

СТЕНОГРАММА

заседания ученого Совета по апробации диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Д 004.027.02 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (протокол № 11)

г. Екатеринбург

18 декабря 2019 г.

Председатель – Черешнев В.А., председатель Совета Д 004.027.02, академик РАН, д.м.н., профессор

Секретарь – Тузанкина И.А., ученый секретарь Совета Д 004.027.02, д.м.н., профессор, ЗДН РФ

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИИ

«Особенности секреции цитокинов нейтрофилами при фагоцитозе бактерий и воздействии синтетического пептида гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ)», представленной Дукардтом Виктором Владимировичем на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Научные руководители:

- Зурочка А.В., д.м.н., профессор;
- Гриценко В.А., д.м.н., профессор (г. Оренбург).

Официальные оппоненты:

- Тотолян А.А.**, академик РАН, д.м.н., профессор (Санкт-Петербург);
- Калуцкий П.В.**, д.м.н., профессор (г. Курск).

Ведущая организация: Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (г. Пермь).

Черешнев В.А., председатель Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 004.027.02 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии УрО РАН, академик РАН, д.м.н., профессор, (далее – дис. совета). Глубокоуважаемые члены диссертационного совета, из 21 члена дис. совета на сегодняшнем заседании присутствуют 16 человек. Из них, 8 докторов наук по специальности 14.03.03 – патофизиология, 8 – по специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология.

Персонально присутствуют:

- | | | |
|-----|-----------------------------------|---|
| 1. | Черешнев Валерий Александрович | председатель Совета по Д 004.027.02, академик РАН, д.м.н., профессор, 14.03.09; медицинские науки |
| 2. | Юшков Борис Германович | зам. председателя Совета Д 04.027.01, д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН, ЗДН РФ, 14.03.03, биологические науки |
| 3. | Тузанкина Ирина Александровна | ученый секретарь Совета Д 004.027.02, д.м.н., профессор, ЗДН РФ, 14.03.09, медицинские науки |
| 4. | Бейкин Яков Борисович | д.м.н., профессор, засл. врач РФ, 14.03.09, медицинские науки |
| 5. | Бельтюков Евгений Кронидович | д.м.н., профессор, 14.03.09, медицинские науки |
| 6. | Гусев Евгений Юрьевич | д.м.н., профессор, 14.03.09, медицинские науки |
| 7. | Данилова Ирина Георгиевна | д.б.н., доцент, 14.03.03, биологические науки |
| 8. | Забокрицкий Николай Александрович | д.м.н., 14.03.03, биологические науки |
| 9. | Зурочка Александр Владимирович | д.м.н., профессор, 14.03.09, медицинские науки |
| 10. | Ковальчук Людмила Ахметовна | д.б.н., доцент, 14.03.03, биологические науки |
| 11. | Котомцев Вячеслав Владимирович | д.б.н., профессор, 14.03.03, биологические науки |
| 12. | Проценко Юрий | д.б.н., 14.03.03, биологические науки |

Леонидович

13. Сарапульцев Петр Алексеевич д.м.н., профессор, ЗДН РФ, 14.03.09, биологические науки
14. Цывьян Павел Борисович д.м.н., профессор, 14.03.03, биологические науки
15. Чистякова Гузель Нуховна д.м.н., профессор, 14.03.09, медицинские науки

Отсутствуют по уважительным причинам 6 человек: Бершицкий Сергей Юрьевич, д.б.н., 14.03.03, биологические науки; Леонтьев Сергей Леопольдович, д.м.н., 14.03.03, биологические науки; Мальчиков Игорь Александрович, д.м.н., доцент, 14.03.09, медицинские науки; Черешнева Маргарита Владимировна, д.м.н., профессор, ЗДН РФ, 14.03.09, медицинские науки; Якушева Марина Юрьевна, д.м.н., 14.03.03, биологические науки; Филимонкова Нина Николаева, д.м.н., профессор, 14.03.09, медицинские науки.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Предлагает перейти к защите диссертационной работы. Зачитывает повестку: объявляется публичная защита диссертации. Соискатель *Дукардт Виктор Владимирович*, пожалуйста. Тема диссертации «Особенности секреции цитокинов нейтрофилами при фагоцитозе бактерий и воздействии синтетического пептида гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора», по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Работа выполнена в лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

Научные руководители:

– *Зурочка Александр Владимирович*, д.м.н., проф., в.н.с. лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН;

– *Гриценко Виктор Александрович*, д.м.н., проф., г.н.с. лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН – филиала Федерального

государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН (г. Оренбург).

Оба руководителя здесь.

Официальные оппоненты:

– *Толоян Арег Артемович*, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор научно-исследовательского института имени Пастера (г. Санкт-Петербург). Вы его хорошо знаете, Арег Артёмович здесь.

– *Калуцкий Павел Вячеславович*, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии и иммунологии Курского государственного медицинского университета Минздрава России.

Ведущая организация – Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (г.Пермь).

Слово предоставляется ученому секретарю, Тузанкиной Ирине Александровне, для обзора поступивших документов.

Тузанкина И.А., ученый секретарь дис. совета, д.м.н., проф., ЗДН РФ. Уважаемые члены диссертационного совета, в деле Дукардта Виктора Владимировича есть все необходимые документы, оформленные в соответствии с требованиями: заявление Дукардта В.В. от «08» октября 2019 г. в дис. совет о приеме диссертации к публичной защите; обоснование назначения 2-м научным руководителем д.м.н., проф. Гриценко Виктора Александровича; личный листок по учету кадров, заверенный главным специалистом по кадрам ИИФ УрО РАН Роговой И.В.; копия диплома об окончании Челябинской государственной медицинской академии в 2003 г., присуждена квалификация врач по специальности «лечебное дело»; копия диплома о проф. переподготовке по программе «Бактериология» (420 час.) в Южно-Уральском государственном медицинском университете с 01.10.2006 г. по 31.01.2007 г., присвоена квалификация и право ведения профессиональной деятельности в сфере «Бактериология»; копия удостоверения о повышении квалификации (144 час.) с 01.08 по 29.08.2015 г.

