

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П.Чумакова»
Российской академии медицинских наук

РФ, 142782, город Москва, поселение Московский
поселок Институт полиомиелита, 27 км Киевского шоссе
Тел. (495) 841-90-07. Факс (495) 841-93-30. E-mail: institute@poliomyelit.ru

№ 2306
«26» августа 2014г.

В диссертационный совет при
ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России

«У Т В Е Р Ж Д А Ю»

Директор Федерального

государственного бюджетного

учреждения «Институт полиомиелита и

вирусных энцефалитов имени

М.П.Чумакова»

Российской академии медицинских наук,

член-корр. РАН, д.м.н., профессор



Михайлов М.И.

«26» августа 2014 г.

Отзыв ведущей организации

о научно-практической ценности диссертационной работы Плотниковой М.А. на тему «Мультиплексные методы определения вирус-индуцированной экспрессии цитокинов на основе микрочипов и ПЦР», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - вирусология

Вирусы гриппа А (ВГА) представляют наибольшую эпидемиологическую опасность, так как вызывают ежегодные сезонные эпидемии и периодические пандемии с высоким уровнем летальности. ВГА индуцируют острые высококонтагиозные заболевания верхних дыхательных путей. Некоторые ВГА (H5N1, H1N1 1918 года и H1N1pdm 09) могут вызывать серьезные легочные повреждения и воспаления, приводящие к смертельным исходам. Особенности иммунопатогенеза ВГА является предметом постоянного изучения. ВГА вызывают в организме продукцию медиаторов иммунного ответа — цитокинов (ЦТ). При этом продуцируются провоспалительные ЦТ: ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-18, TNF- α ; противовирусные ЦТ(интерфероны I типа): IFN- α , IFN- β . При легком течении инфекций, вызываемой

непандемическими ВГА (H1N1 или H3N2) локальный (нозальный) и системный (периферическая кровь) цитокиновый ответы обусловлены в основном повышением продукции ИЛ-6 и ИЛ-8, уровень которых напрямую связан с тяжестью заболевания. Уровень ИЛ-6 является показателем длительности и тяжести заболевания, а также осложнений: энцефалопатий и кардиореспираторных нарушений. Штаммы высокопатогенных ВГА H5N1 и пандемических вирусов H1N1pdm 09 индуцируют высокие уровни ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, а также IFN- α , IFN- β .

Высокопатогенные штаммы ВГА приводят к развитию в организме инфицированных людей «цитокинового шторма» или гиперцитокинемии. Именно с этим явлением связывают повреждающее действие вирусного инфекционного процесса. Неконтролируемая каскадная гиперпродукция ЦТ (ИЛ-6, ИЛ-8) и некоторых хемокинов (IP-10) при ВГА инфекции приводит к несостоятельности врождённого иммунного ответа организма и ограничению развития специфического иммунитета, что ведет к нарушению цитокинового баланса. У пациентов с ВГА инфекцией регистрируется интенсивная продукция провоспалительных ЦТ и иммунным ответом по Th-1 типу прямо коррелируя с неконтролируемой вирусной репликацией. При этом уровень экспрессии и профиль ЦТ и хемокинов, индуцируемый различными штаммами ВГА, сильно различаются. «Цитокиновый шторм» при ВГА инфекции связывают, в частности, с белком NS1, являющимся одним из факторов патогенности ВГА. Белок NS1 обладает способностью блокировать продукцию IFN I типа (α , β , ω) и супрессировать экспрессию ряда провоспалительных ЦТ (ИЛ-8, ИЛ-12, IFN- γ).

Цитокиновый профиль является важнейшей характеристикой иммунного статуса пациентов с ВГА, поэтому работа Плотниковой М.А., посвященная мультиплексным методам определения вирус-индуцированной экспрессии цитокинов на основе микрочипов и ПЦР, является очень актуальной. Автором разработан не имеющий прямых аналогов количественный метод детекции мРНК цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12 β , ИЛ-18, IFN- γ и TNF- α) с использованием мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Впервые в России были разработаны белковый микрочип для количественной детекции ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, IFN- γ и TNF- α и олионуклеотидный микрочип для оценки мРНК ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12 β , ИЛ-18, IFN- γ и TNF- α человека.

