

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук доцента Соколова Дмитрия Игоревича о диссертационной работе Жиркова Антона Анатольевича «Диагностическое значение субпопуляционного состава лимфоцитов цереброспинальной жидкости и крови при менингитах у детей» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Жиркова Антона Анатольевича посвящена вопросу диагностического значения субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора при менингитах у детей. Актуальность темы диссертации обусловлена тяжестью течения менингита, с нередким формированием неврологических осложнений, приводящих к инвалидизации, либо нарушению становления и развития высшей нервной деятельности у детей разного возраста. Воспалительные процессы в оболочках мозга сопровождаются нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера с инфильтрацией клеток из кровотока в ликворные пространства, что приводит к резкому изменению клеточного состава ликвора. Увеличение числа клеток в ликворе, нейтрофильный или моноцитарный характер плеоцитоза являются главными на сегодняшний день дифференциально-диагностическими критериями гнойных и серозных менингитов, но не раскрывают особенности иммунопатогенеза менингитов, не всегда коррелируют с тяжестью заболевания и его природой (бактериальной или вирусной), что ограничивает диагностическую ценность стандартного исследования ликвора и обуславливают актуальность разработки новых диагностических показателей. Учитывая роль в формировании адекватного иммунного ответа на инфекцию лимфоцитарного пула, его исследование при менингитах у детей обосновано, а параллельное исследование субпопуляций лимфоцитов крови и ликвора значимо для улучшения диагностики и прогноза менингитов у детей.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и практических рекомендаций диссертации Жиркова Антона Анатольевича подтверждается тщательно выполненным эмпирическим и аналитическим исследованием. Автором самостоятельно методом проточной цитометрии проведено исследование 374 образцов крови и ликвора, полученных от 125 детей с менингитами вирусной и бактериальной природы и 27 детей, составивших группу сравнения. Используются адекватные методы параметрической и непараметрической статистики, корреляционного анализа, рассчитана диагностическая чувствительность и специфичность исследованных параметров, что позволяет считать, сформулированные научные положения, выводы и практические рекомендации обоснованными. Результаты диссертационной работы опубликованы в авторитетных отечественных журналах, рекомендованных ВАК по специальности «Клиническая лабораторная диагностика». Получен патент «Способ дифференциальной диагностики менингитов у детей».

Новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Автором впервые с помощью оптимизированного метода проточной цитометрии проведено исследование субпопуляционного состава цереброспинальной жидкости группы детей с диагнозом «острая респираторная вирусная инфекция с менингизмом», что позволило автору использовать полученные данные в качестве контрольных для сравнения с характеристиками лимфоцитарного пула ликвора при менингитах у детей.

Впервые выявлены характерные изменения в составе основных и малых субпопуляций крови и ликвора детей с серозным вирусным и бактериальным гнойным менингитом на разных стадиях заболевания, установлены наиболее информативные субпопуляции для дифференциальной диагностики вирусного и бактериального менингита и уточнения степени

тяжести бактериального гнойного менингита. Показаны различия соотношений субпопуляций лимфоцитов ликвор/кровь при менингитах у детей, свидетельствующие, вероятно, о селективном проникновении в интратекальное пространство субпопуляций, наиболее значимых для борьбы с вирусным или бактериальным возбудителем.

Новизной обладает исследование малых субпопуляций лимфоцитов при менингитах у детей. В диссертационной работе Жирков Антон Анатольевич использовал дополнение к алгоритму стандартной тест-системы для возможной оценки малых субпопуляций, в частности, определения (NKT (Natural Killer T-cells), DN (Double Negative T-cells), DP (Double Positive T-cells), $CD3^+CD8^{br}$, $CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^-CD8^+NK$). Это представляет дополнительные диагностические возможности и углубляет понимание механизмов иммунопатогенеза менингитов у детей. Известно, что малые субпопуляции обладают собственными функциями, в частности, синтезом про- и противовоспалительных цитокинов, определяющих направленность иммунных реакций и, в конечном итоге, исход заболевания.