в частном учреждении дополнительного проф. образования медицинских работников «Новый уровень» по программе «Проточная цитометрия в клинической лабораторной диагностике»; копия удостоверения об окончании интернатуры в 2003 г. по специальности «Клиническая лабораторная диагностика», выданная Челябинской государственной медицинской академией; справка об окончании очной аспирантуры ИИФ УрО РАН (с 01 августа 2014 по 31 июля 2017 года) и копия удостоверения о сдаче кандидатских экзаменов в аспирантуре, оценки за экзамены: клиническая иммунология, аллергология - «отлично» и английский язык – «хорошо», история и философия науки (медицинские науки) – «удовлетворительно»; информация о размещении кандидатской диссертации на сайте ИИФ УрО РАН – 08 октября 2019 г., информация о размещении автореферата кандидатской диссертации на сайте ИИФ УрО РАН – 14 октября 2019 г.; объявление о защите и размещении автореферата кандидатской диссертации на сайте ВАК – 16 октября 2019 г.; информационная справка о Дукардте В.В. (сведения о научном руководителе, выпускающей организации, членах комиссии дис. совета, ведущей организации, официальных оппонентах); диссертация и автореферат на правах рукописи. Проверка оригинальности /уникальности по системе «Антиплагиат» показала – оригинальность автореферата 70,82 %, диссертации – 72,14 %; диссертация и 2 экз. автореферата были сданы в Центральную научную библиотеку УрО РАН за два месяца до защиты – 17 октября 2019 года.

В деле имеются 7 актов о внедрении результатов научного исследования: 7 актов о внедрении результатов научного исследования соискателя: в научно-исследовательскую работу по разработке синтетических препаратов, обладающих комбинированными свойствами Лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН. Акт утвержден директором ИИФ УрО РАН, д.ф.-м.н., доцентом Соловьёвой О.Э.; Государственного НИИ особо чистых препаратов ФМБА России (Санкт-Петербург). Акт утвержден зам. директора по науч. работе, д.б.н. Зориной

В.Н.; Оренбургского научно-исследовательского центра УрО РАН. Акт утвержден ВРИО директора, чл.-корр. РАН, д.м.н. Черкасовым С.В. В учебный процесс кафедры микробиологии Ростовского государственного медицинского университета. Акт утвержден проректором по учебной работе, д.м.н., проф. Дробота Н.В. В практику работы ООО «НПФ «Верта» в технологических подходах по разработке лекарственных средств местного применения. Акт утвержден директором Колобовым А.А. (г. Санкт-Петербург); ООО «Медицинский лабораторный центр «Фамилия» при использовании косметологических препаратов «АЦЕГРАМ-геля» и «АЦЕГРАМ-спрея» в рамках комплексной терапии. Акт утвержден зам. гл. врача Атамановой Т.Ю. (г. Челябинск); ООО «Академический инновационный научный центр» при использовании косметологических препаратов «АЦЕГРАМ-геля» и «АЦЕГРАМ-спрея» в рамках комплексной терапии при различных видах патологии. Акт утвержден зам. директора Зуевой Е.Б. (г. Челябинск).

Список научных трудов по теме диссертации имеет 15 наименований, из них: в рецензируемых изданиях 12, в том числе 2 – Scopus и 10 – РИНЦ).

Разосланы авторефераты 15 ноября 2019 г. в 33 организации, из них 7 – обязательных адресов, 26 – дополнительных.

Документы соответствуют требованиям п.29 «Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук», утв. приказом Минобрнауки России от 10 ноября 2017 г. N 1093.

Разрешите зачитать **характеристику**: Дукардт Виктор Владимирович в 2003 году окончил лечебный факультет Челябинской государственной медицинской академии по специальности «лечебное дело», с 2003 по 2004 год обучался в клинической интернатуре в Челябинской государственной медицинской академии по специальности «клиническая лабораторная диагностика». В 2006-2007 гг. обучался по программе профессиональной переподготовки по специальности «бактериология» в Челябинской

государственной медицинской академии Росздрава. С 2017 г. по настоящее время работает заведующим клинико-диагностической лабораторией ООО «ДокторЛаб» (г. Челябинск). Кроме того, с 2019 года работает м.н.с. в лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии.

В 2014 году он был принят в очную аспирантуру Института иммунологии и физиологии, которую окончил в 2017 году.

За время выполнения диссертационной работы проявил себя квалифицированным врачом-специалистом, владеющим современными методами иммунологического анализа, показал хорошие навыки работы с современной лабораторной техникой, умение работать с полученным материалом, пользоваться научной литературой.

Диссертация Дукардта Виктора Владимировича может быть представлена к защите, а соискатель достоин присуждения ученой степени кандидата медицинских наук.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Уточняет у членов дис. совета, есть ли вопросы к ученому секретарю. Вопросов нет. Предоставляет слово Дукардту В.В. для доклада по диссертационной работе.

Соискатель Дукардт В.В. Докладывает основные положения диссертационной работы (*доклад на DVD-R*).

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Черешнев В.А. Предлагает членам дис. совета задавать вопросы. Пожалуйста, Ирина Георгиевна.

Данилова И.Г., д.б.н., доцент. Скажите, пожалуйста, а есть ли у бактерий гены, кодирующие цитокины?

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемая Ирина Георгиевна, в настоящее время генов, кодирующих цитокины у бактерий, официально не выявлено. Но имеется такой факт: многие бактерии образуют достаточно сложные вещества такие, как гормоноподобные вещества, золотистый

стафилококк имеет способность продуцировать лизоцим. И, в общем-то, на мой взгляд, принципиальной разницы между возможностью синтезировать лизоцим или какие-то иные цитокины нет. Лизоцим тоже имеет определённые свойства цитокинов. Поэтому, раз бактерии способны производить лизоцим, значит у них есть ген, позволяющий производить его синтез, следовательно, не исключено, что имеются и гены, которые позволяют бактериям синтезировать какие-то цитокиноподобные вещества.

