

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертационную работу Корнеева Кирилла Викторовича
«Структурно-функциональные особенности активации TLR4 на миелоидных
клетках мыши *in vitro* и в модели острой гепатотоксичности»,
представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 03.03.03 – «иммунология»

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Корнеева К.В. относится к исследованиям системы сигналинга толл-подобных рецепторов (TLR). Этот сигнальный путь играет ключевую роль во врожденном иммунитете. Работа посвящена изучению активации рецептора 4 типа (TLR4) липополисахаридами (LPS), полученными из различных бактерий, а также установлению роли TLR4, экспрессирующегося на миелоидных клетках, в патогенезе острой гепатотоксичности у мышей. В мире активно ведется разработка как блокаторов, так и индукторов TLR4 сигнального пути для контроля развития различных патологий. Это связано с тем, что сигнальный путь TLR4 активируется в ответ на заражение грамотрицательными бактериями и принимает участие в патогенезе сепсиса, аутоиммунных и онкологических заболеваний, вирусно-бактериальных коинфекций и др. Полученные в работе новые данные о структурно-функциональных особенностях дифференциальной активации TLR4 позволяют объяснять факты существования различий в иммунных ответах на некоторые штаммы патогенных бактерий. Изучение роли TLR4, экспрессирующегося на миелоидных клетках, в экспериментальной модели острой гепатотоксичности необходимо для лучшего понимания механизмов развития септического шока, распространенной причиной смертности людей во всех странах. Таким образом, актуальность исследований, представленных в диссертационной работе Корнеева К.В., не вызывает сомнений.

Оценка новизны и научно-практической значимости работы

Полученные в работе Корнеева К.В. результаты являются новыми. Данные о влиянии микрогетерогенности структурных компонентов липида А на степень активации TLR4 сигнального пути можно использовать для теоретического предсказания биологической активности LPS по его структуре. Установление роли TLR4, экспрессирующегося на миелоидных клетках, в патогенезе острой гепатотоксичности открывает новые возможности для изучения механизмов развития септического шока, а также может способствовать разработке новых методов терапии. Таким образом, полученные в работе результаты имеют как теоретическую, так и практическую значимость.

Достоверность и обоснованность полученных результатов

Достоверность полученных Корнеевым К.В. результатов обеспечена использованием современных методов, тщательным анализом полученных данных и корректными способами их математической обработки. Выводы базируются на полученных результатах, а содержание автореферата полностью отражает основные результаты и выводы диссертационной работы. Результаты данной работы были апробированы на отечественных и международных конференциях, также по теме работы были опубликованы четыре статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus.

Содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Корнеева К.В. изложена на 107 страницах, проиллюстрирована 31 рисунком и содержит 3 таблицы. Список цитированной литературы содержит 198 источников. Рукопись диссертации имеет классическую структуру и включает в себя следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы по теме диссертации, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы и благодарности.

В расширенном разделе «Введение» (7 страниц) автором подробно изложены актуальность и степень разработанности темы исследования, сформулирована цель работы и поставлены задачи, необходимые для ее достижения. В этом разделе также обоснована научная новизна работы её теоретическая и практическая значимость, приведены методология и методы исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы представлен на 19 страницах и включает в себя общую характеристику Toll-подобных рецепторов и роль TLR4 в развитии патологических состояний иммунной системы. Описаны особенности активации TLR4 с помощью LPS. К достоинствам этой части работы можно отнести рис. 7, на котором автор наглядно суммировал известные данные о механизмах индукции экспериментальной модели острой гепатотоксичности.

Раздел «Материалы и методы» занимает 22 страницы и разделен на четыре подраздела, в которых подробно описаны методы работы с клетками, методы работы с мышами, молекулярно-биохимические методы и статистическая обработка данных.

Раздел «Результаты и обсуждение» представлен на 31 странице, хорошо проиллюстрирован, разделен на две части, посвященные изучению особенностей активации TLR4 различными LPS и роли TLR4 в развитии острой гепатотоксичности у мышей. Автор подробно излагает, критически анализирует и обобщает полученные результаты.