В ходе выполнения диссертационной работы впервые разработан способ дифференциальной диагностики вирусного и бактериального менингита, основанный на оценке субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора, в частности оценки относительного содержания В-лимфоцитов.

Достоверность полученных в исследовании результатов определяется обследованием достаточного количества детей и применением необходимых и достаточных методов статистической обработки данных.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Результаты проведённого исследования дополняют и обобщают современное представление о патогенезе вирусного серозного и бактериального гнойного менингита. Установлено участие основных (Т-лимфоциты, включая Th и CTL, NK, В-лимфоциты) и малых субпопуляций лимфоцитов (DN, DP, NKT, $CD3^+CD8^{br}$, $CD3^+CD8^{dim}$, $CD3^-CD8^+NK$) крови и

ликвора в пато- и саногенезе вирусного серозного и бактериального гнойного менингита, а также их связь со степенью тяжести бактериального гнойного менингита. Установлено, что показатели субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора являются характерными маркерами вирусного и бактериального менингита и могут быть использованы для эффективной дифференциальной диагностики менингитов вирусной и бактериальной природы. Предложенный способ дифференциальной диагностики вирусного и бактериального менингита может способствовать своевременной диагностике заболевания и коррекции этиотропной терапии.

Данные фенотипирования лимфоцитов ликвора без воспалительных изменений у детей могут быть использованы в качестве контрольных значений для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов при различных поражениях центральной нервной системы.

Общая оценка структуры и содержания диссертации

Диссертация построена по классической структуре, состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, главы результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейших исследований, списка литературы. Работа изложена на 122 страницах машинописного текста, иллюстрирована 13 рисунками и 19 таблицами, которые облегчают восприятие диссертации. Содержание всех глав диссертации соответствует их названию и поставленным задачам. Список литературы включает 172 источника, из которых 32 отечественных и 140 иностранных авторов.

Во введении автор актуализирует проблему изучения клеточного состава лимфоцитов при менингитах у детей, отмечает недостаточную изученность клеточных системных и интратекальных иммунных реакций в патогенезе вирусного и бактериального менингита и их связь с этиологией и тяжестью течения менингита.

В «Обзоре литературы» изложены современные представления о клеточных механизмах иммунопатогенеза менингита. Автором охарактеризовано разнообразие фенотипов лимфоцитов и описана имеющаяся литература, связанная с субпопуляционным составом лимфоцитов в крови и ликворе в норме и при менингитах.

В главе «Материалы и методы» описаны группы обследованных детей, их характеристика по полу и возрасту, стандартные лабораторные методы, оптимизированный метод проточной цитометрии, алгоритм гейтирования лимфоцитов, позволяющий выделить основные и малые субпопуляции лимфоцитов. Это позволило автору сделать доступным получение дополнительной информации без финансовых затрат. Приведены методы статистической обработки данных.

Глава «Результаты исследования» состоит из пяти подглав. В первой проведён анализ стандартных клинико-лабораторных показателей при серозном вирусном и бактериальном гнойном менингите. В сравнительном аспекте проанализированы данные клинического анализа крови, биохимических показателей и показателей стандартного анализа ликвора. Показано, что рутинные методы диагностики не позволяют эффективно дифференцировать менингиты вирусной и бактериальной природы.

Во второй подглаве диссертантом охарактеризован субпопуляционный состав основных и малых субпопуляций лимфоцитов в ликворе детей без воспалительных процессов в центральной нервной системе (ОРВИ с менингизмом). Установлена корреляционная взаимосвязь между субпопуляционным составом лимфоцитов ликвора и возрастом детей.

В следующей подглаве проведён анализ изменений субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора детей с серозным вирусным и бактериальным гнойным менингитом в зависимости от сроков заболевания, этиологии и степени тяжести. Выявлены значимые различия субпопуляционного состава лимфоцитов в остром периоде и периоде реконвалесценции, показано увеличение цитотоксических Т-лимфоцитов и

их субпопуляции $CD3^+CD8^{dim}$, NKT клеток и снижение В-лимфоцитов в ликворе у пациентов с крайне тяжелым течением бактериального гнойного менингита.

