

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

**доктора медицинских наук профессора Серебряной Натальи Борисовны на диссертационную работу Сайтгалиной Марии Александровны «Оценка состояния иммунной системы пациентов при вирусных инфекциях с помощью количественного определения молекул TREC и KREC в периферической крови», представленную к защите в диссертационный совет 04.1.001.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 3.2.7. Иммунология**

### **Актуальность темы исследования**

Иммуносупрессивное влияние вирусов известно иммунологам с 20-х годов XX века, когда было показано, что перенесенная корь отменяет гиперчувствительность замедленного типа к микобактериям туберкулеза у вакцинированных лиц. За последние десятилетия список вирусов, повреждающих различные звенья иммунной защиты существенно расширился за счет как РНК-, так и ДНК содержащих вирусов. Недавно все внимание медицинского сообщества было приковано к инфекции SARS-COVID-2, которая также связана с серьезной иммунной дисфункцией, особенно при тяжелых формах инфекции и в условиях «долгого Ковида».

С другой стороны, опыт клинической иммунологии позволил установить, что наличие определенного первичного иммунного дефекта определяет сверхтяжелое или атипичное течение ряда вирусных инфекций. Особую важность для противовирусной защиты имеют клетки адаптивного иммунитета – Т- и В-лимфоциты. Это определяет чрезвычайную актуальность проблемы определения состояния иммунной системы для своевременной профилактики тяжелых форм вирусных инфекций и поисков соответствующих методов терапии.

В связи с изложенным, диссертационная работы Сайтгалиной Марии Александровны, направленная на оценку состояние иммунной системы, а именно процессов формирования Т- и В-лимфоцитов у взрослых лиц при острых и хронических вирусных инфекциях для прогнозирования тяжести течения и исхода заболеваний, представляется чрезвычайно актуальной.

## Научная новизна исследования

Для улучшения диагностики иммунных дефектов, развивающихся при вирусных инфекциях, автор предложила использовать метод количественного определения ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови, который дает информацию о работе первичных органов иммунной системы – костного мозга и тимуса, а именно о процессе формирования наивных Т- и В-лимфоцитов. Такая информация не может быть получена традиционными методами клинической лабораторной диагностики, и, следовательно, позволяет нам глубже понять причины иммунных нарушений и их последствия. Для получения достоверной информации о развитии Т- и В-лимфоцитов автором разработана оптимизированная тест-система на основе технологии ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени, определены ее основные аналитические характеристики, получена новая информация о референтных интервалах молекул TREC и KREC в периферической крови у людей разных возрастных групп, а также у больных ВИЧ-инфекцией и COVID-19. Полученная автором информация позволила определить прогностическую значимость оценки уровней TREC и KREC для определения тяжести течения и исхода инфекционных заболеваний.

## Достоверность и апробация результатов

Исследования проведены на материале 7851 здоровых лиц и больных первичными иммунодефицитами, ВИЧ-инфицированных и лиц с подтвержденным диагнозом коронавирусная инфекция COVID-19. Всего проведено 21513 исследований, значительная часть которых – при разных формах, стадиях инфекционного процесса. О состоянии лимфоцитов судили на основании фенотипирования клеток периферической крови с использованием метода многоцветной проточной цитометрии. В целях исключения влияния на результаты исследования острых инфекционных заболеваний определяли антитела различных изотипов к инфекциям *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*. Методом ПЦР в биообразцах выявляли РНК вирусов гепатитов В и С, вируса иммунодефицита человека, вирусов Эпштейна-Барр, герпеса 6 типа, цитомегаловируса.



Все полученные данные обработаны методами статистического анализа с корректным использованием непараметрических критериев при помощи современных компьютерных программ. Кроме того, использован метод бинарного классификатора (ROC-анализ) с вычислением значения площади под ROC-кривой (AUC). Приведенные данные позволяют отметить, что работа проведена на широком лабораторном материале с использованием современных методов исследования. Адекватность методов исследования целям работы и корректность статистической обработки полученных результатов не вызывает сомнений.

Материалы диссертации в достаточном объеме доложены и обсуждены на многочисленных всероссийских и международных научных конференциях и форумах, проходивших в 2021-2023 гг.

### **Теоретическая и практическая значимость полученных результатов**

Основная практическая ценность диссертационной работы состоит в разработке оригинальной тест-системы на основе использования технологии ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени для определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови. В отличие от уже имеющихся на российском рынке ПЦР-наборов для анализа уровней TREC/KREC в периферической крови, данная тест-система использует не один ген внутреннего контроля для нормирования количественных результатов, а два, что повышает надежность полученных результатов. Автором определены основные аналитические и диагностические характеристики разработанной тест-системы; установлены референтных интервалов уровней TREC и KREC в периферической крови детей и шести возрастных группах взрослого населения Санкт-Петербурга.

Использование разработанной тест-системы позволило автору получить новый теоретически значимый материал об уровнях молекул TREC и KREC в крови ВИЧ-инфицированных лиц с разным уровнем вирусной нагрузки и применяемой терапией, а также у больных с инфекцией COVID-19 при разной степени тяжести состояния и разным исходом заболевания.

### **Лично участие автора в разработке научной проблемы**

Диссертант принимала личное участие в планировании диссертационной работы, определение целей и задач исследования, во всех этапах лабораторных

исследований, проведении. Самостоятельно провела статистическую обработку и анализ полученных результатов (под руководством и при участии научных руководителей). М.А. Сайтгалиной написан текст диссертации и автореферата.

### **Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом**

Диссертация изложена на 146 страницах компьютерного текста, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», 3 глав, посвященных описанию результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы. Диссертация иллюстрирована 54 рисунками, представлено 27 таблицы, список литературы включает 107 источника, из которых 18 – работы отечественных авторов, 89 - зарубежных. Значительное число процитированных работ опубликовано за последние 5 лет.

