

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Козлова Ивана Генриховича на диссертационную работу Муругиной Нины Евгеньевны «Кооперация рецепторов врожденного иммунитета NOD1 и TLR4» представленной к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Аллергология и иммунология

Актуальность темы диссертации

Клетки врожденной иммунной системы участвуют в эффективном уничтожении патогенов, формировании воспаления и повреждения тканей. Детекция патогенов осуществляется паттерн-распознающими рецепторами (ПРР), распознающими патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП). При инфекционных заболеваниях иммунная система сталкивается не с одним ПАМП, а с набором различных ПАМП, которые распознаются разными рецепторами. Возникающие функциональные взаимодействия между рецепторами приводят к количественным и качественным изменениям суммарного ответа клеток.

Одним из вариантов кооперации ПРР является «синергизм», когда ответ клеток на сочетание их лигандов выше, чем сумма ответов на каждый агонист по отдельности. Неконтролируемые синергические взаимодействия ПРР при инфекциях могут приводить к гиперактивации врожденного иммунитета с развитием тяжелых осложнений, таких, как септический шок и другие. С другой стороны, контролируемое применение синергически взаимодействующих агонистов может быть положено в основу создания двухкомпонентных иммуностимуляторов и адьювантов.

Целью работы Муругиной Н.Е. является изучение биологических эффектов, возникающих при сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4, на модели макрофагов человека. Рецепторы NOD1 и TLR4 являются ключевыми представителями семейств NOD-подобных и Toll-подобных рецепторов, соответственно. Оба рецептора играют важную роль в распознавании грам-отрицательных бактерий клетками врожденной иммунной

системы. Механизмы синергического взаимодействия рецепторов NOD1 и TLR4 в настоящее время остаются неясными. Изучение механизма кооперации NOD- и Toll-подобных рецепторов является актуальной проблемой.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Тема диссертации посвящена изучению биологических эффектов, возникающих 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

Диссертационная работа Муругиной Н.Е. посвящена изучению биологических эффектов, возникающих при сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4, на модели макрофагов человека. Вначале были определены концентрации агонистов NOD1 и TLR4, дающие выраженный синергический эффект. Изучение кинетики экспрессии генов *TNF* и *IL6* после раздельной и сочетанной стимуляции макрофагов агонистами NOD1 и TLR4 показало, что синергический эффект агонистов NOD1 и TLR4 формируется на уровне экспрессии мРНК между 1 и 4 ч после начала стимуляции.

Муругина Н.Е. проанализировала кинетику ядерной транслокации белков NF-κB, являющихся ключевыми регуляторами транскрипции генов провоспалительных цитокинов, где показала, что при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 происходило наложение кинетик ядерной транслокации c-Rel, p65 и p50, индуцированной каждым из двух рецепторов, однако синергического эффекта не наблюдалось. Аналогичные данные были получены при изучении ядерной транслокации p65 в единичных клетках методом иммунофлюоресценции.

Для более точной оценки кооперации рецепторов NOD1 и TLR4 была исследована экспрессия генов проксимальных адапторов NOD1 и TLR4; экспрессия этих генов не менялась ни при одном виде стимуляции. Наконец, был проверен еще один возможный механизм развития синергического

эффекта: опосредованный секретируемыми цитокинами. Полученные данные позволяют утверждать, что растворимые медиаторы, секретируемые макрофагами, вряд ли вносят значительный вклад в механизмы синергической кооперации NOD1-TLR4.

Проведенный далее анализ изменений гликолиза показал, что прирост таких показателей как высвобождение лактата и потребление глюкозы при активации рецепторов NOD1-TLR4 носят несинергический характер. Оценка активации некоторых сигнальных путей, регулирующих клеточный метаболизм показала, что уровни фосфорилированных форм киназ увеличиваются, но синергических эффектов не наблюдалось. Диссертантом было проверено, может ли синергический ответ быть отменен путем ингибирования сигнальных путей рецепторов NOD1-TLR4 и показано, что для получения синергического эффекта NOD1-TLR4 необходима непрерывная сигнализация через NOD1-RIP2 между 1 и 4 часами после начала стимуляции.

Кроме того, исследована противоопухолевая активность макрофагов, индуцированных сочетанием агонистов NOD1 и TLR4. Установлена возможность перепрограммирования активности макрофагов с проопухоловой на противоопухоловую, и раскрыты некоторые механизмы противоопухоловой активности макрофагов.

Основные результаты диссертации опубликованы в 11 статьях в журналах (из них 3 зарубежных), которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций, а также 1 публикация в материалах международных конгрессов и конференций.

Достоверность полученных результатов

Представленная диссертационная работа является правильно спланированной и грамотно выполненной. Тщательно проанализирована научная литература по теме исследования. Работа выполнена с применением

современных методов, используемых в иммунологии: культивирование макрофагов, ПЦР в режиме реального времени, иммуноферментный анализ, вестерн-блоттинг, иммунофлуоресцентное окрашивание макрофагов, лазерная проточная цитометрия и другие. Анализ полученных данных проводился с помощью релевантных методов статистической обработки. Полученные результаты являются воспроизводимыми. Выводы логично вытекают из полученных результатов.

Научная новизна исследования

Работа обладает несомненной научной новизной, существенно дополняя имеющиеся знания по иммунобиологии и синергическим взаимодействиям ПРР. Получены новые знания о механизмах взаимодействия рецепторов NOD1 и TLR4. Впервые показано, что активация NF-кБ- и p38-зависимого сигнальных путей недостаточна для развития синергического эффекта. Исключена роль аутокринных механизмов с участием цитокинов в развитии синергизма NOD1-TLR4. Впервые выявлено, что разные виды биологических ответов при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 могут усиливаться как синергически, так и несинергически. Впервые продемонстрировано, что комбинация агонистов NOD1 и TLR4 является эффективным индуктором противоопухолевой активности макрофагов *in vitro*, причем эффективность комбинации существенно превышает эффективность каждого отдельного агониста.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в том, что обнаружены и описаны синергические эффекты при действии комбинации агонистов NOD1 и TLR4 на макрофаги человека; подобраны оптимальные дозы агонистов NOD1 и TLR4, дающие выраженный синергический эффект.

