

УТВЕРЖДАЮ
Временно исполняющий обязанности
заместителя начальника академии
по научной работе
кандидат медицинских наук доцент
Д.В.Овчинников

«30» 05 2024 г.
рег. № 4/16/ 427



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Сайтгалиной Марии Александровны «Оценка состояния иммунной системы пациентов при вирусных инфекциях с помощью количественного определения молекул TREC и KREC в периферической крови», представленной к защите в диссертационный совет Д 04.1.001.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России на соискание учёной степени кандидата биологических наук по научным специальностям: 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 3.2.7. Иммунология

Актуальность избранной темы

Одним из наиболее тяжелых и наиболее изученных иммунодефицитных состояний, вызываемых вирусными инфекциями, является синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), который развивается в результате инфицирования вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Главной мишенью вируса являются Т-лимфоциты, несущие на своей поверхности рецептор CD4+, однако и другие клетки гемопоэтического ряда, могут быть поражены. Один из корецепторов CXCR4, необходимый для проникновения вируса в клетку, экспрессирован на поверхности наивных Т-лимфоцитов и первичных тимоцитов. Таким образом, потенциально, ВИЧ может поражать не дифференцированные и наивные лимфоциты.

Также большой интерес вызывает влияние на лимфоцитарные функции вируса SARS-CoV-2 в связи с его широким распространением среди популяции в последние годы. Накопленные на сегодняшний день знания о патогенезе инфекции COVID-19 позволяют говорить о том, что одним из факторов, определяющих тяжесть состояния пациентов, является лимфопения, обусловленная истощением как циркулирующих, так и дифференцирующихся Т- и В-клеток.

Лимфопении при вирусных инфекциях могут развиваться посредством разных механизмов, при этом восстановление количества созревающих и циркулирующих лимфоцитов играет существенную роль для выздоровления, а иногда и для сохранения жизни пациента. Ввиду вышесказанного оценка состояния иммунной системы пациентов при вирусных инфекциях с помощью количественного определения молекул TREC и KREC в периферической крови, несомненно, является актуальной, так же, как и разработка лабораторного теста, доступного для широкого использования в клинической практике, для выявления нарушения или восстановления процессов созревания лимфоцитов *de novo*. В связи с тем, что представленные на российском рынке тест-системы для ПЦР-анализа уровней TREC и KREC предназначены для определения содержания этих анализов у детей, установление границ нормы содержания молекул TREC и KREC в периферической крови у пациентов разных возрастных групп, также, является актуальной задачей.

Применение количественной оценки эксцизионных колец TREC и KREC в периферической крови, в качестве суррогатных маркеров созревания лимфоцитов в центральных лимфоидных органах, нашло широкое применение в программах неонатального скрининга с целью выявления новорожденных с тяжелыми формами первичных иммунодефицитов (ПИД) в первую неделю жизни для оказания неотложной помощи. При этом, как в нашей стране, так и за рубежом в последние годы прослеживается тенденция роста количества взрослых пациентов с выявляемыми первичными иммунодефицитами. Для многих таких пациентов,

также, как и для пациентов с вторичными иммунодефицитами, выявление уровней TREC и KREC является важным лабораторным исследованием.

Таким образом актуальность выполненного Сайтгалиной М.А. диссертационного исследования не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования и полученных результатов

В представленной работе впервые проведена валидация ПЦР-анализа уровней TREC и KREC для прогноза тяжести течения и исхода заболевания в острый период у больных COVID-19, в том числе для оценки тяжести иммунодефицитного состояния у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

В ходе работы разработана оригинальная тест-система для количественной оценки ДНК-молекул TREC и KREC в периферической крови у взрослых и детей с детекцией результатов в режиме реального времени. Впервые в тест-системе для количественной оценки ДНК-молекул TREC и KREC методом ПЦР использованы два гена «домашнего хозяйства» для нормировки количественных данных, что позволяет повысить точность и снизить вариабельность результатов анализа.

