

ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора биологических наук, профессора
Гуляевой Людмилы Федоровны на диссертационную работу
Васильева Филиппа Филипповича «Ассоциация аллельных вариантов
генов рецепторов TNF α и IL1 с уровнем экспрессии их
мембраносвязанных и растворимых рецепторов», представленную на
соискание ученой степени кандидата медицинских наук по
специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»**

Актуальность темы. Многообразие взаимодействий различных цитокинов и их рецепторов является основой формирования иммунного ответа, как в норме, так и при развитии патологии. В регуляцию таких взаимодействий вовлечено множество факторов, в том числе количество экспрессирующихся рецепторных белков, а также генетически детерминированные изменения в экспрессии генов цитокинов и их рецепторов. Фактор некроза опухоли альфа (TNF α) и интерлейкин-1 (IL1) являются одними из ключевых цитокинов, играющих важную роль в развитии иммунопатологических процессов. Для реализации биологических эффектов данные цитокины специфично взаимодействуют с рецепторами, причем последние представлены мембраносвязанной и растворимой формами. Однако малоизученными остаются вопросы о количественном содержании рецепторов в иммунокомпетентных клетках, а также о влиянии различных аллельных вариантов генов рецепторов TNF α и IL1 на их белковую продукцию. Между тем, ответ на эти вопросы расширит наши представления о причинах гетерогенности иммунного ответа и роли генетического полиморфизма цитокинов в его развитии. В связи с этим цель диссертационной работы Васильева Ф.Ф.: изучить ассоциированность аллельных вариантов генов рецепторов TNF α и IL1 с уровнем экспрессии их мембраносвязанных форм на мононуклеарных клетках, а также с уровнем растворимых рецепторов TNF α и IL1 в сыворотке крови, является перспективным и актуальным исследованием.

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнения. В ней впервые определено содержание мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 в субпопуляциях мононуклеарных клеток условно здоровых индивидов. Показаны межиндивидуальные различия в уровне экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типов для TNF α и IL1. В работе впервые исследован полиморфизм промоторов генов рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 у здоровых индивидов Юго-Западной Сибири. Впервые проведено исследование генотип:фенотип, в ходе которого выявлена

взаимосвязь некоторых аллельных вариантов промоторов генов рецепторов TNF α I и II типа с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α I и II типов на субпопуляциях мононуклеарных клеток, а также сывороточным уровнем растворимых рецепторов TNF α I типа. Впервые установлена ассоциация между аллельными вариантами промоторных участков генов рецепторов IL1 I и II типа и уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов IL1 I и II типа на субпопуляциях мононуклеарных клеток.

Теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования. Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о природе иммунного ответа, связанного с генетически детерминированными изменениями в экспрессии рецепторов I и II типов для провоспалительных цитокинов TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток условно здоровых индивидов. Гетерогенность иммунного ответа подтверждена различным индуцирующим действием ЛПС на уровень экспрессии рецепторов. Важным результатом работы является установление ассоциации исследованных полиморфных вариантов генов рецепторов TNF α и IL1 с уровнем экспрессии их мембраносвязанных рецепторов и сывороточным уровнем растворимых рецепторов. Данные результаты, с одной стороны, подтверждают функциональность исследуемого полиморфизма, и, с другой, свидетельствуют о роли генетического полиморфизма в формировании индивидуальных различий в уровне экспрессии исследуемых рецепторов. В ходе работы оптимизированы протоколы пробоподготовки для оценки уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 I и II типов методом проточной цитофлуориметрии с помощью калибровочных частиц BD QuantiBRITE PE. Показатели уровня экспрессии рецепторов и относительного числа клеток, экспрессирующих мембраносвязанные формы рецепторов TNF α и IL1 в субпопуляциях иммунокомпетентных клеток условно здоровых индивидов, могут рассматриваться для использования в качестве диагностических и прогностических маркеров при различных иммунопатологических состояниях.

Степень достоверности и обоснованности полученных результатов. Автором лично проведены эксперименты, в которых проанализирован большой объем материала. В исследование взяты мононуклеарные клетки периферической крови; сыворотка периферической крови; геномная ДНК лейкоцитов периферической крови условно здоровых индивидов. Выборка была сформирована из 150 жителей г. Новосибирска.

Все исследования проведены с привлечением современных методик, а

полученные результаты обработаны с использованием традиционных методов статистики, применяемых в биологических исследованиях.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Васильева Ф.Ф. построена традиционно, она изложена на 147 страницах, состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 373 работы отечественных и иностранных авторов. Содержание диссертации характеризуется логичным и последовательным изложением, она иллюстрирована 18 рисунками, количественные данные представлены в 8 таблицах.

