

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Джаруллаевой Алины Шахмировны «Роль сочетанной стимуляции Toll- и NOD-подобных рецепторов врожденного иммунитета в формировании реакций адаптивного иммунного ответа», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология.

Актуальность темы диссертационной работы

В современном мире грипп представляет собой серьезную медицинскую и социально-экономическую проблему. Вакцинация повсеместно считается наиболее эффективной и безопасной стратегией предотвращения болезни и ее осложнений. В субъединичных вакцинах антиген подвергают максимальной очистке, что может снижать его иммуногенность. В настоящее время в качестве адъювантов для повышения иммуногенности вакцин используют агонисты, способные вызывать активацию одного из паттерн-распознающих рецепторов (ППР). Наиболее изученными ППР являются Toll-подобные рецепторы (TLR). В последние годы было показано, что в цитозоле бактериальные продукты распознает семейство внутриклеточных белков NOD. Мурамилдипептид (MDP), структурный компонент пептидогликана, давно изучается в иммунологии, хотя специфический рецептор (NOD2) был выявлен только в начале 2000-х годов. Монофосфорил-липид А (MPLA), нетоксичный лиганд TLR4, полученный из липополисахарида (LPS), используется клинически в качестве адъюванта в вакцинах против рака, гепатита и малярии, а также в аллерген-специфической иммунотерапии. При этом необходимо отметить, что комплексная стимуляция ППР, относящихся к разным семействам, может вызывать более выраженный иммунный ответ. В связи с вышеизложенным, тема диссертации является актуальной и соответствует требованиям сегодняшнего дня.

Диссертантом была сформулирована концепция, которая заключается в поиске эффективного комплексного адьювантного компонента субъединичных вакцин за счет использования сочетания агонистов Toll- и NOD-подобных рецепторов. В качестве возможных рассматривались сочетания агонистов, дававших наибольший синергетический эффект, такие как CL075 (агонист TLR7/8) и MDP (агонист NOD2), и MPLA (агонист TLR4), и MDP (агонист NOD2). Для дальнейших исследований было выбрано сочетание MPLA и MDP, которое оказалось наиболее универсальным и эффективным.

Научная новизна полученных результатов

Автором проведены исследования по поиску эффективных сочетаний Toll- и NOD- подобных рецепторов *in vitro*, при этом впервые было показано, что сочетанная стимуляция рецепторов TLR4 и NOD2 приводит к синергетическому повышению активности основных провоспалительных транскрипционных факторов (NF-κB, AP-1) и экспрессии 72 генов, ответственных за развитие иммунных реакций. Впервые исследованы реакции адаптивного иммунитета, инициируемые в ответ на использование комплексного молекулярного адьюванта на основе агонистов TLR4 и NOD2 рецепторов в составе вакцинной формуляции, и проведены сравнения с формуляциями, содержащими индивидуальные агонисты PPP. При использовании данной вакцинной формуляции было показано усиление фагоцитоза, экспрессии ко-стимуляторных молекул CD80 и CD86 и секреции цитокинов дендритными клетками. Впервые показано, что иммунизация мышей вакцинной формуляцией, содержащей комплексный молекулярный адьювант на основе агонистов TLR4 и NOD2 рецепторов, приводит к повышению антиген-зависимой пролиферации CD4⁺ Т-лимфоцитов, продукции IFN-γ мононуклеарными клетками, образование IgG антител в сыворотке крови мышей. В реакции торможения гемагглютинации (РТГА) показано увеличение титра специфических антител в сыворотке крови мышей,

иммунизированных изучаемой вакцинной формуляцией. Впервые показано, что использование комплексного молекулярного адьюванта на основе агонистов TLR4 и NOD2 в составе вакцины приводит к снижению летальности на модели гриппозной инфекции (заражение вирусом A/California/07/2009 (H1N1)).

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость диссертационной работы определяется проведенными автором углубленными исследованиями механизмов индукции реакций врожденного и приобретенного иммунитета в ответ на использование агонистов Toll- и NOD-подобных рецепторов. Основные результаты работы показали, что сочетанная стимуляция Toll- и NOD-подобных рецепторов (главным образом TLR4 и NOD2) приводит к синергетическому усилению интенсивности иммунных реакций по сравнению с индивидуальной стимуляцией данных рецепторов. Данная работа имеет несомненную практическую значимость, поскольку полученная в результате проведенных исследований вакцинная формуляция на основе комплексного молекулярного адьюванта (MPLA и MDP) и носителя (частицы поли(молочной-коглицековой) кислоты (PLGA) может быть использована для создания субъединичных вакцин. Практическая значимость работы подтверждается патентами РФ на изобретение RU 2742580 C2 от 16.11.2018 и RU 2724896 C1 от 14.11.2019.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Автором вынесены на защиту шесть положений, положения адекватно сформулированы и соответствуют полученным в работе результатам. В работе использованы современные иммунологические, молекулярно-биологические, биохимические, вирусологические методы, которые соответствуют задачам работы. Эксперименты выполнены на высоком методическом уровне. Достоверность полученных результатов подтверждается использованием адекватных методов статистического анализа. Объем проведенных

исследований соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Выводы основаны на результатах проведенных исследований, соответствуют задачам и положениям диссертационной работы. Практические рекомендации сформулированы на основании полученных в работе результатов.