Данилова И.Г., д.б.н., доцент. Второй вопрос. Скажите, пожалуйста, а те цитокиноподобные вещества бактерий, которые Вы определили, как Вы считаете, они обладают точно такими же свойствами как и нормальные цитокины, например, выделяющиеся нейтрофилами? И как Вы можете мне это доказать? Может они выделяют цитокины, а активности у них никакой нет?

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемая Ирина Георгиевна, однозначного ответа на Ваш вопрос я дать не могу. Мы выделили какие-то цитокиноподобные вещества. Мы можем утверждать, что они выделяются, потому что они определяются тест-системами, которые мы использовали. Насколько специфично эти тест-системы улавливают цитокиноподобные вещества – вопрос остаётся пока спорным, он сейчас разрабатывается.

Данилова И.Г., д.б.н., доцент. Я не о специфичности, а о биологической активности спрашиваю.

Соискатель Дукардт В.В. Мы обнаружили факт того, что выделяют цитокиноподобные вещества. Мы не можем сказать, что это аналоги цитокинов человека, они просто улавливаются использованными нами тест-системами. Поэтому мы не можем сказать, что эти цитокиноподобные вещества и биологический эффект они оказывают такой же, как и цитокины истинные.

Данилова И.Г., д.б.н., доцент. Можно ещё третий вопрос? Скажите, пожалуйста, Вы проводили инкубацию нейтрофилов со стафилококком и определяли там увеличение цитокинов. Рассчитали ли вы долю того, что

выделяет сам нейтрофил, и то, что выделяет сам стафилококк? Вы же потом со стафилококком обнаружили цитокины, так какая доля выделенных цитокинов – стафилококка, а какая – нейтрофила?

Соискатель Дукардт В.В. Точно ответить на этот вопрос невозможно. Я думаю, что такой феномен имеет место быть – мы определяем и те, и другие. Но в опыте показывается, что уровень секреции нейтрофилами этих цитокинов гораздо выше, чем у микроорганизмов. Да, мы допускаем, что при инкубации нейтрофилов со стафилококками мы имеем какую-то суммарную выявляемую секрецию, но конкретно сказать, какая доля выделена нейтрофилами, а какая микроорганизмами в данный момент невозможно. Мы такую задачу не ставили. Наверное, это возможно – математически оценить цитокиновую продукцию с микроорганизмами, цитокиноподобную продукцию микроорганизмов отдельно, и, в определённом приближении, если из одного вычесть другое, мы получим истинный уровень цитокинопродукции нейтрофилов.

Данилова И.Г., д.б.н., доцент. Тогда мы могли бы точно сказать, Ваш пептид действует на бактерии, либо он действует на нейтрофилы. А сейчас у Вас какой-то суммарный?

Дукардт В.В. Дело в том, что в одном из практических выводов нашей работы указано, что при определении цитокинов тест-системами, которые для этого предназначены, надо учитывать, что при определении цитокинов в нестерильных локусах, в которых могут присутствовать микроорганизмы, надо иметь в виду, что мы можем получить некую суммарную продукцию цитокинов.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Пожалуйста, Петр Алексеевич.

Сарапульцев Петр Алексеевич, д.м.н., профессор, ЗДН РФ. Уважаемый Виктор Владимирович, Вы выделяли штаммы некоторых бактерий из крови больного. Дело в том, что есть исследования, которые показывают, при пневмонии, во всяком случае, что ИЛ-6, 10, 8 при

начальных стадиях повышаются, а затем идёт снижение. Вы определяли у одного и того же пациента в крови или нет?

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемый Петр Алексеевич, дело в том, что для экспериментов использовались штаммы микроорганизмов из коллекции Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уро РАН. Это штаммы, которые выделены из ран больных с синдромом диабетической стопы, из половых органов женщин с миомой матки и из пустул у пациентов с пиодермией. Микроорганизмы взяты не из крови, соответственно, в этот момент кровь у этих пациентов не бралась, поэтому мы не можем сказать какова продукция цитокинов в крови в это время присутствует.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Есть ещё вопросы? Борис Германович, пожалуйста.

Юшков Б.Г., чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ЗДН РФ. Уважаемый Виктор Владимирович, у меня парочка вопросов. Первый вопрос. У Вас концентрация цитокинов даётся в пикограммах на миллилитр. Скажите, пожалуйста, предпринимали ли Вы попытки пересчитать это на количество клеток?

Соискатель Дукардт В.В. Дело в том, что единицы измерения пикограмм на миллилитр – это единицы измерения уровня цитокинов, предлагаемые создателями коммерческих тест-систем. Поэтому эта единица измерения была для нас неизменной, так как была предложена производителем. Задачу пересчёта единиц при выполнении исследований мы перед собой не ставили.

Юшков Б.Г., чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ЗДН РФ. Чем Вы можете объяснить стимулирующий эффект синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора на продукцию самого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора? То есть составная часть стимулирует продукцию целого?

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемый Борис Германович, дело в том, что использованный в работе пептид ZP2 – он, конечно, часть

гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, но, получается, это главная его часть, которая выполняет функциональную нагрузку всего фактора. Поэтому он способен сам по себе, подобно резонансу, стимулировать выделение цельного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Я себе представляю это таким же образом, как действует сам гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор. Есть рецептор к данному фактору, на который действует не сам цитокин, а его синтетический активный центр. При этом эффект получается такой же, как при воздействии самого росткового фактора.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Ещё вопросы есть? Да, пожалуйста, Гузель Нуховна.

Чистякова Г.Н., д.м.н., профессор. У меня достаточно короткие два вопроса. Во-первых, понятие «цитокиноподобные» - это Ваше понятие, или Вы его где-то взяли? Что Вы вкладываете в него?

