

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и

клинической иммунологии»

доктор биологических наук,

А.Н.Силков

2023 г.



ОТЗЫВ

о научно-практической значимости диссертационной работы Муругиной Н.Е.
«Кооперация рецепторов врожденного иммунитета NOD1 и TLR4» на
соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности
«3.2.7 – аллергология и иммунология»

Актуальность темы диссертации

Каждый инфекционный агент, как правило, содержит в себе несколько патоген-ассоциированных молекулярных паттернов и, следовательно, активирует два и более паттерн-распознающих рецептора (ПРР) врожденного иммунитета, которые взаимодействуют между собой. Характер врожденного иммунного ответа при инфекциях определяется именно кооперацией ПРР. При коопeraçãoции ПРР возможно формированием эффекта «синергизма», когда эффект одновременной активации двух рецепторов больше, чем сумма эффектов активации каждого рецептора в отдельности. 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 синергической индукции провоспалительных цитокинов и хемокинов комбинациями агонистов NOD-подобных и Toll-подобных рецепторов в настоящее время изучены недостаточно. Неконтролируемая

синергическая коопeração ПРР в ходе инфекций может приводить к развитию избыточной воспалительной реакции, лежащей в основе сепсиса, септического шока и других угрожающих жизни воспалительных заболеваний. Контролируемая синергическая коопeração рецепторов может быть использована терапевтически или профилактически для активации врожденной иммунной защиты, синергическая коопeração может быть положена в основу создания новых иммунологических адьювантов. Учитывая сказанное, изучение механизмов коопeration NOD- и Toll-подобных рецепторов является актуальной проблемой.

Таким образом, тема является актуальной и может быть основой для разработки подходов по иммунотерапии сепсиса и опухолей методом активации врожденной иммунной защиты при коопerationе рецепторов NOD1 и TLR4.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Тема диссертационной работы полностью соответствует специальности «3.2.7 – аллергология и иммунология» (области исследования: №2 Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии. №3 Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты. №6 Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов).

Основные результаты диссертационной работы

Сформулированные автором цель и задачи исследования достигнуты полностью. Диссертантом были подобраны оптимальные дозы агонистов NOD1 и TLR4, необходимые для получения выраженного синергического эффекта по продукции важного провоспалительного цитокина TNF. Далее исследована кинетика экспрессии генов провоспалительных цитокинов: фактора некроза

опухолей, интерлейкина-1 β , интерлейкина-6, интерлейкина-23. На данном этапе исследования было установлены, что синергический эффект формируется на этапе экспрессии генов цитокинов в первые 4 часа после начала стимуляции. На следующем этапе исследований диссертант охарактеризовала вклад факторов транскрипции семейства NF-кВ p50, p65 и c-Rel, являющихся ключевыми регуляторами транскрипции генов провоспалительных цитокинов, в формирование синергического ответа. Было выявлено, что факторы транскрипции семейства NF-кВ необходимы для экспрессии генов провоспалительных цитокинов, но недостаточны для формирования именно синергического эффекта. Также на этом этапе была исследована экспрессия генов, кодирующих белки-участники сигнальных путей: *TLR4*, *NOD1*, *NOD2*, *TIRAP*, *TICAM1 (TRIF)*, *MYD88*, *TICAM2 (TRAM)*, *RIPK2 (RIP2)* и установлено, что при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 экспрессия этих генов увеличивается несинергическим образом. При использовании ингибиторов компонентов сигнальных путей NOD1 и TLR4 показано, что для получения синергического эффекта NOD1-TLR4 необходима непрерывная сигнализация через NOD1-RIP2. Не менее важной для понимания механизмов формирования синергического эффекта при кооперации рецепторов NOD1 и TLR4 является оценка метаболических изменений в клетке при действии агонистов NOD1 и TLR4. Диссертант исследовала динамику скорости закисления культуральной среды (ECAR) в реальном времени, потребление глюкозы из культуральной среды за 24 ч, высвобождение лактата в культуральную среду за 24 ч. Также с применением метода Вестерн blotting были оценены уровни фосфорилированных форм Akt, p70, p38, ERK, MNK и eIF4E - компоненты PI3K-зависимого и МАП-киназного сигнальных путей, регулирующих клеточный метаболизм. Полученные данные позволили сделать вывод, что активация PI3K-зависимого и МАП-киназного сигнальных путей, быстрое усиление гликолиза при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 суммируются, но не усиливаются синергически. Автором была проанализирована экспрессия 24 генов и при анализе корреляций между синергизмом и базовой экспрессией

