

О Т З Ы В

официального оппонента, академика РАН, д.м.н., профессора Тотоляна А.А. 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 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. Работа посвящена созданию нового методического подхода к оценке цитокинов клеток при воздействии на них живых бактерий.

Развитие, течение и исход инфекционно-воспалительного процесса в значительной степени связаны с 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 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. Не является исключением и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), нашедший широкое применение в клинической практике. В последние годы 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 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 экзосомы, 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 клеток 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 научных результатов обусловлена широким спектром современных лабораторных методов исследований, достаточным объемом выборки.

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. Автором проведены эксперименты на 30 штаммах грамотрицательных и 108 штаммах грамположительных культур бактерий (как музейных штаммах, так и изолятов 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 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 (протокол №2 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, 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 конференциях иммунологов Урала (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).

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, 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 цитокинопродукцию 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.

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 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.

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.

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 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 конференциях иммунологов Урала (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).

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.

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.

Характеристика работы. 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.

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, показано что

цитокиноподобная активность выявляется в основном у грамположительных микробов, и в меньшей степени у грамотрицательных бактерий, выявленный феномен достаточно обсужден и требует дальнейших исследований, по-видимому, в рамках других диссертационных работ.

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, выявлена преимущественно антицитокиновая активность как у самих бактерий, так и их супернатантов.

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

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК и отражает цель, задачи, объем, 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 (г.Екатеринбург), Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН (г.Оренбург), НИИ Особо чистых биопрепаратов ФМБА РФ (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» (г.Санкт-Петербург), ООО «Академический инновационный научный центр» (г.Челябинск), в медицинскую практику работы ООО «Медицинского лабораторного центра «Фамилия» (г. Челябинск).

По ходу рассмотрения работы возник ряд вопросов и замечаний. В качестве замечаний хотелось бы отметить, что автор и его научные руководители

явно «пожадничали». В работе впервые описаны новые свойства грамположительных и грамотрицательных бактерий – способность секретировать в культуральную среду цитокиноподобные вещества. Сам по себе этот факт по нашему мнению требует более детального изучения его природы, механизмов межмолекулярного взаимодействия цитокиноподобных веществ с моноклональными антителами против цитокинов человека, а также выяснением целого ряда вопросов: обладают ли эти молекулы той же биологической активностью что и сами цитокины, способны ли они связываться со специфическими рецепторами против соответствующих цитокинов, в случае связывания с рецептором приводит ли это к внутриклеточной передаче сигнала и т.д.? Однако автор предпочел ограничиться описанием самого феномена и изучением влияния на него субстанции ZP2, что ни в коей мере не умаляет достоинств рассматриваемой работы. Тем не менее при ознакомлении с содержанием диссертационной работы возникли также 4 вопроса, носящие в целом дискуссионный характер, но требующие разъяснения:

1. Могут ли цитокины, секретлируемые нейтрофилами в достаточно широком спектре, синтезироваться в течение 1 часа инкубации и активации клеток, или методика предназначена для выявления пресинтезированных цитокинов?

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?

3. Описаны ли в литературе другие исследования по цитокиноподобной активности бактерий кроме Ваших?

4. Каков предположительный механизм воздействия пептида ZP2 на цитокиноподобную активность стафилококков?

Указанные замечания и перечисленные вопросы не влияют на позитивную оценку диссертационной работы в целом.

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 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.

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.



Т.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 ознакомлен «29» ноября 2019 г.
Соискатель



В.В. Дукардт