В ходе работы впервые были определены референтные интервалы содержания эксцизионных колец TREC и KREC в периферической крови в шести возрастных группах взрослого населения Санкт-Петербурга. Было доказано, что на снижение уровней молекул TREC и KREC у ВИЧ-инфицированных пациентов могут влиять: время, прошедшее с момента инфицирования пациента, величина вирусной нагрузки и эффективность применяемой антиретровирусной терапии. Определено достоверное снижение уровней молекул TREC и KREC у тяжелых больных с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. А также впервые установлена прогностическая значимость оценки уровня KREC для прогноза исхода заболевания при инфекции COVID-19.

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Сайтгалиной М.А. выполнена на высоком методическом уровне, в работе использованы современные и актуальные молекулярно-биологические и статистические методы анализа.

Сформулированные цель, задачи, научные положения и рекомендации работы обоснованы и подтверждаются материалами, представленными в работе. Выводы, сделанные автором, основываются на результатах проведенных исследований и вытекают из поставленных задач. Достоверность и обоснованность результатов исследования обеспечена тщательным анализом как отечественных, так и зарубежных литературных источников, посвященных изучаемой проблеме, использованием современных методов исследования, соответствующих цели и задачам исследования, качественным и глубоким статистическим анализом данных, репрезентативным объемом выборки обследованных лиц (всего в ходе работы проанализирован биологический материал, полученный от 7851 лиц). Статистическая значимость полученных данных не вызывает сомнений.

По материалам диссертации опубликовано 22 научные работы, в том числе 7 научных статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований. В опубликованных работах в полной мере изложены основные положения диссертации.

Получен патент на изобретение: Останкова Ю.В., Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Тотолян А.А. «Способ лабораторной персонифицированной диагностики состояния иммунитета пациентов и набор олигодезоксирибонуклеотидных праймеров, и флуоресцентно меченых зондов, и стандартных образцов» (патент 2786211 с1, патент 19.12.2022., заявка № 2022107106 от 17.03.2022).

Общая характеристика работы

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. Работа содержит 27 таблиц и 54 рисунка.

В введении изложена актуальность проблемы, указана цель и задачи исследования, научная новизна и основные положения, выносимые на защиту. Диссертант вынес на защиту три основных положения, которые обоснованы в тексте работы.

В литературном обзоре представлен обширный материал по исследуемой диссертантом теме. Подробно описаны особенности иммунодефицитных состояний, роль исследования иммунного статуса и данные, накопленные к настоящему времени по тем положениям, которые автор выносит на защиту.

В «Материалах и методах» описаны все используемые в работе методы исследований. Используемые в работе методы соответствуют международному уровню и позволяют решить основную цель – оценить состояние иммунной системы взрослых лиц при острых и хронических вирусных инфекциях для прогноза тяжести течения и исхода заболеваний на основе разработанной тест-системы для количественного определения ДНК-молекул TREC и KREC.

Во всех исследованиях автор использует современные методики, работа проведена на сертифицированном оборудовании.

Результаты собственных исследований, изложенные в трёх главах получены на репрезентативной выборке, представлены подробно, с хорошим иллюстративным материалом, с ясными и логическими выводами. Объективность и достоверность научных результатов не вызывают сомнений, так как они основаны на квалифицированном комплексном использовании современных методов, соответствующих поставленным задачам.

Выводы обоснованы и отражают представленную работу. На основе выво-

дов формируются практические рекомендации для врачей инфекционистов и врачей клинической лабораторной диагностики.

Автореферат отражает содержание диссертации

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость диссертационного исследования Сайтгалиной М.А. определяется тем, что полученные результаты расширяют представление о механизмах инфекционного процесса при острых и хронических вирусных заболеваниях. Полученные результаты дают представление о нормальном содержании молекул TREC и KREC в крови и об изменении этих норм в зависимости от возраста, пола или других факторов. Установленное в ходе выполнения работы снижение уровней молекул TREC и KREC в крови при увеличении тяжести заболевания как при новой коронавирусной инфекции COVID-19, так и при ВИЧ-инфекции, даёт возможность оценки общей реакции иммунной системы на инфекционный процесс.