Соискатель Дукардт В.В. Это понятие и наше, и не наше. Мы выявили какие-то вещества, которые мы не можем, с полной уверенностью, назвать цитокинами, потому что мы не знаем, что они есть по своей структуре. Это какие-то субстанции, которые определяются точно также и которые воздействуют, возможно, специфически. Мы приняли решение, называть их цитокиноподобными, так как мы не знаем всего про них, это предмет дальнейших исследований. Но в литературе мы встретили статью у китайских исследователей, которые также выявили тест-системами для определения мышинных цитокинов у золотистого стафилококка продукцию каких-то веществ, которые они также назвали цитокиноподобными, точнее, подобными цитокинам. Поэтому, так уж получилось, что и мы сами решили, и они.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Так кто первый? Дата-то есть?

Соискатель Дукардт В.В. Китайская работа 2016 года.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. А у Вас?

Дукардт В.В. Получается, они раньше.

Чистякова Г.Н., д.м.н., профессор. Второй вопрос. В практических рекомендациях Вы предлагаете модель Вашу перенести на практическое здравоохранение. Это нереально, при такой массе цитокинов. Какие наиболее значимые цитокины, которые бы Вы рекомендовали для практического здравоохранения?

Соискатель Дукардт В.В. Наиболее значимые, я думаю, те, которые наиболее часто встречаются в практическом здравоохранении и определяются, но так как в различных отраслях они свои, я просто по всем клиническим направлениям не могу утверждать какие в данной конкретной ситуации важны для клинициста. Просто надо держать в уме, что такое воздействие в определённых локусах может исказить истинный уровень определяемых цитокинов.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Есть ещё вопросы? Достаточно. Тогда объявляется технический перерыв.

Технический перерыв. После перерыва.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Продолжаем нашу работу. Слово предоставляется научному руководителю, пожалуйста, Александр Владимирович.

Зурочка А.В., 1-й научный руководитель, д.м.н., проф. Глубокоуважаемый Валерий Александрович, глубокоуважаемые коллеги. Виктор Владимирович прошёл достаточно сложный путь. Он начинал как классический практический врач, который вышел на уровень заведующего лабораторией, микробиологической лабораторией. Потом он сменил специальность на клиническую лабораторную диагностику и тоже достиг уровня заведующего лабораторией. Это как раз характеризует человека, как умеющего очень чётко ставить определённые задачи и цели и достигать их. И

эта диссертационная работа, которая идёт на стыке нескольких лабораторных дисциплин, и показывает его квалификацию высококвалифицированного специалиста. Ну, а умение отвечать на вопросы, саму диссертацию, конечно же, должен оценивать учёный совет. А я, как руководитель, горжусь этим учеником, мне очень приятно было с ним работать, и эта работа доставляла мне истинное удовольствие. *(текст отзыва прил.)*.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Спасибо большое. Слово для обзора поступивших отзывов предоставляется Ирине Александровне, ученому секретарю.

Тузанкина И.А., ученый секретарь дис. совета, д.м.н., проф., ЗДН РФ. Уважаемые коллеги, в деле есть заключение выпускающей организации, в качестве которой выступает Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, зачитывает текст заключения *(прил.)*.

Таким образом, диссертационная работа Дукардта В.В., представленная на соискание ученой 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 регуляции нейтрофилов при фагоцитозе бактерий и воздействии синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора ZP2.

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 Дукардта Виктора Владимировича «Особенности секреции цитокинов нейтрофилами при фагоцитозе бактерий и воздействия синтетического пептида гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ)» 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.

Тузанкина И.А., ученый секретарь дис. совета, д.м.н., проф., ЗДН РФ. Оглашает положительный отзыв ведущей организации – *Института экологии и генетики микроорганизмов* – филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (г. Пермь), подписанный *Гейном С.В.*, д.м.н., проф., зам. директора по научной работе института утвержденный директором института, чл.-корр. РАН, д.м.н., проф. *Демаковым В.А. (отзыв прил.).*

Принципиальных замечаний к диссертации в отзыве нет. Было задано 2 вопроса:

1 вопрос. *Как автор может объяснить тот факт, что в таблицах 1 и 2, в контроле, содержащем только среду RPMI, детектируются цитокины в концентрациях до 210 пг/мл?*

Соискатель Дукардт В.В. Дело в том, что среда RPMI 1640 предназначена для выращивания и поддержания культур клеток длительное время. В том числе она используется для выращивания макрофагов из моноцитов периферической крови. Поэтому эта среда, помимо основных питательных веществ, содержит в своём составе и ростовые факторы. А так как среда предназначена для культивирования макрофагов, она в своём составе имеет и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий

фактор. Уровень других цитокинов в этой среде таким не определялся. Поэтому среда была взята за отрицательный контроль в последующих расчетах, и мы учитывали, что в ней имеется какая-то базовая активность по данному цитокину, просто потому, что она содержит его в своём составе, так как она предназначена для получения макрофагов.

2 вопрос. С чем автор связывает высокие концентрации цитокинов в супернатантах культур нейтрофилов уже через 1 ч от начала культивирования?

Соискатель Дукардт В.В. Мы получаем условно интактные нейтрофилы. Это не нейтрофилы, которые находятся в циркуляции в кровяном русле. Из-за того, что мы взяли у пациента кровь, подвергли её центрифугированию – это уже для нейтрофилов определённый стресс. Соответственно их можно считать только условно интактными, в ответ на этот стресс они, конечно, могут выделять определённый уровень различных цитокинов. Мы этот уровень так же учитывали, как контрольный. Надо понимать, что эти нейтрофилы условно интактные, они могут после простой инкубации, без воздействий извне, уже иметь уровень секреции определённых цитокинов.

