

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института экологии и генетики микроорганизмов – филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор



В.А.Демаков

2019 г.

О Т З Ы В

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации Добрыниной Марии Александровны на тему: "Иммунные и антибактериальные эффекты синтетического пептида гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в системе взаимодействия клетка-пептид-грамотрицательные бактерии", представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Актуальность избранной темы. Диссертационная работа Добрыниной М.А. выполнена в рамках одного из направлений фундаментальной иммунологии и посвящена исследованию механизмов действия синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора ZP2.

В настоящее время одной из задач современной иммунологии является получение соединений, обладающих иммуномодулирующей, активностью, что обусловлено важной ролью иммунной системы в развитии и исходе многих патологических процессов, возникающих в макроорганизме. В этой связи особый интерес представляют биологически активные регуляторные молекулы, продуцируемые иммунокомпетентными клетками. Здесь, в первую очередь, следует отметить цитокины, зарекомендовавшие себя как эффективные лечебные препараты. Таковым является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), нашедший широкое применение в клинической практике. К настоящему времени также

получены пептиды из человеческого ГМ-КСФ, антитела к этим пептидам, ингибиторные пептиды, блокирующие действие ГМ-КСФ, созданы искусственные молекулярные конструкции, обладающие биологической активностью цитокина.

Основными отличительными особенностями пептидов при сравнении с нативной молекулой цитокина являются меньшая иммуногенность и способность индуцировать отдельные эффекты из спектра воздействий, характерных для природного соединения. Так, например, можно разделить, адьювантную, колониестимулирующую, и антимикробную активности. Последнее особенно актуально, в связи с формированием устойчивых к антибиотикам штаммов микроорганизмов. Разработка новых противомикробных препаратов, в том числе, на основе эндогенных антимикробных пептидов, представляется весьма перспективной. Относительно традиционно используемых антибиотиков антимикробные пептиды обладают важными преимуществами, которые включают широкий диапазон антибактериального действия, эффективность при более низких концентрациях, ограниченную способность возбудителей формировать к ним устойчивость, а также в возможность синтеза аналогов природных пептидов с направленно-измененными биологическими свойствами.

Вышесказанное свидетельствует о том, что представленная работа посвящена актуальной современной проблеме.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Автором работы получены новые данные при исследовании иммуотропных и антибактериальных свойств синтетического пептида ZP2 в условиях *in vitro*. Показано, что синтетический пептид ZP2 в широком диапазоне концентраций (10-300 мкг/мл) обладает способностью вызывать пролиферацию лимфоцитов в культуре, снижать апоптоз моноцитов, а также стимулировать хемотаксис и хемокинез нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека, в том числе в системе взаимодействия

фагоциты-пептид-грамотрицательные бактерии. Кроме того, установлено, что синтетический пептид ZP2 способен сильнее, чем грамотрицательные микроорганизмы и супернатанты их суточных бульонных культур индуцировать продукцию гранулоцитами периферической крови человека ряда цитокинов: IL-17A, IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , IL-8, MIP-1 β .

Впервые охарактеризованы особенности антибактериального действия синтетического пептида ZP2 на грамотрицательные микроорганизмы различной видовой принадлежности в условиях *in vitro*. Выявлен дозозависимый ингибирующий эффект синтетического пептида ZP2 в отношении тест-штамма *E. coli*, а также показано, что указанный пептид и созданное на его основе косметическое средство «АЦЕГРАМ-спрей» преимущественно снижают рост и размножение клинических изолятов *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* и их биопленкообразование.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов. Теоретическая значимость работы заключается в выявлении новых биологических эффектов синтетического пептида ZP2, связанных с влиянием препарата на иммунокомпетентные клетки человека (лимфоциты, нейтрофилы и моноциты) и грамотрицательные микроорганизмы разных видов. Кроме того, при реализации антимикробной активности ZP2 установлено его комплексное действие в системе фагоциты-пептид-грамотрицательные бактерии (эшерихии, клебсиеллы, псевдомонады, ацинетобактеры).

