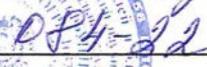


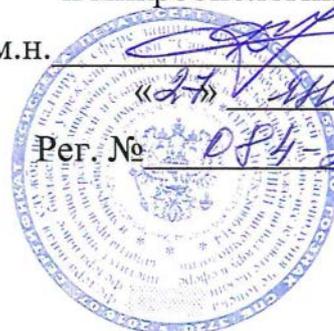
«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по научной работе
ФБУН Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера

к.м.н.  В.Г. Дедков

2022 г.

Рег. № 



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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 к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Актуальность темы диссертационного исследования

В настоящее время показана потенциальная связь между представителями Herpesviridae, этиологическими агентами которых выступают ВЭБ (вирус Эпштейна-Барр) и ВГЧ-6 (вирус герпеса человека 6 типа) и повышенным риском развития аутоиммунных заболеваний. Широкое распространение и разнообразие клинических проявлений патогенов, а также их способность вызывать рецидивирующие инфекции, также делают их изучение исключительно актуальным. Как ВЭБ, так и ВГЧ-6 участвуют в патогенезе инфекционного мононуклеоза, различных поражений центральной нервной системы, ряда воспалительных и онкологических заболеваний. Спектр клинических проявлений ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции постоянно расширяется. ВЭБ и ВГЧ-6 располагают значительным набором факторов, воздействующих на иммунокомпетентные клетки, что позволяет вирусам успешно уклоняться от иммунного ответа и пожизненно персистировать в организме. Несмотря на активное изучение, молекулярные механизмы иммунопатогенеза ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции остаются во многом неисследованными, что препятствует разработке специфических методов терапии. Сложность жизненных циклов вирусов, отсутствие подходящих животных моделей и ограниченные данные о выборе адъювантов и иммунных реакциях препятствуют активной разработке вакцин.

По данным литературы в ходе ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции наблюдаются различные нарушения регуляции сигнальных путей апоптоза и выживания клеток. Чувствительность клеток к апоптозу зависит от изменений уровней экспрессии генов и транскриптов – участников сигнальных путей апоптоза и выживания.

Таким образом, актуальной целью настоящего исследования является изучение экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в лейкоцитах крови пациентов с ВЭБ и ВГЧ-6 инфекцией.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа выполнена в соответствии с отраслевой научно-исследовательской программой Роспотребнадзора «Разработка новых способов оценки и мониторинга функционального состояния клеточного звена иммунитета при вирусных инфекциях с помощью технологии биочипов».

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В ходе диссертационной работы был проведен мультиплексный анализ экспрессии 483 генов и транскриптов участников сигнальных путей апоптоза и выживания в лейкоцитах крови пациентов с ВЭБ и ВГЧ-6 инфекцией.

Установлено, что в лейкоцитах крови в острой фазе ВЭБ инфекции по сравнению со здоровыми донорами повышаются уровни экспрессии антиапоптотических генов и транскриптов (DR5/TNFRSF10B-NR_027140, DCR1/TNFRSF10C-NM_003841, DCR2/TNFRSF10D-NM_003840, CASP6-NM_032992, BIRC2-NM_001166, BIRC2-NM_001256166) и генов сигналинга выживания (NIK/MAP3K14, NEMO/IKBKG), при этом снижаются уровни экспрессии проапоптотических генов и транскриптов (TRAIL/TNFSF10-NM_003810, DR5/TNFRSF10B, FADD-NM_003824, BAK1, BAX-NM_138763, CASP7, CASP7-NM_033338).

Показано, что в лейкоцитах крови в острой фазе ВГЧ-6 инфекции по сравнению со здоровыми донорами повышаются уровни экспрессии проапоптотических генов и транскриптов (TRAIL/TNFSF10, HVEM-L/TNFSF14, DR3/TNFRSF25, DR4/TNFRSF10A-NM_003844, DR5/TNFRSF10B, FADD-NM_003824, FAF1-NM_007051, DAPK2-NM_014326, FLASH/CASP8AP2-NM_001137667, CASP2, FASTK, PUMA/BBC3, OMI/HTRA2, CASP7-NM_001267057, ENDOG-NM_004435), антиапоптотических генов и транскриптов (BCLXL/BCL2L1, ITCH, ITCH-NM_001257138, BTK-NM_001287345), а также генов и транскриптов сигналинга выживания (TRAF-1, TRAF-5, TAB1, MAP4K4-NM_001242560, MAP2K4, MAPK14, MAPK14-NM_001315, JNK1/MAPK8, JNK2/MAPK9).

