

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Галкиной Светланы Ивановны на тему: «Дистанционные взаимодействия нейтрофилов человека с клетками и бактериями, опосредованные мембранными тубуловезикулярными структурами (цитонемами)», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03. 03. 04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность работы

Диссертационная работа Галкиной С. И. посвящена изучению механизмов адгезионных взаимодействий нейтрофилов человека с клетками и бактериями, а также изучению влияния окиси азота (NO) на эти процессы. Являясь составной частью иммунной системы организма, нейтрофилы играют ключевую роль в его защите от патогенных бактерий благодаря способности проникать из кровеносного русла в очаг инфекции и там обезвреживать болезнетворные микроорганизмы, секретируя бактерицидные агенты в сформировавшиеся фагосомы. Устойчивость современных инфекций к лечению антибиотиками вызывает необходимость поиска природных медиаторов, способных стимулировать врожденный иммунитет. Одним из таких факторов является оксид азота (NO), продуцируемый нейтрофилами и другими клетками. Защитное действие NO при различных бактериальных инфекциях было продемонстрировано в многочисленных исследованиях. Полагают, что защитный эффект NO реализуется через стимуляцию фагоцитов – макрофагов и нейтрофилов, однако конкретный механизм противомикробного действия NO до сих пор не выяснен. Поскольку NO является природным регулятором адгезионных взаимодействий лейкоцитов, чрезвычайно важным представляется исследование влияния NO на процессы адгезионных взаимодействий нейтрофилов с патогенными бактериями. Изучение механизмов адгезионных взаимодействий нейтрофилов с клетками, в основе которых лежит аномальная (интегрин-зависимая) адгезия нейтрофилов к стенкам сосудов, весьма актуально для более полной оценки вклада этих процессов в этиологию и патогенез заболеваний сердечно-сосудистой системы. Интегрин-зависимая адгезия нейтрофилов является причиной развития воспалительных процессов при реперфузии после ишемии, а также рассматривается как возможная причина развития микроангиопатий, приводящих к слепоте и нарушению функций почек у больных сахарным диабетом. Оксид азота, продуцируемый нейтрофилами,

подавляет интегрин-зависимую адгезию лейкоцитов, причем установлено, что NO оказывает защитное при реперфузии после ишемии, а также улучшает состояние сосудов у больных сахарным диабетом.

Таким образом, работа С.И.Галкиной, посвященная исследованию механизмов адгезионных взаимодействий нейтрофилов человека с клетками и бактериями, а также механизма влияния NO на эти процессы безусловно является весьма актуальной.

Общая характеристика, структура и оформление диссертации

Диссертация построена по общепринятому плану и состоит из «Введения», «Обзора литературы», главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, описания результатов и их обсуждения, «Выводов» и «Списка цитированной литературы». Диссертация содержит 195 страниц текста, 43 рисунка и 11 таблиц. Список литературы включает 287 источников.

В «Обзоре литературы», наряду с основными сведениями о строении и функциях нейтрофилов, приведены сведения об адгезионных рецепторах нейтрофилов и их локализации в клетках. Основное содержание обзора представляет анализ мембранных тубулярных, тубуловезикулярных и везикулярных структур, которые образуются в нейтрофилах и осуществляют дистанционные контактные взаимодействия с другими клетками и субстратами. Размеры, строение, способы индуцировать образование мембранных тубуловезикулярных структур в клетках, а также метаболические процессы клеток, отвечающие за образование этих структур, являются одной из центральных тем обзора. В обзоре также проанализированы работы, демонстрирующие способность паразитических простейших и бактерий устанавливать прямые адгезионные контакты с удаленными объектами при помощи мембранных тубулярных или тубуловезикулярных структур. Содержание литературного обзора представляет несомненный интерес для клеточных биологов, микробиологов и специалистов, изучающих строение клеточных мембран. Учитывая отсутствие подобных сводок в отечественной литературе, полагаю весьма полезным публикацию сокращенной версии обзора в качестве отдельной журнальной статьи.

В работе использован широкий арсенал современных микроскопических и биохимических методов. Сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия, флуоресцентная микроскопия и микрофлуориметрия были использованы для морфологических наблюдений и измерения внутриклеточного pH. Биохимические препаративные методы и электрофорез в полиакриламидном геле были применены для

экстракции и разделения белков, хроматография высокого разрешения и масс-спектрометрия были использованы для идентификации пептидов и белков. Использование всех этих методов позволило автору диссертации провести весьма качественное комплексное исследование структуры и состава мембранных тубуловезикулярных структур (цитонем) нейтрофилов и сделало основные научные положения диссертации объективными и обоснованными.

