

Отзыв официального оппонента
на диссертационную работу Шепельковой Галины Сергеевны «Регуляция
воспаления при туберкулезе в эксперименте и клинике» на соискание
ученой степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7.
Иммунология»

Актуальность темы

Актуальность диссертации Шепельковой Г.С. «Регуляция воспаления при туберкулезе в эксперименте и клинике» на соискание степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» не вызывает сомнения. Туберкулез (ТБ) - это инфекционное заболевание, от которого ежегодно умирает почти два миллиона человек. Несмотря на снижение заболеваемости активным ТБ и смертности от этого заболевания в мире неуклонно растет количество выявляемых случаев ТБ с множественной лекарственной устойчивостью. Лечение такого ТБ не всегда эффективно. При тяжелом течении заболевания патология ТБ в значительной степени обусловлена чрезмерным, неадекватно сильным иммунным ответом хозяина, направленным на борьбу с репликацией бактерий. Неразрешающееся воспаление, опосредованное провоспалительными медиаторами хозяина в ответ на высокую бактериальную нагрузку, приводит к легочной патологии, включая кавитацию и фиброз. Нарушение баланса между активацией иммунного ответа хозяина против патогена и механизмами распространения *M. tuberculosis* приводит к широкому спектру иммунопатологии, начиная от бессимптомной инфекции и заканчивая диссеминированным заболеванием и, в конечном итоге, смертью пациента. Учитывая важность функции легких для гомеостаза млекопитающих и относительно низкий потенциал регенерации респираторной паренхимы, восстановление функции легких без повреждений следует рассматривать как перспективную цель для будущих стратегий вмешательства. Работа Шепельковой Г.С. направлена на поиск факторов, коррелирующих с развитием хронического воспалительного процесса, факторов

фиброзообразования, факторов и регуляторов, определяющих переход воспалительного ответа при инфекции из хронической в острую фазу.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Тема диссертации соответствует специальности «3.2.7. Иммунология» (направления исследований: №2. Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии; №3. Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противопаразитарной иммунной защиты; №4. Исследование роли иммунных механизмов в различных физиологических процессах (регенерации, репродукции, старении, нейроэндокринных взаимодействиях, взаимодействии с микробиомом и др.); №6. Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических других иммунопатологических процессов; №7. Разработка способов воздействия на иммунную систему с помощью фармакологических препаратов и методов иммунобиотерапии. Исследование эффективности и безопасности этих воздействий).

Основные результаты диссертационной работы

В работе Шепельковой Г.С. исследуется активация бактериостатического механизма макрофагов при экспериментальной ТБ инфекции у мышей. Для чего используется два подхода: изучение взаимодействия механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответов, а именно – активация макрофагов Т-клетками; изучение влияния механизмов врожденного иммунного ответа, опосредованного сапозин D. Показано, что Th1 эффекторы $CD4^+$ $CD62L^{lo}$ $CD27^{lo}$ способны активировать бактериостатическую функцию как перитонеальных, так и интерстициальных макрофагов легких. Данный механизм активации не зависит от генерации NO^+ . Для активации Т лимфоцитами антимикобактериальной функции макрофагов необходимо контактное взаимодействие макрофага и Т-эффектора. Также продемонстрировано, что дефицит сапозина D приводит к снижению бактериостатической активности как интерстициальных макрофагов легких, так и перитонеальных макрофагов в системе *in vitro*; компенсация дефицита

данного гликопротеина ведет к восстановлению антибактериальной активности макрофагов. *In vivo* дефицит сапозина D при экспериментальной ТБ инфекции у мышей способствует нарастанию воспалительных процессов, а также усиливает предрасположенность клеток легкого к апоптозу.

В экспериментальной модели ТБ с использованием линий мышей с оппозитной чувствительностью к ТБ показано, что при инфицировании устойчивых к ТБ мышей линии A/Sn в очаге инфекции уровень экспрессии изменяется у большего числа генов, чем в случае с инфицированием чувствительных к ТБ мышей I/St. У чувствительных к ТБ мышей I/St наблюдалась повышенная активация генов, вовлеченных в реакции воспаления ассоциированных с ответом нейтрофилов на инфекцию. Также установлено, что у генетически гетерогенных потомков F2 (I/St x A/Sn) прогрессирование ТБ связано с интенсивной воспалительной реакцией, опосредованной фагоцитирующими клетками хозяина, и проявляющейся в повышенной экспрессии факторов воспаления IL1b, IL11, Cxcl2, Mmp-8 и прогрессирующим накоплением нейтрофилов в легочной ткани инфицированных животных.

