

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Гоголевой Виолетты Сергеевны
на тему: «Нейроиммунные и гомеостатические функции лимфотоксина
альфа»
по специальности 3.2.7. Иммунология**

Тема диссертационной работы Гоголевой Виолетты Сергеевны «Нейроиммунные и гомеостатические функции лимфотоксина альфа» является чрезвычайно актуальной и востребованной для современной биологии и медицины. Представленная работа посвящена исследованию функций лимфотоксина альфа (LT α) как в норме, так и при развитии аутоиммунных заболеваний. Лимфотоксин (LT) относится к цитокинам суперсемейства фактора некроза опухоли (TNF), однако ему присущи функции отличные и не перекрываются с функциями TNF α . И, хотя лимфотоксин был открыт более полувека назад, многие его нейроиммунные и гомеостатические функции до сих пор не объяснены. Во многом это обусловлено близким расположением генов, кодирующих TNF, LT α и LT β , что затрудняет точное удаление соответствующих генов без затрагивания регуляторных участков соседних генов, что в свою очередь затрудняет получение нокаутных мышей. К тому же LT может существовать в двух разных формах – растворимый гомотример (LT α) или мембраносвязанный гетеротример (LT β); а передача сигнала осуществляется как минимум через три рецептора: TNFR1, TNFR2 и LT β R. Тем не менее за последние годы было показано, что LT участвует в формировании и поддержании архитектуры лимфоидных органов, регуляции иммунного ответа, а также патогенезе аутоиммунных заболеваний, в основном за счет индукции формирования третичных лимфоидных органов. Были даже предприняты попытки создания лекарственных препаратов, основанных на блокировке сигнальных путей лимфотоксина, однако они не увенчались успехом, что демонстрирует пробелы в целостном понимании роли LT, и указывает на целесообразность

разработки новых вариантов фармакологических блокаторов для терапии аутоиммунных заболеваний.

Данная работа была выполнена в коллективе, известном своими пионерскими исследованиями в области изучения суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли. Не удивительно, что, используя имеющийся в лаборатории опыт и экспериментальные заделы, автору удалось весьма эффективно провести исследования функций лимфотоксинов и получить новые важные результаты. Так, используя панель уникальных генетически модифицированных мышей с полным или тканеспецифичным удалением *Lta*, автору удалось показать, что полное удаление *Lta* влияет на поддержание гомеостаза ILC3 в тонком кишечнике взрослого организма и на дифференцировку миелоидных клеток в моноциты *in vitro*. Одним из наиболее важных результатов работы явилась демонстрация развития сильных симптомов ЭАЭ у мышей с дефицитом *Lta* в ILC3. Автору удалось доказать, что инактивация *Lta* в Т-клетках усугубляет динамику развития ЭАЭ путем контроля прайминга антиген-специфичных Т-клеток во вторичных лимфоидных органах. Кроме того, было показано, что лимфотоксин α , продуцируемый так же и В-клетками, играет ключевую роль в патогенезе ЭАЭ.

Работа построена по традиционному плану и состоит из списка сокращений, оглавления, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, экспериментальной части, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 96 страницах машинописного текста, включает 21 рисунок, 4 таблицы, и список литературы, включающий 239 наименований.

В введении довольно четко и сжато изложены основные направления иммунологических исследований, связанных с лимфотоксинами, и указана логически связанная основная цель данной работы. Эта цель: определение нейроиммунных, а также некоторых гомеостатических функций молекулярных форм лимфотоксина α .

Литературный обзор изложен на 25 страницах, хорошо проиллюстрирован, вполне отражает современное положение дел в данной области науки, изложен логично и последовательно. В частности, в нем даны современные представления о компонентах системы TNF/LT α /LT β , о роли лимфотоксинов в развитии вторичных лимфоидных органов, об их участии в поддержании структурной организации лимфоидных органов взрослого организма. Особое внимание уделено литературным данным о влиянии лимфотоксина на изменение состава микробиоты, а также о его участии в развитии различных популяций иммунных клеток и воспалительных процессов. Завершается обзор описанием рассеянного склероза (РС), его мышинной модели (ЭАЭ) и роли LT в развитии РС и ЭАЭ.