Результаты исследования их новизна и научно-практическая значимость

В работе описан принципиально новый дистанционный механизм адгезионных взаимодействий нейтрофилов при осуществлении иммунных реакций, что по сути является открытием нового механизма клеточного иммунитета. Показано, что нейтрофилы могут устанавливать прямые контактные взаимодействия с твердыми субстратами, другими клетками и бактериями на расстоянии при помощи нитевидных мембранных тубуловезикулярных структур (цитонем). При помощи электронной микроскопии показано, что диаметр цитонем колеблется в пределах 130-250 нм, а их длина может многократно превышать диаметр нейтрофила.

С.И.Галкиной впервые выявлен целый ряд природных и фармакологических агентов, способных индуцировать образование цитонем в нейтрофилах. Автором диссертации выдвинута гипотеза о том, что NO является физиологическим агентом, регулирующим образование цитонем в нейтрофилах *in vivo*. Предполагается, что способность индуцировать образование цитонем и, тем самым, изменять адгезионные свойства нейтрофилов, является природным механизмом, при помощи которого NO регулирует взаимодействие нейтрофилов со стенками сосудов или с бактериями.

Проведенное С.И.Галкиной комплексное изучение морфологии и изменений внутриклеточного pH нейтрофилов при адгезии к фибронектину позволило выявить метаболические и ионообменные процессы, контролирующие образование цитонем в нейтрофилах. Результаты работы показали, что образование цитонем в нейтрофилах может быть связано: с подавлением активности АТФаз вакуолярного типа; с подавлением транспорта и метаболизма глюкозы; с разрушением актинового цитоскелета; а также с блокированием хлорных каналов или со снижением концентрации ионов Na^+ в экстраклеточной среде.

Протеомный анализ состава цитонем, проведенный при помощи хроматографии высокого разрешения и масс-спектрометрии, показал, что цитонемы содержат белковые бактерицидные компоненты секреторных первичных и вторичных гранул нейтрофилов.

При помощи метода сканирующей электронной микроскопии в работе показано, что цитонемы, индуцированные различными агентами, способны связывать бактерии на значительном удалении от нейтрофилов. Выдвинута гипотеза о том, что связывание патогенов цитонемами представляет собой новый, альтернативный фагоцитозу, механизм детоксикации патогенов с участием экзоклеточных секреторных структур, содержащих бактерицидные агенты нейтрофилов. Уничтожение бактерий в этом случае производят бактерицидные агенты, высвобождающиеся из цитонем при разрушении этих структур.

В работе Галкиной С.И впервые продемонстрировано, что грамотрицательные бактерии, устанавливая контакты с клетками эукариот (нейтрофилами) и с другими бактериями в биопленках при помощи мембранных трубочек, сформированных из наружной мембраны клеточной стенки бактерий и по свойствам совпадающие с цитонемами нейтрофилов.

Молекула NO является свободным радикалом, способным вступать в быстрое взаимодействие с супероксидными анион-радикалами ($\cdot\text{O}_2^-$) с образованием пероксинитрита (ONOO^-), обладающего мощным повреждающим действием на клетки. В диссертационной работе было изучено влияние $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{NO}$ и ONOO^- на адгезию нейтрофилов человека к монослою первичных эндотелиальных клеток человека. Полученные С.И.Галкиной результаты указывают на то, что деструкция эндотелия и стимулирование интегрин-зависимой адгезии нейтрофилов к эндотелию в большей степени зависят от образования супероксидных радикалов, а не пероксинитрита. Более того, было показано, что NO защищал эндотелий от повреждения супероксидными радикалами и предотвращал интегрин-зависимую адгезию нейтрофилов к монослою клеток эндотелия.

Суммируя сказанное можно констатировать, что диссертационная работа С.И. Галкиной представляет собой комплексное научное исследование фундаментальных клеточных процессов, вовлеченных в адгезионные взаимодействия нейтрофилов с клетками и бактериями. Полученные С.И.Галкиной данные позволяют расширить существующие представления о способах взаимодействий между клетками, расположенными на значительном удалении друг от друга, о механизмах клеточной секреции и роли секреторных мембранных структур в установлении дистанционных контактов между клетками.

Результаты, полученные при выполнении диссертационной работы С.И.Галкиной, изложены в 21 статье в ведущих международных и отечественных научных журналах и в виде 2-х отдельных глав в книгах, изданных международными

издательствами. Результаты работы С.И.Галкиной неоднократно докладывались на различных национальных и международных конференциях и конгрессах. Диссертация написана весьма обстоятельно хорошим литературным языком и логично построена.

Автореферат и опубликованные по теме диссертации научные статьи достаточно полно отражают содержание работы.

