

**ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию Муругиной Нины Евгеньевны
«Кооперация рецепторов врожденного иммунитета NOD1 и TLR4»
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности «3.2.7 – аллергология и иммунология»**

Актуальность темы

Врожденный иммунитет является первой линией защиты организма от патогенов и реализуется через клеточные и гуморальные факторы. Важным компонентом системы врожденного иммунитета являются паттерн-распознающие рецепторы (ПРР), участвующие в распознавании консервативных молекулярных структур микроорганизмов (PAMP). К основным семействам ПРР относят Toll-подобные рецепторы (TLR), NOD-подобные рецепторы (NLR), лектин-подобные рецепторы С-типа (CLR), RIG-подобные рецепторы (RLR) и цитозольные сенсоры ДНК. Распознавание микробных компонентов инициирует активацию сигнальных путей, в результате чего происходит экспрессия генов цитокинов, костимулирующих молекул и др. При этом характер и интенсивность ответа определяется некоторыми компонентами: лигандами рецепторов врожденного иммунитета, самими рецепторами, молекулами, осуществляющими трансдукцию сигнала (адаптерными белками), а также вырабатывающимися эффекторными молекулами.

Научная работа Н.Е. Муругиной посвящена изучению механизма взаимного влияния ключевых представителей семейств NOD-подобных и Toll-подобных рецепторов на клеточном и молекулярном уровнях, что делает работу актуальной.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Тема диссертации посвящена изучению биологических эффектов, возникающие при сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4, на

модели макрофагов человека. Тематика диссертационной работы полностью соответствует специальности «3.2.7 – аллергология и иммунология».

Основные результаты диссертационной работы

В рамках диссертационной работы Муругиной Н.Е. проведено комплексное исследование биологических эффектов, возникающих при сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4, на модели макрофагов человека. В первую очередь было показано, что при сочетанной стимуляции макрофагов агонистами NOD1 и TLR4 происходит синергическое увеличение продукции фактора некроза опухоли, которое возрастает по мере увеличения доз агонистов и времени инкубации. На следующем этапе показано, что для провоспалительных цитокинов - TNF, IL6, IL23A, IL12B синергический эффект формируется на этапе экспрессии генов в период между 1 и 4 часами после начала стимуляции, а экспрессия генов, кодирующих белки-участники сигнальных путей, при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 увеличивается не синергическим образом.

При изучении активации NF-κB-зависимого, МАР-киназного, Akt- зависимого сигнальных путей в макрофагах при раздельной и сочетанной активации рецепторов NOD1 и TLR4 показано, что ядерная транслокация NF-κB суммируется, но не усиливается синергически.

Показан вклад показателей клеточного метаболизма макрофагов в формирование синергического эффекта.

Ингибиторный анализ выявил вклад отдельных сигнальных путей и цитокинов в развитие синергического эффекта при сочетанной активации рецепторов NOD1 и TLR4.

В заключительной части работы была проведена оценка противоопухолевой активности макрофагов, активированных агонистами NOD1, TLR4 и их сочетанием. Установлено, что сочетание агонистов NOD1 и TLR4 эффективно перепрограммирует активность макрофагов человека с проопухолевой на противоопухолевую.

По теме диссертации опубликовано 11 статей в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций и 1 публикация в материалах международного конгресса.

Достоверность полученных результатов

Экспериментальная работа построена по логичному плану, который позволил выполнить поставленные в работе задачи.

В работе был применен комплекс современных методов исследований, позволивших детально оценить активность исследуемых соединений на молекулярном, клеточном и организменном уровне. Каждый вариант экспериментов повторялся достаточно большое число раз. Полученные результаты являются достоверными. Выводы и практические рекомендации являются обоснованными и вытекают из полученных результатов.

Научная новизна

Целью данной работы явилось изучение биологических эффектов, возникающих при сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4, на модели макрофагов человека. В рамках настоящей работы впервые показано синергическое и не синергическое изменение биологических ответов при сочетанной стимуляции основных рецепторов врожденного иммунитета, участвующих в распознавании грамотрицательных бактерий, представлены сроки развития и масштабы синергического эффекта.

Впервые выявлено, что при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 в макрофагах *in vitro* в первые 4 ч после стимуляции наблюдается синергическое усиление экспрессии и продукции ряда провоспалительных цитокинов. Было показано, что сигнальные пути и процессы, не требующие активации транскрипции (усиление гликозилиза) при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 активируются не синергическим образом. Причем гены, индуцируемые синергически при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4, отличаются от не-

синергически индуцируемых генов более низкой базальной экспрессией и более высокими индексами стимуляции. Также автором впервые выявлено, что активация фактора транскрипции NF-кВ- и p38-зависимого сигнальных путей недостаточна для развития синергического эффекта.

При исследовании противоопухолевой активности комбинации агонистов NOD1 и TLR4 впервые показано, что они эффективно перепрограммируют активность макрофагов человека с проопухолевой на противоопухолевую, причем эффективность комбинации существенно превышает эффективность каждого отдельного агониста.

