной работы могут быть воспроизведены и соответствуют всем требованиям, предъявляемым к диссертационному исследованию. Вклад Першина Д.Е. заключается в непосредственном участии во всех этапах выполненной работы. Автором был определен дизайн исследования, согласно которому производилась разработка и валидация описанных диагностических методов. Автор лично принимал участие в пробоподготовке биологических образцов от пациентов с ХЛП 1 и 2 типов и СВО и осуществлял оценку

клинического статуса, посредством анализа медицинской документации пациентов.

### **Рекомендации по использованию результатов работы и выводов диссертации**

Разработанные диагностические подходы могут быть интегрированы в лабораторные подразделения различных лечебных учреждениях нашей страны, оснащенных проточными цитофлюориметрами. Что приведет к улучшению диагностики пациентов с СВО и ХЛП 1 и 2 типов, предотвращению развития у них тяжелых жизнеугрожающих состояний и скорейшему началу подготовки к ТГСК.

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 при планировании проведения ТГСК.

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.

Настоящий отзыв по диссертации Першина Д.Е. подготовлен доктором медицинских наук, доцентом кафедры онкологии и гематологии факультета непрерывного медицинского образования ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Макешовой Айнурой Бекболотовной и заведующей кафедрой клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии факультета непрерывного медицинского образования ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Татаурщиковой Натальей Станиславовной обсужден и утвержден на заседании кафедры онкологии и гематологии факультета непрерывного



### В Диссертационный совет 21.1.025.01

при ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава РФ  
(117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1)

### СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

по диссертации **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 по специальностям 3.1.28. Гематология и переливание крови, 3.2.7. Аллергология и иммунология

Полное и сокращенное наименование ведущей организации	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования РФ ФГАОУ ВО «РУДН»
Фамилия Имя Отчество Ученая степень, ученое звание руководителя ведущей организации	<b>Ястребов Олег Александрович</b> доктор юридических наук, профессор, Ректор ФГАОУ ВО «РУДН»
Фамилия Имя Отчество лица, утвердившего отзыв ведущей организации, ученая степень, отрасль науки, ученые специальности, по которым им защищена диссертация, ученое звание, должность и полное наименование организации, являющейся основным местом ее работы	<b>Костин Андрей Александрович</b> доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН Специальности: 14.01.23 Урология, 14.01.12 Онкология Первый проректор - проректор по научной работе ФГАОУ ВО «РУДН»  Согласен на обработку персональных данных.
Фамилия Имя Отчество ученая степень, ученое звание сотрудника, составившего отзыв ведущей организации	<b>Макешова Айнура Бекболотовна</b> доктор медицинских наук, доцент кафедры онкологии и гематологии факультета непрерывного медицинского образования ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» специальность 3.1.28. Гематология и переливание крови  Согласен на обработку персональных данных.  <b>Татаурщикова Наталья Станиславовны</b> доктор медицинских наук, профессор, специальность: 3.2.7. Аллергология и иммунология Заведующая кафедрой клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии факультета непрерывного медицинского образования ФГАОУ ВО «РУДН»  Согласна на обработку персональных данных.

<p>Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Овсянников Д.Ю., Кузьменко Л.Г., Халед М., Илларионова Т.Ю., Назарова Т.И., Елисеева Т. И., Фролов П. А., Семятов С.М., Нгуен Б.В. // Клинические и лабораторные маркеры бактериальной инфекции у детей разного возраста. Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. – 2019. – Т. 98. – №1. -186-192.</li> <li>2. Овсянников Д. Ю., Кешипян Е. С., Крпеминская, И. В., Быстрова, О. В. // Распространенность бронхолегочной дисплазии в Российской Федерации. Реальны ли получаемые данные? - Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2022. – Т. 67. – №. 3. – С. 34-38.</li> <li>3. Кравчук Д.А., Овсянников Д.Ю. // Эпидемиология бронхиальной астмы у недоношенных детей: метаанализ. - Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2019 – Т.58 - №3. – С.27-32.</li> <li>4. Овсянников Д.Ю., Колганова Н.И. // Практические основы выбора препарата биологической терапии бронхиальной астмы у детей и подростков. - Астма и аллергия. -2022 - №.1. - С. 25-36.</li> <li>5. Сангидорж Б., Татаурщикова Н. С., Ронжина А.Н. // Локальная иммунотерапия у пациентов с вирус-ассоциированным аллергическим ринитом. Практическая медицина. – 2017. - Т. 7. - №. 108. - С. 160-165.</li> </ol>
---	---

#### Адрес ведущей организации

<b>Индекс</b>	117198
<b>Объект</b>	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов»
<b>Город</b>	Москва
<b>Улица</b>	Миклухо-Маклая
<b>Дом</b>	6
<b>Телефон</b>	(495) 787-38-03 (1216), 434-42-12, 434-66-82
<b>e-mail</b>	rector@rudn.ru, rudn@rudn.ru
<b>Web-сайт</b>	http://www.rudn.ru

Ведущая организация подтверждает, что соискатель не является ее сотрудником и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе ведущей организации или в соавторстве с ее сотрудниками.

**Первый проректор - проректор по научной работе  
ФГАОУ ВО «Российский университет  
дружбы народов», д.м.н., профессор,  
член-корреспондент РАН**



 **А.А. Костин**