Ученый секретарь дис. совета, д.м.н., проф., ЗДН РФ Тузанкина И.А. В заключении ведущей организации сообщается, что диссертация является самостоятельно выполненной, научно-квалификационной работой, в которой решена важная научная задача, раскрывающая по изучению механизмов взаимодействия в системе клетки иммунной системы синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора ZP2 - грамотрицательные бактерии, что имеет существенное значение для иммунологии. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, представленная диссертационная работа соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой

степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании лаборатории Института экологии и генетики микроорганизмов – филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН «08» ноября 2019 г., протокол заседания № 14.

На диссертацию и автореферат поступило 4 положительных отзыва, не имеющих вопросов и замечаний (*отзывы прил.*). Первый отзыв был дан академиком РАН, д.б.н., проф. **Зверевым Виталием Васильевичем**, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ (г. Москва). Он подчеркивает значимость диссертации Дукардта В.В., ее актуальность, теоретическую и практическую ценность, считает, что в работе решена конкретная научная задача по проведению анализа механизмов цитокиновой регуляции при фагоцитозе бактерий и воздействии синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагонального колониестимулирующего фактора ZP2. Есть отзыв от члена-корреспондента РАН, д.м.н., проф. **Свитич Оксаны Анатольевны**, директора ФГБНУ НИИ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (г. Москва). По ее мнению, автореферат написан традиционно со строгим и логическим изложением данных собственных исследований. Все экспериментальные данные изложены в таблицах и рисунках хорошего качества. Результаты, полученные автором, являются новыми и способствуют развитию современной медицинской науки. Поступил отзыв от д.б.н., проф. **Хайдукова Сергея Валерьевича**, старшего научного сотрудника лаборатории углеводов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В отзыве отмечено, что результаты, полученные автором, новы и способствуют развитию современной иммунологии, выводы работы полностью

соответствуют поставленной цели и задачам, соответствуют ее содержанию, базируются на результатах статистического анализа фактических данных и логично вытекают из них. Четвертый отзыв прислал д.м.н., проф. ЗДН РФ **Жестков Александр Викторович**, зав. кафедрой микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, он отмечает, что в диссертации Дукардта В.В. содержится решение задачи, важной для специальности клиническая иммунология, аллергология и связанной с оценкой особенностей продукции цитокинов нейтрофилами при фагоцитозе грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Все рецензенты считают, что, судя по автореферату, в исследовании содержится решение задачи, имеющей существенное значение для специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология – по выявлению особенностей реакции нейтрофилов при фагоцитозе бактерий, а также при воздействии синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Работа соответствует требованиям ВАК, автор достоин присуждения ученой степени кандидата медицинских наук.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Предлагает заслушать выступления официальных оппонентов. Пожалуйста, Арег Артемович Тотолян.

Тотолян А.А., 1-й официальный оппонент, академик РАН, д.м.н., профессор. Озвучивает положительный отзыв (*отзыв прил.*). При ознакомлении с содержанием диссертационной работы возникли 4 вопроса, а также ещё есть пятый вопрос, который не нашёл отражения в отзыве и пойдёт, как дополнение. Часть вопросов носят дискуссионный характер, но хотелось, тем не менее, узнать мнение Виктора Владимировича по этому поводу.

Вопрос 1: *Могут ли цитокины, секретируемые нейтрофилами в достаточно широком спектре, синтезироваться в течение 1 часа инкубации*

и активации клеток, или методика предназначена для выявления пресинтезированных цитокинов?

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемый Арег Артёмович, наш взгляд таков. Методика эта предназначена как для выявления преформированных цитокинов, так и позволяет оценивать и индуцированную секрецию внутриклеточных цитокинов нейтрофилов, потому что в течение 1 часа вполне возможна выработка новых цитокинов и выброс их в культуральную среду.

Тотолян А.А., 1-й официальный оппонент, академик РАН, д.м.н., профессор. Вопрос 2: *Цитокиноподобная активность бактерий – это секреция цитокинов, идентичных цитокинам человека, или это какие-то белки бактерий, способные специфически или неспецифически связываться с антителами против цитокинов человека?*

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемый Арег Артёмович, однозначно ответить на Ваш вопрос, я думаю, не представляется возможным. По нашему мнению бактерии, и, в первую очередь, золотистый стафилококк, способны выделять широкий спектр белков (белок А, белок F), которые способны неспецифически связываться с IgG человека и животных. Именно эти иммуноглобулины используются в тест-системах для детекции цитокинов. В то же время, не исключено, что какие-то участки этих белков могут обладать тропностью к Fab-фрагментам иммуноглобулинов. Об этом может свидетельствовать тот факт, что цитокиноподобная активность в отношении некоторых цитокинов выявляется в очень высоких значениях, а в отношении других цитокинов – в крайне низких, что может свидетельствовать о некоторой специфичности взаимодействий цитокиноподобных субстанций с иммуноглобулинами тест-систем. Хочу сказать, что в настоящее время коллектив исследователей под руководством профессоров Зурочки Александра Владимировича и Гриценко Виктора Александровича занимается этими вопросами. Выделены белки из супернатантов золотистого стафилококка и изучается их специфичность при

взаимодействии с тест-системами, содержащими IgG против различных антигенов, не обязательно цитокиновым. Частично эти результаты опубликованы.

Тотолян А.А., 1-й официальный оппонент, академик РАН, д.м.н., профессор. Вопрос 3. *Имеются ли в литературе другие исследования по цитокиноподобной активности бактерий кроме ваших?*

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемый Арег Артёмович, как я уже говорил, мы нашли у китайских исследователей под руководством Ньюмана Джейвда, за 2016 год, описанный ими феномен определения веществ, названных ими цитокиноподобными, у золотистого стафилококка с помощью тест-систем к цитокинам мыши.

