


УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки

Института иммунологии и физиологии
УрО РАН, д.ф.-м.н., доцент

 О.Э. Соловьёва

«...» июня 2019 года



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института иммунологии и физиологии Уральского отделения
Российской академии наук

Диссертация «Иммунные и антибактериальные эффекты синтетического пептида гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в системе взаимодействия клетка-пептид-грамотрицательные бактерии» выполнена в лаборатории иммунологии воспаления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (далее – *Института иммунологии и физиологии УрО РАН*).

В период подготовки диссертации соискатель Добрынина Мария Александровна работала в Институте иммунологии и физиологии УрО РАН младшим научным сотрудником лаборатории иммунологии воспаления.

В 2010 году окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Челябинская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ» по специальности «Лечебное дело».

С 01.07.2011 по 30.06.2014 годы Добрынина М.А. обучалась в очной аспирантуре Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2013 г. Институтым иммунологии и физиологии УрО РАН.

Научные руководители:

– *Черешнев Валерий Александрович*, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, должность – главный научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммуофармакологии;

– Гриценко Виктор Александрович, доктор медицинских наук, профессор, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, должность – главный научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов (г. Оренбург).

По итогам обсуждения принято следующее **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Личное участие автора в получении научных результатов. Личный вклад соискателя состоит в ее непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, цели и задачи, определение методологии и общей концепции диссертации вырабатывались совместно с научными руководителями: академиком РАН, д.м.н., проф. В.А. Черешневым и д.м.н., проф. В.А. Гриценко. Автором лично проведены все эксперименты; часть опытов выполнена совместно с сотрудниками: ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии» (директор, д.м.н., проф. Суховой Ю.Г., д.м.н., проф. Петров С.А., к.б.н., Костоломова Е.Г.), лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН (в.н.с., д.м.н., профессор Зурочка А.В., д.м.н., с.н.с. Зурочка В.А., м.н.с. В.В. Дукардтом), лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН (аспиранты Тяпаева Я.В. и Белозерцева Ю.П.), Научно-исследовательского института Особо чистых биопрепаратов ФМБА России (научный руководитель института, член-корр. РАН, д.м.н., проф. Симбирцев А.С., д.б.н. Колобов А.А.).

Анализ зарубежной и отечественной литературы по исследуемой проблеме цитокинов и, в частности, ГМ-КСФ и его синтетических аналогов проведен лично диссертантом.

Лабораторные исследования проводились на базе лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН, лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН (далее – ФГБУН ОФИЦ УрО РАН).

Сбор первичных данных, их статистическая обработка, интерпретация полученных результатов, аналитическая проработка, написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов исследований в научных статьях и докладах на конференциях осуществлялись соискателем лично.

Степень достоверности результатов проведенных исследований.

Проверка первичной документации проведена комиссией в составе г.н.с., зав. лабораторией иммунологии воспаления, д.м.н. профессора Гусева Е.Ю., г.н.с. лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии, д.м.н., проф., ЗДН РФ Черешневой М.В., г.н.с., зав. лабораторией биохимии и морфологии, д.б.н., доцентов Даниловой И.Г. в соответствии с приказом ИИФ УрО РАН от 14.06.2019 г. № 5). Первичная документация соответствует материалам исследования, представлена в полном объеме и признана достоверным материалом, который соответствует выполненной работе. Составлен акт проверки достоверности первичной документации от 14.06.2019 г.

Актуальность проблемы. 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 важных задач современной иммунологии является получение новых химических соединений, обладающих плеiotропной, в том числе иммуномодулирующей, активностью. Необходимость создания новых иммуноактивных соединений на основе эндогенных пептидных регуляторов обусловлена ключевой ролью иммунной системы в определении развития, течения и исхода большинства патологических процессов, возникающих в макроорганизме. В этой связи особый интерес представляют биологически активные регуляторные молекулы, продуцируемые иммунокомпетентными клетками для поддержания гомеостаза организма, которые могут стать основой для создания лекарственных препаратов, позитивно влияющих на поврежденные звенья иммунной системы. К таким веществам/препаратам относятся различные цитокины, в частности, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), нашедший широкое применение в клинической практике лечения. В конце XX века из активного центра ГМ-КСФ были получены пептиды, обладающие активностью, идентичной таковой цельной молекулы ГМ-КСФ. Эти исследования позволили создать основу для дальнейшего изучения иммунобиологических свойств синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ.