Принципиальных замечаний, существенно влияющих на качество работы у меня нет. Можно высказать лишь мелкие «придирки» к тексту диссертации и автореферата, а именно:

1. Устойчивый англоязычный термин reactive oxygen species – ROS автор диссертации в разных местах текста обозначает как “реактивные формы кислорода», «активированные формы кислорода» или как «активные формы кислорода», тогда как в русскоязычной научной литературе общепринятым является только последнее написание;
2. Автор диссертации использует такие термины как «супероксиданионрадикалы» и «окись азота», тогда как правильное писать «супероксидный анион-радикал» (или «супероксидный радикал») и «оксид азота»;
3. Отсутствие списка сокращений в автореферате (в диссертации он имеется) несколько затрудняет чтение, несмотря на то, что все сокращения вводятся в тексте;
4. Трудно согласиться с интерпретацией полученных результатов, когда автор утверждает, что пероксинитрит обладает много меньшим повреждающим действием на клетки, чем супероксидный радикал. Дело в том, что супероксид обладает весьма слабой повреждающей способностью, тогда как пероксинитрит, способный разваливаться с образованием чрезвычайно активного гидроксил-радикала, напротив способен выступать в качестве мощного повреждающего клетки агента. В то же время, супероксидные радикалы способны дисмутировать с образованием пероксида водорода (этот процесс весьма эффективен при катализе супероксиддисмутазой, присутствующей во всех клетках), который по реакции Фентона также разлагается с образованием гидроксил-радикала. Может быть преобладающее действие супероксидных радикалов по сравнению с пероксинитритом можно объяснить чрезвычайной эффективностью протекания реакции Фентона в условиях проводимых экспериментов?

Тем не менее, должен признать, что высказанные соображения носят дискуссионный характер и не влияют на правильность соответствующих выводов диссертации.

Заключение

Исходя из вышесказанного считаю, что диссертационная работа «Дистанционные взаимодействия нейтрофилов человека с клетками и бактериями, опосредованные мембранными тубуловезикулярными структурами (цитонемами)» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует требованиям, установленным п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а автор этой диссертации С.И. Галкина заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности: 03.04.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Руководитель лаборатории биохимии
свободнорадикальных процессов
Института кардиологии им. А. Л. Мясникова
ФГБУ «Российский кардиологический
научно-производственный комплекс»
Минздрава РФ,
доктор биологических наук,
профессор

В. З. Ланкин

Подпись профессора В. З. Ланкина заверяю
Ученый секретарь Института кардиологии им. А. Л. Мясникова
ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ,
канд. мед. наук



Т.Ю.Полевая

17 сентября 2014 г.

Ланкин Вадим Зиновьевич,

доктор биологических наук наук, профессор,

заведующий лабораторией биохимии свободнорадикальных процессов

НИИ кардиологии имени А. Л. Мясникова ФГУ «РКНПК Росмедтехнологий»

121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15А;

раб. Тел. 495-414-65-11;

email: lankin@cardio.ru,

Публикации В.З. Ланкина, близкие по теме к диссертации С.И. Галкиной:

- 1). Pisarenko OI, Lankin VZ, Konovalova GG, Serebryakova LI, Shulzhenko VS, Timoshin AA, Tskitishvili OV, Pelogeykina YA, Studneva IM. Apelin-12 and its structural analog enhance antioxidant defense in experimental myocardial ischemia and reperfusion. Mol Cell Biochem. 2014 391(1-2):241-50.
- 2). Babizhayev MA, Lankin VZ, Savel'Yeva EL, Deyev AI, Yegorov YE. Diabetes mellitus: novel insights, analysis and interpretation of pathophysiology and complications management with imidazole-containing peptidomimetic antioxidants. Recent Pat Drug Deliv Formul. 2013 7(3):216-56.
- 3). Pisarenko OI, Beshpalova ZhD, Lankin VZ, Timoshin AA, Serebriakova LI, Shul'zhenko VS, Pelogeikina IuA, Studneva IM, Tskitishvili OV, Az'muko AA, Sidorova MV, Pal'keeva ME, Konovalova GG, Chazov EI. Antioxidant properties of apelin-12 and its structural analogue in experimental ischemia and reperfusion. Kardiologiya. 2013 53(5):61-7.
- 4). Lankin VZ, Tikhaze AK, Kumsikova EM. Macrophages actively accumulate malonyldialdehyde-modified but not enzymatically oxidized low density lipoprotein. Mol Cell Biochem. 2012 365(1-2):93-8.
- 5). Shumaev KB, Gubkin AA, Serezhenkov VA, Lobysheva II, Kosmachevskaya OV, Ruuge EK, Lankin VZ, Topunov AF, Vanin AF. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes. Nitric Oxide. 2008 18(1):37-46.

