

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора РАН, член-корреспондента РАН Свитич Оксаны Анатольевны 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» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 3.2.7. Иммунология

Актуальность темы диссертационного исследования

Как известно, иммунодефицитные состояния представляют собой широкий спектр наследственных (первичных) и приобретенных (вторичных) состояний, характеризующихся специфическими аномалиями, затрагивающими множество гуморальных, клеточных и фагоцитарных иммунологических путей. Нарушения механизмов иммунной защиты гуморального или клеточного звена наиболее часто проявляются, как неспособность осуществлять адекватную противoinфекционную защиту.

В начале 21 века определение уровней молекул TREC и KREC в периферической крови зарекомендовало себя как надежный диагностический инструмент выявления нарушений в функционировании Т- и В-клеточного компартмента иммунной системы, соответственно, при осуществлении программ скрининга новорожденных в разных странах мира. Однако, при работе со взрослыми пациентами важно учитывать такие процессы, как возрастная инволюция тимуса, что, несомненно, влияет на содержание в крови Т-клеточных эксцизионных колец в норме. Стоит отметить, что на территории РФ не зарегистрировано ни одной тест-системы для ПЦР-диагностики молекул TREC и KREC у взрослого населения. Кроме того, не описана динамика количественного содержания в крови молекул TREC и KREC при инфекционных заболеваниях в зависимости от тяжести состояния пациентов, сроков инфицирования, исхода заболевания, этнической принадлежности больных и других факторов. Исходя из вышесказанного, актуальность темы диссертационной работы Сайтгалиной Марии Александровны «Оценка состояния иммунной системы пациентов при вирусных инфекциях с помощью количественного определения молекул TREC и KREC в периферической крови», а также поставленных в работе задач не вызывает сомнений.

Научная новизна проведенного исследования и полученных результатов

В ходе выполнения диссертационной работы была разработана и зарегистрирована тест-система для количественной ПЦР-диагностики

молекул TREC и KREC в периферической крови, как среди детской, так и среди взрослой популяции. Впервые в России установлены границы нормы содержания молекул TREC и KREC в зависимости от возраста индивидуума. Впервые проведена валидация ПЦР-анализа уровней TREC и KREC для прогноза тяжести состояния у ВИЧ-инфицированных и COVID-инфицированных пациентов.

В ходе работы доказано достоверное снижение количественного содержания молекул TREC и KREC в периферической крови у ВИЧ-инфицированных больных с высокой вирусной нагрузкой и большой длительностью течения заболевания. Доказано снижение уровней TREC и KREC в острый период у COVID-инфицированных больных в тяжелом состоянии. Установлена связь между определением аналита KREC ниже порогового значения $48,55$ копий/ 10^5 клеток крови и наступлением смерти инфицированного больного.

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

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечена тщательной теоретической проработкой проблемы, достаточным объемом исследованного материала, применением современных лабораторных методов исследования и инструментов статистического анализа. Для установления границ нормы аналитов TREC и KREC у новорожденных в ходе работы проанализировано более 5000 образцов, у взрослых возрастных групп – более 1000 человек. Для оценки количественного содержания молекул TREC и KREC в крови COVID-инфицированных пациентов проанализировано более 1000 образцов крови и для оценки уровней TREC и KREC у ВИЧ-инфицированных пациентов проанализировано более 100 образцов крови.

Поставленные диссертантом цель и задачи исследования соответствуют названию работы и ее содержанию. Выносимые на защиту положения аргументированы и логично вытекают из материалов диссертации. Выводы диссертационной работы логически обоснованы и полностью соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Практическая и теоретическая значимость диссертационной работы

Практическая значимость диссертационной работы Сайтгалиной М.А. заключается в том, что автору удалось показать принципиальную возможность использования уровней аналитов TREC и KREC в крови пациентов для прогнозирования тяжести течения и исхода заболевания при вирусных инфекциях.

В диссертационной работе продемонстрировано, что при ВИЧ-инфекции сниженные уровни молекул как TREC, так и KREC фиксируют только у больных с высоким уровнем вирусной нагрузки и неэффективными схемами антиретровирусной терапии. В то время как у пациентов с низкой вирусной нагрузкой уровни TREC и KREC достоверно не отличаются от контрольной группы. Также продемонстрировано, что в случае новой коронавирусной инфекции COVID-19 имеют место статистически значимые различия в уровнях TREC и KREC у групп пациентов с разной степенью тяжести течения заболевания.

Полученные диссертантом данные позволили выявить лабораторный молекулярный маркер (аналит KREC), который может быть использован для оценки прогноза смертельного исхода при инфекции COVID-19.

Теоретическая значимость заключается в том, что работа Сайтгалиной М.А. расширяет представления о процессах лимфоцитарного неогенеза во время инфекционных процессов, которые непосредственно влияют на развитие тяжелых и жизнеугрожающих состояний.

