

ЗАКЛЮЧЕНИЕ
ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 21.1.025.01, СОЗДАННОГО НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ДЕТСКОЙ ГЕМАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ имени ДМИТРИЯ
РОГАЧЕВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА МЕДИЦИНСКИХ НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 11 апреля 2023 г. № 9

О присуждении Першину Дмитрию Евгеньевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.28 Гематология и переливание крови, 3.2.7. Аллергология и иммунология.

Диссертация «Разработка и оценка значимости метода определения экспрессии внутриклеточных белков в диагностике и мониторинге пациентов с врожденными дефектами иммунитета» по специальностям 3.1.28. Гематология и переливание крови, 3.2.7. Аллергология и иммунология принята к защите 09 февраля 2023 г., протокол заседания №2, диссертационным советом 21.1.025.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГСП-7, 117997. Г. Москва, ул. Саморы Машела д. 1) приказ Минобрнауки от 24 мая 2017, № 508/нк, (приказ от 24 сентября 2021 года № 974/нк, от 07 декабря 2022 года №1700 об изменении состава).

Соискатель Першин Дмитрий Евгеньевич, 10.12.1988 года рождения, в 2012 году окончил ФГАОУ ВО «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Педиатрия». С 2012 по 2013 годы

проходил обучение в клинической интернатуре по специальности «Педиатрия», далее с 2013 по 2015 год обучение в клинической ординатуре по специальности «Аллергология и иммунология», на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Далее в 2015 году прошел профессиональную переподготовку по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» на базе ФГАОУ ВО «Российского Национального Исследовательского Медицинского Университета им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. С 2015 года по настоящее время работает врачом клинической лабораторной диагностики и младшим научным сотрудником лаборатории трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

Масчан Михаил Александрович, доктор медицинских наук, доцент, заместитель генерального директора по научной работе - директор Института молекулярной и экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Щербина Анна Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор РАН, заместитель директора Института гематологии, иммунологии и клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения

«Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Официальные оппоненты:

Латышева Татьяна Васильевна, доктор медицинских наук, научный руководитель отделения иммунопатологии, заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России,

Скоробогатова Елена Владимировна, доктор медицинских наук, заведующий отделением трансплантации костного мозга обособленного структурного подразделения Российская детская клиническая больница федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, дали положительные отзывы на диссертацию.

В отзывах оппонентов указано, что диссертационная работа Першина Дмитрия Евгеньевича является завершённой научно-квалификационным трудом, основанном на собственном, уникальном материале. В работе решена актуальная задача клинической гематологии и иммунологии - улучшение алгоритмов диагностики редких врождённых состояний, таких как синдром Вискотт-Олдрича (СВО) и Х-сцепленный лимфопролиферативный синдром 1 и 2 типов (ХЛП 1 и 2).

Достоверность и обоснованность выводов не вызывают сомнений, исходя из репрезентативности выборки и примененных современных методов статистической обработки. Практические рекомендации четко сформулированы и обоснованы, результаты работы имеют несомненный практический и научный потенциал. Диссертационная работа вопросов у оппонентов не вызвала.

Отмечено, что по актуальности темы, методическому уровню проведённых исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов

диссертационная работа Першина Дмитрия Евгеньевича соответствует требованиям п. 9, п. 10, п. 11, п. 13, п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.21 г. № 426, от 11.09.2021 г. №1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что официальный оппонент, доктор медицинских наук, Скоробогатова Елена Владимировна является ведущим специалистом в области гематологии, онкологии, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и клеточной терапии, ведёт научную работу и имеет публикации, близкие к теме защищаемой диссертации. Официальный оппонент, доктор медицинских наук, Латышева Татьяна Васильевна – ведущий специалист в области иммунологии, ведёт научную работу в области клинической иммунологии взрослых и имеет публикации, близкие к теме защищаемой диссертации. Официальные оппоненты дали своё письменное согласие.