Во введении автор убедительно обосновывает актуальность выбранного исследования, четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов.

Обзор литературы состоит из 3-х глав, где первая глава посвящена характеристике провоспалительных цитокинов TNF α и IL1. Глава 2 содержит информацию о мембраносвязанных и растворимых рецепторах данных цитокинов. Наконец, глава 3 посвящена проблеме генетического полиморфизма рецепторов для TNF α и IL1. В целом, обзор литературы в достаточной мере отражает современное состояние проблемы исследования роли цитокинов TNF α и IL1 и их рецепторов в формировании иммунного ответа в совокупности с вкладом генетического полиморфизма последних.

Материалы и методы исследования адекватны поставленной цели и решаемым задачам. В работе использован широкий набор методов иммунологии: выделение моноклеарных клеток из периферической крови человека и их культивирование, определение экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 на субпопуляциях моноклеарных клеток методом проточной цитофлуориметрии, определение уровня цитокинов TNF α , IL1 β и растворимых рецепторов к TNF α и IL1 методом иммуноферментного анализа. Для генотипирования образцов ДНК использован метод полимеразной цепной реакции с последующей рестрикцией продуктов амплификации.

В главе «Результаты собственных исследований» последовательно приводятся полученные результаты, проводится их статистическая обработка. В главе «Обсуждение полученных результатов» диссертант проводит сравнительный анализ современных данных научной литературы и собственных результатов, обосновывая сформулированные выводы и рекомендации. В целом представленная диссертация выполнена на высоком научно-методическом уровне.

Полученные результаты приводят к важному выводу, что генетический полиморфизм может быть одним из факторов, влияющих на уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 на субпопуляциях моноклеарных клеток. Такие результаты представляют интерес для научно-исследовательских учреждений иммунологического профиля. Использование результатов исследования, полученных Васильевым Ф.Ф., представляется целесообразным для физиологов, иммунологов, генетиков.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на всероссийских научно-практических конференциях и форумах.

По результатам диссертации опубликовано 13 научных работ, включая 6 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации результатов диссертационных исследований. Выводы диссертации соответствуют цели, задачам и основным положениям. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Вместе с тем, при прочтении работы у меня возникли некоторые вопросы:

1. В главе «Обзор литературы» на стр. 19 автор, ссылаясь на литературные источники, отмечает, что уровень рецепторов TNF α зависит от возраста. Вместе с тем, в исследование взяты доноры разного возраста: от 19 до 55 лет (стр. 44). Не может ли этот факт влиять на результаты экспериментов по поиску ассоциаций с аллельными вариантами исследуемых генов?

2. Из работы не ясно, как проводился анализ ассоциаций однонуклеотидных замен исследуемых генов с количеством рецепторов, так как нет данных о содержании рецепторов при диком и мутантном генотипе.

3. Анализировалось ли влияние исследуемых полиморфизмов на способность факторов транскрипции связываться с сайтами на промоторах?

Приведенные вопросы носят дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки выполненной работы.

Заключение. Диссертационная работа Васильева Филиппа Филипповича «Ассоциация аллельных вариантов генов рецепторов TNF α и IL1 с уровнем экспрессии их мембраносвязанных и растворимых рецепторов», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, выполненная под руководством д.м.н., проф. Сенникова С.В., является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для современной иммунологии – установлена ассоциация аллельных вариантов

генов рецепторов TNF α и IL1 с уровнем экспрессии их мембраносвязанных и растворимых рецепторов, что имеет большое значение для понимания формирования иммунного ответа в норме и патологии. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте изложения материалов в рецензируемых печатных научных изданиях работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждения ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автору Васильеву Филиппу Филипповичу следует присудить ученую степень кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология».

Официальный оппонент

доктор биологических наук,
профессор, руководитель
лаборатории молекулярных
механизмов канцерогенеза
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский
институт молекулярной биологии и
биофизики»

630117, Россия, г. Новосибирск,
ул. Тимакова, 2/12,
Тел. 8(383) 335-98-47
imbb@niimbb.ru
<http://niimbb.ru>



Гуляева Людмила
Федоровна

Диссертация на соискание ученой
степени доктора биологических наук
защита по специальности

03.03.03 «Молекулярная биология»

Подпись профессора Гуляевой Л.Ф.
заверяю:
Ученый секретарь, к.б.н.



Сафронова
Ольга Геннадьевна

14 сентября 2015 г.