В обзоре литературы на основании анализа отечественных и зарубежных источников автором охарактеризованы первичные иммунодефициты, в том числе проявляющиеся у взрослых. Описана роль клеток адаптивного иммунитета в развитии иммунодефицитных состояний. Подробно обсуждены генетические события при создании генов антигенраспознающих рецепторов Т- и В-лимфоцитов, в том числе приводящие к формированию эксцизионных колец TREC и KREC. Указаны методы определения иммунного статуса и количественной оценки TREC и KREC в периферической крови.

В разделе работы «Материалы и методы» автор подробно описывает все этапы разрабатываемого метода, оценивает его аналитические характеристики, в том числе специфичность, воспроизводимость аналитический диапазон, точность и линейность измерений. Особое внимание уделено методам экстракции нуклеиновых кислот из цельной крови и сухих пятен.

В разделе работы, посвященном изложению результатов собственных исследований (главы 3-5), автором проанализированы выбор нормировочных генов, условия ПЦР-реакции в реальном времени и оценка результатов. Приведены данные математического и статистического анализа, позволившие определить чувствительность и специфичность метода, линейность и точность измерений, внутри- и межсерийную воспроизводимость. Проанализирован диагностическая



значимость разработанного метода для больных ВИЧ и COVID-19, описаны особенности преаналитического этапа и возможные ошибки при пробоподготовке.

При обсуждении полученных данных автор отталкивается от трудностей, с которыми сталкиваются при определении концентраций ДНК-молекул TREC и KREC, когда речь идет о взрослых лицах, для которых характерны относительно низкие уровни указанных молекул по сравнению с новорожденными, и подробно описывает методические приемы, использованные при разработке тест-системы и ее применении, позволившие добиться искомой точности при работе с пациентами с вирусными инфекциями и врожденными иммунодефицитами.

Работа заканчивается 6 выводами и практическими рекомендациями, логично вытекающими из основных материалов диссертации. Выводы отражают новизну, теоретическую и практическую значимость проведенных исследований. Все выводы диссертации логично вытекают из глубокого анализа и обобщения результатов исследования и поэтому не вызывают возражений.

#### **Замечания и вопросы по диссертационной работе**

Работа написана хорошим литературным языком. Принципиальных замечаний нет. В качестве дискуссионного вопроса, хотелось бы уточнить, в какой степени определение TREC и KREC повышает прогностическую значимость диагностической разработки больных ВИЧ и COVID-19. В лечебных учреждениях какого типа рекомендуется внедрить разработанный автором метод?

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертация Сайтгалиной Марии Александровны на тему «Оценка состояния иммунной системы пациентов при вирусных инфекциях с помощью количественного определения молекул TREC и KREC в периферической крови», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 3.2.7. Иммунология, является законченной научной квалификационной работой, в которой решена актуальная задача, а именно доказана диагностическая и прогностическая значимость оценки уровней молекул TREC и KREC в периферической крови пациентов при вирусных инфекциях (ВИЧ-инфекции и

значимость разработанного метода для больных ВИЧ и COVID-19, описаны особенности преаналитического этапа и возможные ошибки при пробоподготовке.

При обсуждении полученных данных автор отталкивается от трудностей, с которыми сталкиваются при определении концентраций ДНК-молекул TREC и KREC, когда речь идет о взрослых лицах, для которых характерны относительно низкие уровни указанных молекул по сравнению с новорожденными, и подробно описывает методические приемы, использованные при разработке тест-системы и ее применении, позволившие добиться искомой точности при работе с пациентами с вирусными инфекциями и врожденными иммунодефицитами.

Работа заканчивается 6 выводами и практическими рекомендациями, логично вытекающими из основных материалов диссертации. Выводы отражают новизну, теоретическую и практическую значимость проведенных исследований. Все выводы диссертации логично вытекают из глубокого анализа и обобщения результатов исследования и поэтому не вызывают возражений.

#### **Замечания и вопросы по диссертационной работе**

Работа написана хорошим литературным языком. Принципиальных замечаний нет. В качестве дискуссионного вопроса, хотелось бы уточнить, в какой степени определение TREC и KREC повышает прогностическую значимость диагностической разработки больных ВИЧ и COVID-19. В лечебных учреждениях какого типа рекомендуется внедрить разработанный автором метод?

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертация Сайтгалиной Марии Александровны на тему «Оценка состояния иммунной системы пациентов при вирусных инфекциях с помощью количественного определения молекул TREC и KREC в периферической крови», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 3.2.7. Иммунология, является законченной научной квалификационной работой, в которой решена актуальная задача, а именно доказана диагностическая и прогностическая значимость оценки уровней молекул TREC и KREC в периферической крови пациентов при вирусных инфекциях (ВИЧ-инфекции и



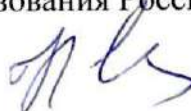
инфекции COVID-19), что имеет практическое применение и играет важную роль для развития клинической лабораторной диагностики и иммунологии.

По актуальности темы, поставленным задачам, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов, обоснованности научных выводов диссертационная работа Сайтгалиной М.А. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в пунктах 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции), а ее автор, Сайтгалина Мария Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научным специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 3.2.7. Иммунология

**Официальный оппонент**

Доктор медицинских наук, профессор,  
заведующая лабораторией общей иммунологии отдела иммунологии  
федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Институт экспериментальной медицины»  
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

«30» Мая 2024 г.

 Серебряная Наталья Борисовна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12  
Телефон: 8 (812) 234-68-68  
E-mail: iem@iemspb.ru

Подпись Серебряной Натальи Борисовны удостоверяю:  
Начальник УРП и ОДО ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»  
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

