

ОТЗЫВ

**официального оппонента, доктора медицинских наук Пашенкова
Михаила Владимировича на диссертацию Джаруллаевой Алины
Шахмировны «Роль сочетанной стимуляции Toll- и NOD-подобных
рецепторов врожденного иммунитета в формировании реакций
адаптивного иммунного ответа» на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности «14.03.09 – Клиническая
иммунология, аллергология»**

Актуальность избранной темы

Вакцинация против инфекционных заболеваний – одно из наиболее значимых достижений практической иммунологии. Хотя первая вакцина появилась еще на рубеже XVIII-XIX веков, создание новых препаратов данного класса продолжает оставаться актуальной задачей, поскольку: 1) до сих пор отсутствуют эффективные вакцины против многих социально значимых инфекционных заболеваний, таких как туберкулез и ВИЧ-инфекция; 2) появляются новые патогены человека, такие как SARS-CoV-2, требующие экстренной разработки вакцинных препаратов; 3) появляются новые штаммы уже известных патогенных и условно патогенных бактерий, резистентные к большинству известных антибиотиков и требующие разработки альтернативных методов профилактики и лечения, в том числе вакцинопрофилактики.

Одной из основных проблем при разработке вакцин является низкая иммуногенность многих микробных антигенов, против которых должен быть направлен защитный адаптивный иммунный ответ. Эта проблема особенно остра в случае субъединичных и пептидных вакцин. В этой связи критическое значение приобретают иммунологические адъюванты – вещества, повышающие иммуногенность и усиливающие адаптивный иммунный ответ против вакцинных антигенов через активацию клеток врожденной иммунной системы. На сегодня разработан целый ряд адъювантов, однако ни один из них в полной мере не удовлетворяет требованиям эффективности (способность вызывать значимое и длительное

повышение уровней защитных антител и/или эффекторных Т-клеток) и безопасности (минимум побочных эффектов). Таким образом, разработка эффективных и безопасных иммунологических адъювантов является весьма актуальной задачей, которой и посвящена представленная диссертационная работа Джаруллаевой А.Ш.

Научная новизна исследования

Целью диссертации является разработка новой разновидности иммунологических адъювантов, которые можно охарактеризовать как «комбинаторные адъюванты». Для создания такого адъюванта впервые использовано явление синергизма между определенными сочетаниями паттерн-распознающих рецепторов (ПРР) клеток врожденной иммунной системы. ПРР – это сенсоры, с помощью которых клетки врожденной иммунной системы распознают инфекции и другие виды угроз. Известно, что при активации некоторых сочетаний ПРР ответ клеток врожденной иммунной системы значительно превышает сумму ответов, вызываемых при активации каждого рецептора по отдельности. Этот феномен носит название синергизма и проявляется, в том числе, в усилении продукции ряда провоспалительных цитокинов, бактерицидных свойств, способности к представлению антигенов и т.д. В литературе довольно хорошо описан синергизм между семействами NOD-подобных и Toll-подобных рецепторов. Однако до сих пор не было попыток использовать феномен синергизма для создания иммунологических адъювантов. В данной работе впервые проведен систематический скрининг агонистов NOD- и Toll-подобных рецепторов на предмет индукции синергических эффектов в клетках врожденной иммунной системы. Впервые продемонстрирована высокая адъювантная активность сочетания агонистов рецепторов NOD2 и TLR4, изучены механизмы этой активности. Впервые показано, что комбинация агонистов NOD2 и TLR4 обладает достоверно более выраженной адъювантной активностью, чем агонист TLR4 – монофосфорилированный липид А, один из широко применяемых в настоящее время адъювантов. Все это определяет несомненную новизну представленной работы.