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Галкиной Светланы Ивановны «Дистанционные взаимодействия нейтрофилов человека с клетками и бактериями, опосредованные мембранными тубуловезикулярными структурами (цитонемами)», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03. 03. 04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы

Нейтрофилы, или полиморфноядерные лейкоциты, являются важными эффекторами врожденного иммунитета и играют важную роль в защите организма от бактериальных и грибковых инфекций. Нейтрофилы обладают способностью мигрировать из кровяного русла в очаг воспаления и там фагоцитировать и уничтожать патогены. Целью диссертационной работы Галкиной С.И. было изучение механизмов адгезионных взаимодействий нейтрофилов человека с клетками и бактериями, а также изучение механизма влияния оксида азота (NO) на эти процессы. Изучение механизмов адгезионных взаимодействий нейтрофилов принципиально важно для понимания процессов, происходящих при выполнении ключевой функции нейтрофилов – связыванию и элиминации бактериальных и грибковых патогенов, проникших в организм хозяина. Выявление внутриклеточных процессов и внешних факторов, регулирующих адгезионные свойства нейтрофилов, актуально также для понимания причин возникновения и выработки способов профилактики и лечения сосудистых патологий, вызванных нарушениями адгезии нейтрофилов к стенкам сосудов. Такого рода патологии происходят при реперфузии после ишемии, при сердечно-сосудистых заболеваниях и у больных сахарным диабетом. В многочисленных работах продемонстрировано защитное действие NO на состояние сосудов при метаболических заболеваниях. NO является также важным фактором защиты организма человека от бактериальных инфекций. Однако механизм противомикробного действия NO, как и механизм действия оксида азота на адгезию нейтрофилов к эндотелию не выяснен.

Новизна научных результатов и выводов диссертации

В диссертационной работе Галкиной С.И. описан новый механизм адгезионных взаимодействий нейтрофилов с удаленными субстратами, клетками и бактериями при помощи нитевидных мембранных тубуловезкулярных структур (цитонем), диаметр которых варьирует в пределах 130-250 нм, а длина может многократно превышать диаметр нейтрофилов. Наряду с этим, впервые определен ряд агентов, способных индуцировать образование цитонем в нейтрофилах. Охарактеризованы внутриклеточные процессы, ответственные за образование цитонем в нейтрофилах, а именно: подавление транспорта и метаболизма глюкозы, ингибирование АТФаз вакуолярного типа, блокирование Cl^- и Na^+ -зависимых ионообменных процессов, деполимеризация актинового цитоскелета. Проведенный автором протеомный анализ показал присутствие в цитонемах бактерицидных агентов и цитозольных белков нейтрофилов, продемонстрировав, таким образом, секреторную природу цитонем. Впервые обнаружено, что оксид азота способен индуцировать образование цитонем в нейтрофилах и смещать механизм взаимодействия нейтрофилов с бактериями от фагоцитоза к экстраклеточному связыванию бактерий цитонемами. Несомненной новизной обладают также результаты, демонстрирующие, что клетки прокариот, а именно клетки грамотрицательных бактерий, подобно клеткам эукариот, могут контактировать на расстоянии при помощи мембранных трубочек диаметром около 60 нм, сформированных из наружной мембраны клеточной стенки бактерий.

Структура и оформление диссертации

Диссертация оформлена по общепринятому образцу и изложена на 195 страницах машинописного текста и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы». В работе представлены 43 рисунка и 11 таблиц. Список цитируемой литературы включает 287 источников.

В «Обзоре литературы» автор анализирует накопившиеся сведения о механизмах дистанционных взаимодействий клеток, описанные в научной литературе, и проводит их сравнение с цитонемами, изученными в

диссертационной работе. Сложности изучения подобного рода структур связаны с тем, что их трудно зафиксировать и сохранить для изучения при помощи электронной микроскопии. Изучение нанометровых структур при помощи флуоресцентной или фазово-контрастной микроскопии не дает возможности адекватно оценить их строение и размеры.

Автор диссертации дает четкое определение цитонем и оценивает их размеры и функции, основываясь на собственных результатах исследования этих структур с помощью методов сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии, флуоресцентной и фазово-контрастной микроскопии. Для определения белкового состава цитонем автор использует современные биохимические препаративные методы и такие методы идентификации белков, как хроматография высокого разрешения и масс-спектрометрия.

