

ОТЗЫВ

**официального оппонента Гривенникова Игоря Анатольевича
на диссертацию Гоголевой Виолетты Сергеевны
«Нейроиммунные и гомеостатические функции лимфотоксина альфа»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 3.2.7. «Иммунология»**

Актуальность избранной темы. Лимфотоксины (LT) альфа и бета относятся к суперсемейству фактора некроза опухоли (TNF) и были открыты, а их гены клонированы как и ген TNF, еще в прошлом тысячелетии.

Несмотря на то, что LT и TNF обладают определенным сходством в биологической активности, годы исследований, в первую очередь на генно-модифицированных мышах, показали, что LT имеет уникальные, не перекрывающиеся с TNF, функции в организме. Так было установлено, что LT может существовать как в растворимой гомотримерной форме (LT α ₃, далее LT α), так и в мембраносвязанной гетеротримерной форме – LT α 1 β 2 (далее LT β). Для исследования биологически важных эффектов системы цитокинов TNF/LT α /LT β , такие как функционирование иммунной системы и онкогенез, были созданы мыши с полной или, что еще более важно, клеточно-специфичной инактивацией соответствующих молекул. Анализ фенотипа этих мышей позволил охарактеризовать физиологическую роль LT α /LT β , которая заключалась в формировании и поддержании архитектуры лимфоидных органов, а также регуляции иммунного ответа. Как и следовало ожидать, в дальнейших исследованиях было показано участие LT α /LT β в развитии аутоиммунных заболеваний, в основном за счет индукции формирования третичных лимфоидных органов, образующихся в очагах хронического воспаления, путем взаимодействия с соответствующими рецепторами (LT β R, TNFR).

И хотя были предприняты попытки создания лекарственных препаратов, блокирующих сигнальный путь, через который осуществляется действие $LT\alpha/LT\beta$, однако в клинических испытаниях ни один из созданных к настоящему времени препаратов не продемонстрировал высокую эффективность. Стоит отметить, что изучение функций $LT\alpha/LT\beta$ как в норме, так и при различных патологиях является крайне сложной задачей. Во-первых, конструирование таких нокаутных мышей осложняется близким расположением генов, кодирующих TNF, $LT\alpha$ и $LT\beta$, что затрудняет прицельное удаление соответствующих генов без затрагивания регуляторных участков соседних генов. Также известно, что LT характеризуются несколькими путями передачи сигнала – от растворимого гомотримера $LT\alpha$ или мембранного гетеротримера $LT\beta$, с участием минимум трех рецепторов, а именно TNFR1, TNFR2 и $LT\beta R$. Кроме этого показано, что LT продуцируются различными клетками лимфоидного происхождения (ILC3, T- и B-клетками).

Исходя из вышеизложенного, диссертационная работа Гоголевой В. С., посвященная установлению нейроиммунных, а также некоторых гомеостатических функций молекулярных форм $LT\alpha$ в модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у мышей является безусловно актуальной и востребованной в настоящее время, а степень обоснованности положений, выносимых на защиту, не вызывает сомнений. Актуальность и востребованность настоящей работы заключается еще и в том, что ЭАЭ является удобной моделью изучения рассеянного склероза (РС) - распространенного тяжелого аутоиммунного заболевания у человека.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, благодарностей, списка литературы и приложения. Список литературы включает 239 источников. Работа изложена на 96 страницах, содержит 21 рисунок и 4 таблицы.

Глава «Введение» посвящена описанию состояния проблемы, обоснованию актуальности диссертационного исследования, постановке цели и задач работы. В этой главе также описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы и сформулированы положения, выносимые на защиту, приведен список опубликованных по теме диссертации работ и вклад автора в работу.

Глава «Обзор литературы» состоит из трех основных подразделов. Первый подраздел посвящен общей характеристике лимфотоксинов α и β . В следующем подразделе автор подробно описывает основные физиологические функции мембраносвязанной и растворимой форм LT их участие в поддержании гомеостаза лимфоидных органов, их развитии и регуляции иммунитета слизистых оболочек организма. В третьем подразделе автор представляет функции LT α и LT β в хроническом воспалении организма и в аутоиммунных заболеваниях. Уделяется особое внимание их роли в развитии РС и экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) как распространенной модели РС. В целом обзор написан достаточно подробно, с привлечением источников литературы последних лет. Чувствуется, что автор хорошо знаком с проблематикой, которой посвящена диссертационная работа.