Выявлены взаимосвязи между уровнями экспрессии выявленных генов и транскриптов и содержанием субпопуляций иммунокомпетентных клеток (цитотоксических Т-клеток, Т-хелперов, дубль-позитивных Т-клеток, В-клеток и НК-клеток) в острой фазе ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции.

Предложен набор молекулярно-генетических маркеров (BIM/BCL2L11, IAP-2/BIRC3, SF1-NM_201995, XIAP-NM_001167, CELF6), изменение экспрессии которых характерно для тяжелой формы течения ВЭБ инфекции.

Степень научной обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений диссертации

Достоверность полученных результатов диссертационного исследования обоснована применением широкого спектра методов инструментального (ДНК микрочипы, проточная цитофлуорометрия, ПЦР) и статистического (Т тест с поправкой на ожидаемую долю ложных отклонений, критерий Уилкса, собственный алгоритм MDA (Microarray Data Analysis) анализа. Научные заключения, положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные на основании результатов диссертационного исследования, соответствуют поставленным целям и задачам, аргументированы и обоснованы.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Полученные автором результаты исследования позволяют оценить вклад широкого спектра генов в механизмы иммунопатогенеза ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции в лейкоцитах крови пациентов, что имеет большую теоретическую значимость. Показано, что в острой фазе ВЭБ инфекции баланс уровней экспрессии генов и транскриптов изменялся в сторону антиапоптотических факторов, а при ВГЧ-6 – проапоптотических.

Практическая значимость исследования заключается в выявлении маркерных генов и транскриптов, изменения экспрессии которых характерны для тяжелого течения ВЭБ инфекции. С их помощью возможна разработка новых методов оценки риска развития тяжелых форм ВЭБ инфекции. Описанные в работе оригинальные подходы к анализу экспрессии генов и транскриптов с помощью ДНК микрочипов могут быть использованы с целью поиска молекулярно-генетических маркеров для оценки риска тяжелого течения заболеваний разного генеза.

Апробация результатов диссертационного исследования и полнота опубликования результатов диссертации в научной печати

Основные результаты диссертации опубликованы в 12 печатных работах, в том числе 4 статья в журналах, рекомендованных ВАК по теме специальности (14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология), 3 статья, индексируемых в базе данных Web of Science, 1 статье – в базе данных Scopus, 1 статье – в базе данных РИНЦ/RSCI и 3 тезисов в материалах всероссийских конференций. Кроме этого зарегистрировано 4 патента РФ на изобретения.

Общая характеристика диссертации

Диссертация Сахарнова Николая Александровича является научным трудом, в рамках которого достигнута поставленная цель и решены задачи исследования. Диссертация оформлена в традиционном стиле в соответствии с требованиями ВАК РФ и ГОСТ Р 7.0.11-2011, изложена на 113 страницах, включает классические

разделы, содержит 9 таблиц и 22 рисунка. Список литературы включает 203 источника, из которых - 36 отечественных и 167 зарубежных.

Работа состоит из последовательно выстроенных логических частей - введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения. В работе представлены заключение, практические рекомендации и выводы.

В разделе «Введение» обосновывается актуальность исследования, определяются цель и задачи, соответствующие тематике и направленности диссертационной работы.

Глава «Обзор литературы» освещает современные представления о ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции, молекулярных механизмах апоптоза и выживания и применении технологии ДНК-микрочипов для анализа транскриптома.

Глава «Материалы и методы» изложена подробно. Высокий научно-методический уровень диссертационного исследования подтверждается использованием современных методов инструментального и статистического анализа.