Диссертационная работа является логически завершенной, а выводы полностью соответствуют результатам проведенных экспериментов. Результаты исследований полностью опубликованы. Основные положения диссертации изложены в 23 печатных работах. Из них 20 экспериментальных статей и один обзор опубликованы в рецензируемых журналах, и 2 работы опубликованы в виде отдельных глав в книгах международных издательств. Работы автора цитируются, достоверность результатов работы подтверждена в работах других авторов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Теоретическое и практическое значение исследования

Диссертационная работа Галкиной Светланы Ивановны представляет собой комплексное научное исследование фундаментальных клеточных процессов, вовлеченных в адгезионные взаимодействия нейтрофилов с клетками и бактериями и во многом определяющих механизмы этих взаимодействий. Полученные данные позволяют расширить существующие представления о способах взаимодействий между клетками, расположенными на значительном удалении друг от друга, о влиянии метаболических и ионообменных внутриклеточных процессов на механизмы адгезии клеток, о взаимосвязи процессов клеточной секреции и клеточной адгезии. Автор диссертации доказал существование нового механизма адгезионных взаимодействий между клетками

на расстоянии при помощи мембранных нитевидных тубуловезикулярных структур секреторной природы (цитонем) и выявил физиологические факторы, ответственные за образование цитонем. Полученные в диссертационной работе результаты расширяют представления о противобактериальных механизмах врожденного иммунитета, а именно о функциях нейтрофилов в защите организма от бактериальных инфекций и демонстрируют новую роль окиси азота в этом процессе.

Полученные в работе результаты могут внести существенный практический вклад в разработку новых методов предотвращения и лечения инфекций, основанных на повышении активности нейтрофилов в связывании и уничтожении бактериальных патогенов. Новая стратегия борьбы с инфекциями может быть направлена на стимуляцию образования цитонем и связывания патогенных бактерий цитонемами нейтрофилов при помощи NO или фармакологических агентов. Результаты диссертационной работа Галкиной С.И, могут также найти практическое применение в профилактике сосудистых патологий, вызванных адгезией нейтрофилов к эндотелию кровеносных сосудов при метаболических дисфункциях. Новым направлением в этой области могут стать поиски агентов, способных регулировать адгезионные свойства нейтрофилов, воздействуя на внутриклеточные метаболические, ионообменные и секреторные процессы.

Замечания

В диссертационной работе описан новый способ контактных взаимодействий нейтрофилов с клетками и бактериями на расстоянии при помощи нитевидных мембранных структур. Работа выполнена на клетках одного типа – нейтрофилах человека. Возникает вопрос о том, является ли образование подобных структур специфическим свойством нейтрофилов или образование подобных структур происходит и в других клетках крови, в клетках эпителия или соединительной ткани? Проведение аналогичных экспериментов на клетках различных типов могло бы существенно расширить представление о происхождении и функциях цитонем. В обсуждении результатов стоило бы обсудить возможные механизмы образования мембранных тубуловезикулярных

структур на поверхности клеток, например, провести аналогию с процессами тубуляции/везикуляции мембран в процессах эндоцитоза.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям ВАК

Диссертационная работа С.И. Галкиной «Дистанционные взаимодействия нейтрофилов человека с клетками и бактериями, опосредованные мембранными тубуловезикулярными структурами (цитонемами)» представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует требованиям, установленным п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а диссертант заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности: 03.04.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Заведующий лабораторией клеточных взаимодействий
Института биоорганической химии имени академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
доктор биологических наук,
профессор

А.М. Сапожников

Подпись А.М. Сапожникова заверяю

Ученый секретарь ИБХ РАН, д.ф.-м.н.

В.А. Олейников



Сапожников Александр Михайлович, доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией клеточных взаимодействий

Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

тел. 495-330-40-11;

email: amsap@mx/ibch.ru

Публикации А.М. Сапожникова, близкие по теме к диссертации С.И. Галкиной:

1. Shevchenko MA, Bolkhovitina EL, Servuli EA, Sapozhnikov AM. Elimination of *Aspergillus fumigatus* conidia from the airways of mice with allergic airway inflammation. *Respir Res.* 2013 27; 14:78.
2. Kanevskiy LM, Telford WG, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. Lipopolysaccharide induces IFN- γ production in human NK cells. *Front Immunol.* 2013 28; 4:11.
3. Konstantinova EV, Khomyakova NF, Konstantinova NA, Podkolzina AV, Sapozhnikov AM. Relationship between apoptosis and expression of heat shock proteins in peripheral blood lymphocytes of patients with myocardial infarction. *Bull Exp Biol Med.* 2011;150(6):682-4.
4. Balandin TG, Edelweiss E, Andronova NV, Treshalina EM, Sapozhnikov AM, Deyev SM. Antitumor activity and toxicity of anti-HER2 immunoRNase scFv 4D5-dibarnase in mice bearing human breast cancer xenografts. *Invest New Drugs.* 2011 29(1):22-32.
5. Glinka EM, Andryushchenko AS, Sapozhnikov AM, Zatsepina OV. Construction of the plasmid for expression of ETA-EGFP fusion protein under control of the cytomegalovirus promoter and its effects in HeLa cells. *Plasmid.* 2009 62(2):119-27.