Степень обоснования и достоверности полученных результатов

Экспериментальная работа была построена по логичному плану, который позволил выполнить поставленные в работе задачи. Вначале был проведен скрининг сочетаний различных агонистов NOD- и Toll-подобных рецепторов по их способности вызывать синергическое усиление экспрессии NF-κB-регулируемого репортерного гена в клетках THP-1 (перевиваемая моноцитозидная клеточная линия, широко используемая в качестве модели клеток врожденной иммунной системы человека). Для дальнейшей работы было отобрано сочетание агонистов рецепторов NOD2 (мурамилдипептид) и TLR4 (монофосфорилированный липид A), дающее наиболее выраженный синергический эффект. Далее показано синергическое влияние данной комбинации агонистов на экспрессию ключевых генов иммунного ответа в клетках THP-1, в т.ч. цитокинов, хемокинов, факторов транскрипции. Интересно, что судя по представленным данным, активация основных сигнальных путей в тех же клетках под действием сочетания агонистов NOD2+TLR4 носит аддитивный характер, что соответствует ранее опубликованным данным. Затем были получены вакцинные формуляции на основе наночастиц поли(молочной-ко-гликолевой) кислоты с включением субоптимальной дозы модельного антигена (гемагглютинина вируса гриппа), причем было получено 4 разновидности вакцин: без адьюванта, с включением агонистов NOD2 и TLR4 по отдельности и с включением обоих агонистов. Были всесторонне исследованы и сопоставлены свойства полученных вакцин: их физико-химические характеристики, удельное содержания антигена и адьювантов, способность захватываться антигенпредставляющими (дендритными) клетками и усиливать их антигенпредставляющую и костимуляторную активность, способности индуцировать врожденный иммунный ответ *in vivo* (в последнем случае применен метод биолюминесценции *in vivo* с использованием трансгенных репортерных мышей). Во всех случаях показано, что комбинация агонистов NOD2+TLR4 обладает более выраженным эффектом на изучаемые параметры, чем каждый агонист по отдельности, причем эффект комбинации агонистов варьирует от аддитивного до синергического. Далее, при

иммунизации мышей вакциной, содержащей сочетание агонистов, наблюдалась более выраженная индукция клеточного и гуморального адаптивного иммунного ответа против гемагглютинаина по сравнению с иммунизацией каждым агонистом по отдельности. Наконец, на завершающем этапе исследования на модели гриппозной инфекции у мышей было продемонстрировано, что иммунизация вакциной, содержащей в качестве адъюванта комбинацию агонистов NOD2+TLR4, дает существенно более выраженный протективный эффект, чем иммунизация вакцинами, содержащими агонисты NOD2 или TLR4 по отдельности, и тем более вакциной без адъюванта. Таким образом, поставленные задачи были полностью выполнены.

В работе был применен комплекс современных методов исследования, позволивших детально оценить активность исследуемых соединений на молекулярном, клеточном и организменном уровне. Выбор доз и концентраций препаратов, используемых в основных опытах, обусловлен результатами предварительных экспериментов. Эксперименты выполнены в достаточно большом количестве повторностей. Для обработки результатов были применены адекватные методы математической статистики. Полученные результаты являются достоверными. Научные положения, выводы и практические рекомендации являются обоснованными и вытекают из полученных результатов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в том, что продемонстрирована принципиальная возможность использования синергических взаимодействий паттерн-распознающих рецепторов врожденной иммунной системы для усиления протективного эффекта вакцин. Вакцина, содержащая комбинаторный адъювант в виде сочетания агонистов двух синергически взаимодействующих рецепторов, позволяет добиться более выраженной активации антигенпредставляющих клеток, большей напряженности адаптивного иммунного ответа и более выраженного протективного эффекта по сравнению с вакцинами,

содержащими агонист только одного рецептора, в том числе широко используемый ныне монофосфорилированный липид А. Кроме того, в работе представлен алгоритм действий, который может быть использован при создании и изучении других, возможно еще более эффективных, комбинаторных адъювантов.

Основной практический результат работы – создание нового иммунологического адъюванта (мурамилдипептид + монофосфорилированный липид А), более эффективного по сравнению с существующими аналогами. Этот результат может быть использован: а) для создания вакцин, содержащих слабоиммуногенные антигены; б) для снижения дозы антигена в вакцинах, содержащих высокоиммуногенные антигены, что может повысить их безопасность и уменьшить стоимость. Кроме того, в ходе работы были созданы новые методики оценки физико-химических свойств вакцин, которые уже применяются на практике для контроля качества ныне выпускаемых в России вакцинных препаратов.