Практическая значимость диссертации Сайтгалиной М.А. заключается в разработанном новом методе оценки состояния иммунной системы пациентов, который не требует значительных экономических и временных затрат на выполнение анализа, а также не является технологически сложным. Разработанный метод количественной оценки ДНК-молекул TREC/KREC в периферической крови имеет высокие показатели диагностической значимости при выявлении первичных и вторичных иммунодефицитных состояний. Анализ уровней молекул TREC и KREC у инфицированных больных позволяет дать оценку функциональной активности Т- и В-клеточного звеньев иммунитета, и, следовательно, выявлять пациентов с повышенным риском развития тяжелого течения заболевания, для оказания своевременной помощи. Таким образом, метод анализа уровней молекул TREC и KREC можно отнести к методам превентивной диагностики, направленной на повышение выживаемости больных.

Автором зарегистрировано медицинское изделие «Набор реагентов для количественного определения эксцизионных колец TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (TREC/KREC-Amp PS)» (рег. удостоверение № МИ-RUBY-000031, действительно на территории Российской Федерации и Республики Беларусь).

**Рекомендации по использованию результатов и выводов,
полученных в диссертации**

Разработанный диссертантом лабораторный метод количественной оценки ДНК-молекул TREC/KREC в периферической крови целесообразно использовать в работе лабораторных отделений медицинских стационаров, специализированных для лечения инфекционных больных с целью оценки состояния иммунной системы пациентов при вирусных инфекциях и выявления пациентов с повышенным риском осложнений. Кроме того, данный метод можно рекомендовать для внедрения в специализированные иммунологические и научные центры, работающие с пациентами, страдающими различными формами иммунодефицитов с целью уточнения диагноза и планирования терапии.

Результаты диссертационного исследования Сайтгалиной М.А. используются в практической и научно-исследовательской работе федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», а также в учебном процессе кафедры иммунологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова».

В результате проведенного исследования подготовлен проект методических рекомендаций «Применение метода полимеразной цепной реакции для выявления первичных иммунодефицитов в целях прогноза и профилактики инфекционных осложнений» МР 3.3. -24 (на стадии утверждения).

Замечания и вопросы

Принципиальных замечаний по существу диссертационного исследования Сайтгалиной М.А. нет. В работе имеются незначительные погрешности, которые не влияют на научную ценность проведенного исследования.

В ходе ознакомления с работой возникли следующие вопросы:

1. Исходя из представленных в работе результатов, следует, что снижение уровней TREC и KREC фиксировали у пациентов при тяжелом течении заболевания, либо в тех случаях, когда проводимая терапия не была эффективна. Есть ли данные об уровнях этих молекул при выздоровлении (в случае коронавируса) либо при улучшении состояния пациента?

2. В работе получены данные о границах нормы уровней TREC и KREC у новорожденных детей и у лиц старше 18 лет. По какой причине в работу не включены лица до 18 лет? Есть ли данные о нормах содержания TREC и KREC у детей до 18 лет? Если есть, отличаются ли эти нормы от новорожденных?

3. Каковы пороговые значения (cut off) по содержанию TREC и KREC у пациентов с ВИЧ инфекцией?

4. Отмечена ли Вами разница в содержании TREC и KREC между пациентами со среднетяжёлым и тяжёлым течением заболевания при COVID-19?

Заключение

Диссертация Сайтгалиной Марии Александровны «Оценка состояния иммунной системы пациентов при вирусных инфекциях с помощью количественного определения молекул TREC и KREC в периферической крови» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований решена актуальная задача, имеющая существенное значение для клинической лабораторной диагностики и иммунологии – доказана диагностическая информативность определения уровней молекул TREC и KREC в

периферической крови ВИЧ-инфицированных и COVID-19-инфицированных пациентов с разной степенью тяжести состояния и с разным исходом заболевания.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов, представленная диссертация полностью соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (действующая редакция), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а 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.

Отзыв заслушан, обсужден и одобрен на заседании кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, протокол № 168 от «23» мая 2024 г.

Профессор кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики
доктор медицинских наук, доцент

«29» мая 2024 г.



Роман Арикович Грашин

Подлинность подписи доцента Р.А. Грашина заверяю.



СТАРШИЙ ПОМОЩНИК
НАЧАЛЬНИКА ОТДЕЛА КАДРОВ
ВОЕННО-МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИИ
ПОДПОЛИТЕНАНТ
К. ШЕЛКО



ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, лит. Ж. Тел: 8 (812) 667-71-18, e-mail: vmeda-nio@mil.ru; тел. +7(812)667-71-18; Grashin62@mail.ru