В названии подраздела 1.2.2. Лимфотоксины α и β в регуляции иммунитета слизистых, следовало бы добавить «оболочек организма».

В главе «Материалы и методы» автор описывает схемы и протоколы проведенных экспериментов. Для решения поставленных задач был выбран адекватный набор современных методов иммунологии, молекулярной и клеточной биологии: индукция ЭАЭ в трансгенных мышах, получение и культивирование клеток иммунной системы, проточная цитофлуориметрия, приготовление препаратов клеток и тканей и иммунофлуоресцентная детекция антигенов, ПЦР в реальном времени, мультиплексный анализ продукции цитокинов. Приводится описание экспериментов по фармакологической блокаде TNF или LT α *in vivo*.

Очень хорошо, что автор указывает возраст и пол животных, использованных в экспериментах («В экспериментах были использованы самки и самцы возраста 9-12 недель»). Однако, было бы более наглядно, если бы автор:

- приводил количество животных в группах при индукции ЕАЕ;
- пояснил откуда была взята стандартная шкала оценки клинических симптомов заболевания (от 0 до 5);
- указал с какими значениями данной шкалы и через какое время после иммунизации животные (и какое их количество) брались в дальнейшие клеточные и молекулярно-биологические эксперименты. Хотя эти сведения приводятся в разделе «Результаты».

В целом материал, изложенный в этой главе, свидетельствует о методической подготовленности автора к решению задач настоящей работы.

В главе «Результаты» автор последовательно излагает полученные результаты. На первом этапе работы автор исследовал влияние полного генетического удаления *LTa* на гомеостаз иммунной системы. Отдельно хотелось бы отметить, что автор использовал несколько генетически измененных линий мышей в модели ЭАЭ, среди которых были мыши с полным удалением *LTa*, полным удалением *Tnf*, полным удалением *Tnfrsf1a*, тканеспецифичным удалением *LTa* в *ILC3* и *T*-клетках (или в *T*-клетках) и с тканеспецифичным удалением *LTa* в *B*-клетках. Получение и использование таких экспериментальных животных придает особую ценность настоящей работе. Кроме того, учитывая гетерогенность ЭАЭ (также как и РС) для создания такой патогенетической модели использовались различные антигены: пептид *MOG(35-55)* или полноразмерный *MOG(1-125)*. *MOG* - миелин олигодендрокитарный гликопротеин, присутствующий в миелиновых оболочках в ЦНС и достаточно часто применяемый для индукции ЭАЭ, наряду с основным белком миелина и протеолипидным белком.

Далее автор переходит к оценке влияния генетической и фармакологической нейтрализация LT α на развитие симптоматики ЭАЭ у экспериментальных животных. Далее представлены результаты по влиянию удаления LT α в ILC3, Т-клетках и В-клетках (тканеспецифичный нокаут) на динамику и симптоматику развития ЭАЭ. Показано, что молекулярные формы LT α , экспрессирующиеся Т-клетками, выполняют патогенетическую роль в ЭАЭ за счет контроля прайминга TH-клеток на периферии, а вот молекулы LT α , синтезируемые В-клетками, выполняют патогенетическую роль в модели MOG(1-125)-индуцированного ЭАЭ, но не в модели MOG(35-55)-зависимого ЭАЭ. Изложение полученных результатов построено логично, грамотно и понятно.

Основные полученные результаты и их оригинальность. Автором впервые было показано, что полное удаление LT α , также как TNF и TNFR влияет на поддержание гомеостаза ILC3 (лимфоциты врожденного иммунитета) в тонком кишечнике взрослого организма, на дифференцировку миелоидных клеток в моноциты *in vitro*, снижая ее примерно в 2 раза. Предполагается, что это, по-видимому, опосредовано TNF-подобной функцией растворимого LT α . На этих же мышах было обнаружено, что вопреки имеющимся в литературе данным, генетическая инактивация LT α не влияет на клинические симптомы ЭАЭ. Автором было установлено, что мыши с дефицитом LT α в ILC3 развивают сильные симптомы ЭАЭ, скорее всего, за счет увеличения инфильтрации в ЦНС моноцитов, дифференцирующихся в эффекторные дендритные клетки, а также Т-клеток, продуцирующих интерферон гамма и GM-CSF. Впервые продемонстрировано, что инактивация LT α в Т-клетках усугубляет динамику развития ЭАЭ путем контроля прайминга антиген-специфичных Т-клеток во вторичных лимфоидных органах. Также впервые показано, что молекулярные формы LT α , продуцируемые В-клетками, играют ключевую роль в патогенезе ЭАЭ, индуцированного MOG(1-125).

