

ОТЗЫВ

официального оппонента, д.м.н., профессора Калущкого П.В. на диссертационную работу Дукардта Виктора Владимировича на тему: «Особенности секреции цитокинов нейтрофилами при фагоцитозе бактерий и воздействии синтетического пептида гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ)», представленной на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Актуальность избранной темы. Инфекционно-воспалительный процесс обусловлен во многом функционированием иммунной системы. Ранние этапы формирования инфекционной патологии тесно связаны с взаимодействием бактерий и профессиональных фагоцитов (прежде всего, нейтрофилов) и вовлечением в него цитокинов. Последние могут играть не только роль чисто регуляторных молекул, усиливающих или снижающих воспаление, но и выступать как самостоятельные антимикробные факторы. Поэтому регуляторные биологически активные молекулы, продуцируемые клетками иммунной системы для поддержания гомеостаза организма, становятся важными кандидатами для создания новых лекарственных препаратов. К таким веществам относятся, в первую очередь, цитокины. Не является исключением и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), нашедший широкое применение в клинической практике. Недавно у одного из них (синтетический пептид ZP2) выявлен комплекс новых свойств, отражающий наличие у него не только широкого спектра иммуотропных, но антимикробных и репаративных эффектов, что приводит к необходимости дальнейших исследований иммунобиологической активности указанного пептида. В частности, остается открытым вопрос, связанный с особенностями влияния синтетического пептида ZP2 на секрецию цитокинов нейтрофилами, в том числе при фагоцитозе грамположительных и грамотрицательных бактерий.

С другой стороны, мало изученным остаётся вопрос о взаимодействии бактерий с цитокинами, хотя недавно было выявлено, что бактериальные метаболиты (супернатанты бульонных культур микроорганизмов) способны инактивировать отдельные цитокины (INF- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 и др.), то есть проявлять «антицитокиновую» активность. Кроме того, неизвестно могут ли бактерии секретировать в среду экзометаболиты, которые способны

взаимодействовать со специфическими антителами к цитокинам и улавливаться известными тест-системами для их определения в исследуемых образцах.

Диссертационная работа Дукардта В.В. выполнена в рамках одного из направлений фундаментальной иммунологии и посвящена исследованию механизмов цитокиновой активности нейтрофилов в условиях воздействия на них бактерий и синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора – ZP2.

Литературные данные, затрагивающие вопрос о механизмах цитокиновой регуляции нейтрофилов при взаимодействии с бактериями и пептидами активных центров, противоречивы и не всегда вписываются в имеющиеся представления о механизмах действия цитокинов, из которых они получены.

Поэтому выявление новых данных о цитокиновой активности нейтрофилов при фагоцитозе грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов при воздействии синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора – ZP2 является, несомненно, актуальным.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Степень обоснованности данного диссертационного исследования обусловлена широким спектром современных лабораторных и инструментальных исследований, достаточным объёмом выборки полученных результатов.

Достоверность полученных результатов работы, правомочность основных положений и выводов основаны на достаточном числе наблюдений, использовании современных методов статистической обработки материалов исследования с применением программ Statistica v. 6.0 for Windows, глубоком и аргументированном анализе полученных результатов.

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.

Проведены эксперименты на 30 штаммах грамотрицательных и 108 штаммах грамположительных культур бактерий (как музейных штаммах, так и изолятах от больных пациентов). Для получения и изучения клеток крови была

использована кровь 60 условно здоровых доноров.

Получение биологического материала для исследования (клетки крови) произведено с учётом положений Хельсинской Декларации ВМА (2000) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999). Организация исследования одобрена этическим комитетом ИИФ УрО РАН от 14.04.2017.

Для достижения цели и решения поставленных задач в работе использованы современные иммунологические, микробиологические и статистические методы исследования.

Достоверность результатов подтверждена актом проверки первичной документации, проведённой экспертной комиссией Института 15.06.2019 (на основании Приказа ИИФ УрО РАН № 5 от 14.06.2019).

Научная новизна. Автором работы получены новые данные о том, что бактерии различных видов и продукты их жизнедеятельности способны как повышать уровень секреции цитокинов нейтрофилами, так и снижать их активность, и этот процесс также связан с видом бактерий. Впервые исследованы новые свойства грамположительных и грамотрицательных бактерий – способность секретировать в культуральную среду цитокиноподобные вещества. При этом показано, что наибольшей цитокиноподобной активностью как по спектру, так и по уровню цитокинопродукции, обладали бактерии вида *S. aureus*.

