

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук, Кудрявцева Игоря Владимировича, заведующего лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» на диссертационную работу Сахарнова Николая Александровича на тему «Анализ экспрессии генов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в иммунокомпетентных клетках при ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Актуальность темы исследования

Актуальность изучения ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции определяется исключительной распространенностью этих вирусов, их тропностью к иммунокомпетентным клеткам, широким диапазоном клинических проявлений и различных осложнений, а также недостаточной изученностью молекулярных механизмов иммунопатогенеза этих заболеваний. По данным литературы основное патогенетическое действие ВЭБ и ВГЧ-6 направлено на изменение активности иммунокомпетентных клеток, в том числе путем воздействия на сигнальные пути апоптоза и выживания. Элементы данных сигнальных путей характеризуются высоким полиморфизмом, который обеспечивается на уровне транскрипции кодирующих их генов. В связи с этим соискателем был проведен анализ экспрессии генов сигнальных путей апоптоза и выживания в лейкоцитах крови пациентов с ВЭБ и ВГЧ-6 инфекцией и здоровых доноров.

Научная новизна исследования

С помощью метода ДНК микрочипов был выявлен ряд изменений уровней экспрессии генов и транскриптов - участников сигнальных путей апоптоза и выживания в лейкоцитах крови пациентов с ВЭБ и ВГЧ-6 инфекцией по сравнению со здоровыми донорами. Установлены взаимосвязи между уровнями экспрессии изучаемых генов и транскриптов (изменение которых было значимо в острой фазе инфекций по сравнению со здоровыми донорами) и содержанием различных субпопуляций лимфоцитов (цитотоксических Т-клеток, Т-хелперов, дубль-позитивных Т-клеток, В-клеток и НК-клеток) в острой фазе ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции. Предложены молекулярно-генетические маркеры (BIM/BCL2L11, IAP-2/BIRC3, SF1-NM_201995, XIAP-NM_001167, CELF6), изменения уровней экспрессии которых характерны для тяжелой формы течения ВЭБ инфекции.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Данные, изложенные в диссертационной работе имеют высокую теоретическую значимость, поскольку расширяют существующие представления о молекулярных механизмах иммунопатогенеза ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции и отражают особенности функционального состояния клеточного звена иммунитета.

Практическая значимость исследования заключается в том, что полученные данные могут использоваться для разработки новых методов оценки риска развития тяжелых форм течения ВЭБ инфекции.

Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом исследований и использованием современных инструментальных и аналитических методов, адекватных поставленным задачам. Положения и

выводы, сформулированные автором, логично основываются на полученных результатах, которые были также сопоставлены с данными мировой и отечественной литературы. Результаты диссертационной работы изложены в 12 публикациях, из которых 4 статьи опубликованы в журналах из списка ВАК по теме диссертации. Также по результатам работы было зарегистрировано 4 патента РФ. В автореферате в полной мере отражено содержание диссертационной работы автора.

Общая характеристика исследования

Диссертационная работа Н.А. Сахарнова написана в традиционном стиле, содержит 113 страниц, состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций. В списке литературы представлены зарубежные, так и отечественные работы, а сам список состоит из 167 иностранных и 36 отечественных источников. Работа проиллюстрирована 22 рисунками и 9 таблицами.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования, степень разработанности проблемы, формулирует цель, задачи исследования и положения, выносимые на защиту.

Глава 1 «Обзор литературы» содержит общие сведения о ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции и механизмах их патогенеза, молекулярных механизмах апоптоза и выживания и их регуляции на транскрипционном уровне, а также анализе транскриптома с помощью ДНК микрочипов.

Глава 2 «Материалы и методы» включает характеристику пациентов и формируемых групп исследования. Далее описывается методика проточной цитометрии, дизайн ДНК микрочипов, методика пробоподготовки мРНК и ее гибридизации на ДНК микрочипы, алгоритмы расчета уровней экспрессии генов и транскриптов, алгоритмы расчета взаимосвязей уровней экспрессии генов и транскриптов и содержания субпопуляций лимфоцитов

периферической крови, а также алгоритмы поиска маркеров тяжелой формы течения ВЭБ инфекции.

Глава 3 «Результаты» включает в себя 5 подразделов.

В первом подразделе приводится анализ жизнеспособности лейкоцитов в острой фазе ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции по сравнению со здоровыми донорами. Было выявлено, что в случае ВЭБ инфекции было повышено процентное содержание живых лейкоцитов и снижено процентное содержание апоптотирующих и погибших лейкоцитов. При ВГЧ-6 инфекции повышалось процентное содержание апоптотирующих лейкоцитов.

Во втором подразделе приводится анализ изменений уровней экспрессии генов и транскриптов сигнальных путей апоптоза и выживания в лейкоцитах крови при ВЭБ инфекции по сравнению со здоровыми донорами. Выявлено повышение уровней экспрессии ряда генов и транскриптов, участвующих в ингибировании сигнальных путей апоптоза, а также элементов NF- κ B-опосредованного сигнального пути выживания.

В третьем подразделе приводится анализ изменений уровней экспрессии изучаемых генов и транскриптов в лейкоцитах крови пациентов с ВГЧ-6 инфекцией по сравнению со здоровыми донорами. Показано, что в отличие от ВЭБ инфекции детектируется повышение уровней экспрессии генов и транскриптов про-апоптотических факторов внешнего и митохондриального путей апоптоза.

В четвертом подразделе описывается выявление взаимосвязей между уровнями экспрессии изучаемых генов и транскриптов, изменение которых было значимо по сравнению со здоровыми донорами, и содержанием различных субпопуляций лимфоцитов при ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции.

В пятом подразделе полученные данные об экспрессии изучаемых генов и транскриптов были использованы для поиска молекулярно-генетических маркеров тяжелой формы ВЭБ инфекции. Был предложен набор генов и транскриптов, изменения уровней экспрессии которых не

детектировались при ВЭБ инфекции средней тяжести, а также не зависели от пола и возраста пациентов.

В главе «Обсуждение» проводится анализ и логическое осмысление полученных результатов в сопоставлении с большим количеством данных литературы. Проведенный анализ был визуализирован с помощью наглядных логических схем.

На основе полученных результатов соискатель формулирует заключение и выводы, соответствующие поставленным задачам.

Критических замечаний к диссертационной работе нет. Хотелось бы услышать мнение диссертанта по следующему вопросу:

Каковы перспективы дальнейшего использования выявленных маркеров тяжелой формы течения ВЭБ инфекции? Представляется ли возможной разработка каких-либо тест-систем для практического применения в клинической лабораторной диагностике?

Заключение

Диссертация Н.А. Сахарова «Анализ экспрессии генов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в иммунокомпетентных клетках при ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании результатов выполненных исследований решена актуальная научная задача по анализу экспрессии генов апоптоза и выживания в лейкоцитах крови пациентов с ВЭБ и ВГЧ-6 инфекцией. Рецензируемая диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., № 650 от 29.05.2017г., № 1024 от 28.08.2017г., № 1168 от 01.10.2018г.), предъявляемым

к кандидатским диссертациям, а Н.А.Сахарнов заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Институт экспериментальной медицины» кандидат биологических наук
(14.00.36 – аллергология и иммунология)

Игорь Владимирович Кудрявцев

Подпись И.В. Кудрявцева заверяю,

Ученый секретарь ФГБНУ

«Институт экспериментальной медицины»

Адрес: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12.

Телефон: +7-921-633-80-21

e-mail: igorek1981@yandex.ru



Тихомиров М.Н.