Теоретическая значимость

Теоретическая значимость работы состоит в том, что охарактеризованы этапы и сроки развития синергических эффектов, их место среди всех активационных процессов в клетке; в диссертационной работе изучены новые аспекты противоопухолевой активности макрофагов, активированных комбинацией агонистов NOD1 и TLR4, по отношению к опухолевой клеточной линии K562. Установлена связь сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4 в макрофагах человека с синергическим усилением продукции фактора некроза опухолей и экспрессией генов провоспалительных цитокинов и хемокинов. Показано, что аутокринные и паракринные механизмы с участием секретируемых цитокинов (фактора некроза опухоли, интерлейкина-1 α , интерлейкина-1 β , интерферонов I типа) не участвуют в формировании синергического эффекта при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4. Раскрыта роль факторов транскрипции семейства NF-кВ в формировании синергического эффекта: факторы транскрипции семейства NF-кВ необходимы для экспрессии генов провоспалительных цитокинов, но недостаточны для формирования синергического эффекта.

Научно-практическая значимость

Практическая значимость работы состоит в том, что полученные в работе данные по механизмам и кинетике взаимодействия NOD- и Toll-подобных

рецепторов врожденного иммунитета можно использовать для разработки комбинированных иммуностимуляторов микробной природы с целью повышения эффективности терапии инфекционно-воспалительных заболеваний и опухолей. Применяя низкие дозы двух синергически действующих агонистов, можно потенциально достичь того же защитного эффекта, что и при использовании высоких доз каждого отдельного агониста, что позволит снизить затраты на лечение и, возможно, расширит спектр противомикробной защиты. Также, поскольку индукция адаптивного иммунного ответа зависит от активации врожденной иммунной системы, то синергические взаимодействия могут быть положены в основу создания новых иммунологических адьювантов.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертация имеет традиционную структуру, изложена на 150 страницах машинописного текста, состоит из «Введения», глав «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение», а также «Выводов» и «Списка использованной литературы». Список литературы содержит 208 работ, из них 205 работ зарубежных и 3 работы отечественных авторов. В диссертации 11 таблиц и 31 рисунок.

Во введении освещено обоснование выбора темы, подробно описана целесообразность проведения данного исследования. Цели и задачи сформулированы корректно.

В обзоре литературы очень подробно и грамотно освещены строение и роль Toll- и NOD-подобных рецепторов, пути передачи сигнала от рецепторов к ядру с участием NF-кB, возможные взаимодействия NOD-TLR на уровне сигнальных путей, транскрипционных факторов и их регуляция, продукция цитокинов, метаболические изменения в клетке при активации NOD- и Toll-подобных рецепторов, а также клиническая значимость синергических взаимодействий NOD-TLR. Текст сопровождается наглядными схемами, облегчающими восприятие представленного материала.

В главе «Материал и методы» дана исчерпывающая характеристика используемых автором в своей работе современных методов (иммунофлюоресценции, ИФА, ОТ-ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинга и др.). Арсенал используемых методов очень широк и показывает высокую квалификацию диссертанта.

В главе «Результаты собственных исследований» последовательно, четко и логично представлены все результаты выполненных работ. Автором изучены несколько стадий активации макрофагов человека под действием агонистов NOD1, TLR4 и их сочетания: активация сигнальных путей, активация гликолиза, деградация ингибиторных белков I_kB и транслокация белков NF-_kB в ядро, экспрессия мРНК цитокинов, хемокинов и регуляторных молекул, продукция цитокинов.

В главе «Обсуждение» проведено сравнение результатов с литературными данными, грамотно представлен анализ собственных результатов. Полученный материал кратко обобщен в заключении работы.

«Выводы» сформулированы четко, логично вытекают из полученных результатов, полностью отвечают поставленным задачам.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Замечаний к диссертации нет.

Заключение

Таким образом, диссертация Муругиной Нины Евгеньевны: «Кооперация рецепторов врожденного иммунитета NOD1 и TLR4» является научно-квалификационной работой, в которой осуществлено решение актуальных задач, имеющих важное значение для аллергологии и иммунологии: показано, что разные виды биологических ответов при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 могут усиливаться как синергически (усиление экспрессии мРНК ряда провоспалительных цитокинов - TNF, IL6, IL23A, IL12B), так и несинергически (активация сигнальных путей, быстрая активация гликолиза, активация

противоопухолевых эффекторных механизмов, экспрессия мРНК большинства исследованных генов - аддитивное или инфааддитивное взаимодействие).

Диссертация Муругиной Н.Е. полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (пп. 9-14, постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года в редакции постановления Правительства РФ от 18 марта 2023 г. N 415), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «3.2.7 – аллергология и иммунология».

Официальный оппонент, ведущий научный сотрудник
лаборатории клинической иммунологии опухолей ФГБУ
«НМИЦ онкологии имени Н.Н.Блохина» Минздрава
России
доктор медицинских наук, профессор

З.Г.Кадагидзе

Адрес: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д.24
ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н.Блохина» Минздрава России
Телефон: 8 (499) 324 94 74
Электронная почта: kad-zaira@yandex.ru

Подпись З.Г.Кадагидзе заверяю:
Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ онкологии
имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, к.м.н.

«__12__» __апреля__ 2023 г



И.Ю. Кубасова