Замечания к работе следующие.

Литературный обзор. Несмотря на общую удовлетворенность этим разделом, у меня есть ряд замечаний к нему. Широкий, но в то же время достаточно лаконичный охват литературы в главе про роль TLR4 в развитии заболеваний, лучше было систематизировать с использованием таблиц или сократить, поскольку часть диссертационной работы посвящена изучению роли TLR4 в развитии острой гепатотоксичности, а не роли TLR4 в патогенезе аутоиммунных или опухолевых заболеваний. Для более четкой

постановки проблемы в обзоре литературы нужно было подробнее рассмотреть работы других исследователей, посвященные изучению биоактивности LPS, в частности остановиться на различиях в активации TLR4 сигнального пути у мыши и человека, поскольку в работе используют клетки из обоих организмов.

Материалы и методы. Следует указывать место получения клеточных линий RAW264.7 и L929, также важно конкретизировать в каждом случае способ снятия клеточных культур (с помощью скребка или трипсина). Хорошо было бы подробнее отметить в подразделе «2.3.1. Получение образцов LPS из разных штаммов грамотрицательных бактерий» какими методами была проведена очистка препаратов и каким образом подтверждали их чистоту, поскольку это важно для решения задач, поставленных автором.

Результаты. При чтении работы возникли следующие вопросы.

1. В чем преимущества использования для скрининга различных LPS культуры костномозговых макрофагов, а не перитонеальных?
2. Почему всю работу по определению биоактивности LPS нельзя было сделать на клетках RAW264.7?
3. В обзоре литературы отмечено, что ингибиторы/антагонисты TLR4 существуют, однако в самой работе они не использовались, хотя применение ингибиторов (например, CLI-095) является достаточно эффективным способом подтвердить специфичность активации TLR4 различными LPS.

Замечания по оформлению. В подписях к рисункам (раздел Результаты) следовало указать время обработки макрофагов LPS и используемую концентрацию, чтобы рисунки читались самостоятельно, без дополнительного изучения раздела Материалы и методы. В разделе «3.1.2. Биологическая активность LPS повышается с увеличением степени ацилированности липида А» идет подробное описание структуры различных

LPS, которое уместнее смотрелось бы в литературном обзоре. На рис. 11, 12 и 15 относительная экспрессия мРНК провоспалительных медиаторов после активации макрофагов LPS из *E. coli* принята за 1, а остальные значения нормированы на нее, что следовало отразить в подписях к рисункам. Также следует унифицировать использование аббревиатур преимущественно на английском, либо на русском языке: например, на протяжении всей диссертационной работы автор использует русскоязычное сокращение «ЛПС» и англоязычное «TLR4» из-за чего возникают смешения: «взаимодействие ЛПС-TLR4», «ЛПС-TLR4 стимул».

Заключение

Изложенные замечания имеют рекомендательный характер, не указывают на принципиальные ошибки и не подвергают сомнению достоверность полученных результатов и сделанных на их основе выводов. Работа Кирилла Викторовича Корнеева «Структурно-функциональные особенности активации TLR4 на миелоидных клетках мыши *in vitro* и в модели острой гепатотоксичности» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.03.03 – «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 приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Соискатель Кирилл Викторович Корнеев заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.03 – «иммунология».

Официальный оппонент:

доктор химических наук,

Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени
А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

M. C. Furt

Контактные данные:

Тел.: +7(495)9394332, e-mail: sergeeva@genebee.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация:

03.00.04 – биохимия

Адрес места работы:

119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40,

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени
А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

тел.: +7(495)9395359; e-mail: fxb@genebee.msu.su

Подпись сотрудника

НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ

М.Г. Сергеевой удостоверяю:

М.П.

Зав. канцелярией
Нис ФЖБ и печати
ЖКФ
(Седрова)

А. Н. Белозерского ИГУ