Полученные данные раскрыли новые о механизмы действия синтетического пептида ZP2, а выявленные свойства легли в основу разработки и создания косметических средств [«АЦЕГРАМ-спрей» и «АЦЕГРАМ-гель» (РОСС RU. АВ66. Н00566 (№ 0203563) и РОСС RU. АВ66. Н00565 (№ 0203562) от 30.10.2017], предназначенных для наружного местного применения. Пептид ZP2 имеет перспективы для использования в лечении инфекционно-воспалительных поражений кожи и слизистых оболочек. Представленные в работе сведения также могут стать

предпосылкой для расширения спектра применения уже разработанных косметических препаратов, обладающих комбинированными иммуностимулирующими и антибактериальными эффектами, в том числе, в отношении грамотрицательных бактерий разных видов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Результаты работы могут быть использованы при разработке сочетанных (пептид-антибиотик) антибактериальных препаратов, информирования представителей фармацевтических компаний и практических врачей, занимающихся проблемами лечения гнойно-воспалительных заболеваний, вызванных грамотрицательными микроорганизмами, в том числе, и резистентными к антибиотикам штаммами. Полученные данные могут стать основой для проведения клинических испытаний разработанных ранее спрея и геля при таких патологических процессах как гнойные фарингиты, риносинуситы, фурункулез, гнойные раны, пролежни. Результаты исследований могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах иммунологии, микробиологии высших медицинских учебных заведений, биологических и медико-биологических факультетов университетов, в центрах и отделениях клинической иммунологии, НИИ и лабораториях, занимающихся проблемами иммунопатогенеза гнойно-воспалительных заболеваний.

Степень обоснованности и достоверности полученных результатов исследования. Достоверность полученных результатов исследования определена использованием широкого спектра современных лабораторных методов исследования, достаточным объемом фактического материала, его корректной статистической обработкой, а также подтверждена проверкой достоверности первичной документации экспертами ИИФ УрО РАН (акт проверки от 14.06.2019 г.).

Основные материалы диссертационной работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в

Сибири» (г. Абакан, 2011), конференциях иммунологов Урала (Тюмень, 2012; Сыктывкар, 2013; Екатеринбург, 2014; Пермь, 2015; Калининград, 2016), Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013), «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2015), 9-13 Всероссийских конференциях с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018).

Оценка содержания диссертации. Диссертация изложена на 161 странице печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием используемых материалов и методов исследования, двух глав собственных результатов, заключения, выводов, списка литературы, включающего 212 источников, из них 143 иностранных и 69 отечественных. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 10 рисунками, содержит приложение.

Во «Введении» автор четко обосновывает выбор темы, формулирует цель исследования, задачи для ее реализации и положения, выносимые на защиту. В литературном обзоре подробно освещено современное представление о структуре, строении, взаимодействии с рецепторами клеток, с клетками иммунной системы, бактериями как самого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, так и его синтетических аналогов. Рассмотрены проблемы и механизмы взаимодействия пептидов с эукариотическими и прокариотическими клетками.

В главе «Материалы и методы» описаны методики, использованные при выполнении поставленных задач. Автор использовал достаточный набор современных иммунологических (включая проточную цитометрию и мультиплексный анализ) и микробиологических методов (в том числе биопленкообразование бактерий), обеспечивающих надежность полученных результатов. Результаты исследований адекватно обработаны статистически. **Замечание:** Описание использованных методов исследования представлено неравноценно. Одни методики описаны избыточно подробно (например,

процедура приготовления агарозного геля для проведения хемотаксиса и хемокинеза нейтрофилов; раздел 2.2.3). Вместе с тем, о методе оценки пролиферативной активности лимфоцитов дана лишь следующая информация (раздел 2.2.1): «РБТЛ оценивали методом проточной цитометрии [38]».

Результаты собственных исследований автора описаны в 2 главах. Глава 3 посвящена исследованию механизмов действия синтетического пептида ZP2 на РБТЛ, апоптоз моноцитов, хемотаксис и хемокинез фагоцитов, цитокинопродукцию нейтрофилов. Особое внимание уделено взаимодействию клеток иммунной системы с грамотрицательными бактериями в системе взаимодействия клетки-пептид-грамотрицательные бактерии.

Автором получены уникальные данные о влиянии пептида ZP2 на пролиферацию лимфоцитов крови (таблица 1). Средний уровень бластов в культуре с ZP2 оказался на 1/3 выше чем в культуре с ФГА и достиг 97,4%. Эти результаты свидетельствуют о том, что ZP2 является универсальным митогеном, способным полностью активировать разные популяции Т-, В- и НК-лимфоцитов. Однако эти фундаментальные результаты никак автором не обсуждаются. Непонятно, почему в таблице 2 оптимальная доза синтетического пептида ZP2 (10 мкг/мл) была увеличена в 3 и 30 раз. Но даже в избытке пептид показал высокую хорошо воспроизводимую митогенную активность (30 мкг/мл – $67,0 \pm 0,5\%$; 300 мкг/мл – $65,0 \pm 0,8\%$). К сожалению, в «Выводах» эти уникальные свойства пептида звучат скромно: «Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора ZP2 усиливает пролиферацию лимфоцитов в РБТЛ». Следует также отметить, что столь высокая плейотропная митогенная активность препарата может быть препятствием для его использования в качестве лечебного средства по причине риска развития онкологических заболеваний. Единственное, что «смущает» в этих данных,

это то, что пролиферация лимфоцитов в культурах, содержащих только IL-2, была выше, чем в культурах с ФГА.