Диссертантом установлено, что синтетический пептид ZP2 обладает способностью снижать/повышать цитокино-продукцию бактерий, при этом вариабельность ответов зависит от вида и штамма микроорганизмов. Применение синтетического пептида ZP2 повышает продукцию цитокинов нейтрофилами при влиянии на них как самих бактерий, так и продуктов их секреции: независимо снижалась или повышалась активность цитокинопродукции нейтрофилов в ответ на воздействие только различных бактерий или их супернатантов. Установлено, что бактерии и их продукты снижают в зависимости от вида и штамма микроорганизмов цитокиновую продукцию активированных пептидом нейтрофилов, а степень выраженности влияния зависит от вида изучаемых бактерий.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование Дукардта В.В. имеет важное теоретическое и практическое значение. На основе

полученных данных автором разработана методология оценки цитокинового статуса фагоцитов (в частности, нейтрофилов), в том числе, при их взаимодействии с грамположительными и грамотрицательными бактериями, их экзометаболитами и синтетическим пептидом ZP2, включая различные комбинации указанных факторов.

Показано, что в качестве дополнительных контролей необходимо определять цитокиноподобную активность бактерий и учитывать её значение при исследованиях, в которых изучаются цитокиновый профиль на моделях взаимодействия бактерии – клетки – цитокины. При сочетанном воздействии на фагоциты супернатантов бактерий и препаратов цитокинов, обладающих иммуотропной, антимикробной и репарационной активностью, необходимо учитывать цитокиноподобную и антицитокиновую активность используемых в опытах микроорганизмов.

Результаты проведённых 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-септических заболеваний, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями; в практическом здравоохранении врачами, занимающимися проблемами гнойно-воспалительных заболеваний.

Публикации. Основные результаты диссертации отражены в 15 публикациях (4,13 печатных листа), в том числе 10 статей в журналах из перечня ВАК (2 – Scopus, РИНЦ, 8 – РИНЦ), 3 статьи в рецензируемых журналах, не входящих в перечень ВАК (3 – РИНЦ).

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора. Степень достоверности обусловлена широким спектром современных лабораторных и инструментальных исследований, достаточным объёмом выборки. Достоверность результатов подтверждена актом проверки первичной документации, проведённой экспертной комиссией Института 15.06.2019 (на основании Приказа ИИФ УрО РАН № 5 от 14.06.2019).

Основные материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на конференциях иммунологов Урала (Калининград 2016,

Челябинск, 2017), 11, 12, 13 Всероссийских конференциях с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск 2016, 2017, 2018), конференции «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2017).

Основная идея исследования, планирование научной работы, цели и задачи, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с научными руководителями д.м.н., проф. А.В. Зурочкой и д.м.н., проф. В.А. Гриценко. Часть экспериментов проводилась совместно с сотрудниками лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН (д.м.н., с.н.с. В.А. Зурочка, к.б.н., с.н.с. Е.Б. Зуева, м.н.с. М.А. Добрынина), лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН (аспирант Я.В. Тяпаева, аспирант Ю.П. Белозерцева), НИИ Особо чистых биопрепаратов ФМБА России (д.б.н. А.А. Колобов) Личный вклад соискателя состоит в непосредственном выполнении всех этапов диссертационного исследования.

Анализ современной зарубежной и отечественной литературы по изучаемой проблеме цитокинов и их синтетических аналогов был проведён лично диссертантом. Сбор первичных материалов, статистическая обработка данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление диссертации, представление результатов работы в научных статьях и в виде докладов на конференциях осуществлялись соискателем лично.

Характеристика работы. Диссертация изложена на 129 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием используемых материалов и методов исследования, трёх глав собственных результатов, заключения, выводов, списка литературы, включающего 122 источника, из них 55 иностранных и 67 отечественных. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 3 рисунками.

Во «Введении» автор чётко обосновывает выбор темы, формулирует цель исследования, задачи для её реализации и положения, выносимые на защиту, новизну и практическую значимость работы.

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 регуляции взаимодействия пептидов активных центров цитокинов с клетками иммунной системы и грамположительными и грамотрицательными бактериями, показано биоразнообразие активных молекул бактерий секретируемых в среду инкубации.

В главе «Материалы и методы» описаны методики, использованные при выполнении поставленных задач. Автор использовал достаточный набор современных иммунологических и микробиологических методов (включая мультиплексный анализ цитокинов нейтрофилов и цитокиноподобных веществ бактерий), обеспечивающих надёжность полученных результатов. Результаты исследований адекватно обработаны статистически.