Тотолян А.А., 1-й официальный оппонент, академик РАН, д.м.н., профессор. Вопрос 4: *Какой предположительный механизм действия пептида ZP2 на цитокиноподобную активность стафилококков?*

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемый Арег Артёмович, есть несколько вариантов воздействия пептида на цитокиноподобную активность стафилококков. Он может как повышать, так и снижать их цитокиноподобную активность или оставлять её без изменений. Соответственно и вариантов механизмов воздействия может быть несколько. Снижение уровня цитокиноподобных веществ может быть напрямую связано с подавлением роста и размножения бактерий пептидом, что показано в диссертационной работе Зурочки Владимира Александровича в 2016 г., где у пептида ZP2 были выявлены бактерицидные свойства.

Что же касается стимуляции продукции цитокиноподобных веществ, можно допустить, что бактерии могут использовать пептид в качестве источника питательных веществ. Микроорганизм получает дополнительные питательные вещества, стимулируются его рост, размножение и, возможно, его функциональная активность.

Тотолян А.А., 1-й официальный оппонент, академик РАН, д.м.н., профессор. Ещё один вопрос, назовём его дополнительным, поскольку в

официальном отзыве он отсутствует. *При оценке секреции цитокинов нейтрофилами Вы определяли 17 цитокинов, а при оценке цитокиноподобной активности бактерий использовали 15-плексный набор. Сознательно ли это было сделано, и есть ли в этом какой-нибудь скрытый смысл?*

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемый Арег Артёмович, надо сказать, что это было сделано и сознательно, и не совсем так. Во-первых, не всегда имелись возможности использовать одни и те же тест-системы. Но, с другой стороны, использование тест-систем разных производителей повышает достоверность того, что выявленные изменения не являются артефактом.

Тотолян А.А., 1-й официальный оппонент, академик РАН, д.м.н., профессор. Зачитывает 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 ученой степени кандидата медицинских наук, представляет собой законченную научную квалификационную работу, содержащую решение важной научной задачи для клинической иммунологии и аллергологии, состоящую в проведении анализа механизмов цитокиновой регуляции нейтрофилов при фагоцитозе бактерий и воздействии синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Работа по своей научной новизне, научной и практической значимости, объёму исследований отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно раздела II «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (в ред. Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изм., утв. 21.04.2016 г. № 335). имеет существенное значение для клинической иммунологии и аллергологии, а диссертант заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Виктор Владимирович, можете сказать несколько слов оппоненту.

Соискатель Дукардт В.В. Выражает благодарность акад. РАН, д.м.н., проф. Тотоляну А.А.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Предоставляет слово 2-му официальному оппоненту Калущкому Павлу Вячеславовичу.

Калущкий П.В., 2-й официальный оппонент, д.м.н., профессор. Зачитывает положительный отзыв (*отзыв прил.*). Задаёт 4 вопроса.

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

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемый Павел Вячеславович, принципиальное отличие заключается в том, что при оценке внутриклеточных цитокинов методом проточной цитометрии определяются цитокины, находящиеся внутри клетки, секреция таких цитокинов и, следовательно, функциональная активность клетки не определяется. Наша методика позволяет определить функциональную активность нейтрофилов, а именно секрецию во внеклеточное пространство как спонтанных (в случае простой инкубации нейтрофилов без дополнительного воздействия), так и индуцированных (бактериями или пептидом ZP2) цитокинов.

Калущкий П.В., 2-й официальный оппонент, д.м.н., профессор. 2 вопрос. *На Ваш взгляд, почему у стафилококков цитокиноподобная активность намного выше и шире по спектру, чем у грамотрицательных микроорганизмов?*

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемый Павел Вячеславович, скорее всего, это связано с характером белковых молекул, которые способны синтезировать и секретировать стафилококки, а, в особенности, золотистый стафилококк. Например, секретлируемые им высокомолекулярные белки: белок-А и белок-Г с молекулярной массой более 100 тыс. дальтон (для сравнения молекулярная масса цитокинов 15-16 тыс. дальтон). Эти белки

могут неспецифически, а, возможно, и частично специфически связываться с иммуноглобулинами против цитокинов человека. Не исключено, что стафилококки способны секретировать и другие вещества. Известно, что *S.aureus* может синтезировать гормоноподобные соединения (катехоламины и гонадотропный гормон и, как я уже упоминал, лизоцим, подобная способность у грамотрицательных бактерий не описана. Поэтому стафилококки могут как неспецифически реагировать за счёт белков-Аи F с иммуноглобулинами тест-систем против цитокинов, так и, возможно, секретировать вещества, связывающиеся в определённой степени специфично с Fab-фрагментами иммуноглобулинов тест-систем.

Калуцкий П.В., 2-й официальный оппонент, д.м.н., профессор.

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

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемый Павел Вячеславович, по видимому, живые бактерии способны использовать цитокины как белки, включая их в свою пищевую цепь, разрушая цитокины протеолитическими ферментами. Возможно антицитокиновая активность является одним из способов защиты бактерий в очаге воспаления за счёт снижения концентрации провоспалительных цитокинов.

Калуцкий П.В., 2-й официальный оппонент, д.м.н., профессор.

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

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемый Павел Вячеславович, скорее всего, да. Например дефенсины и кателицидины способны нарушать структуру и функцию цитоплазматической мембраны микроорганизмов и функционирование микробной клетки, тем самым они могут снижать и их цитокиноподобную и антицитокиновую активность. Но таких данных мы в литературе не находили.

Калуцкий П.В., 2-й официальный оппонент, д.м.н., профессор.

Оглашает 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 ученой 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 регуляции нейтрофилов при фагоцитозе бактерий и воздействии синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора ZP2. 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 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.

Соискатель Дукардт В.В. Благодарит Калуцкого П.В.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Пожалуйста, кто желает продолжить дискуссию? Прошу, Борис Германович.

Юшков Б.Г., чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ЗДН РФ. Уважаемый Валерий Александрович, уважаемый Виктор Владимирович, уважаемые коллеги. Я полностью согласен с заключениями официальных оппонентов, но, как патофизиолог, хотел бы обратить внимание на некоторые аспекты, которые, на мой взгляд, остались в стороне, хотя представляют достаточно большой интерес с точки зрения расшифровки механизмов взаимодействий. У меня на этот счёт есть несколько замечаний.

