

О Т З Ы В

официального оппонента, академика РАН, д.м.н., профессора Тотоляна А.А. на диссертационную работу Добрыниной Марии Александровны на тему: «Иммунные и антибактериальные эффекты синтетического пептида гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в системе взаимодействия клетка-пептид-грамотрицательные бактерии», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Актуальность избранной темы. Актуальность данного исследования не вызывает сомнения и обусловлена тем, что 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 одновременно различными свойствами, в том числе иммуномодулирующими и антимикробными. Необходимость создания новых иммуноактивных соединений на основе эндогенных пептидных регуляторов обусловлена ключевой ролью иммунной системы в развитии, течении и исходе многих патологических процессов, возникающих в макроорганизме. В этой связи особый интерес представляют цитокины, продуцируемые иммунокомпетентными клетками для поддержания гомеостаза организма, которые могут стать основой для создания лекарственных препаратов, позитивно влияющих на поврежденные звенья иммунной системы. В частности, к таким цитокинам относится гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), нашедший широкое применение в клинической практике лечения различных заболеваний. В конце XX века из активного центра GM-CSF были получены пептиды, обладающие активностью, идентичной таковой цельной молекулы GM-CSF. Эти исследования позволили создать основу для дальнейшего изучения иммунобиологических свойств синтетических пептидов активного центра GM-CSF.

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 штаммов 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.

При исследовании ряда синтетических пептидов активного центра GM-CSF (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 воздействие синтетического пептида ZP2 на различные грамотрицательные микробы остается мало изученным. 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. Поэтому выявление новых иммуностимулирующих и антимикробных эффектов синтетического пептида ZP2 в системе взаимодействия клетка-пептид-грамотрицательные бактерии является несомненно актуальным.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Определяется теоретической базой, представленной трудами отечественных и зарубежных ученых в обзоре литературы, достоверностью собранного материала и адекватностью его статистического анализа. Достоверность 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. Достоверность результатов подтверждена актом проверки первичной документации экспертами ИИФ УрО

РАН (акт проверки от 14.06.2019 г.). Исследования были проведены с использованием синтетического пептида ZP2, иммунокомпетентных клеток (лимфоциты, нейтрофилы), полученных из периферической крови 50 здоровых доноров методом центрифугирования на двойном градиенте фиколл-верографина, клеток культуры ТНР-1 (клетки моноцитарной лейкемии человека), 2 музейных штаммах бактерий – *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P), 10 клинических изолятах *Staphylococcus aureus* и 71 клиническом изоляте грамотрицательных микроорганизмов разных видов (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*). Получение биологического материала для исследования (клетки крови) произведено с учетом 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.

Научная новизна. В работе автором получены новые данные по исследованию иммуностропных 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 тест-штамма *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.

Полученные автором результаты могут быть использованы в практической работе в преподавании соответствующих разделов на теоретических и клинических кафедрах медицинских вузов, в научно-исследовательской работе иммунологических лабораторий профильных институтов и в клинической практике

работы иммунологов при лечении больных гнойно-воспалительными заболеваниями, вызванных грамотрицательными бактериями.

Публикации. Соискателем 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 (4,84 печ. листа).

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

Основные материалы диссертационной работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (г. Абакан, 2011), конференциях иммунологов Урала (Тюмень, 2012; Сыктывкар, 2013; Екатеринбург, 2014; Пермь, 2015; Калининград, 2016), Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013), «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2015), 9-13 Всероссийских конференциях с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018).

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., сотрудники д.м.н., проф. Петров С.А., к.б.н., Костоломова Е.Г.), с сотрудниками 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 (аспирант Тяпаева Я.В., аспирант 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.

Характеристика работы. Диссертация изложена на 161 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 2 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 212 источников, из них 143 иностранных и 69 отечественных. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 10 рисунками, содержит приложение.

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

взаимодействия ГМ-КСФ и его синтетических пептидных аналогов с клетками иммунной системы и микроорганизмами.

В главе «Материалы и методы» описаны методики, использованные при выполнении поставленных задач. Автор использовал достаточный набор современных иммунологических (включая проточную цитометрию и мультиплексный анализ) и микробиологических методов (в том числе биопленкообразование бактерий), обеспечивающих надежность полученных результатов. Результаты исследований адекватно обработаны статистически.

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

В главе 4 отражено исследование влияния синтетического пептида ZP2 на рост и размножение грамотрицательных бактерий различных видов, на их биопленкообразование, рассмотрены вопросы видовой и штаммовой вариабельности ответов бактерий на пептид, изучены механизмы антибактериального действия как пептида, так и косметического средства (АЦЕГРАМ) на широкий спектр грамотрицательных бактерий (*E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*). Показано, что синтетический пептид ZP2 в целом снижает рост, размножение и биопленкообразование грамотрицательных бактерий различных видов и штаммов.

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

Автореферат диссертации полностью отражает материалы диссертационной работы.

Внедрение результатов исследования 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).

По ходу рассмотрения работы возник ряд вопросов и замечаний. В качестве замечаний хотелось бы отметить, что диссертационная работа носит прежде всего экспериментальный характер, а не клиническому применению косметических средств «АЦЕГРАМ –спрей» и «АЦЕГРАМ-гель», в связи с чем вызывает сомнения целесообразность и корректность практической рекомендации №1.

Также возникли 2 вопроса, носящие в целом дискуссионный характер, но требующие разъяснения:

1. Каков предположительный механизм действия синтетического пептида ZP2 на апоптоз мононуклеарных клеток?
2. На какие структуры грамотрицательных бактерий может действовать пептид ZP2, нарушая их биопленкообразование?

Перечисленные замечания и вопросы не влияют на позитивную оценку диссертационной работы и не снижают общей ценности диссертационного исследования.

Заключение. Диссертационная работа Добрыниной Марии Александровны на тему: «Иммунные и антибактериальные эффекты синтетического пептида гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в системе

взаимодействия клетка-пептид-грамотрицательные бактерии», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология – представляет собой законченную квалификационную научно-исследовательскую работу, содержащую решение конкретной научной задачи по исследованию механизмов взаимодействия в системе клетки иммунной системы – синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора ZP2 – грамотрицательные бактерии.

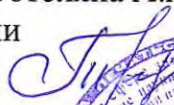
Работа по своей научной новизне, научной и практической значимости, объему исследований отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (в ред. Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изм., утв. 21.04.2016 г. № 335), а автор диссертации заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент,
Академик РАН, доктор медицинских наук, профессор,
директор ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера, заведующий
лабораторией молекулярной иммунологии



А.А. Тотолян

Подпись д.м.н., профессора, академика РАН Тотоляна А.А. заверяю
Ученый секретарь ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера, к.м.н.



Г.Ф. Трифонова

«29» октября 2019 года



Тотолян Арег Артемович, академик РАН, д.м.н., профессор, директор Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии. Адрес: г. Санкт-Петербург, 197101, ул. Мира, д. 14. Телефоны: (812) 233-20-92, 233-08-56. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru; totolian@pasteurorg.ru

Отзыв официального оппонента поступил «29» ноября 2019 г.
Ученый секретарь Совета Д 004.027.02



И.А. Тузанкина

С отзывом официального оппонента ознакомлена «29» ноября 2019 г.
Соискатель



М.А. Добрынина