В то же время такие пептиды, как и некоторые цитокины (например, IL-26, IFN- β и др.), могут обладать более широким спектром биологических эффектов, в частности, проявлять антимикробную активность. Последнее особенно актуально, поскольку продолжается интенсивное использование в клинической практике антибиотиков, сопровождающееся формированием антибиотикорезистентных микроорганизмов, циркуляция которых представляет опасность не только для

больных, инфицированных ими, но и для лиц, контактирующих с такими пациентами. И разработка новых противомикробных препаратов, в том числе, на основе эндогенных антимикробных пептидов, представляется весьма перспективной.

Антимикробные пептиды обладают важными преимуществами по сравнению с традиционными антибиотиками, которые состоят в более широком диапазоне антибактериального действия, проявляют активность при значительно более низких концентрациях, малой выраженностью способности возбудителей формировать устойчивость к ним, а также в возможности синтеза аналогов природных пептидов с направленно-измененными биологическими свойствами. При исследовании ряда синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ (в том числе, ZP2 с химической формулой: THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO) выявлено, что они в широком диапазоне концентраций обладают выраженной антибактериальной активностью в отношении разных видов стафилококков, причем, не только подавляют рост и размножение бактерий, но и снижают их биопленкообразование. Однако действие синтетического пептида ZP2 на грамотрицательные бактерии изучено достаточно фрагментарно. Кроме того, требуют дальнейшего анализа биологические эффекты данного пептида в системе взаимодействия фагоциты-пептид-грамотрицательные бактерии.

Литературные данные, затрагивающие вопрос о механизмах плеiotропного действия таких пептидов, довольно противоречивы и не всегда вписываются в имеющиеся представления о механизмах действия цитокинов, из которых они получены. В то же время поиск новых соединений активных центров цитокинов и изучение механизмов их действия является актуальным и несомненно перспективным направлением исследований.

Поэтому выявление новых иммуностимулирующих и антимикробных эффектов синтетического пептида ZP2 в системе взаимодействия клетка-пептид-грамотрицательные бактерии является несомненно актуальным.

Новизна. 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 усиливать пролиферацию лимфоцитов в РБТЛ, снижать апоптоз культуры клеток 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 индуцировать

продукцию гранулоцитами периферической крови человека ряда цитокинов (IL-17A, IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , IL-8, MIP-1 β) сильнее, чем грамотрицательные микроорганизмы и супернатанты их суточных бульонных культур, а при комбинированном действии на фагоциты пептида и микроорганизмов (или их супернатантов) уровень их цитокинопродукции имеет промежуточные значения.

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 развития тестштамма *E. coli* в бульонной культуре, 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.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в выявлении у синтетического пептида ZP2 новых иммуотропных эффектов, связанных как с его изолированным влиянием на иммунокомпетентные клетки человека (лимфоциты, нейтрофилы и моноциты) и грамотрицательные микроорганизмы разных видов, так и с его сочетанным действием в системе фагоциты-пептид-грамотрицательные бактерии, а также с антибактериальной активностью в отношении ряда грамотрицательных бактерий (эшерихии, клебсиеллы, псевдомонады, ацинетобактеры).

Полученные данные расширяют наши представления о механизмах действия синтетического пептида ZP2, а выявленные дополнительные свойства легли в основу разработки и создания косметических средств [«АЦЕГРАМ-спрей» и «АЦЕГРАМ-гель» (РОСС RU.AB66.H00566 (№ 0203563) и РОСС RU.AB66.H00565 (№ 0203562) от 30.10.2017], которые предназначены для наружного местного использования и могут применяться при инфекционно-воспалительных поражениях кожи и слизистых оболочек. Полученные данные служат предпосылками для расширения спектра применения указанных косметических препаратов, обладающих комбинированными иммуотропными и антибактериальными эффектами, в том числе, в отношении грамотрицательных бактерий разных видов.

Ценность научных работ соискателя. Научные работы Марии Александровны опубликованы в центральных и региональных изданиях. Публикации используются в научной деятельности ученых, занимающихся проблемами иммунологического характера, в практике работы врачей-иммунологов, в учебном процессе.

Внедрение в практику. Результаты исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН (г. Екатеринбург), лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (г. Оренбург), ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России (г. Санкт-Петербург), в учебный процесс кафедры микробиологии и вирусологии № 1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону), в производственную деятельность ООО «НПФ Верта» (Санкт-Петербург), в медицинскую практику работы ООО «Академический инновационный научный центр» (г. Челябинск), ООО «Медицинский лабораторный центр «Фамилия» (г. Челябинск).