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Галкиной Светланы Ивановны на тему: «Дистанционные взаимодействия нейтрофилов человека с клетками и бактериями, опосредованные мембранными тубуловезикулярными структурами (цитонемами)», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы исследования.

Актуальность темы исследования определяется значимостью врожденного иммунитета в инфекционной патологии человека. Межклеточные взаимодействия являются основой жизнедеятельности организма при осуществлении физиологических функций, при патологических состояниях и их коррекции. Попадание инфекционного агента в организм приводит к активации врожденного иммунитета. В этом случае в процесс вовлекаются, с одной стороны патогены, с другой стороны клеточные популяции, осуществляющие иммунный надзор и принимающие участие в развитии воспалительного процесса. Первые этапы процесса межклеточных взаимодействий реализуются при непосредственном контакте клеток на уровне наружных мембран, а также без непосредственного контакта с помощью растворимых медиаторов. Многообразие участников этого процесса и сложность определяют необходимость вычленения отдельных этапов межклеточных взаимодействий и изучение внутриклеточных механизмов этих взаимодействий. Основным фактором защиты от бактериальных инфекций являются нейтрофильные гранулоциты способные, с одной стороны оказывать бактерицидное действие, с другой стороны аномально влиять на сосудистый эндотелий. Вследствие этого изучение фундаментальных механизмов взаимодействия нейтрофилов с клетками эндотелия сосудов и бактериальными патогенами и влияния на эти процессы фактора

врожденного иммунитета и агентов метаболических дисфункций определяют актуальность диссертационной работы С.И. Галкиной.

Общая характеристика работы.

Основной целью данного исследования явилось исследование механизмов дистанционного взаимодействия нейтрофилов крови, осуществляющих неспецифическую защиту организма, с клетками эндотелия сосудов, каузальными клетками воспалительного процесса, и другими клетками и с бактериальными патогенами и, кроме этого механизмов влияния на эти процессы важного фактора врожденного иммунитета окиси азота. Для решения этой цели автором сформулированы 6 задач, решение которых направлено на

- изучение электронномикроскопическими методами морфологии нейтрофилов и при помощи препаративных биохимических методов и масспектрометрического анализа и белкового состава секрети нейтрофилов при адгезии к твердому субстрату в различных условиях;
- изучение влияния адгезионных взаимодействий нейтрофилов с субстратом и клетками на величину внутриклеточного рН нейтрофилов, с определением ионообменных механизмов этого процесса и влиянии ингибиторов метаболизма глюкозы и окислительного фосфорилирования на морфологию и внутриклеточный рН при адгезии к твердому субстрату;
- изучение влияния окиси азота и супероксиданионрадикалов на монослой клеток эндотелия человека и на адгезию к ним нейтрофилов;
- изучение электронномикроскопическими методами механизмов адгезионных взаимодействий нейтрофилов с бактериями и влияния на этот процесс окиси азота;
- доказательство при помощи сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии мембранной природы тубулярных структур бактерий *Salmonella Typhimurium*, соединяющих бактерии между собой в биопленках и прикрепляющих бактерии к нейтрофилам.

Диссертационная работа С.И.Галкиной построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и Методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы» и «Список цитируемой литературы». Диссертация изложена на 195 страницах, иллюстрирована 43 рисунками и 11 таблицами. Список литературы представлен на 16 страницах.

Глава **«Обзор литературы»** начинается с введения, в котором автор предваряет и готовит к восприятию собственно обзор. Такое предварительное введение вполне оправдано, за исключением того, что нет необходимости включать в него результаты собственных исследований, место которым в другом разделе. В этой же главе достаточно подробно охарактеризованы структура и функции нейтрофилов, адгезионные взаимодействия с эндотелием сосудов с помощью молекул клеточной адгезии (МКА) и зависимость от внутриклеточного рН и дистанционные взаимодействия путем продукции цитокинов и мембранных везикул. Важным для понимания собственных исследований автора являются данные литературы, в которых представлена информация об образовании выростов из цитоплазмы нейтрофилов: цилиндров и экстраклеточных уздечек и образования цитонем иммуннокомпетентными клетками. Несколько разделов этой главы посвящены подробному описанию механизмов образования цитонем нейтрофилам. Эти материалы очень важны для понимания результатов собственных исследований, однако, они и опираются на эти результаты. Скорее всего, эта информация должна быть представлена или в разделе собственных исследований или в обсуждении. Глава иллюстрирована схемами и электронными фотографиями, что делает ее более информативной.