Результаты собственных исследований автора описаны в трёх главах. Глава 3 посвящена исследованию механизмов действия грамположительных и грамотрицательных бактерий различных видов на цитокинопродукцию нейтрофилов. Особое внимание здесь уделено взаимодействию клеток нейтрофилов как с живыми бактериями, так и с их супернатантами. Автором выявлены различия в изменении цитокинового профиля нейтрофилов под воздействием различных видов бактерий, показана видо-специфичность таких воздействий.

В главе 4 отражено исследование цитокиноподобной активности бактерий различных видов, при этом особое внимание уделено анализу биоразнообразия цитокиноподобной активности стафилококков, выявивших наибольший спектр по цитокиноподобной активности с изучаемыми тест-системами. Выявлено, что цитокиноподобная активность определяется у ряда штаммов как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, причём наибольшим разнообразием отличаются золотистые стафилококки (как по спектру, так и по концентрации, выявляемых цитокиноподобных веществ).

В главе 5 показано влияние синтетического пептида ZP2 на секрецию цитокинов нейтрофилов при взаимодействии с грамположительными и грамотрицательными бактериями разных видов и продуктами их секреции. Показано, что пептид ZP2 частично восстанавливает сниженную цитокиновую активность, обусловленную бактериями различных таксонов.

Результаты исследований обсуждены в главе «Заключение». Шесть выводов диссертации чётко сформулированы и непосредственно вытекают из собственных данных автора и соответствуют цели, задачам и положениям, выносимым на защиту.

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК и отражает цель, задачи, объём, методы исследования, основное содержание работы, выводы и практические рекомендации, изложенные в диссертации.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН (Екатеринбург), Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН (Оренбург), НИИ Особо чистых биопрепаратов ФМБА РФ (Санкт-Петербург); в учебный процесс кафедры микробиологии и вирусологии №1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России (Ростов-на-Дону); в производственную деятельность ООО «НПФ Верта» (Санкт-Петербург), ООО «Академический инновационный научный центр» (Челябинск); в медицинскую практику работы ООО «Медицинский лабораторный центр «Фамилия» (Челябинск).

При ознакомлении с содержанием диссертационной работы возникли некоторые вопросы, носящие в целом дискуссионный характер, но требующие разъяснения:

1. В чём принципиальное отличие Вашей методики оценки цитокинов нейтрофилов от известного метода проточной цитометрии?

2. На Ваш взгляд, почему у стафилококков цитокиноподобная активность намного выше и шире по спектру, чем у грамотрицательных бактерий?

3. За счёт каких механизмов у живых бактерий антицитокиновая активность выше, чем у их же супернатантов?

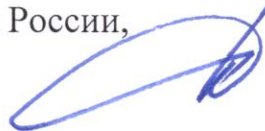
4. Могут ли другие пептиды, а не только пептид ZP2 влиять на цитокиноподобную активность стафилококков?

Заключение. Диссертационная работа Дукардта Виктора Владимировича на тему: «Особенности секреции цитокинов нейтрофилами при фагоцитозе бактерий и воздействии синтетического пептида гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ)»,

представленная на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, представляет собой законченную научную квалификационную работу, содержащую решение важной научной задачи для специальности – 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, состоящую в проведении анализа механизмов цитокиновой активности нейтрофилов при фагоцитозе бактерий и воздействии синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора ZP2.

Работа по своей научной новизне, научной и практической значимости, объёму исследований отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждённым Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 с изменениями, утверждёнными Постановлением Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, 02.08.2016 № 748) и имеет существенное значение для клинической иммунологии, аллергологии, медицинские науки, а диссертант заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Проректор по образовательной деятельности и
общим вопросам, зав. кафедрой микробиологии,
вирусологии, иммунологии
ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор



Калуцкий П.В.

Подпись заверяю.

Учёный секретарь учёного совета
ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России
профессор кафедры микробиологии, вирусологии,
иммунологии, д.б.н., доцент




Медведева О.А.

1 ноября 2019 года

Калуцкий Павел Вячеславович, д.м.н., профессор,
Проректор по образовательной деятельности и общим вопросам,
зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии
ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, д.м.н., профессор,
305041, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3
телефон: +7(4712) 58-81-52, e-mail: KalutzkiyPV@kursksmu.net

Отзыв официального оппонента поступил «19» ноября 2019 г.
Ученый секретарь Совета Д 004.027.02


И.А. Тузанкина

С отзывом официального оппонента ознакомлен «19» ноября 2019 г.
Соискатель


В.В. Дукардт