В экспериментальной модели ТБ на чувствительных к инфекции мышах линии I/St продемонстрировано влияние локального блока воспаления. Так, в работе диссертанта установлено, что подавление продукции IL11 у зараженных *M. tuberculosis* мышей с помощью поликлональных антител или генетически модифицированного белка ведет к подавлению нейтрофильного воспаления и способствует пролонгированию времени жизни инфицированных мышей. Также показано, что селективное ингибирование классического пути активации NF-kB с помощью NBD-пептида ведет к уменьшению интенсивности воспалительных реакций в легочной ткани инфицированных *M. tuberculosis* животных.

С помощью использования биоматериала, полученного от пациентов с диагнозом активный ТБ легких, продемонстрировано, что выраженность воспалительных реакций в очаге инфекции у пациентов с диагнозом ТБ легких по результатам гистологических исследований, а также по данным определения цитокинов/хемокинов и микроРНК усиливается в ряду туберкулема без

распада, туберкулема с распадом, каверна. Создан набор из шести зрелых сывороточных микроРНК позволяющий охарактеризовать активность процессов воспаления при ТБ в легочной ткани пациентов. Продemonстрировано влияние вирусной коинфекции (COVID-19) на течение ТБ. Показано, что через три месяца после перенесенного COVID-19 в легких пациентов с туберкулезом сохраняются признаки воспаления, связанные с вирусной инфекцией.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа Шепельковой Г.С. выполнена на высоком научно-методическом уровне. В работе использованы современные методы исследования. Экспериментальные данные обработаны с применением адекватных методов математической статистики, достоверность подтверждена.

Научная новизна диссертационной работы

Научная новизна диссертационной работы Шепельковой Г.С. заключается в разработке научно-обоснованная концепция связи экспрессии биомаркеров (микроРНК) и факторов, вовлеченных в регуляцию острого локального и системного хронического воспаления при инфицировании *M. tuberculosis*.

Автором впервые показано, что наиболее эффективная активация бактерицидной функции как перитонеальных, так и легочных макрофагов мыши достигается при их взаимодействии с высокодифференцированными Th1 эффекторами с фенотипом $CD4^+ CD62L^{lo} CD27^{lo}$. Также впервые продемонстрировано, что данное взаимодействие опосредовано растворимым фактором с молекулярной массой от 3 до 10 кДа и не зависит от продукции активных радикалов азота. Также, впервые охарактеризована важная роль сапозина D в антибактериальной активности макрофагов, а также в способности макроорганизма противостоять туберкулезной инфекции.

Проведенные автором исследования в оригинальной экспериментальной модели ТБ впервые позволили установить возможность достижения терапевтического успеха путем регуляции специфического туберкулезного воспаления с помощью поликлональных IgG анти-IL11 антител, либо

генетически модифицированным рекомбинантным IL11, либо посредством местного селективного ингибирования классического пути активации транскрипционного фактора NF- κ B.

Автором исследования сформирован оригинальный набор из 6 зрелых сывороточных микроРНК (miR-155, miR-191, miR-223, miR-26a, miR-222, miR-320), по уровню экспрессии которых в сыворотке крови возможно охарактеризовать активность воспалительных процессов в легких больных ТБ.

Впервые исследовано оппозитное действие miR-191-5p и miR-222-3p на антимикобактериальную активность инфицированных *in vitro* *M. tuberculosis* макрофагов человека. Установлено, что модулирующее действие данных miRs не связано с генерацией активных форм азота и проявляется в изменении экспрессии ряда факторов воспаления и других микроРНК.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых знаний о механизмах активации бактериостатической активности макрофагов при экспериментальной ТБ инфекции *in vitro*. Доказана роль субпопуляции высокодифференцированных Т эффекторов, экспрессирующих фенотип CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low}CD27^{low}, в активации бактериостатической функции как перитонеальных, так и «наивных» интерстициальных легочных макрофагов. Предложена научная гипотеза о существовании нитрит-независимого механизма активации макрофагов высокодифференцированными CD4 эффекторами при туберкулезной инфекции; сделано и обосновано предположение о влиянии механизмов врожденного иммунного ответа, опосредованного сапозинотом D, на регуляцию туберкулезного воспаления, что в дальнейшем открывает перспективы для разработки новой противотуберкулезной терапии. Также получено экспериментальное подтверждение гипотезы о модулирующем действии miR-191-5p и miR-222-3p на экспрессию ряда факторов воспаления, а также других микроРНК в инфицированных микобактериями макрофагах. Продемонстрировано, что влияние вышеупомянутых микроРНК на бактериостатическую активность макрофагов не связано с генерацией NO[•].