Ведущая организация Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский Университет Дружбы Народов" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном Макешовой Айнурой Бекболотовной, доктором медицинских наук, доцентом кафедры онкологии и гематологии факультета непрерывного медицинского образования ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» и Татаурщиковой Натальей Станиславовной, доктором медицинских наук, профессором, заведующей кафедрой клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии Факультета непрерывного медицинского образования ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», утверждённым Костиным Андреем Александровичем- первым проректором-проректором по научной работе ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» указала, что диссертация Першина

Дмитрия Евгеньевича является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача по улучшению диагностики редких врожденных состояний в области клинической иммунологии и гематологии. По своей актуальности, научной новизне, практической значимости, степени достоверности полученных результатов и объему выполненных исследований диссертационная работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 № 1024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а её автор, Першин Дмитрий Евгеньевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.28 Гематология и переливание крови, 3.2.7. Аллергология и иммунология.

Отзыв о научно-практической ценности диссертационной работы обсужден и утвержден на заседании кафедры онкологии и гематологии факультета непрерывного медицинского образования ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», протокол №10 от 21 марта 2023 года.

Выбор ведущей организации Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский Университет Дружбы Народов" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации основывается на том, что учреждение известно своими исследованиями в области гематологии, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и клеточной терапии, а также публикациями, близкими к теме защищаемой диссертации, способно оценить научную новизну и практическую значимость полученных результатов и дало своё согласие.

Соискатель имеет 53 опубликованные работы, в том числе 3 работы по теме диссертации все из которых опубликованы в научных изданиях, рекомендуемых в перечне ВАК Минобрнауки России для публикации диссертационных работ.

Наиболее значимые работы:

1. **Першин Д.Е.**, Лодоева О.Б., Фадеева М.С., Мерсиянова И.В., Хорева А.Л., Владимиров И.С., Воронин К.А., Бриллиантова В.В., Варламова Т.В., Ведмедская В.А., Родина Ю.А., Райкина Е.В., Масчан М.А., Щербина А.Ю. Разработка метода диагностики синдрома Вискотта–Олдрича путем оценки экспрессии белка WASP с использованием проточной цитофлуориметрии. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020;19(2):141-151. Степень участия 90%.
2. **Першин Д.Е.**, Ведмедская В.А., Фадеева М.С., Владимиров И.С., Кулаковская Е.А., Роппельт А.А., Киева А.М., Райкина Е.В., Родина Ю.А., Масчан М.А., Щербина А.Ю. Использование метода проточной цитофлуориметрии для верификации диагноза X-сцепленного лимфопролиферативного синдрома 1-го и 2-го типов. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020;19(4):108-118. Степень участия 90%.
3. **Першин Д.Е.**, Кулаковская Е.А., Хорева А.Л., Мерсиянова И.В., Ведмедская В.А., Фадеева М.С., Владимиров И.С., Малахова Е.А., Лодоева О.Б., Киева А.М., Райкина Е.В., Родина Ю.А., Масчан М.А., Щербина А.Ю. Феномен бимодальной экспрессии белка WASP у пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича при оценке с помощью проточной цитофлуориметрии. Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. 2021; 100 (2): 31– 40. Степень участия 95%.

Во всех вышеуказанных статьях можно отметить высокую степень личного участия автора: разработка дизайна исследования, проведение преаналитического и аналитического этапов исследования, формулирование целей и задач, анализ полученных результатов и литературных данных. Опубликованные в журнале «Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии» статьи «Разработка метода диагностики синдрома Вискотта–Олдрича путем оценки экспрессии белка WASP с использованием проточной цитофлуориметрии» и

«Использование метода проточной цитофлуориметрии для верификации диагноза Х-сцепленного лимфопролиферативного синдрома 1-го и 2-го типов», а также опубликованная статья «Феномен бимодальной экспрессии белка WASP у пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича при оценке с помощью проточной цитофлуориметрии» в журнале «Педиатрия им. Г.Н. Сперанского» являются наиболее значимыми работами по теме диссертации. В них отражены базовые исследования разработки и оценки значимости методов определения экспрессии внутриклеточных белков в диагностике и мониторинге пациентов с врожденными дефектами иммунитета, которые легли в основу данной диссертационной работы.

