

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Хайдукова Сергея Валерьевича на диссертационную работу Беленюк Василия Дмитриевича «Особенности фенотипа клеток иммунной системы у больных перитонитом», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология и аллергология.

Актуальность темы диссертационной работы

Актуальность диссертационной работы Беленюк В.Д. продиктована высокой значимостью для клинической иммунологии проблем тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваний (в частности, таких как распространённый гнойный перитонит – РГП), иммунопатогенез которых до конца не ясен. Не смотря на постоянное развитие методов хирургического лечения и применяемой лекарственной терапии, смертность при РГП сохраняется на уровне 20-30%, а при развитии полиорганной недостаточности может достигать 90%. Известно, что при РГП значительную роль в формировании характера течения заболевания играют процессы, протекающие в иммунной системе. Формируется выраженная активация врожденного иммунитета, обусловленная высоким уровнем вовлечения в процесс воспаления всех популяций фагоцитов, при этом часто отмечается угнетение адаптивного звена иммунной системы. Зачастую развитие РГП определяет наличие нарушений в регуляторных и эффекторных механизмах местного и системного иммунитета. Иммунный ответ при РГП часто характеризуется снижением количества НК-клеток, числа и активности Т-лимфоцитов, а также снижением поглотительной функции нейтрофилов и моноцитов. Из-за нарушения баланса про- и противовоспалительных механизмов иммунной системы при РГП может формироваться иммунодефицит, что на фоне проводимой терапии будет в значительной степени усугублять течение основного заболевания.

Таким образом, диссертационная работа Беленюк В.Д. посвященная изучению особенностей реакции иммунитета на абдоминальную инфекцию и поиск новых маркеров раннего прогнозирования исхода и течения заболевания, безусловно, является актуальной и значимой для науки и практической медицины.

Научная новизна работы

В диссертационной работе Беленюк В.Д. впервые определены закономерности распределения субпопуляций моноцитов у больных РГП в дооперационном и послеоперационном периоде на фоне стандартной терапии. Обнаружено, что у больных с неблагоприятным исходом РГП в дооперационном периоде снижается содержание зрелых НК- и НКТ-клеток в периферической крови, в том числе, и относительно показателей пациентов с благоприятным исходом заболевания. Впервые установлено, что в дооперационном периоде

при благоприятном исходе РГП повышается количество активированных Т-регуляторных клеток. Показано, что в дооперационном периоде и в течение двух недель после операции при благоприятном исходе РГП увеличивается содержание CD62L⁺ Т-лимфоцитов. При этом у пациентов с неблагоприятным исходом РГП повышение числа активированных Т-регуляторных клеток выявляется только на третью неделю наблюдения. Представлены новые данные о характерных для благоприятного и неблагоприятного исхода РГП изменениях субпопуляционного состава В-лимфоцитов и количества активированных В-клеток в крови. Обнаружено, что в плазме крови больных с неблагоприятным исходом РГП одновременно повышаются концентрации провоспалительного IL-8 и противовоспалительного IL-10, что может дополнительно усугублять течение воспалительного процесса и оказывать ингибирующее влияние на реактивность Т-клеточного иммунного ответа.

Научно-практическая значимость исследований

На основании комплексного исследования автором выполнен анализ иммунологического профиля пациентов в динамике лечения распространенного гнойного перитонита с учётом исхода заболевания.

Данная работа направлена на расширение знаний об особенностях реакций клеток иммунной системы в зависимости от исхода РГП. Полученные результаты раскрывают взаимосвязь между нейтрофилами, субпопуляциями моноцитов, NK-, NKT-клеток и процессами подавления адаптивного иммунитета. Определен вклад Th-клеток в течение воспалительного процесса при РГП.

Практическая значимость работы заключается в разработке способа прогнозирования исхода течения распространенного гнойного перитонита на основании исследования фенотипического состава регуляторных Т-клеток и В-лимфоцитов (Цитометрический способ прогнозирования исхода распространенного гнойного перитонита // Патент на изобретение RU 2691742 С1, 18.06.2019. Заявка № 2018119060 от 23.05.2018).