В главе 4 отражено исследование влияния синтетического пептида ZP2 на рост и размножение грамотрицательных бактерий различных видов, на их биопленкообразование, рассмотрены вопросы видовой и штаммовой вариабельности ответов бактерий на пептид.

Результаты исследований обобщены и кратко отражены в главе «Заключение». Пять выводов диссертации четко сформулированы и непосредственно вытекают из данных работы и соответствуют цели и задачам исследования. Основные результаты диссертации отражены в 17 публикациях (4,84 печатных листа), в том числе: 11 статей в журналах из перечня ВАК (3 – Scopus, РИНЦ, 8 – РИНЦ), 4 статьи в рецензируемых журналах, не входящих в перечень ВАК (4 – РИНЦ), получено 2 патента РФ на изобретения.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК РФ и отражает цель, задачи, объем, методы исследования, основное содержание работы, выводы и практические рекомендации, изложенные в диссертации.

Замечания и вопросы. В литературном обзоре содержится множество стилистических казусов. Ниже приведено несколько выдержек.

Стр. 14: «Обе субъединицы – тип I: трансмембранный гликопротеин, структурно характеризующийся присутствием модулей соответствия рецептора цитокина, состоит из двух областей фибронектина тип III [97, 203].».

Стр. 15: «Взаимосвязь между GM-CSF и GM-CSFR включает три места взаимодействия.» Там же: «Эти три комбинации способствуют тому, что формирование более высокого додекаэдр-комплекса, составленного двумя гексамерными комплексами, связанными четвертым местом взаимодействия.»

Стр. 17: «С-комплект и GM-CSFRa – известные маркеры гемопоэтической дифференцировки клеток». *Пояснение автора отзыва:* С-комплект – это перевод электронным словарем термина C-kit. Предыдущие и последующие фразы, по-видимому, также являются продуктом электронного словаря: «Стимуляция GM-SFRa1- изоформы вызывает увеличенную процессию CD86 и белков поверхности клеток, и это может также вызвать интенсивное фосфорилирование Jak-2 [105]. У изоформы GM-CSFRa-2 есть другая цитоплазматическая область, но она созывается с GM-CSFR α и в результате действует таким же образом, как и GM-CSFRa-1 [70].». Читать такое крайне утомительно.

Вопрос, на который хотелось бы получить ответ:

Как автор объясняет тот факт, что уровень бластов в культурах с IL-2 был выше, чем в культурах с ФГА? Ведь рецептор к IL-2 у здоровых доноров крови присутствует только на НК-клетках (~10%) и Treg (~8%).

Заключение. Диссертационная работа Добрыниной Марии Александровны на тему: «Иммунные и антибактериальные эффекты синтетического пептида гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в системе взаимодействия клетка-пептид-грамотрицательные бактерии» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, представляет собой законченную квалификационную научно-исследовательскую работу, содержащую решение конкретной научной задачи, значимой для специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, состоящей в исследовании механизмов взаимодействия в системе клетки иммунной системы - синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора ZP2 - грамотрицательные бактерии.

Работа по своей научной новизне, научной и практической значимости, объему исследований отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и соответствует разделу II «Положения о присуждении ученых степеней» (утв. Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г.

№ 842, с изм., утв. 21.04.16 № 335, 02.08.2016 № 748) и может быть представлена к защите по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, медицинские науки. Автор диссертации заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании проблемной комиссии по иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов – филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН «_08_» _ноября_ 2019 г., протокол заседания № _14_.

Заведующий лабораторией экологической иммунологии ИЭГМ УрО РАН, д.м.н.,



К.В. Шмагель

Подпись д.м.н., Шмагеля К.В. заверяю
Специалист отдела кадров



Данные об авторе отзыва:

Шмагель Константин Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов – филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, 614084, г. Пермь, ул. Голева, д. 13, тел. Рабочий +7-904-84-314-40, e-mail shmagel@iegm.ru

Отзыв ведущей организации поступил 29.11.2019 года
Ученый секретарь Совета Д 004.027.02

И.А. Тузанкина

С отзывом ведущей организации ознакомлен 29.11.2019 года
Соискатель

М.А. Добрынина