В главе «**Заключение**» автор подводит итоги проведенной работы и отмечает перспективность разработанных подходов для дальнейших исследований. С точки зрения Гоголевой В. С. результаты настоящей работы подтверждают, что в контексте роли LT в слизистых оболочках и экспериментальных условиях *in vitro* реализуется именно TNF-подобная функция LT α . В дополнение к данным о роли LT в аутоиммунитете, результаты экспериментов по изучению эффектов полного удаления TNF/LT в гомеостазе иммунной системы подтверждают гипотезу о необходимости разработки клеточно-специфичных терапевтических подходов. В этой же главе автор приводит и выводы проделанной работы, что смотрится несколько непривычно (обычно **ВЫВОДЫ** выделяют в отдельный раздел диссертации).

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования имеют важное значение как для фундаментальной иммунологии (установление молекулярных механизмов регуляции эффектов цитокинов суперсемейства TNF), так и для возможного объяснения неэффективности блокаторов сигнальных путей, опосредованных лимфотоксином, в клинических испытаниях соответствующих лекарственных препаратов. На фоне дефицита LT α было выявлено значительное увеличение доли ILC3 в тонком кишечнике экспериментальных животных и уменьшение дифференцировки миелоидных клеток в моноциты *in vitro*, что важно для прогнозирования возможных побочных эффектов при применении препарата этанерцепта, блокатора TNF/LT α , в терапии аутоиммунных заболеваний. Полученные данные о вкладе молекулярных форм LT α , продуцируемых разными типами иммунных клеток в патогенез ЭАЭ, в значительной степени расширяют наше понимание молекулярных механизмов патологии нейровоспаления в контексте РС, а также демонстрируют разделение функций LT α по нескольким направлениям: в зависимости от клеточного источника, во времени и в локализации. Более

того, результаты работы являются предпосылкой к разработке фармакологической блокировки молекулярных форм ЛТ α , производимых Т-клетками, в качестве подхода для избирательного таргетирования этого цитокина при развитии аутоиммунных заболеваний. Наконец, полученные данные дают основание предположить, что в случае аутоантитело-ассоциированного подтипа РС, В-клетки, экспрессирующие молекулярные формы ЛТ α , могут рассматриваться в качестве потенциальной иммунотерапевтической мишени.

Полученные автором результаты могут быть использованы при чтении лекций по иммунологии на Биологическом факультете МГУ им. М. В. Ломоносова и ряде медицинских университетов нашей страны.

Достоверность результатов работы не вызывает сомнений, поскольку они базируются на достаточном объеме экспериментального материала. Достоверность результатов подтверждается также их воспроизводимостью и использованием современных методов исследования и статистической обработки: на всех этапах применялись современные способы получения репрезентативных данных. Важно отметить также, что перед опытами мышей содержали совместно для выравнивания состава микробиоты.

Выводы диссертации обоснованы и логично вытекают из полученных результатов и их обсуждения. Принципиальных замечаний по диссертационной работе не имеется. Автору следовало бы более внимательно оформить список литературы: в ряде случаев страницы статей даются в неполном варианте. **Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.**

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus или РИНЦ. Результаты работы были представлены и обсуждены на 5 симпозиумах, конференциях и школах как российских, так и международных.

Заключение. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 3.2.7. «Иммунология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель **Гоголева Виолетта Сергеевна** заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. «Иммунология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник Лаборатории молекулярной
нейрогенетики и врожденного иммунитета
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

Гривенников Игорь Анатольевич

123182, г. Москва, пл. ак. Курчатова, д.2, Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»)

Шифр и наименование специальности, по которой защищена диссертация: 1.5.3. –
молекулярная биология; 3.3.6. – фармакология, клиническая фармакология.

Подпись Гривенникова И.А. заверяю,
Главный Ученый секретарь
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

К.Е. Борисов

«7» февраля 2024 г.