Охарактеризованы этапы и сроки развития синергических эффектов, установлено их место среди всех активационных процессов в клетке. Показана

роль в коопeraçãoи рецепторов врожденного иммунитета NOD1 и TLR4 растворимых медиаторов, факторов транскрипции NF-κB и проксимальных адапторов, специфически участвующих в передаче сигналов рецепторов NOD1 и TLR4. Эти результаты могут иметь значение для понимания патогенеза сепсиса и других инфекционных заболеваний, связанных с избыточным воспалительным ответом.

Впервые продемонстрировано, что комбинация агонистов NOD1 и TLR4 является эффективным индуктором противоопухолевой активности макрофагов *in vitro*, причем эффективность комбинации существенно превышает эффективность каждого отдельного агониста. Установлена роль TNF, IFN- β мембрano-ассоциированных молекул в механизмах противоопухолевого действия макрофагов.

Научно-практическая значимость работы

Научно-практическая значимость работы состоит в том, что диссертантом была разработана модель синергической активации макрофагов, основанная на коопेrации рецепторов врожденного иммунитета NOD1 и TLR4.

В работе Муругиной Н.Е. были разработаны и применены методы исследования метаболической активности макрофагов, противоопухолевой активности макрофагов, получены последовательности праймеров для исследования экспрессии 23 генов врожденного иммунитета.

Результаты исследований по механизмам синергических взаимодействий агонистов NOD1 и TLR4 и противоопухолевой активности макрофагов можно использовать при разработке комбинированных иммуностимуляторов микробной природы. Эти данные могут быть использованы для разработки новых препаратов для терапии сепсиса и других инфекционных заболеваний, связанных с избыточным воспалительным ответом. Сочетание агонистов рецепторов NOD1 и TLR4 может рассматриваться в качестве кандидатного противоопухолевого препарата.

Полученные диссидентом данные о механизмах кооперации рецепторов врожденного иммунитета могут быть использованы для обучения студентов и аспирантов медицинских и биологических специальностей.

Общая структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа построена по традиционному плану и включает главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение», «Выводы», «Список использованной литературы». Диссертационная работа изложена на 150 страницах машинописного текста. Библиография включает 208 источников, из них 205 работ зарубежных и 3 работы отечественных авторов. Работа проиллюстрирована 31 рисунками и 11 таблицами.

В главе «Введение» сформулированы актуальность, цели и задачи исследования, обозначена научная новизна работы, а также теоретическая и практическая значимость исследования.

Глава «Обзор литературы» представлена в достаточном объеме, описано строение, функции сигнальных путей NOD- и Toll-подобных рецепторов, регуляция транскрипционных факторов NF-кБ, изложены известные на данный момент возможные механизмы синергического взаимодействия NOD- и Toll-подобных рецепторов, особое внимание уделено роли NOD- и Toll-подобных рецепторов в формировании сепсиса и активации противоопухолевых свойств макрофагов.

В главе «Материал и методы» подробно изложены использованные методы исследования. Работа выполнена с применением современных методов: культивирование макрофагов, ПЦР в режиме реального времени, иммуноферментный анализ, вестерн-блоттинг, лазерная проточная цитометрия и другие.

Глава «Результаты собственных исследований» четко структурирована и состоит из 13 разделов, включающих в себя дополнительные подразделы. В данной главе описано изучение нескольких этапов активации макрофагов при

раздельной и сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4: передача сигнала от рецепторов в ядро, экспрессия генов цитокинов и регуляторных молекул, продукция цитокинов, перестройка клеточного метаболизма, активация противоопухолевых эффекторных механизмов. Все результаты проверены в достаточном количестве экспериментальных повторностей, хорошо проиллюстрированы рисунками.

В главе «Обсуждение» подробно проанализированы результаты каждого из аспектов активации макрофагов, исследованных в работе. Муругина Н.Е. анализирует полученные экспериментальные данные, сравнивая их с уже имеющимися в научной литературе и выделяя собственные новые результаты, а также подробно объясняет наблюдаемые эффекты и закономерности, подводя к ним теоретическую базу.

«Выводы» диссертационной работы вытекают из полученных результатов, корректны и обоснованы. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

В целом, работа производит хорошее впечатление, охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием методологически обоснованного плана научного исследования и соответствия решенных задач в общей цели исследования. Автор грамотно подошла к построению этапов работы, они логично вытекают один из другого. Диссертация соответствует специальности 3.2.7. Аллергология и иммунология.

Заключение

Диссертационная работа 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, является научно-квалификационной работой, в которой осуществлено решение актуальной задачи, имеющей существенное значение

для аллергологии и иммунологии: продемонстрированы синергические эффекты при действии комбинации агонистов NOD1 и TLR4 на макрофаги человека. Охарактеризованы этапы и сроки развития синергических эффектов, установлено их место среди всех активационных процессов в клетке. Показано, что комбинация агонистов NOD1 и TLR4 является эффективным индуктором противоопухолевой активности макрофагов *in vitro*.

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

Доктор медицинских наук, профессор,
профессор кафедры организации и
управления в сфере обращения
лекарственных средств Института
последипломного образования ФГАОУ
ВО «Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Козлов Иван Генрихович

119991 г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет)
Тел.: +7(499) 248-05-53; E-mail: rektorat@sechenov.ru

