

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертацию Демина Михаила Валерьевича, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему: «Изучение мутационного статуса гена фосфотрансферазы цитомегаловируса и вируса герпеса человека 6, выделенных от реципиентов гемопозитических стволовых клеток» по специальности 1.5.10 – «Вирусология»**

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Вирусные инфекции являются одной из чрезвычайно важных проблем у пациентов с вторичным иммунодефицитом, в частности, у реципиентов трансплантата гемопозитических стволовых клеток (ТГСК). Этому способствует целый ряд компрометирующих факторов: высокоинтенсивная иммуноабляция до трансплантации для профилактики острого криза отторжения трансплантата; иммуносупрессивная терапия после трансплантации для профилактики РТПХ; активное использование современных препаратов (в том числе клеточных геномодифицированных) с таргетным эффектом на различные субпопуляции лимфоцитов и цитокиновые рецепторы; отсроченная иммунореконституция и т.д. Все это приводит к тому, что роль вирусных инфекций, как в структуре заболеваемости, так и структуре смертности после трансплантации является весьма значимой.

Вирусные инфекции герпетической группы, учитывая их широкую распространенность, относятся к категории наиболее важных, как с точки зрения тяжести клинической симптоматики, так и частоты развития после ТГСК. Тяжелые последствия и риски неблагоприятных исходов вирусных

инфекций могут быть ассоциированы с целым рядом проблем, к числу которых безусловно относится и появление мутаций, приводящих к неспособности вирусоспецифических препаратов ингибировать репликацию вирусного генома.

### **Структура и содержание диссертационной работы**

Диссертационная работа изложена на 122 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 13 рисунками, содержит 8 таблиц. Список литературы включает 117 литературных источников: 4 отечественных и 113 зарубежных источников.

В первой главе "Введение" обоснована актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, научная новизна и практическая ценность, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Вторая глава диссертации посвящена обзору литературных данных о характеристиках вирусов ЦМВ и ВГЧ-6 и о клинических проблемах, ассоциированных с  $\beta$ -герпесвирусами после ТГСК. Кроме того, достаточно подробно представлены сведения о современных противовирусных препаратах и механизмах развития устойчивости к отдельным вирусостатикам и о методах выявления мутаций в ДНК герпесвирусов.

В третьей главе описываются материалы и методы исследования. В ней подробно описан дизайн исследования, представлены основные понятия, группы пациентов и методика исследования, включая подготовку проб, выделение ДНК и амплификацию, методику секвенирования и анализа полученных данных.

Четвертая глава посвящена результатам и их обсуждению. Основные результаты касаются исследованию мутаций в гене UL97 ЦМВ, направленных

в отношении резистентности к вирусостатическим препаратам. Мутации были обнаружены в 8,2% случаев из всех пациентов с признаками резистентной инфекции. У всех пациентов с выявленной мутацией, принципиальным образом увеличивалась как вирусная нагрузка, так и время сохраняющейся высокой вирусной нагрузки. Интересно, что выявленные мутации обладали разным потенциалом резистентности, что может иметь значение при использовании полученных результатов в клинической практике.

В работе также представлены три клинических случая, демонстрирующих анализ динамики возникновения мутаций в гене. Важным отражением клинической значимости оценки индекса резистентности было подтверждение роста вирусной нагрузки при выявлении дополнительной мутации вируса с более высоким индексом резистентности (при имеющейся ранее мутации с меньшей устойчивостью). Также появление новой высокорезистентной мутации соответствовало усугубление тяжести клинических проявлений. В этом же разделе подтверждена целесообразность скрининга на наличие мутации пациентов до развития клинических проявлений, что принципиальным образом может повлиять на выбор тактики терапии в случае клинико-лабораторной реактивации.

В этой же главе представлены результаты разработки тест-системы для идентификации мутаций в гене UL97 ЦМВ. С помощью разработанного теста, направленного на детекцию мутаций С592G и С603W в образцах ДНК ЦМВ были проанализированы архивные образцы ДНК, что было важно для отработки технологии и получения дополнительной информации о присутствии мутантных штаммов в банкированных материалах. Показано, что формат АС-ПЦР позволяет использовать данный способ для быстрого и удобного скрининга конкретных мутаций у большого числа пациентов, а также проводить мониторинг циркуляции мутантных штаммов в организме пациента, в случае его обнаружения. Также в разделе предоставлена

информация о целесообразности поиска мутаций резистентности в штаммах, выделенных их различных локусов, что также может быть аргументом для разработки тактики наблюдения и терапии.

Кроме того, выполнен поиск мутаций устойчивости к действию противовирусных препаратов в гене U69 ВГЧ-6. Здесь же проанализирована и продемонстрирована растущая динамика в выявлении ДНК ЦМВ и ДНК ВГЧ-6 методом ПЦР по годам с 2015 по 2019 годы.

### **Научная и практическая значимость результатов**

Результаты, полученные М.В. Деминим, представляют большой интерес в области терапии вирусных инфекций. Полученные данные вносят существенный вклад в понимание основ генетической подоплеки в развитии резистентности вирусов к терапии, а также в возможность принятия оптимальных решений в реальной клинической практике. Таким образом, выполненная работа позволяет решать актуальную научно-практическую задачу и имеет существенное значение для вирусологии и гематологии.

Все заключения автора, а также выводы, сделанные на основе полученных результатов, и положения, выносимые на защиту, полностью обоснованы и достоверны, что подтверждается представленным экспериментальным материалом.

### **Полнота опубликованности положений и результатов диссертации**

Основные результаты работы были представлены в 7 публикациях, которые были опубликованы в рецензируемых изданиях. Автореферат диссертации содержит полное описание проведенного исследования.

## **Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе**

В ходе ознакомления с работой у меня возникли следующие вопросы к автору:

- 1) Необходимо ли учитывать выявление мутации в UL97 с низким индексом резистентности при выборе противовирусной терапии или надо полагаться на комплекс дополнительных клинико-лабораторных данных, таких как вирусная нагрузка, длительность и динамика виремии и т.д.?
- 2) Детекция мутации ДНК ЦМВ до начала клинических проявлений заболевания укладывается в принцип оптимального подхода к контролю инфекции у реципиентов ТГСК. Возможно ли на базе прототипа разработанной тест-системы сделать модифицированную модель для проведения ПЦР диагностики в режиме реального времени для количественного определения мутантного вируса в единице объема?

### **Заключение**

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.10 – «Вирусология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Демин Михаил Валерьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – «Вирусология».

Официальный оппонент:

Д.м.н., Заведующий отделением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток № 2, врач-гематолог ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева» МЗ РФ

Балашов Дмитрий Николаевич

Контактные данные:

тел.: , e-mail: bala8@yandex.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

14.01.21 – Гематология

Адрес места работы:

117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1,

ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева» МЗ РФ

Тел.: +7 495 287 65 70; e-mail: info@fnkc.ru

Подпись Балашова Д.Н. подтверждаю:

Д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН

Заместитель генерального директора – директор Института гематологии, иммунологии и клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева» МЗ РФ

Масчан Алексей Александрович