Полнота изложения результатов работы в научной печати

Результаты диссертационной работы Алины Шахмировны достаточно полно представлены в научной печати. По материалам работы опубликовано 15 научных работ, из них 7 научных статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки для опубликования результатов кандидатских диссертаций. Также опубликованы 6 работ в сборниках международных конференций и два патента Российской Федерации.

Структура и содержание диссертации

Диссертация изложена на 171 страницах машинописного текста. Работа написана по традиционному плану и включает все необходимые разделы: список сокращений и условных обозначений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, практические рекомендации, выводы и список литературы. Список литературных источников включает 257 публикации, из которых 8 – отечественные, а 249 – иностранные. Работа проиллюстрирована 6 таблицами и 32 рисунками.

Работа оформлена в соответствии с требованиями Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования РФ. Введение включает актуальность, цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, методологию и методы исследования, степень достоверности результатов, основные положения, выносимые на защиту, апробацию работы, личный вклад автора, количество публикаций, описание объема и структуры диссертации.

Цель работы корректно сформулирована, задачи работы соответствуют поставленной цели.

Обзор литературы написан научным литературным языком, включает обобщенные данные отечественных и зарубежных авторов о структурно-функциональных характеристиках Toll- и NOD- подобных рецепторов, их участии в формировании врожденного и адаптивного иммунитета. Автором проведен анализ публикаций, касающихся изучения адъювантов на основе агонистов Toll- и NOD- подобных рецепторов.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. В разделе материалы даны необходимые характеристики объектов исследований, лабораторного оборудования и реактивов. Описание методов является подробным, четким и дает полное представление о высоком методическом уровне проведенных исследований. Эксперименты с животными одобрены этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол №21, 2020г).

Третья глава диссертации представляет собой описание результатов собственных исследований. Проведенный автором поиск сочетания агонистов Toll- и NOD- подобных рецепторов, активирующих транскрипционные факторы NF-κB и AP-1 *in vitro*, позволил сделать выбор в пользу сочетания агонистов рецепторов TLR4 и NOD2 (MPLA и MDP соответственно). В ответ на сочетанную стимуляцию MPLA и MDP в клетках линии ТНР-1 увеличивалась экспрессия генов, ответственных за развитие иммунных реакций, увеличивались уровни фосфорилирования киназ (ERK, JNK, p65, p38 и IκB), повышалась экспрессия гена *rel*, кодирующего белок c-Rel, представителя семейства транскрипционного фактора NF-κB. В свою очередь, сочетанная стимуляция приводила к достоверному увеличению секреции цитокинов IL-1β, IL-6 и IL-8 клетками ТНР-1, по сравнению с индивидуальной стимуляцией. В работе была получена и детально охарактеризована вакцинная формуляция, в состав которой входит антиген

(гемагглютинин вируса гриппа A/California/07/2009 (H1N1), комплексный молекулярный адъювант (MPLA и MDP) и носитель (частицы поли(молочной-ко-гликолевой) кислоты (PLGA)). В опытах *in vitro* было доказано, что после иммобилизации в составе частиц вакцины комбинация молекул MPLA и MDP сохраняет свою способность вызывать активацию транскрипционных факторов NF-κB и AP-1. Последующие эксперименты *in vivo* с использованием трансгенных мышей, содержащие в своем геноме репортерный ген NF-κB-зависимой люциферазы, подтвердили, что при использовании изучаемой вакцинной формуляции достоверно повышаются уровни активации NF-κB, и усиливается последующий цитокиновый ответ у вакцинированных животных. При использовании комплексного молекулярного адъюванта в составе вакцинных частиц было показано усиление фагоцитоза, экспрессии ко-стимуляторных молекул CD80 и CD86 и секреции цитокинов дендритными клетками. Представленные результаты указывают на то, что использование в качестве адъюванта сочетания агонистов рецепторов TLR4 и NOD2 приводит к усилению продукции IFN-γ спленоцитами иммунизированных мышей, а также обеспечивает увеличение титра антиген-специфичных антител, по данным ИФА и РТГА. При изучении комплексного молекулярного адъюванта в составе вакцины показано повышение иммуногенности и протективности кандидатной субъединичной противогриппозной вакцины на мышинной модели летальной инфекции вирусом A/California/07/2009 (H1N1).