На диссертацию и автореферат поступили положительные отзывы от:

Усачевой Анны Юрьевны - кандидат медицинских наук, заведующая консультативно-диагностическим центром ОСП «Российская детская клиническая больница» ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России;

Роппельт Анны Артуровны – кандидат медицинских наук, врач консультативно-диагностического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения города Москвы;

Коноплянниковой Юлии Евгеньевны - кандидат медицинских наук, врач высшей категории, врач - аллерголог-иммунолог, заведующая центром аллергологии и иммунологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы "Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского Департамента здравоохранения города Москвы"

Все отзывы положительные, в них отмечена высокая актуальность темы исследования, научная новизна и практическая значимость диссертационной работы. Критических замечаний в отзывах, поступивших на автореферат диссертации Першина Дмитрия Евгеньевича, не содержится.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований были **разработаны** лабораторные протоколы для диагностики редких врожденных жизнеугрожающих состояний, таких как Синдром Вискотт-Олдрича и

X-сцепленный лимфопролиферативный синдром 1 и 2 типа, с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

Разработанные научно-исследовательские протоколы успешно внедрены в лечебно-диагностическую работу лабораторных и клинических подразделений ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Перспективный тип исследования позволил провести анализ биологического материала 540 пациентов, с подозрением на СВО (оценка экспрессии WASP n=178), ХЛП 1 типа (оценка экспрессии SAP n=165) и ХЛП 2 типа (оценка экспрессии XIAP n=197). В результате чего была сформирована репрезентативная, с учетом распространённости данных врождённых ошибок иммунитета, выборка: СВО – 56 пациентов, ХЛП 1 – 11 пациентов, ХЛП 2 типа – 10 пациентов.

Внедрение разработанных методов позволило установить корректный диагноз большинству пациентов и сформировать основные выводы диссертационного исследования обоснованы, полученные в соответствии с основными принципами доказательной медицины.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что **разработанная и внедрённая** лабораторная оценка пациентов с подозрением на СВО и ХЛП 1 и 2 типа, позволила с высокой долей достоверности установить или опровергнуть предполагаемый диагноз в течении 24 часов от момента поступления биологического материала в лабораторию. Наличие информации об экспрессии ключевых белков, непосредственно ускоряет и оптимизирует диагностические алгоритмы пациентов, нуждающихся в назначении корректной патогенетической терапии и проведении трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Автором **представлены** подробные рекомендации по хранению, подготовке и анализу биологического материала пациентов с подозрением на СВО и ХЛП 1 и 2

типа. А также изложены особенности, с которыми можно столкнуться при несоблюдение должествующих условий преаналитического этапа.

Вычислены и оптимизированы нижние пороговые диагностические значения экспрессии белка WASP, что позволяет поставить данный диагноз с 90,9% чувствительностью и 100% специфичностью. Разработанная и валидированная методика диагностики ХЛП 1 и 2 типов, позволяет установить данный диагноз с 92% чувствительностью и 100% специфичностью (для Т лимфоцитов).

Помимо основной диагностической функции, при проведении оценки экспрессии белка WASP **выявлено**, что лейкоциты пациентов с верифицированным диагнозом СВО несут различные уровни экспрессии белка. Учитывая имеющиеся разнообразие клинических фенотипов у пациентов с СВО, было **предложено** исследовать возможную имеющуюся зависимость между тяжестью клинической картины и уровнем экспрессии белка WASP. На основании **доказанной** обратной корреляции уровня экспрессии WASP и выраженности клинических симптомов, автором **предложено использование данного** критерия в качестве дополнительного, при прогнозировании тяжести течения заболевания и с целью принятия решения о сроках выполнения ТГСК.

Уникальной точкой приложения данного метода, является возможность его использования при исследовании уровня донорского химеризма у пациентов СВО после процедуры ТГСК. Метод был **применен** у пациентов перенесших процедуру ТГСК и продемонстрировал высокую сопоставимость со стандартными методами определения доли донорского химеризма основанными на методе ПЦР. В будущем, анализ такого рода может быть полезен у пациентов с СВО, в качестве дополнительного инструмента оценки эффективности проведения генной терапии.