Первое, когда Вы говорите об активности клеток, то, конечно, надо делать пересчёт на клетку, потому что только так можно оценить активность той или иной клетки.

Второй момент, из материалов и методов я не очень понял, всё-таки, кто является донором. Одно дело, если Вы взяли доноров из клиники, другое дело – когда на станции переливания крови.

Ещё один момент в той или иной степени звучал, но кое-что, на мой взгляд, было упущено. Надо было, всё таки, сравнить цитокиновый спектр, цитокиноподобные вещества у разных штаммов. Если бы прозвучало, что для грамположительных такой-то спектр характерен, а для грамотрицательных такой-то, всё было бы более убедительно.

Почему Вы не сравнили выработку цитокинов бактериями и нейтрофилами? Получается большую часть цитокинов вырабатывают нейтрофилы. И в то же время очень интересное наблюдение, почему гранулоцитарный колониестимулирующий фактор нейтрофилами вырабатывается в меньшем количестве, чем бактериями? То же касается IL-12p70. Когда нейтрофилы вырабатывают цитокины – это понятно. А вот какой биологический смысл, когда бактерия вырабатывает цитокиноподобное вещество в большем количестве?

Ну и что касается оформления. Где-то не хватает одного слова, а смысл получается другой. Вот таблица 3: Супернатант нейтрофилов + ZP2. Вы же к клеткам его добавляли, а, как написано, получается Вы взяли супернатант, добавили туда цитокин.

По поводу цитокиноподобных веществ. Надо на литературные источники сослаться, по каким критериям Вы ставите знак равенства между цитокинами и цитокиноподобными веществами.

Все эти замечания мелкие, так сказать, заметки на полях. Но мне кажется, что если бы Вы это сделали, чётче и убедительней прозвучали бы Ваши выводы.

Соискатель Дукардт В.В. Глубокоуважаемый Борис Германович, спасибо за объективные и ценные замечания. Мы обязательно учтём их в дальнейших исследованиях и постараемся убрать из оформления неточности, а этим вопросам уделить больше внимания.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Кто-нибудь ещё желает высказаться? Достаточно. Тогда вам заключительное слово. Пожалуйста, Виктор Владимирович.

Соискатель Дукардт В.В. Выражает всем благодарность.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Переходим к голосованию. Счётная комиссия предлагается в таком составе: Чистякова Гузель Нуховна, д.м.н., проф., Цывьян Павел Борисович, д.м.н., проф. и Проценко Юрий Леонидович, д.б.н. Кто «за» эту комиссию, прошу голосовать. Кто «против», «воздержался»? Принято единогласно.

Голосование.

Председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Черешнев В.А. Пока идет подсчет голосов, все остальные могут посмотреть проект заключения и, если есть какие-то замечания, сразу отметить недостатки.

Предоставляет слово председателю счетной комиссии Цывьяну Павлу Борисовичу.

Цывьян П.Б., председатель счетной комиссии, д.м.н., проф. Уважаемый председатель, уважаемые коллеги, разрешите зачитать протокол №2 заседания счётной комиссии (*зачитывает протокол № 2 счетной комиссии от 18 декабря 2019 года*) Состав совета – 21 человек, присутствовало на заседании 15 членов совета (в том числе по профилю рассматриваемой диссертации – 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология – 7 докторов медицинских наук. Роздано бюллетеней – 15. Осталось нерозданных бюллетеней – 5. Оказалось в урне бюллетеней – 15.

Результаты голосования по вопросу о присуждении ученой степени кандидата медицинских наук Дукардту Виктору Владимировичу:

за - 15, против - 0, недействительных бюллетеней - нет.

Открытым голосованием Протокол счетной комиссии утверждается единогласно.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Ну что ж, Виктор Владимирович, поздравляем Вас с успешной защитой диссертации.

Уточняет у членов дис. совета есть ли замечания и предложения по тексту проекта Заключения.

Юшков Б.Г., чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ЗДН РФ. Внес предложения об изменении в проект Заключения: убрать орфографические и стилистические ошибки.

Черешнев В.А., председатель дис. совета, академик РАН, д.м.н., проф. Кто за то, чтобы принять Заключение дис. совета в целом, прошу голосовать.

Открытым голосованием Заключение дис. совета утверждается единогласно.

После внесения предложений в соответствии с п.32 «Положения о присуждении ученых степеней» единогласным открытым голосованием принимается следующий **текст заключения:**

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана научная концепция, определяющая роль синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора Zp2 в системе взаимодействия пептид-цитокины нейтрофилов -бактерии;

предложена оригинальная научная гипотеза о наличии влияния низкомолекулярного синтетического пептида Zp2, представляющего собой

активный центр гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, на нейтрофилы и грамположительные и грамотрицательные бактерии, при этом пептид стимулирует секрецию цитокинов нейтрофилами, в том числе и при воздействии на них как самих бактерий, так и их супернатантов;

доказано наличие закономерностей, определяющих эффекты секреции цитокинов нейтрофилов в системе взаимодействия клетки – пептид – бактерии;

введены новые понятия и методики выявления секреции нейтрофилами широкого спектра цитокинов и влияния на их секрецию синтетического пептида Zp2 и бактерий.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения о наличии новых, неизвестных ранее свойств синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора Zp2 влиять на секрецию цитокинов нейтрофилами в системе взаимодействия клетки – пептид – бактерии;

применительно к проблематике диссертации эффективно использован комплекс современных методов исследования цитокинов нейтрофилов и оценки механизмов цитокиновой регуляции в системе взаимодействия клетки – бактерии – пептид, как высокоспецифичных, так и интегральных, а также широкий спектр современных статистических методов;

изложены:

- факты, доказывающие влияние на цитокиновую активность нейтрофилов синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора Zp2;