В обсуждении (Глава 4) автором проводится детальный анализ полученных данных и сопоставление результатов собственных исследований с литературными данными.

В заключении дана обобщенная оценка цели исследования, приведены основные результаты работы.

Раздел «Практические рекомендации» включает рекомендации по использованию комплексного молекулярного адъюванта, а также наноразмерных частиц на основе поли(молочной-ко-гликолевой) кислоты в

качестве адъюванта-носителя при создании средств специфической профилактики заболеваний.

По результатам работы автором сформулированы шесть выводов. Завершает работу список литературы.

С учетом того, что диссертация посвящена изучению роли сочетанной стимуляции Toll- и NOD- подобных рецепторов врожденного иммунитета в формировании реакций адаптивного иммунного ответа, а также разработке и изучению вакцинной формуляции, содержащей комплексный молекулярный адъювант на основе агонистов TLR4 и NOD2, работа соответствует профилю специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает основные результаты и содержание диссертационной работы.

Рекомендации по использованию выводов и результатов работы

Результаты представленного диссертационного исследования могут быть использованы в научно-исследовательских учреждениях Российской Федерации, занимающихся изучением реакций врожденного и приобретенного иммунитета, при разработке средств специфической профилактики гриппозной инфекции для повышения иммуногенности субъединичных вакцин.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

Замечания.

- Аббревиатуры в тексте работы приведены частично на английском, частично на русском языке. Например, иммуноглобулин G сокращен как IgG, в то время как интерлейкин-1 и другие интерлейкины как ИЛ-1 и т.п. Общепринято при написании научной работы выбирать какой-либо один вариант для сокращений (в основном, английский язык).

- При написании научного текста следует избегать сленговых слов и выражений. Так, вместо слов «забивочный буфер», «буфер для забивки» (стр. 60, 77, 78) правильнее писать «блокирующий буфер».

Приведенные выше замечания, как и наличие единичного количества опечаток, нисколько не снижают значения данной диссертационной работы. Принципиальных возражений по рассматриваемой диссертационной работе не имеется.

В плане научной дискуссии по содержанию работы хотелось бы узнать мнение автора по следующим вопросам.

1. Согласно приведенным в работе данным, под влиянием сочетанной стимуляции Toll- и NOD-подобных рецепторов увеличивалась экспрессия большого количества генов. А были ли выявлены случаи подавления экспрессии генов при использовании совместной стимуляции TLR4 и NOD2 рецепторов? И если были, то каких именно генов. Биологически, репрессия генов имеет не меньшую функциональную значимость чем их стимуляция.
2. В работе показано, что сочетанная стимуляция Toll- и NOD-подобных рецепторов приводит к повышению уровней транскрипционной активности NF-κB, AP-1 и последующему увеличению уровней экспрессии генов, продукции цитокинов, участвующих в развитии иммунных реакций. Предполагается использование данного комплексного молекулярного адъюванта в составе вакцины. В то же время известно, что NF-κB обеспечивает критическую связь между воспалением и развитием рака в результате усиления экспрессии цитокинов и ряда других генов, способствующих развитию опухоли. В этой связи, изучалась ли безопасность данной вакцины, в частности ее канцерогенность?

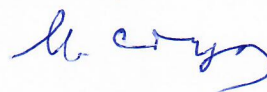
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, диссертация Джаруллаевой Алины Шахмировны «Роль сочетанной стимуляции Toll- и NOD-подобных рецепторов врожденного иммунитета в формировании реакций адаптивного иммунного ответа», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, является самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи, связанной с поиском новых средств профилактики инфекционных заболеваний с использованием комплексного молекулярного адьюванта на основе агонистов TLR4 и NOD2 рецепторов.

По своей актуальности, новизне и научно-практической значимости работа полностью отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (редакция от 21.04.2016 г. № 335 и от 20.03.2021 г. №426), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Джаруллаева Алина Шахмировна заслуживает присуждения искомой степени по специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология (биологические науки).

заведующая лабораторией векторных вакцин Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кандидат медицинских наук

30 августа 2022 года



Стукова М. А.

Подпись Стуковой М. А. заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации



Лобова Т.Г.

В диссертационный совет Д 208.130.01

при ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи»
Министерства Здравоохранения Российской Федерации (123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18)

СВЕДЕНИЯ

Об официальном оппоненте по диссертации Джаруллаевой Алины Шахмировны на тему

«Роль сочетанной стимуляции Toll- и NOD-подобных рецепторов врожденного иммунитета в формировании реакций адаптивного иммунного ответа»

по специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Фамилия, Имя, Отчество, дата рождения, гражданство	Ученая степень, наименование отрасли науки, научная специальность, по которой защищена диссертация, ученое звание	Должность, полное наименование организации, являющейся основным местом работы официального оппонента, структурное подразделение, адрес	Список основных публикаций
Стукова Марина Анатольевна, дата рождения	Кандидат медицинских наук, диссертация «Создание и	заведующая лабораторией векторных вакцин Федерального	1. Klausberger M. The Potential of Influenza HA-Specific Immunity in Mitigating Lethality of Postinfluenza