Оценка личного вклада соискателя в разработку научной проблемы

Все этапы диссертационной работы выполнены при непосредственном участии автора. Автором самостоятельно проведен обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Автор лично принимал участие в разработке принципиально новой ПЦР-тест-системы, в ее апробации и регистрации, проводил преаналитическую подготовку образцов крови к исследованию, молекулярно-биологический анализ ДНК-образцов, статистический анализ полученных результатов. Диссертантом произведена интерпретация полученных результатов, сформулированы выводы, обозначены дальнейшие перспективы разработки темы исследования, оформлен текст диссертации.

Объем и структура диссертации, оценка ее завершенности

Диссертация изложена на 146 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 107 источников, в том числе 18 отечественных и 89 зарубежных. Текст содержит 27 таблиц и 54 рисунка.

Во введении автор обосновывает актуальность выполненного исследования, формулирует цель, ставит задачи, необходимые для ее достижения. Последовательность сформулированных задач, требующих

решения, соответствует теме диссертации, а их решение служит основанием достижения цели работы.

В первой главе «обзор литературы» автор анализирует существующие методы оценки функционирования Т- и В-клеточного компартмента иммунной системы при первичных и вторичных иммунодефицитных состояниях, описывает их недостатки и ограничения. С одной стороны, подробное описание наиболее часто встречающихся иммунодефицитных состояний и трудностей при их диагностике указывает на глубокую проработанность научной проблемы, с другой стороны, можно отметить, что большое внимание уделено описанию врожденных нарушений иммунитета, хотя тема диссертационной работы посвящена вирусным инфекциям.

Во второй главе «Материалы и методы» приведена подробная характеристика клинического материала, а также методы лабораторных исследований, применяемые соискателем в ходе выполнения задач и достижения цели работы. Объем клинического материала является более чем достаточным для обстоятельного анализа полученных результатов и обоснования научных выводов. Также в этой главе подробно описаны применяемые статистические методы и инструменты расчета параметров аналитической и диагностической значимости разработанной тест-системы.

В третьей главе диссертационной работы подробно описаны все этапы разработки ПЦР-анализа, начиная с подбора олигонуклеотидных праймеров и других компонентов и условий реакции, и заканчивая, описанием интерпретации результатов анализа. Стоит отметить обилие иллюстрационных материалов в этой главе, которые облегчают понимание текста диссертации.

В четвертой главе приведены подробные вычисления и описание аналитических характеристик разработанного лабораторного метода.

В пятой главе доказана диагностическая значимость метода, как при первичных иммунодефицитах, так и при острых и хронических вирусных инфекциях. Стоит отметить, что большое внимание в пятой главе уделено описанию особенностей преаналитического этапа, и подготовки образцов крови и образцов ДНК, подробно проанализированы возможные ошибки на стадии пробоподготовки, описано влияние выбора метода экстракции нуклеиновых кислот на определяемые уровни TREC/KREC.

В шестой главе «Обсуждение» приведен сравнительный анализ и сопоставление полученных в ходе работы над диссертацией данных с совокупностью данных, имеющихся в зарубежной и отечественной литературе, что дает основание для формулирования полноценных выводов.

Диссертационная работа заканчивается практическими рекомендациями, которые могут служить ценным дополнением в инструментах клинико-лабораторной диагностики для уточнения прогноза течения вирусных заболеваний.

Материалы диссертации полностью отражены в автореферате и в достаточном количестве опубликованных работ (22 печатные работы по теме диссертации, из них 7 научных статей в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК).

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Принципиальных замечаний по работе нет. Научная и практическая важность исследования не вызывает сомнений. Однако, так как в процессе обсуждения собственных результатов автор не объясняет возможные механизмы нарушений в процессах дифференцировки Т- и В-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции и Новой коронавирусной инфекции COVID-19, возникает ряд вопросов:

1. Какие механизмы могут лежать в основе нарушения созревания новых наивных лимфоцитов в центральных лимфоидных органах при описанных инфекциях?
2. Каким образом дефекты созревания лимфоцитарных клеток, и, следовательно, сниженные уровни молекул TREC и KREC повлияют на течение вирусного инфекционного процесса?
3. Были ли среди обследованных инфицированных больных пациенты с врожденными нарушениями иммунитета? Как протекал у них инфекционный процесс?

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 самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальных задач, направленных на оценку состояния лимфоцитарного неогенеза у пациентов при вирусных инфекциях с помощью количественной диагностики молекул TREC и KREC в периферической крови, что имеет существенное значение для клинической лабораторной диагностики иммунодефицитных состояний и иммунологии в целом.

По актуальности избранной темы, поставленным задачам, новизне и значимости полученных результатов, обоснованности научных выводов диссертационная работа Сайтгалиной М.А. соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Сайтгалина Мария Александровна, заслуживает присуждения искомой 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 РАН, член-корреспондент РАН, директор федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

«17» мая 2024 г.

Свитич Оксана Анатольевна

105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а
телефон: +7 (495) 917-49-00
e-mail: mech.inst@mail.ru

Подпись проф. РАН, член-корр. РАН, д.м.н. Свитич О.А.
ЗАВЕРЯЮ

Заместитель директора федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, к.м.н.



Артемьева Ольга Владимировна