Специальность, которой соответствует диссертация. По объему и новизне полученных автором данных, разработанных теоретических положений диссертационная работа Добрыниной Марии Александровны на тему «Иммунные и антибактериальные эффекты синтетического пептида гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в системе взаимодействия клетка-пептид-грамотрицательные бактерии» полностью соответствует заявленной специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, медицинские науки.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 печатных работы, 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. Изложенные материалы полностью отражают результаты диссертационной работы.

Наиболее значимые публикации:

1. Дозозависимое влияние синтетического пептида активного центра

гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ – ZP2) на индуцированный апоптоза моноцитов / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, В.В. Дукардт, В.А. Гриценко, И.В. Кудрявцев, М.К. Серебрякова, А.С. Трулев, В.А. Черешнев // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10 (19), № 3. С.265-269 (РИНЦ – 0,389, PubMed).

2. Анализ чувствительности клинических изолятов стафилококков к синтетическому пептиду активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, В.А. Гриценко, Я.В. Тяпаева, Ю.П. Белозерцева // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18), № 3 (1). С. 82-85 (РИНЦ – 0,634).

3. Оценка влияния различных комбинаций синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и биологически-активных веществ (дефенсинов, лизоцима, интерцида и супернатантов клеток CD34⁺) на антибактериальные, иммуностропные и репарационные свойства / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18), № 2 (1). С. 239-240 (РИНЦ – 0,634).

4. Доза-зависимые эффекты антибактериального действия синтетического пептида активного центра GM-CSF / А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Г. Костоломова, А.А. Колобов, А.С. Симбирцев // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 3. С. 657-660 (Scopus – N/A, РИНЦ – 0,265).

5. Сравнительная характеристика антибактериальных свойств пептидов активного центра ГМ-КСФ и веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45-клеток предшественников гемопоэза / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина, Ю.Г. Суховой, В.А. Гриценко // Гигиена и санитария. 2012. № 3. С. 71-72 (Scopus – N/A, РИНЦ – 0,739).

6. Сравнительная характеристика антибактериальных свойств различных синтетических пептидов активного центра GM-CSF и веществ полученных из супернатантов CD34+CD45^{dim} клеток предшественников гемопоэза / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина, Ю.Г. Суховой, В.А. Гриценко, А.А. Колобов, А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. 2012. Т.11, № 2. С. 96-99 (РИНЦ – 0,816).

Патенты РФ

7. Патент РФ на изобретение № 2448725. Способ повышения бактерицидной активности / А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, С.А. Петров, И.Г. Унгер, Е.Г. Костоломова // Бюл. 2012. № 12. Оpubл. 27.04.2012.

8. Патент РФ на изобретение № 2465001. Способ повышения пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови / А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, С.А. Петров, И.Г. Унгер, Е.Г. Костоломова // Бюл. 2012. № 30. Оpubл. 27.10. 2012.

Рекомендации к защите диссертации с учетом научной зрелости соискателя. Добрынина Мария Александровна является сформировавшимся научным работником. Диссертационная работа Добрыниной М.А. является самостоятельно выполненным научно-квалификационным исследованием, которое вносит существенный вклад в специальность 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, т.к. результаты работы могут быть непосредственно использованы в практическом здравоохранении врачами, занимающимися проблемами лечения гнойно-воспалительных заболеваний, вызванных грамотрицательными микроорганизмами, в том числе, и антибиотикорезистентными штаммами, при таких процессах, как гнойные фарингиты, риносинуситы (может применяться разработанный спрей), лечение фурункулов, гнойных ран, пролежней (гель). Результаты проведенных исследований могут быть использованы на разных уровнях: 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.

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, 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.

Диссертация «Иммунные и антибактериальные эффекты синтетического пептида гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в системе взаимодействия клетка-пептид-грамотрицательные бактерии» Добрыниной Марии Александровны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Заключение принято на заседании проблемной комиссии Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

Присутствовало на заседании 11 членов комиссии. Результаты голосования: «за» – 11 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет чел., протокол № 3 от 18 июня 2019 года.

Председатель проблемной комиссии
по патофизиологии, иммунологии и аллергологии
ИИФ УрО РАН
д.м.н., профессор, ЗДН РФ



И.А. Тузанкина

Секретарь проблемной комиссии

Е.Н. Денкс