<p>31 августа 1963 г., Российская Федерация</p>	<p>экспериментальная оценка эффективности гриппозных векторов, экспрессирующих микобактериальный антиген ESAT-6» по специальности 03.00.06 – Вирусология.</p>	<p>государственного бюджетного учреждения «Научно- исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородицева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376 г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 15/17, marina.stukova@influenza.s pb.ru +7 (812) 499-15-21</p>	<p>Pneumococcal Infections. / Klausberger M., Leneva I.A., Falynskova I.N., Vasiliev K., Poddubikov A.V., Lindner С., Kartaschova N.P., Svitich O.A., Stukova M., Grabherr R., Egorov A. // Vaccines (Basel). – 2019. – №17 –Режим доступа: doi: 10.3390/vaccines7040187. 2. Kiseleva I. A Phase 1 Randomized Placebo-Controlled Study to Assess the Safety, Immunogenicity and Genetic Stability of a New Potential Pandemic H7N9 Live Attenuated Influenza Vaccine in Healthy Adults. / Kiseleva I., Isakova- Sivak I., Stukova M., Erofeeva M., Donina S., Larionova N., Krutikova E., Bazhenova E., Stepanova E., Vasilyev K., Matyushenko V., Krylova M., Galatunova J., Ershov A., Lioznov D., Sparrow E.G., Torelli G., Rudenko L. // Vaccines</p>
---	---	--	---

	<p>(Basel). – 2020 – №10 – Режим доступа: doi: 10.3390/vaccines8020296.</p>		<p>3. Krasilnikov I.V. Design and Immunological Properties of the Novel Subunit Virus-like Vaccine against SARS-CoV-2. / Krasilnikov I.V., Kudriavtsev A.V., Vakhrusheva A.V., Frolova M.E., Ivanov A.V., Stukova M.A., Romanovskaya-Romanko E.A., Vasilyev K.A., Mushenkova N.V., Isaev A.A. // Vaccines (Basel). – 2022 – №10 – Режим доступа: doi: 10.3390/vaccines10010069.</p>
			<p>4. Vasilyev K. Enhancement of the Local CD8+ T-Cellular Immune Response to Mycobacterium tuberculosis in BCG-Primed Mice after Intranasal Administration of Influenza Vector Vaccine Carrying TB10.4 and HspX</p>

	<p>Antigens. / Vasilyev K., Shurygina A.P., Zabolotnykh N., Sergeeva M., Romanovskaya-Romanko E., Pulkina A., Buzitskaya J., Dogonadze MZ., Vinogradova T.I., Stukova M.A. // Vaccines (Basel). – 2021 – №9 – Режим доступа: doi: 10.3390/vaccines9111273.</p> <p>5. Ерофеева М. К. Оценка профилактической эффективности гриппозных вакцин. / Ерофеева М. К., Стукова М. А., Шахланская Е. В., Бузицкая Ж. В., Максакова В. Л., Крайнова Т. И., Писарева М. М., Попов А. Б., Позднякова М. Г., Лиознов Д. А. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2021. – №5 – с. 52-60. – Режим доступа: https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-5-52-60-52-60.</p>	
--	--	--

		<p>6. Sergeeva M., Mucosal Influenza Vector Vaccine Carrying TB10.4 and HspX Antigens Provides Protection against Mycobacterium tuberculosis in Mice and Guinea Pigs. / Sergeeva M., Romanovskaya-Romanko E., Zabolotnyh N., Pulkina A., Vasilyev K., Shurigina A.P., Buzitskaya J., Zabrodskaya Y., Fadeev A., Vasin A., Vinogradova T.I., Stukova M.A. // Vaccines (Basel). – 2021 – №9 – Режим доступа: doi: 10.3390/vaccines9040394.</p> <p>7. Vasilyev K. Intranasal Immunization with the Influenza A Virus Encoding Truncated NS1 Protein Protects Mice from Heterologous Challenge by Restraining the Inflammatory Response in the Lungs. / Vasilyev K, Shurygina AP, Sergeeva M, Stukova M, Egorov A. //</p>
--	--	---

			Microorganisms. – 2021 – №9 – Режим доступа: doi: 10.3390/microorganisms9040690.
--	--	--	--

Официальный оппонент:

заведующая лабораторией векторных вакцин Федерального
государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский
институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
кандидат медицинских наук
197376 г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 15/17,
marina.stukova@influenza.spb.ru
+7 (812) 499-15-21
30 августа 2022 год.

Стукова М. А.



Подпись Стуковой М. А. заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
кандидат медицинских наук

Лобова Т.Г.

