

«УТВЕРЖДАЮ»

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



В.А. Демаков

« 8 » 11 2019 г.

О Т З Ы В

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации 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 ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

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

Развитие, течение и исход инфекционно-воспалительного процесса в значительной степени связаны с функционированием иммунной системы. Ранние этапы формирования инфекционной патологии тесно сопряжены с взаимодействием бактерий и профессиональных фагоцитов (прежде всего, нейтрофилов) и вовлечением в него цитокинов. Последние могут выступать не только в роли чисто регуляторных молекул, усиливающих или снижающих воспаление, но и выступать в роли самостоятельных антимикробных факторов. 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. В конце 90-х годов прошлого века были получены синтетические пептидные аналоги активного центра данного цитокина, обладавшие иммуностимулирующей активностью, идентичной таковой цельной молекуле ГМ-КСФ, а в последние годы у одного из них (синтетический пептид ZP2) выявлен комплекс новых свойств, отражающий наличие у него не только широкого спектра иммуностропных, но антимикробных и репаративных эффектов, что требует проведения 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 остается 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.

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.

Связь работы с плановой тематикой научно-исследовательских работ. Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте иммунологии и физиологии Уральского

отделения Российской академии наук согласно плану научно-исследовательской деятельности ИИФ УрО РАН г. Екатеринбург (№ Гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, дата регистрации 06.02.2018).

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. 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, этот процесс также связан с видом бактерий.

Впервые исследованы новые свойства грамположительных и грамотрицательных бактерий – способность секретировать в культуральную среду цитокиноподобные вещества.

Показано, что наибольшей цитокиноподобной активностью, как по спектру, так и по уровню цитокинопродукции, обладали бактерии вида *S. aureus*.

Синтетический пептид ZP2 обладал способностью снижать/повышать цитокино-продукцию бактерий, при этом вариабельность ответов зависела 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. 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.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов. 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 ее 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 иммуностропной, антимикробной и репарационной активностью, необходимо учитывать цитокиноподобную и антицитокиновую активность используемых в опытах микроорганизмов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. 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-септических заболеваний, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями, в практическом здравоохранении врачами, занимающимися проблемами гнойно-воспалительных заболеваний.

Личный вклад 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. Зурочкой А.В. и д.м.н., проф. Гриценко В.А. 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 Тяпаева Я.В., аспирант Белозерцева Ю.П.), НИИ Особо чистых биопрепаратов ФМБА России (д.б.н. Колобов А.А.) 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 проведен 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.

Степень обоснованности и достоверность полученных результатов исследования обусловлена широким спектром современных лабораторных и инструментальных исследований, достаточным объемом выборки. Достоверность результатов подтверждена актом проверки первичной документации, проведенной экспертной комиссией Института 15 июня 2019г. (на основании Приказа ИИФ УрО РАН № 5 от 14.06.2019).

Основные материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на иммунологических конференциях различного уровня (Калининград, 2016, Челябинск, 2017), 11, 12, 13 Всероссийских конференциях с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 2016, 2017, 2018), Дни иммунологии в Санкт-Петербурге (2017).

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

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).

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

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 надежность полученных результатов. Результаты исследований адекватно обработаны статистически.

Результаты собственных исследований автора описаны в 3 главах. Глава 3 посвящена исследованию механизмов действия грамположительных и грамотрицательных бактерий различных видов на цитокинопродукцию нейтрофилов. Особое внимание уделено взаимодействию клеток нейтрофилов как с живыми бактериями, так и их супернатантами.

В главе 4 отражено исследование цитокиноподобной активности бактерий различных видов, особое внимание уделено анализу биоразнообразия цитокиноподобной активности стафилококков, выявивших наибольший спектр по цитокиноподобной активности с изучаемыми тест-системами.

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.

Результаты исследований обобщены и кратко отражены в главе «Заключение». Шесть выводов диссертации четко сформулированы и непосредственно вытекают из собственных данных автора и соответствуют цели и задачам исследования.

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

Замечания и вопросы.

Положительно оценивая работу, в целом, хотелось бы задать диссертанту ряд вопросов:

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


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

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 может быть представлена к защите по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, медицинские науки. Автор диссертации заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании проблемной комиссии по иммунологии и аллергологии Института экологии и генетики микроорганизмов – филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН «_8_» __11__ 2019 г., протокол заседания № 14.

Доктор медицинских наук,
профессор, зам. директора по научной работе
«ИЭГМ УрО РАН»


Сергей Владимирович Гейн

Подпись Гейна С.В. заверяю:
Директор «ИЭГМ УрО РАН»,
чл.– корр. РАН, профессор,
доктор медицинских наук,


Виталий Алексеевич Демаков



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН) филиал «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» («ИЭГМ УрО РАН»).

614081, Пермский край, г. Пермь, ул. Голева, д.13

Тел.: (342) 280-74-42, факс: 280-92-11

www.iegm.ru; e-mail: info@iegm.ru

Отзыв ведущей организации поступил 02.12.2019 года
Ученый секретарь Совета Д 004.027.02

С отзывом ведущей организации ознакомлен 02.12.2019 года
Соискатель



И.А. Тузанкина



В.В. Дукардт