генов было показано, что гены, индуцируемые синергически при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4, отличаются от несинергически индуцируемых генов более низкой базальной экспрессией и более высокими индексами стимуляции. На заключительном этапе работы диссертантом была проанализирована противоопухолевая активность макрофагов, активированных комбинацией агонистов NOD1 и TLR4, по отношению к опухолевой клеточной линии K562 и изучены механизмы противоопухолевого действия макрофагов. Результаты этих исследований позволили сделать выводы, что в реализации противоопухолевых эффектов макрофагов, активированных сочетанием агонистов NOD1+TLR4 участвуют TNF и другие растворимые и мембраноассоциированные молекулы, а одним из механизмов противоопухолевой активности макрофагов является антитрополиферативный эффект.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа Муругиной Н.Е. представляет собой исследование, направленное на решение научной задачи, имеющей значение для развития иммунологии, которое включает тщательный анализ данных литературы, грамотное планирование экспериментов, применение современных методов, адекватную статистическую обработку и анализ полученных данных. Полученные результаты являются достоверными и воспроизводимыми. В результате проведенных исследований был получен большой фактический материал, проведен его тщательный анализ и сопоставление с современными научными данными.

Выводы диссертационной работы корректны, соответствуют поставленным задачам, логично вытекают из полученных результатов.

Основные результаты диссертации опубликованы в 11 печатных работах общим объемом 97 страниц, в том числе 11 статей в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций («Journal of Leukocyte Biology»,

«Journal of Biological Chemistry», «Journal of Immunology», «Иммунология», «Российский иммунологический журнал»), в том числе 2 публикации в материалах международных конгрессов и конференций.

Научная новизна

Получены новые знания о механизмах кооперации рецепторов NOD1 и TLR4. Впервые изучены несколько последовательных стадий активации макрофагов человека под действием агонистов NOD1, TLR4 и их сочетания: активация сигнальных путей, активация гликозилизации, деградация ингибиторных белков IкВ и транслокация белков NF-кВ в ядро, экспрессия генов цитокинов, хемокинов и регуляторных молекул, продукция цитокинов. Впервые показано, что разные виды биологических ответов при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 могут усиливаться как синергически, так и несинергически. Так, сигнальные пути, вплоть до поступления активационного сигнала в ядро, а также процессы, не требующие активации транскрипции (усиление гликозилизации) при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 активируются несинергическим образом. Однако на выходе из ядра имеет место синергическое усиление экспрессии генов ряда провоспалительных цитокинов (*TNF*, *IL6*, *IL23A*, *IL12B* и др.). Синергический эффект развивается между 1 и 4 ч после начала стимуляции. При этом экспрессия ряда других генов иммунного ответа (*NFKBIA*, *TNFAIP3* и др.) меняется несинергическим образом.

Таким образом, впервые установлены сроки развития и уровень синергического эффекта. Впервые показано, что активация NF-кВ- и p38- зависимого сигнальных путей недостаточна для развития синергического эффекта. Впервые исследована и исключена роль аутокринных механизмов с участием цитокинов в развитии синергизма NOD1-TLR4.

Впервые продемонстрировано, что комбинация агонистов NOD1 и TLR4 является эффективным индуктором противоопухолевой активности макрофагов *in vitro*, причем эффективность комбинации агонистов NOD1 и TLR4 существенно превышает эффективность каждого отдельного агониста.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в детальном изучении на клеточном и молекулярном уровнях механизмов взаимного влияния ключевых представителей семейств NOD-подобных и Toll-подобных рецепторов: NOD1 и TLR4. Экспериментально показан вклад активации экспрессии генов, ядерной транслокации NF-κB, активации Р13К-зависимого и МАП-киназного сигнальных путей, усиления гликолиза в формирование стимулирующего эффекта при сочетанной стимуляции рецепторов врожденного иммунитета NOD1 и TLR4 в макрофагах человека *in vitro*, установлены время и место формирования синергических процессов в клетке. Впервые исследована и исключена роль аутокринных и паракринных механизмов с участием цитокинов (фактора некроза опухоли, интерлейкина-1 α , интерлейкина-1 β , интерферонов I типа) в развитии синергизма NOD1-TLR4. Эти данные представляют научно-практическую ценность для иммунологов, изучающих молекулярные механизмы сигнализации NOD-подобных и Toll-подобных рецепторов макрофагов человека. Материалы диссертации могут быть использованы при обучении студентов медицинских и биологических специальностей.

Научно-практическая значимость работы

Научно-практическую ценность представляют данные по совместной активации рецепторов NOD1 и TLR4. Диссидентом были отработаны методические подходы по изучению влияния агонистов рецепторов врожденного иммунитета NOD1 и TLR4 на макрофаги человека: модель оценки противоопухолевой активности макрофагов человека *in vitro* и модель оценки метаболической активности макрофагов *in vitro*.

С практической точки зрения, полученные результаты работы могут быть использованы для разработки новых комбинированных иммуностимуляторов микробной природы с целью повышения эффективности терапии инфекционно-воспалительных заболеваний и опухолей.