Достоверность и обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне и представляет собой завершённое исследование. Сформулированные автором цель и задачи исследования достигнуты полностью. Достаточная выборка пациентов, продуманный дизайн, применение критериев включения и исключения при отборе пациентов, использование современных методов и соответствующая поставленным задачам статистическая обработка данных свидетельствуют о достоверности и обоснованности полученных результатов. Научные положения, выносимые на защиту, базируются на изучении большого объёма экспериментального материала. Выводы обоснованы результатами исследований, четко сформулированы и отражают суть проведенных исследований. Следует отметить личное

участие автора во всех этапах лабораторной части работы (подготовка биоматериала, анализ фенотипа клеток иммунной системы методом проточной цитометрии, проведение ИФА анализа, выписка и анализ полученных данных). Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, представлены и обсуждены на международных и российских научных конференциях. Основные результаты исследования опубликованы 18 печатных работах, из них 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертационных работ, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, получен 1 патент.

Оценка содержания и завершенности диссертации

Диссертация имеет классическую структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 44 таблицами и 19 рисунками. Список литературы включает 162 библиографических изданий.

Во введении четко представлена актуальность избранной темы и степень ее освещённости. Цель исследования сформулирована корректно, поставленные задачи обоснованы целью и служат ее достижению. Далее автор формулирует все необходимые элементы диссертационного исследования: научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробацию результатов исследования. Положения, выносимые на защиту, отражают наиболее значимые результаты проведенного исследования.

Представленный автором обзор литературы основан как на отечественных, так и на зарубежных источниках, что позволяет автору достаточно полно раскрыть состояние проблемы и определяет место и значение предпринятого исследования в системе существующих научных знаний. Текст обзора достаточно структурирован и логичен, написан с соблюдением норм русского языка.

В главе «Материалы и методы» автор подробно описывает критерии отбора пациентов и лабораторные методы, использованные в исследовании. Автором проведено обследование 35 пациентов с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, 38 относительно здоровых людей, которые в дальнейшем, на основании исхода заболевания, были разделены на группы: больные с благоприятным исходом РГП; больные с неблагоприятным исходом РГП; контроль. Далее дается детальное описание алгоритмов забора крови, иммунологических методов исследования и используемых методов статистической обработки данных. Выбор методов обоснован целью, соответствует задачам, поставленным автором, и в оптимальной мере служит их решению и достижению цели.

В главе «Результаты собственных исследований» подробно и последовательно представлены результаты данного диссертационного исследования. В частности, автором показано, что фагоцитарный индекс нейтрофилов в дооперационном периоде и до 21-х суток наблюдения у больных с благоприятным исходом РГП увеличен в 2 раза по сравнению с контрольным диапазоном. При этом у пациентов с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде и до 21-х суток наблюдения в 1,5-2 раза относительно контрольной группы и в 3-4 раза относительно группы с неблагоприятным исходом РГП повышено фагоцитарное число нейтрофилов. Автор указывает, что у пациентов с благоприятным течением РГП иммуновоспалительный процесс характеризуется 2-х кратным снижением количества $CD14^{++}CD16^{-}$ моноцитов в периферической крови и 1,5 кратным увеличением содержания $CD14^{+}CD16^{+}$ моноцитов. У пациентов с неблагоприятным течением заболевания, на фоне снижения числа $CD14^{++}CD16^{-}$ моноцитов, увеличения содержания $CD14^{+}CD16^{+}$ моноцитов в первые 3 недели лечения не наблюдалось. Автор отмечает, что в дооперационном периоде у пациентов с благоприятным исходом РГП снижено содержание зрелых NK- и NKT-клеток, восстановление числа которых осуществляется к концу послеоперационного периода за счет повышения количества $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{dim-}$, $CD3^{-}CD16^{-}CD56^{++}$ и $CD3^{+}CD16^{-}CD56^{+}$ и $CD3^{+}CD8^{+}CD16^{+}CD56^{+}$ клеток, соответственно. У пациентов с неблагоприятным исходом РГП содержание зрелых NK- и NKT-клеток снижено в ходе всего периода наблюдения.