Определены новые критерии для использования предложенных методов определения экспрессии белков WASP, SAP и XIAP в качестве инструмента определения статуса носительства мутаций генов *WAS*, *SH2D1A* у родственниц женского пола пациентов с подтвержденными диагнозами СВО и ХЛП 1 типа, с

целью дальнейшего семейного консультирования. В отличие от них, определение уровня экспрессии белка XIAP является более чувствительным к преаналитическим условиям, в связи с чем, не может быть рекомендовано в качестве рутинного теста определения носительства мутантного аллеля.

Разработанная методика может являться необходимым инструментом даже после проведения генетического тестирования, позволяя дополнить имеющуюся картину в отношении патогенности найденных генетических вариантов. В нашем исследовании это было продемонстрировано для 28 пациентов с СВО, 5 пациентов с ХЛП 1 и 10 пациентов с ХЛП 2 типа.

Изучение редкого феномена реверсивного мозаицизма способствует лучшему пониманию молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе врожденных иммунологических и гематологических заболеваний.

На основании подробных методологических данных проведенного анализа, предложенные лабораторные диагностические методы могут быть применены в лабораториях медицинских центров, занимающихся диагностикой и лечением пациентов с врожденными ошибками иммунитета.

Теоретическая значимость исследования обоснована детальным анализом лейкоцитов частично экспрессирующих нормальные значения уровней экспрессии белка WASP и SAP. Изучена природа частично восстановленной экспрессии в лейкоцитах периферической крови пациентов с СВО, а также проведено динамическое наблюдение за данными популяциями. По его результатам **доказано**, что в основе феномена частично восстановленной экспрессии белка WASP лежат, как дополнительные мутации, так и истинные обратные мутации, восстанавливающие дикий тип последовательности гена.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии во всех этапах работы – в анализе литературных данных, в постановке цели и определении задач, представлении результатов работы на конференциях и конгрессах. Автор лично принимал участие в пробоподготовке биологического материала пациентов,

обработке данных полученных с проточных цитофлюориметров, а также в анализе необходимой медицинской документации пациентов, вошедших в исследование. Соискателем была проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Установлена взаимосвязь и взаимодополнение авторских результатов с результатами, представленными в независимых зарубежных источниках по данной тематике, когда такое сравнение является обоснованным.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что работа **построена** на проверяемых данных, может быть воспроизведена в практике специализированных лабораторий и медицинских учреждений, согласуется с опубликованными в зарубежной литературе данными по теме диссертации. **Идея базируется** на анализе и обобщении клинико-лабораторных данных, полученных в ходе исследования у детей с СВО и ХЛП 1 и 2 типа.

В ходе защиты диссертации критических замечаний не было.

Соискатель Першин Дмитрий Евгеньевич аргументированно ответил на все задаваемые в ходе заседания вопросы. В ходе дискуссии не возникло вопросов в высокой значимости, актуальности и новизне работы. Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной задачи.

Диссертация Першина Дмитрия Евгеньевича представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями и дополнениями в редакциях Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.21 г. № 426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

На заседании диссертационного совета 21.1.025.01 от «11» апреля 2023 г., за решение важной задачи, нацеленной на улучшение диагностики тяжелых врожденных гематологических и иммунологических заболеваний, с помощью разработки быстрых и точных лабораторных методов, основанных на внутриклеточной оценке экспрессии ключевых белков для СВО и ХЛП 1 и 2 типов, имеющей существенное значение для специалистов в областях гематология с переливанием крови, аллергология и иммунология, диссертационный совет принял решение присудить Першину Дмитрию Евгеньевичу ученую степень кандидата медицинских наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 24 человек, из них 9 – докторов наук по специальности 3.1.28 Гематология и переливание крови и 3 доктора наук по специальности 3.2.7. Аллергология и иммунология, участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 3 человека, проголосовали: за – 24, против – 0, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель заседания-

Заместитель председателя диссертационного совета,

Член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук,

профессор

Алексей Александрович Масчан

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук



Николай Владимирович Жуков

«11» апреля 2023 г.