Общая структура и содержание диссертационной работы

Диссертация А.Ш. Джаруллаевой составлена по традиционному плану. Она состоит из «Введения», глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Практические рекомендации», «Выводы» и «Список цитируемой литературы». Работа изложена на 171 странице машинописного текста, содержит 32 рисунка и 6 таблиц. В списке литературы 257 источников отечественных и зарубежных авторов. Во «Введении» автор убедительно показала актуальность проблемы, которой посвящена работа. Цель сформулирована четко, задачи соответствуют поставленной цели. В «Обзоре литературы» изложены современные знания о роли паттерн-распознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунном ответе, а также о применении их агонистов в качестве иммунологических адъювантов в клинике и в эксперименте; обоснована необходимость выполнения данной диссертационной работы. Глава «Материалы и методы исследования» содержит подробное описание методов

исследования, реактивов, клеточных линий и лабораторных мышей, использованных в работе. Результаты исследования изложены последовательно, раскрывают поставленные задачи, хорошо проиллюстрированы таблицами и рисунками. Обсуждение результатов подробное, аргументированное, логически выстроенное и свидетельствует о глубоком осмыслении автором проблем и полученных результатов. Выводы и практические рекомендации следуют из представленных материалов, являются обоснованными, достоверными и соответствуют поставленной цели и задачам. В целом, диссертация А.Ш. Джаруллаевой написана ясно, логично, хорошо иллюстрирована, хотя в тексте встречаются отдельные стилистические шероховатости и опечатки, не влияющие на общее впечатление от работы. Основные результаты диссертации опубликованы в 15 печатных работах, в том числе в 7 статьях в журналах, рекомендуемых ВАК для публикации результатов кандидатских и докторских диссертаций, 2 патентах, 6 тезисах конференций. Автореферат написан литературным языком, полностью соответствует содержанию диссертации, четко отражает суть проведенных автором исследований. Принципиальных замечаний по диссертации нет.

Заключение

Таким образом, диссертация Джаруллаевой Алины Шахмировны на тему: «Роль сочетанной стимуляции Toll- и NOD-подобных рецепторов врожденного иммунитета в формировании реакций адаптивного иммунного ответа», выполненная под руководством к.б.н. А.И. Тухватулина, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи, имеющей существенное значение для клинической иммунологии: впервые для создания иммунологического адъюванта успешно использовано явление синергизма между NOD- и Toll-подобными рецепторами врожденной иммунной системы, в результате чего создан новый иммунологический адъювант, представляющий собой комбинацию агонистов синергически взаимодействующих рецепторов NOD2 и TLR4, более эффективный по сравнению с существующими аналогами.

Представленная А.Ш. Джаруллаевой работа по научной новизне, практической значимости и объему проведенных исследований 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 биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности «14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология».

Официальный оппонент,
и.о. заведующего лабораторией
клинической иммунологии
ФГБУ «ГНЦ Институт
иммунологии»
ФМБА России, доктор
медицинских наук



Пашенков Михаил Владимирович

Адрес: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д.24,
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России
Телефон: (499) 617-76-49
Электронная почта: instimmun@nrcii.ru

Подпись *Александров М.В.*
ЗАВЕРЯЮ
Учёный секретарь ФГБУ
«ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России
Александров М.В.
«19» августа 2022 г.



**Сведения об официальном оппоненте диссертации Джаруллаевой А.Ш.
«Роль сочетанной стимуляции Toll- и NOD-подобных рецепторов
врожденного иммунитета в формировании реакций адаптивного
иммунного ответа» на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности «14.03.09 – Клиническая
иммунология, аллергология»**

Ф.И.О.	Пащенко Михаил Владимирович
Ученая степень	Доктор медицинских наук, специальность «03.03.03 – иммунология»
Ученое звание	Нет
Почтовый адрес	115522, г. Москва, Каширское шоссе, д.24, ФГБУ «ГНИЦ Институт иммунологии» ФМБА России
Телефон	(499) 617-76-49
Электронная почта	Организации: instimmun@nrcii.ru Личная: mvpashenkov@yandex.ru
Название организации	ФГБУ «ГНИЦ Институт иммунологии» ФМБА России
Должность	И.о. заведующего лабораторией клинической иммунологии