В работе продемонстрировано 2-х кратное повышение числа регуляторных Т-лимфоцитов и $CD62L^{+}$ регуляторных Т-клеток у пациентов с благоприятным течением РГП. У пациентов с неблагоприятным течением РГП количество данных клеток в дооперационном периоде и в течение двух недель послеоперационного лечения остается неизменным, к 4-й неделе их содержание снижается в 1,5 раза относительно значений контрольной группы. Также автор указывает, что у больных с неблагоприятным исходом РГП наблюдалось 2-х кратное повышение числа активированных $CD19^{+}CD5^{+}$ лимфоцитов. При этом в течение всего послеоперационного периода количество $CD19^{+}$, $CD19^{+}CD27^{-}$ и $CD19^{+}CD5^{-}$ лимфоцитов, а также клеток, экспрессирующих CD23-рецептор, у больных с неблагоприятным исходом РГП в 2-2,5 раза выше, чем у лиц с благоприятным исходом заболевания. На основании полученных данных автором разработан способ прогнозирования исхода РГП на основании расчёта коэффициента Т-клеточной регуляции (КТКР), представляющий собой соотношение относительного содержания В1-лимфоцитов к относительному содержанию активированных Т-регуляторных клеток. В работе показано, что значение КТКР равное или выше 4,23 свидетельствует о снижении Т-регуляторной активности иммуновоспалительного процесса и повышение количества В1-лимфоцитов.

В главе «Обсуждение результатов исследования» автором проведен тщательный сравнительный анализ собственных результатов и данных, опубликованных в Российской и мировой научной литературе, что дает основание для формирования полноценных выводов.

В «Заключении» автор кратко обобщает полученные результаты.

Выводы работы конкретны, информативны, следуют из полученных данных, научно обоснованы и достоверны, соответствуют поставленным задачам и отражают основные положения диссертации.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с существующими требованиями, его содержание соответствует данным, представленным в диссертации, и содержит основные результаты и выводы.

Диссертационная работа по своему содержанию полностью соответствует специальности 14.03.09 – клиническая иммунология и аллергология.

Текст диссертации содержит единичные опечатки и стилистические неточности, которые не влияют на общую положительную оценку работы. Принципиальных замечаний нет.

В ходе изучения диссертационной работы возникли следующие вопросы.

1. В ходе исследования особенностей реакции иммунной системы при РГП проводился анализ только периферическую кровь? Оценивались ли особенности местной реакции?
2. Проводилась ли оценка изменения субпопуляционного состава нейтрофилов на фоне течения РГП?
3. Насколько достоверно можно оценивать исход РГП, используя в прогнозе только результаты по клеткам адаптивного иммунитета? При этом в данной работе продемонстрированы характерные изменения у нейтрофилов, моноцитов и NK-клеток и почему эти параметры не были включены в алгоритм прогноза?

Заключение

Диссертационная работа Беленюк Василия Дмитриевича «Особенности фенотипа клеток иммунной системы у больных перитонитом», является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решены поставленные научные задачи, имеющие значение для клинической иммунологии, а именно исследованы особенности фенотипа и уровней экспрессии активационных и адгезионных молекул на мембране нейтрофилов, моноцитов, NK-, NKT-, T- и B-клеток крови у больных РГП в зависимости от исхода заболевания, на основе выявленных изменений в фенотипе клеток врожденного и приобретённого иммунитета, выделены критерии, имеющие прогностическое значение для оценки исхода течения РГП, разработан способ прогноза исхода РГП.

По своей актуальности, методическому уровню, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Беленюк В.Д. соответствует критериям, установленным в пункте 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней»,

утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 355, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 14.03.09 – клиническая иммунология и аллергология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории углеводов, ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10,
Телефон: +7 (495) 336-63-88
e-mail: khsv@ibch.ru
<https://www.ibch.ru/>

/С.В. Хайдуков/

ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ

Учёный секретарь ИБХ РАН, д.ф.-м.н.

/В.А. Олейников/

« ____ » _____ 2022г.