На основании исследования развития воспалительного ответа у мышей с оппозитной чувствительностью к ТБ, а также на генетически гетерогенной по чувствительности к инфекции популяции гибридов F2 (I/St x A/Sn) сформулирована концепция об ассоциации повышения активации генов, вовлеченных в реакции воспаления ассоциированных с ответом нейтрофилов, на фоне инфекции *M. tuberculosis*.

Научно-практическая значимость работы

Научно-практическая значимость диссертационной работы заключается в разработке новых способов регуляции интенсивности процессов воспаления при экспериментальной ТБ инфекции у мышей (блокирование провоспалительного цитокина - IL11; локальное блокирование классического пути активации транскрипционного фактора NF-kB). Основываясь на результатах исследования можно предположить, что применение данных подходов будет способствовать снижению нейтрофилии и, таким образом, создает предпосылки к возможности разработки новой пациент-ориентированной противотуберкулезной терапии.

Также в научно-практическом плане важным является характеристика развития воспалительных реакций непосредственно в очаге инфекции у пациентов с диагнозом ТБ легких. В работе продемонстрировано, что острота воспалительных реакций нарастает в ряду туберкулема без распада → туберкулема с распадом → каверна. Диссертантом произведена оценка влияния вирусной инфекции (COVID-19) на развитие воспаления у пациентов с диагнозом ТБ легких. Разработан набор из 6 зрелых сывороточных микроРНК, по степени экспрессии которых в сыворотке крови пациентов с диагнозом туберкулема или фиброзно-кавернозный ТБ, возможно охарактеризовать изменение активности воспалительных процессов в легочной ткани, что может помочь врачу определить степень активности ТБ процесса и оценить целесообразность запланированной операции.

Таким образом, полученные в работе знания существенны для разработки новых средств патогенетической терапии, в частности целенаправленной регуляции воспалительных реакций при туберкулезе. Также диссертационная

работа закладывает основу для интеграции микроРНК в клиническую практику для обогащения персонализированных и креативных диагностических стратегий, и дальнейшего принятия решений о лечении ТБ, особенно при лечении пациентов с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis*.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация построена по традиционному типу и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, полученных результатов, их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 255 страницах и проиллюстрирована 46 рисунками и 8 таблицами. Список цитируемой литературы состоит из 294 источников, из них 6 русскоязычных и 288 англоязычных.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность исследования, излагает цель и задачи, описывает новизну и практическую значимость работы, представляет положения, выносимые на защиту докторской диссертации.

В «Обзоре литературы» автор отразила современные представления о рассматриваемых в диссертационной работе научных проблематиках. Обзор литературы посвящен описанию патогенеза туберкулеза, роли воспаления при туберкулезе легких и механизмам иммунной защиты организма от *M. tuberculosis*. Приведены данные литературы о макрофагах, эозинофилах, нейтрофилах, CD4 Т лимфоцитах Th1 и ГЗТ, Th17 и регуляторных Т клетках, модуляции воспаления цитокинами и хемокинами. Часть обзора посвящена данным о роли микроРНК в противотуберкулезном иммунном ответе. В заключении обзора подчеркивается, что исторически сложившаяся концепция "хорошего" и "плохого" иммунного ответа при туберкулезе вряд ли является достаточной. Таким образом, диссертант полагает, что необходимы новые парадигмы прогнозирования детерминант исхода, учитывающие множественность сигналов, пространственную организацию, разнообразие исходов и даже возможность нескольких путей к одному и тому же исходу. На этой платформе и построено диссертационное исследование.

Глава «Материалы и методы» посвящена описанию методологической базы диссертационной работы. Все использованные автором методы

исследования являются адекватными и позволяют получить ответ на поставленные задачи. Все методы описаны подробно и доступно.