**Список основных публикаций Пащенко М.В. по теме диссертации в
рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет**

№	Авторы	Название опубликованной работы	Наименование издания	Год	Номер, том, страницы
1	<u>Pashenkov MV,</u> <u>Balyasova LS,</u> <u>Dagil YA,</u> <u>Pinegin BV</u>	The role of the p38-MNK-eIF4E signaling axis in TNF production downstream of the NOD1 receptor	Journal of Immunology	2017	V.198, N4, P.1638-1648
2	<u>Дагиль Ю.А.,</u> <u>Арбатский Н.П.,</u> <u>Алхазова Б.И.,</u> <u>Львов В.Л.,</u> <u>Пащенко М.В.</u>	Структурные особенности селективных и неселективных агонистов NOD-рецепторов	Медицинская иммунология	2017	Т.19, С. 705-714
3	<u>Dagil YA,</u> <u>Sharova VS,</u> <u>Pinegin BV,</u> <u>Pashenkov MV</u>	A cell-based test system for the assessment of pharmacokinetics of NOD1 and NOD2 receptor agonists	International Immunopharmacology	2018	V.63, P.94-100
4	<u>Pashenkov MV,</u> <u>Dagil YA,</u> <u>Pinegin BV</u>	NOD1 and NOD2: molecular targets in prevention and treatment of infectious diseases	International Immunopharmacology	2018	V.54, P.385-400
5	<u>Pashenkov MV,</u> <u>Murugina NE,</u> <u>Budikhina AS,</u> <u>Pinegin BV</u>	Synergistic interactions between NOD receptors and Toll-like receptors: mechanisms and clinical implications	Journal of Leukocyte Biology	2018	V.105, N4, P.669-680

6	Муругина Н.Е., Балясова Л.С., Будихина А.С., Максимчик П.В., Дагиль Ю.А., Муругин В.В., Чкадуа Г.З., Пинегин Б.В., <u>Пащенко М.В.</u>	Метаболическое репрограммирование макрофагов при их активации агонистом рецептора NOD1	Иммунология	2019	Т.40, №1, С.5-14
7	Муругина Н.Е., Будихина А.С., Максимчик П.В., Дагиль Ю.А., Балясова Л.С., Муругин В.В., Чкадуа Г.З., Пинегин Б.В., <u>Пащенко М.В.</u>	Синергическое взаимодействие рецепторов NOD1 и TLR4 врожденного иммунитета: транскрипционные и метаболические аспекты	Иммунология	2019	Т.40, №2, С.9-16
8	Пинегин Б.В., <u>Пащенко М.В.</u>	Иммуностимуляторы мурамилпептидной природы в лечении и профилактике инфекционно- воспалительных процессов	Иммунология	2019	Т.40, №3, С.65-71
9	Муругина Н.Е., Будихина А.С., Муругин В.В., Селезнёва Е.М., Чкадуа Г.З., <u>Пащенко М.В.</u>	Роль NF-κB в развитии синергического ответа макрофагов человека на сочетанную стимуляцию рецепторов NOD1 и TLR4 in vitro	Иммунология	2020	Т.41, №2, С.114-123
10	Дагиль Ю.А., <u>Пащенко М.В.</u>	Сопоставление трех видов клеточных тест-систем для оценки биологической активности агонистов рецептора NOD2	Иммунология	2020	Т.41, №4, С.304-311
11	Murugina NE, Budikhina AS, Dagil YA, Maximchik PV, Balyasova LS, Murugin VV, Melnikov MV, Sharova VS, Nikolaeva AM, Chkadua GZ, Pinegin BV, <u>Pashenkov MV</u>	Glycolytic reprogramming of macrophages activated by NOD1 and TLR4 agonists: No association with proinflammatory cytokine production in normoxia	Journal of Biological Chemistry	2020	V.295, N10, P.3099- 3114