Раздел «Результаты» идет после раздела «Материалы и методы» и представляет собой описание полученных результатов. После этого раздела имеется два коротких раздела «Обсуждение» и «Заключение». Экспериментальная часть состоит из 7 подразделов, в которых весьма обстоятельно описана проделанная работа, представлены и проанализированы полученные результаты. Несмотря на высокую оценку работы в целом, отмечу несколько замечаний.

В качестве небольших замечаний укажу на относительно редко встречающиеся несогласования, например в разделе “Актуальность” на стр.6 очевидно, что произошел сбой в нумерации подходов.

На стр. 7 автор пишет “...в патогенезе рассеянного склероза, экспериментально индуцированного в мышах...” – не стоит отождествлять РС и ЭАЭ, который является моделью РС, а не самим заболеванием.

Отмечу неточность формулировки на странице 25 “...ранний возраст постановки диагноза и его хроническое течение приводят к утрате работоспособности и ухудшению качества жизни...” – сам по себе возраст постановки диагноза не приводит к утрате работоспособности. Более того, в большинстве случаев постановка диагноза происходит через несколько лет после начала развития РС, что существенно осложняет его лечение.

“Механизмы развития рассеянного склероза в основном изучаются в экспериментальных моделях на мышах” – достаточно спорное утверждение, многие механизмы изучаются непосредственно с использованием образцов человека. Не понятен термин аутоантитело-ассоциированный подтип РС.

В “Материалах и методах” автор пишет, что брэфельдин А использовался для стимуляции Т-клеток. Обычно брэфельдин А используется для ингибирования транспорта при последующем внутриклеточном окрашивании при стимуляции клеток. Формулировку “поверхностное окрашивание” следует заменить на что-то вроде “окрашивание поверхностных маркеров”. Не совсем понятно, как антитела к CD16/CD32 блокировали неспецифичное связывание антител с Fcγ-рецепторами? Если это были полноразмерные IgG мыши, стоит это объяснить чуть подробнее. В методах при описании выделения РНК – следует указать при какой длине волны измеряли концентрацию на спектрофотометре.

На странице 47 в разделе “Результаты” при описании количества ILC3 автор ссылается на рисунок 19 из Приложения. Однако, Приложение начинается с рисунка 20. Скорее всего произошла путаница в нумерации. Так же на Рисунке 20 следует обозначить, какие суб-популяции лимфоцитов выделяются на каждом шаге (как это сделано на остальных рисунках с результатами проточной цитофлуориметрии).

Исходя из результатов, представленных на рисунке 4 Б, автор пишет, что у *Lta*^{Δ/Δ} мышей и у мышей с удалением TNF и TNFR1 наблюдался одинаковый фенотип. Не совсем понятно, что имеется в виду - процентное содержание ILC3? Сравнивались ли между собой количества ILC3 у *Lta*^{Δ/Δ} мышей и у мышей с удалением TNFR1? Визуально кажется, что по Т-тесту должна наблюдаться статистически достоверная разница.

Как упоминалось в обзоре литературы, при инактивации LTα и LTβ нарушается развитие лимфатических узлов. При этом также известно, что у

мышей с удаленными лимфоузлами хуже развивается ЭАЭ. Проверил ли автор, что в созданных $Lta^{\Delta/\Delta}$ мышях действительно нарушено развитие лимфатических узлов? Как в данном контексте можно объяснить, что $Lta^{\Delta/\Delta}$ мыши восприимчивы к ЕАЕ и развивали заболевание, схожее по динамике с заболеванием мышей дикого типа?

Рис. 15б, 19д – необычная загибающаяся форма квадрантов при проточной цитофлуориметрии, хоть это и не влияет на процент детектируемых популяций.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Результаты диссертации были опубликованы в 5 статьях в известных журналах и были представлены на пяти российских и международных конференциях. По актуальности, новизне, практической ценности результатов, объему, методическому уровню проведенных исследований 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, на соискание ученой степени доктора 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:

кандидат биологических наук,
с.н.с. лаборатории биокатализа

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова Российской академии наук

Ломакин Яков Анатольевич

подпись

20.02.2024

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.01.03 – молекулярная биология

Адрес места работы:

117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом
16/10,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова Российской академии наук, лаборатория биокатализа
Тел.: +7 (495) 335-01-00; e-mail: office@ibch.ru

Подпись сотрудника

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
кадровый работник

удостоверяю:
И.О. Фамилия

20.02.24