При помощи ингибиторного анализа установлена возможность отмены синергической продукции провоспалительных цитокинов при ингибировании NOD1 и егоproxимального адаптора RIP2. Эти данные могут быть использованы для разработки новых препаратов для терапии сепсиса и других инфекционных заболеваний, связанных с избыточным воспалительным ответом

В модели совместного культивирования макрофагов и клеток человеческой эритромиелоидной клеточной линии K562 показано подавление роста опухолевых клеток путем сочетанной стимуляции макрофагов агонистами NOD1 и TLR4, что позволит в дальнейшем проводить исследования по оценке эффективности такого подхода в качестве кандидатного противоопухолевого препарата.

Рекомендации по использованию результатов и выводов

диссертации

Представленные Муругиной Н.Е. материалы могут быть использованы при обучении студентов медицинских и биологических специальностей, в учебных программах повышения квалификации на факультетах последипломного образования по вопросам молекулярной биологии, иммунологии, онкологии.

Выносимые на защиту решения научных задач и разработки, выводы и практические рекомендации базируются на полученных результатах исследования, полностью аргументированы, статистически достоверны, научно обоснованы и отражают концепцию автора о том, что синергическая коопeração в паре NOD1- TLR4 является результатом многих перекрывающихся процессов, которые включают усиление позитивных регуляторных событий и дефицит негативных регуляторных механизмов.

Предложенный алгоритм использования комбинации агонистов NOD1 и TLR4 может быть использован в практическом здравоохранении для разработки эффективных методов перепрограммирования активности макрофагов человека с проопухолевой на противоопухолевую и для разработки комбинированных иммуностимуляторов микробной природы.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц, 31 рисунок. Диссертация включает главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список использованной литературы». Библиография включает 208 источников.

В главе «Введение» обоснованы актуальность, научная новизна, практическая значимость исследования, а также сформулированы цель и задачи работы.

В главе «Обзор литературы» рассматриваются современные представления о структуре и функции NOD - и Toll-подобных рецепторов, их взаимодействии и возможное участие синергической кооперации NOD- и Toll-подобных рецепторов в развитии сепсиса и использование синергической кооперации NOD- и Toll-подобных рецепторов для защиты от инфекций и активации противоопухолевых свойств макрофагов.

В главе «Материалы и методы» изложена полная информация об объектах исследования и использованных в работе методических подходах. Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне с применением современных методов, используемых в иммунологии.

Глава «Результаты собственных исследований» содержит несколько взаимосвязанных и логически изложенных разделов. В данной главе показаны данные по механизмам и кинетике кооперации NOD и Toll-подобных рецепторов врожденного иммунитета, при помощи ингибиторного анализа установлена возможность отмены синергической продукции провоспалительных цитокинов при ингибировании NOD1 и его

проксимального адаптора RIP2. В модели совместного культивирования макрофагов и клеток человеческой эритромиелоидной клеточной линии K562 разработана методика подавления роста опухолевых клеток путем сочетанной стимуляции макрофагов агонистами NOD1 и TLR4. Все результаты получены с помощью современных методов, проверены в достаточном количестве экспериментальных повторностей, статистически обработаны, сопровождаются рисунками и таблицами.

В главе «Обсуждение» Н.Е. Муругина проводит анализ полученных результатов, сравнивает полученные результаты с данными литературы и аргументированно раскрывает их научную значимость.

Сделанные в работе выводы корректны, полностью обоснованы результатами проведенного исследования. Работу завершает список использованной литературы, включающий 208 источников. Оформление диссертации соответствует установленным требованиям.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

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 содержится решение актуальных задач, имеющих существенное значение для аллергологии и иммунологии: продемонстрирована возможность активации макрофагов с использованием сочетания более низких доз агонистов NOD1 и TLR4 на макрофаги человека и доказаны механизмы синергических эффектов при действии комбинации агонистов NOD1 и TLR4. Изучена метаболическая активность макрофагов *in vitro* при действии комбинации агонистов NOD1 и TLR4. Создана модель эффективного применения комбинации агонистов NOD1 и TLR4, которая приводит к синергическому увеличению экспрессии генов,

кодирующих провоспалительные цитокины, и является эффективным активатором противоопухолевой активности человеческих макрофагов *in vitro*.

Диссертация Муругиной Н.Е. полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года в редакции постановления Правительства РФ от 21.04.2016 №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности «3.2.7 – аллергология и иммунология».

Отзыв на диссертационную работу Муругиной Нины Евгеньевны подготовлен доктором медицинских наук, профессором, академиком РАН Козловым Владимиром Александровичем, обсужден и утвержден на заседании расширенного семинара лабораторий молекулярной иммунологии и клинической иммунопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (протокол № 4 от 20 апреля 2023 г.).

Научный руководитель НИИФКИ
доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН

20. 04. 2023

В.А. Козлов

Подпись д.м.н., профессора,
академика РАН В.А. Козлова В.А. заверяю:

Ученый секретарь НИИФКИ,
кандидат биологических наук

20. 04. 2023



Е.Д. Гаврилова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

630099, г.Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14,
Тел.+7(383) 222-26-74, факс +7(383) 222-70-28,
e-mail: info@niikim.ru, Официальный сайт <http://www.niikim.ru>