В главе **«Материалы и Методы»** достаточно подробно представлены все составляющие, необходимые для выполнения исследовательского процесса.

В главе «Результаты» автор показала, что нейтрофилы могут взаимодействовать с клетками эндотелия, другими клетками и экстраклеточным матриксом путем адгезии – непосредственного контакта, осуществляемого при участии интегринов, и с помощью дистанционного взаимодействия, связанного с образованием тубуловезикулярных структур цитонем - нитевидных структур, превышающих диаметр клеток в несколько раз, и осуществляемого селектинзависимым способом. С помощью специфических красителей, а также с использованием биохимических методов, хроматографии высокого разрешения и масс-спектрометрии автором было доказано, что цитонемы происходят из мембраны нейтрофилов и содержат белки и специфические гранулы нейтрофилов. Автор подтверждает известные данные об участии молекул клеточной адгезии (МКА) разных типов в адгезионных взаимодействиях между клетками, осуществляющими врожденную защиту организма от патогенов. Это - неплотный контакт между лейкоцитами и эндотелием, осуществляемый с помощью селектинов, и более плотный контакт, реализуемый интегринами и иммуноглобулиновыми рецепторами. Однако автор впервые продемонстрировала возможность такого взаимодействия дистанционным образом с помощью МКА, характеризующих один из начальных этапов межклеточных взаимодействий в иммунном процессе. Автор доказала, что образование цитонем и их состав носят универсальный характер вне зависимости от использованного индуктора: ингибиторов метаболизма, агентов, разрушающих актиновый цитоскелет и естественного модулятора врожденного иммунитета окиси азота.

Большая часть диссертационной работы посвящена изучению внутриклеточного механизма образования цитонем. Автор использовала большое число ингибиторов АТФ-аз трех основных типов, ингибиторов окислительного фосфорилирования, блокирование хлорных каналов и удаление экстраклеточного Na^+ ; определяла площадь, занимаемую

нейтрофилами, прикрепленному к фибронектину и наличие цитонем после воздействия. На основании этих исследований автор выдвигает гипотезу, согласно которой «разрушение актинового цитоскелета приводит к дезорганизации взаимодействия гликолитических ферментов и V-АТФаз, что ведет к нарушению процесса слияния мембран секреторных структур с плазматической мембраной нейтрофилов и, таким образом, инициирует образование и рост цитонем на поверхности нейтрофилов». Воздействие окиси азота также приводило к образованию цитонем на поверхности нейтрофилов. Автор на основании данной работы, а также литературных данных полагает, что механизм действия окиси азота связан с образованием цитонем также путем подавления активности V-типа АТФаз и гликолитического фермента GAPDH или деполимеризацией актинового цитоскелета. Это заключение согласуется с известными данными об ингибции экзоцитоза телец Вейбель-Паладе в клетках эндотелия сосудов. С другой стороны, обработка нейтрофилов L-NAME ингибитора синтеза NO блокировала образование цитонем, индуцированных 4-бромфенацилбромидом. Автор не объясняет, какой механизм действия NO или его ингибитора реализует этот процесс. Возможно, существует аддитивное действие 4-бромфенацилбромида и окиси в образовании цитонем нейтрофилами.

Протеомный анализ цитонем нейтрофилов выявил присутствие в них дефензинов HNP-1-3 белков, которые играют важнейшую роль в бактерицидной активности нейтрофилов. Авторы подтвердили их бактерицидную активность продемонстрировав, что среда, обогащенная разрушенными цитонемами подавляла рост бактерий *Salmonella Typhimurium*. Способность нейтрофилов образовывать цитонемы является очень важным патогенетическим свойством, так как экзоцитоз бактерицидных веществ, с одной стороны, приводит к разбавлению бактерицидных веществ и уменьшению их активности, с другой стороны вместе с бактериальными клетками могут быть повреждены и клетки

организма, в том числе клетки эндотелия сосудов. Цитонемы нейтрофилов, как показано автором методом сканирующей электронной микроскопии, связывают бактерии. После слияния цитонем вместе с бактериями, которое происходит очень быстро в течение минут, цитонемы образуют островки вдали от клетки, после набухания, которое сопровождается утолщением цитонем, и лизиса они высвобождают бактерицидные вещества в непосредственной близости от бактерий.