В главе «Результаты» приведены описания собственных результатов исследования. Описанию результатов предшествует краткое введение в проблему и обоснование необходимости получения новых данных. Восприятию результатов помогают и четкие развернутые подписи ко всем рисункам, что, безусловно, является достоинством диссертации.

Глава «Обсуждение» содержит тщательный анализ собственных результатов и их объективное сравнение с результатами работ других авторов и научных коллективов.

Диссертация завершается заключением, где обобщены основные результаты работы, полнота решения поставленных задач, научная новизна полученных результатов. Выводы логично вытекают из полученного материала, а сформулированные положения подчеркивают научную ценность диссертационной работы.

Оценивая в целом качество изложения и содержание диссертации, следует подчеркнуть масштабность работы автора, фундаментальную и научную новизну, а также практическую значимость в области молекулярной и клеточной биологии, иммунологии и медицины. Основные положения и выводы в процессе исследования обоснованы, детально аргументированы, учитывают современное научное состояние вопроса по совокупности данных международной литературы, подкреплены адекватной статистической обработкой полученных результатов и хорошо проиллюстрированы.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 52 печатные работы, в том числе 23 работы в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций («Инфекция и иммунитет», «Медицинская иммунология», «Туберкулез и болезни легких», «Вестник РГМУ», «Доктор Ру», «Вестник современной клинической медицины», «PLoS ONE», «Tuberculosis (Edinb.)», «Journal of Infection Diseases», «J. Autoimmune Disord.», «Microbiology

Research», «Microorganisms», «Int. J. Mol. Sci.»); глава в рецензируемой монографии; 28 публикаций в материалах научных конгрессов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Однако хотелось бы обратить внимание на наличие в работе разного рода ошибок (орфографических, пунктуационных, стилистических и др.).

Вопросы:

1. Что Вы имеете ввиду «... переход воспалительного ответа при инфекции из хронической в острую фазу»?

2. Вы оценивали зависимость экспрессии изучаемых микроРНК от количества *M. Tuberculosis* в стенке туберкулемы и в легочной ткани, удаленной от туберкулемы?

Заключение

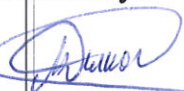
Диссертационная работа Г.С. Шепельковой «Регуляция воспаления при туберкулезе в эксперименте и клинике» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение в области иммунологии: установлено, что для активации бактериостатической функции макрофагов необходим физический контакт между CD4⁺ эффекторами с фенотипом CD44^{high}CD62L^{low}CD27^{low} и макрофагом; продемонстрирована роль сапозина D в функционировании механизмов врожденного иммунитета, направленных на элиминацию микобактериальной инфекции; представлены научно-обоснованные предложения по направлениям разработки новой пациент-ориентированной противотуберкулезной терапии, способствующей подавлению избыточного нейтрофильного воспаления; подтверждено негативное влияние COVID-19 на течение ТБ легких и установлены соответствующие иммунологические корреляты – микроРНК; предложен способ диагностики активности туберкулезного воспаления по уровню экспрессии ряда сывороточных микроРНК, сформирован диагностический

набор из 6 микроРНК, по степени экспрессии которых можно оценить активность специфического воспаления при туберкулезе легких.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям (п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года в редакции постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. №1690, 26.01.2023 г. №101, 18.03.2023 г. №415, 26.10.2023 г. №1786, от 26.01.2023 г. №101, от 25.01. 2024 № 62, от 16.10.2024 №1382), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология».

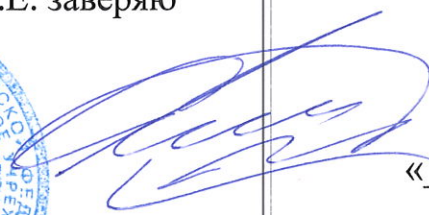
Официальный оппонент,
старший научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии»

Министерства здравоохранения РФ, д.б.н.

 Дьякова М.Е.

Подпись д.б.н. Дьяковой М.Е. заверяю

Ученый секретарь,
к.м.н.

 Муравьев А.Н.

«_05_» _____марта_ 2025 г.

Контактная информация: 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д.2-4; ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» МЗ РФ; телефон: +7 (812) 775-75-50; e-mail: info@spbniif.ru; сайт <https://spbniif.ru>