Глава «Результаты» изложена логично и последовательно описывает проведенные экспериментальные исследования.

Глава «Обсуждение» характеризуется критическим подходом к оценке результатов исследований и глубиной анализа литературы. Приведенные логические схемы в значительной степени структурируют и облегчают понимание полученных результатов.

Заключение, выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы работы хорошо аргументированы, закономерно вытекают из результатов исследования, соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

Замечания к работе

Диссертационная работа выполнена на достаточно высоком научно-методическом уровне. Структура диссертации выстроена логично, содержит все необходимые разделы и характеризуется четкостью формулировок цели, задач и результатов исследования. Замечаний по существу диссертационного исследования Сахарнова Николая Александровича нет. Есть комментарий методического характера: в ходе работы автором был проведен анализ взаимосвязей между уровнями экспрессии изучаемых генов и транскриптов и содержанием субпопуляций лимфоцитов. В связи с тем, что не всегда высокий уровень экспрессии гена означает высокий уровень белка, так как регуляция экспрессии тех или иных генов и кодируемых ими белков может иметь свои особенности, было бы целесообразно подтвердить хотя бы наиболее важные находки, касающиеся экспрессии генов и транскриптов, данными белкового анализа. Данный комментарий не снижает значимости полученных результатов и не влияет на общую положительную оценку диссертационного исследования. В ходе

проводимой экспертизы диссертационного исследования возникли вопросы дискуссионного характера:

1. Чем, по мнению автора, могут быть обусловлены различия в направленности уровней экспрессии антиапоптотических/проапоптотических генов при ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции?

2. Ограниченный объем выборки здоровых доноров не позволяет определить референсные значения уровней экспрессии изучаемых генов и транскриптов. Считает ли автор в принципе возможным и значимым, и планирует ли в дальнейшем, расчет соответствующих уровней при увеличении объема выборки группы сравнения?

3. В работу были включены больные и здоровые дети от 7 до 17 лет. Отличались ли уровни экспрессии антиапоптотических/проапоптотических генов и транскриптов в рамках анализируемых групп между детьми до полового созревания и во время/после начала такового?

4. Будут ли отличаться уровни экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в лейкоцитах крови у взрослых лиц, инфицированных ВЭБ и ВГЧ-6, по сравнению с результатами, полученными для детей? Если отличались, то сохранится ли для взрослых пациентов та же направленность повышения/понижения уровней экспрессии антиапоптотических/проапоптотических генов при ВЭБ и ВГЧ-6?

Заключение

Диссертационная работа Сахарнова Николая Александровича «Анализ экспрессии генов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в иммунокомпетентных клетках при ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология, выполненная под научным руководством к.б.н. Уткина Олега Владимировича является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, решающей научную и практическую задачу, касающуюся анализа экспрессии генов и транскриптов основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в иммунокомпетентных клетках крови пациентов с ВЭБ и ВГЧ-6 инфекцией, что имеет существенное значение для клинической иммунологии.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационное исследование представляет собой законченную научно-квалификационную работу и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, согласно п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от

01.10.2018 г., а ее автор Николай Александрович Сахарнов заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология.

Отзыв о научно-практической значимости кандидатской диссертации Сахарнова Николая Александровича заслушан, обсужден и одобрен на объединенном заседании лаборатории молекулярной иммунологии и лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 25 января 2022 г., протокол заседания № 1.

Заведующий лабораторией молекулярной иммунологии,
д.м.н., профессор, академик РАН

А. А. Тоголян

Заведующий лабораторией иммунологии и
вирусологии ВИЧ-инфекции, к.б.н.

Ю. В. Останкова

Дата: 25.01.2022 г.

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, улица Мира, 14

Телефон: +7 (812) 233-20-92 Web-сайт <https://www.pasteurorg.ru/>

E-mail: pasteur@pasteurorg.ru

Подпись академика РАН д.м.н. профессора А. А. Тоголяна заверяю

Ученый секретарь

Г.Ф. Трифонова

Подпись к.б.н. Ю.В. Останковой заверяю

Ученый секретарь

Г.Ф. Трифонова