- аргументы, свидетельствующие о широком спектре секреции цитокинов нейтрофилами и стимуляцией или депрессии их продукции при

различных воздействиях (синтетический пептид, бактерии, продукты секреции бактерий);

- доказательства значимости влияния синтетического пептида Zp2 на цитокиновую продукцию нейтрофилов, в системе взаимодействия клетки – бактерии – пептид;

- доказательства зависимостей регуляторных влияний пептида Zp2 на секрецию цитокинов нейтрофилами, а также механизмов этой регуляции в системе взаимодействия нейтрофил – пептид - бактерии;

раскрыты существенные проявления теории, а именно: особенности влияния на секрецию нейтрофилов цитокинов в широком спектре, изменение спектра и уровней секреции цитокинов при воздействии на нейтрофилы различных комбинаций бактерий, их супернатантов и синтетического пептида Zp2;

изучены:

- основные механизмы иммуностимулирующего действия синтетического пептида Zp2;

- особенности влияния синтетического пептида Zp2 фактора на секрецию цитокинов нейтрофилов;

- механизмы влияния синтетического пептида Zp2 на секрецию цитокинов нейтрофилами при воздействии на них различных видов и штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, их супернатантов, а также при комбинации воздействия их с добавлением к системе синтетического пептида Zp2;

проведена модернизация способов оценки цитокинов нейтрофилов, разработана модель оценки цитокинов в системе взаимодействия живые клетки – бактерии – пептид.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены результаты, полученные в ходе исследования, а именно - 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, внедренная:

- 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) – при разработке методических подходов к оценке функциональной активности нейтрофилов при их взаимодействии с бактериями различных видов;

- в учебный процесс студентов биологического и медицинского профиля в кафедры микробиологии и вирусологии № 1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону) – комплекс новых научных положений, касающихся механизмов участия активных центров цитокинов в регуляции цитокинов клеток иммунной системы, на примере синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора Zp2;

- в технологический процесс ООО «НПФ Верта» (Санкт-Петербург) и медицинскую практику работы ООО «Академический инновационный научный центр» (г. Челябинск), ООО «Медицинский лабораторный центр «Фамилия» (г. Челябинск) – при разработке и использовании косметологических препаратов «АЦЕГРАМ-гель» и «АЦЕГРАМ-спрей»;

определена перспектива использования полученных данных в процессах создания тест-систем для оценки цитокинов, с учетом влияния пептида на цитокиновую секрецию клеток иммунной системы в условиях

взаимодействия пептид – клетки – бактерии, а также с учетом цитокиноподобной активности бактерий, в первую очередь стафилококков;

создана система практических рекомендаций для более эффективного использования тест систем определения уровней цитокинов в системе взаимодействия пептид – нейтрофилы – бактерии;

представлены рекомендации по разработке методики оценки цитокинового статуса нейтрофилов, которую можно использовать для определения влияния различных факторов на продукцию фагоцитами цитокинов. При изучении содержания цитокинов в инфицированных биоматериалах требуется учитывать цитокиноподобную и антицитокиновую активность сопутствующих бактерий.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ – результаты получены на сертифицированном оборудовании, с использованием коммерческих наборов для проведения лабораторных исследований в точном соответствии с инструкциями производителей, с использованием стандартизированных калибровочных и контрольных материалов; методы исследования современны, используются для мультиплексного анализа широкого спектра цитокинов; статистические методы разнообразны и адекватны;

теория построена на использовании известных, проверяемых данных, фактах о наличии регуляторных эффектов синтетических пептидов активных центров цитокинов на секрецию цитокинов клеток при различных воздействиях и повреждениях, в том числе микробных и согласуется с опубликованными данными по теме диссертации;

идея исследования **базируется** на анализе экспериментального материала, обобщении литературных данных о механизмах цитокинов и их синтетических аналогов, обладающих регуляторными эффектами, в том числе и на секрецию цитокинов нейтрофилами;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по регуляторным эффектам цитокинов и их синтетических аналогов;

установлено качественное и количественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике;

использованы современные методики сбора и обработки исходной информации, представительные выборочные совокупности с обоснованием экспериментального материала (клетки иммунной системы, грамположительные и грамотрицательные бактерии различных видов), включенных в исследование, и разбивки их на группы, статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0»;

Личный вклад соискателя состоит:

включенное участие на всех этапах процесса: **непосредственном участии** в получении исходных данных, обработке и интерпретации экспериментальных данных, личном участии в апробации результатов исследования, подготовке основных публикаций по выполненной работе.

Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы, соответствует критериям внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследования, концептуальности и взаимосвязи выводов с поставленной целью и задачами.

Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы, соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследования, непротиворечивой методологической платформы, основной идейной линии, концептуальности и взаимосвязи выводов.

Диссертационный совет пришёл к выводу о том, что диссертация Дукардта В.В. представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение актуальной научной задачи для отрасли знаний – медицинские науки, по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология и аллергология, в которой проведен анализ механизмов цитокиновой регуляции нейтрофилов при фагоцитозе бактерий и воздействии

синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора ZP2; по актуальности, объему наблюдений, используемым методическим подходам, научной новизне, практической ценности полученных данных и выводов диссертация полностью соответствует критериям раздела II «Положения о присуждении ученых степеней» (утв. Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, с изм., утв. 21.04.2016 г. № 335, в ред. от 02.08.2016 г. № 748, 29.05.2017 г. № 650, 01.10.2018 г. № 1168), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а диссертант Дукардт В.В. достоин присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Председатель Совета Д 004.027.02
на базе ИИФ УрО РАН, академик РАН,
д.м.н., проф.

В.З.



В.А. Черешнев

Ученый секретарь Совета Д 004.027.02
на базе ИИФ УрО РАН,
д.м.н., проф., ЗДН РФ

И.А. Тузанкина

И.А. Тузанкина

18 декабря 2019 года