Все разработанные системы были успешно апробированы на биологическом материале, полученном при заражении клеток человека различными штаммами ВГА. Несомненным преимуществом работы является использование автором широкого спектра клеточных культур для инфицирования ВГА: A549 (карцинома легких человека), Jurkat (иммortalизированные Т-лимфоциты), Namalva (иммortalизированные В-лимфоциты), THP-1 (иммortalизированные моноциты), а также первичной культуры человеческих

лимфоцитов. Для оценки цитокинового статуса автором были выбраны отличающиеся по степени патогенности, адаптации к человеку и филогенетической удаленности штаммы ВГА: A/Victoria/361/11 (H3N2), A/California/07/09 (H1N1 pdm09), A/chicken/Kurgan /05/2005 (H5N1), а также рекомбинантные штаммы A/H5N1 на основе A/Puerto Rico/18/34 (H1N1). Это позволило автору оценить особенности ВГА-индуцированной экспрессии ЦТ. ВГА H1N1pmd09, H3N2 и H5N1 индуцируют в клетках A549 экспрессию мРНК ИЛ-6 и провоспалительных ЦТ: ИЛ-1 β , TNF- α и ИЛ-18. Заражение ВГА H3N2 и H1N1pmd09, но не H5N1, активирует образование мРНК противовоспалительного ЦТ ИЛ-4. Стимуляция провоспалительного ЦТ ИЛ-12 β наблюдается только в случае заражения клеток штаммом H3N2. Удаление гена NS1 в H5N1 приводит к повышению уровней мРНК ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10 и TNF- α и ингибирует синтез мРНК ИЛ-4 в инфицированных клетках A549 по сравнению с вирусом дикого типа. Высокопатогенный ВГА H1N1pmd09 индуцирует в инфицированных клетках A549 синтез мРНК ИЛ-4, ИЛ-10 и TNF- α , но во внеклеточной среде выявляется только TNF- α .

Измерение уровня цитокинов у пациентов при гриппе необходимо для своевременного прогнозирования течения и исхода заболевания, в том числе предупреждения развития потенциально летальной реакции гиперцитокинемии. В работе показана возможность применения разработанных методов для изучения экспрессии ЦТ, индуцированной вирусами гриппа. Предложенные методы для определения цитокинового статуса могут быть использованы при разработке и испытаниях противогриппозных вакцин с целью оценки их безопасности и эффективности при формировании специфического гуморального и клеточного иммунитета. Разработанные системы применимы для анализа экспрессии ЦТ не только при гриппе, но и при проведении широкого круга биологических и медицинских исследований. Разработанные методы весьма перспективны при оценке эффективности и безопасности противовирусных препаратов. Использование предложенных в работе микрочипа и системы мультиплексной ПЦР для оценки иммунного статуса пациентов при вирусных инфекциях позволяет обоснованно использовать соответствующие иммунокорректоры. При внедрении в производство, предложенные в работе методы будут необходимы для оценки иммунного статуса людей при вирусных инфекциях, в частности для характеристики иммунодефицитных состояний и их научно-обоснованной коррекции.

В ходе проведения работы автором не только применялись современные биохимические, вирусологические, молекулярно-биологические и иммунологические методы, но и были разработаны собственные оригинальные методики при конструировании тест-систем на основе микрочипов. Разработанный олигонуклеотидный микрочип позволяет одновременно качественно выявлять мРНК: 1) провоспалительных ЦТ (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-18, TNF- α); 2)

антивирусных ЦТ (IFN- γ и TNF- α); 3) ЦТ, посредством продукции которых осуществляется клеточный противовирусный иммунный ответ. Разработанная система на основе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени позволяет проводить одновременный количественный анализ мРНК вышеперечисленных цитокинов.

Диссертация изложена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утвержденных в ГОСТ Р 011.-2011. По теме диссертации опубликовано 6 статей, из них 5 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и 1 глава в монографии.

Диссертационная работа Плотниковой М.А. по значимости поставленной цели, уровню выполненных исследований и важности полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» от 24.09.2013 г. №842, а автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 — вирусология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании отдела клещевого энцефалита и других арбовирусных инфекций ФГБУ «ИПВЭ им. М.П. Чумакова» РАМН 19 августа 2014г., протокол № 1.

Зав. лабораторией иммунологии и культур тканей

д.б.н.

Подпись С.В.Ожерелкова заверяю:

Ученый секретарь ИПВЭ им. М.П.Чумакова

к.б.н.

 /С.В.Ожерелков/



 /Е.П. Амон/