В четвертой подглаве проведён расчёт коэффициента ЦСЖ/кровь для всех исследованных субпопуляций, выявлены их различия в зависимости от нозологической формы, что автор связал с особенностями проницаемости гематоэнцефалического барьера.

В пятой подглаве проведён сравнительный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора при вирусном и бактериальном менингите. Показано, что определение относительного содержания В-лимфоцитов в ликворе в остром периоде менингита позволяет в кратчайшие сроки дифференцировать вирусный и бактериальный менингит вне зависимости от возраста. На основании полученных данных автором предложена схема лабораторной диагностики менингита с применением стандартных методов лабораторной диагностики и иммунофенотипирования лимфоцитов крови и ликвора.

В «Обсуждение» представлен анализ полученных результатов в сопоставлении с данными отечественной и зарубежной литературы. Изменения в содержании отдельных субпопуляций лимфоцитов автор сопоставил с их функциями, что позволило углубить сведения о процессах пато- и саногенеза менингитов у детей.

Выводы соответствуют поставленным задачам, отражают все наиболее важные полученные автором результаты. Практические рекомендации предназначены для врачей инфекционистов, врачей клинической лабораторной диагностики, биологов и описывают возможность определения относительного содержания В-лимфоцитов в ликворе для дифференциальной диагностики менингитов вирусной и бактериальной природы.

Вопросы и замечания

1. В диссертации представлены только относительные количества отдельных субпопуляций лимфоцитов. Для характеристики содержания отдельных субпопуляций лимфоцитов этого недостаточно, всегда используется представление данных не только в виде относительного, но и абсолютного количества. При различных патологиях абсолютное количество клеток может быть снижено или повышено, при этом относительное количество может сохраняться.
2. Каким способом вычисляли отношение ЦСЖ\кровь? Совпадают ли эти значения при использовании абсолютного или относительного количества клеток?
3. Почему при гейтировании лимфоцитов по прямому и боковому светорассеянию не была после этого проведена дискриминация дублетов?
4. В выводе №2 автор указывает, что «оптимизирован метод проточной цитометрии для исследования популяций лимфоцитов ликвора для диагностики бактериальных и вирусных менингитов». Однако в тексте диссертации оптимизация метода не описана.

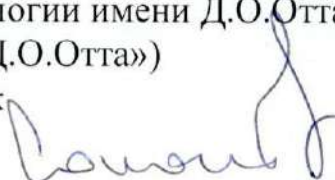
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Жиркова Антона Анатольевича «Диагностическое значение субпопуляционного состава лимфоцитов цереброспинальной жидкости и крови при менингитах у детей», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по научной специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, является самостоятельной завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании проведённых автором исследований решена актуальная научно-практическая задача – определено диагностическое значение исследования субпопуляционного состава лимфоцитов цереброспинальной жидкости и крови при менингитах у детей, что имеет

существенное значение для клинической лабораторной диагностики, расширяя представления об иммунопатогенезе менингитов у детей и представляя новый способ дифференциальной диагностики в зависимости от природы заболевания.

По своему содержанию представленная работа соответствует требованиям пп. 9-14 Положения о присуждении учёных степеней, утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (со всеми действующими изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Жирков А.А., заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Официальный оппонент:
Ведущий научный сотрудник
лаборатории межклеточных взаимодействий
отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий
федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт акушерства,
гинекологии и репродуктологии имени Д.О.Отта»
(ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О.Отта»)
доктор биологических наук
доцент



Соколов Дмитрий Игоревич

« 25 » апреля 2024 г.

199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3
Телефон: +79112436950
E-mail: falcojugger@yandex.ru

Подпись д.б.н., доцента Соколова Д.И. заверяю
Учёный секретарь ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О.Отта»
кандидат медицинских наук



Пачулия О.В.