Автор демонстрирует, что окись азота модулирует адгезивные характеристики нейтрофилов при взаимодействии с частицами зимозана, другими клетками и патогенными микроорганизмами. В отсутствие NO нейтрофилы фагоцитируют зимозан и бактерии *Salmonella Typhimurium* (или же бактерии остаются на поверхности нейтрофилов), а в присутствии ингибитор синтеза NO активируют фагоцитоз бактерий, тогда как в присутствии донора NO нейтрофилы с помощью цитонем связывали зимозан и связывали и агрегировали бактерии. Слияние, набухание и лизис цитонем происходил гораздо быстрее, чем при использовании других индукторов, и одновременно с процессом их образования и роста. Следовательно, автором убедительно показано, что NO модулирует характер взаимодействия нейтрофилов, подключая к адгезии и последующему фагоцитозу дистанционное воздействие на бактерии с помощью цитонем. Кроме этого, образование цитонем нейтрофилами расширяет ареал воздействия на патогенные микроорганизмы.

При попадании бактериальных агентов в сосудах активируются свободнорадикальные формы кислорода, действие которых приводит к развитию сосудистой патологии. Автором показано, что они оказывали повреждающее действие на монослой клеток эндотелия, при этом добавление нейтрофилов усугубляло токсический эффект. Действие окиси азота, наряду с другими антиоксидантами, защищало эндотелий от повреждения как супероксидными анион-радикалами, так и нейтрофилами

что, как показал автор, связано и с изменением характера адгезии нейтрофилов по интегринзависимому способу.

Очень важной частью работы являются исследования тубулярных структур бактерий, связывающих бактерии между собой в биопленках и с другими клетками. Методами электронной микроскопии автор продемонстрировала похожесть тубулярных структур бактерий на цитонемы нейтрофилов по размеру, возможности сдувания и по мембранной природе тубуловезикулярных структур. К сожалению, не проведен их биохимический анализ, однако и имеющиеся морфологические доказательства убедительны.

В этой главе выявляются некоторые неточности: в оглавлении заявлено название «Результаты», тогда как сама глава озаглавлена как «Результаты и обсуждение», в тексте результаты, представленные на рис 36, обозначены как рис 18.

В главе «Обсуждение результатов» автор кратко обсуждает собственные результаты, которые достаточно подробно обсуждались в предыдущей главе, но, кроме этого, достаточно подробно обсуждает более ранние литературные данные, связанные с образованием нейтрофилами тубулярных структур.

«Выводы» очень четко соответствуют результатам работы. В главе «Список цитируемой литературы» есть некоторые неточности в указании года статей.

Таким образом, работу, выполненную С.И.Галкиной можно рассматривать как важное и актуальное фундаментальное исследование, в котором выявлен принципиально новый механизм дистанционных взаимодействий нейтрофилов с эндотелием сосудов, экстраклеточным матриксом, охарактеризован механизм образования цитонем и выполнен их протеомный анализ; выявлен принципиально новый механизм взаимодействия нейтрофилов с патогенными бактериями альтернативный фагоцитозу; впервые обнаружено индуцирующее влияние окиси азота

Щегловитова Ольга Николаевна,

доктор медицинских наук,

заведующая лабораторией противовирусного иммунитета

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18; тел. 499-193-61-43;

email: scheglovitova@yandex.ru

Публикации О.Н. Щегловитовой, близкие по теме к диссертации С.И. Галкиной:

1. Shcheglovitova ON, Skliankina NN, Babaiants AA, Frolova IS, Beliaev DL, Ershov FI. Adhesion molecules expressed in vascular endothelial cells in natural immunity against viral infections. Vestn Ross Akad Med Nauk. 2011; (10):54-60.
2. Skliankina NN, Boldyreva NV, Shcheglovitova ON. Differences in functional activity of cultivated human vascular endothelium received from different donors. Tsitologiya. 2011; 53(4):341-6.
3. Aseichev AV, Azizova OA, Shcheglovitova ON, Skliankina NN, Borisenko GG. The influence of oxidized fibrinogen on apoptosis of endothelial cells. Biomed Khim. 2011; 57(2):210-8.
4. Aseichev AV, Azizova OA, Beckman EM, Skotnikova OI, Dudnik LB, Shcheglovitova ON, Sergienko VI. Effects of gold nanoparticles on erythrocyte hemolysis. Bull Exp Biol Med. 2014; 156(4):495-8.
5. Noskov KA, Shcheglovitova ON, Skliarov OD, Noskov AN. Changing the protective properties of the receptor domain of protective antigen anthrax exotoxin, depending on the orientation of the presentation on nanoparticles. Bioorg Khim. 2011; 37(4):504-9.