

**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

Современные методы лечения туберкулеза (ТБ) основаны на химиотерапии, направленной на уничтожение *M. tuberculosis*. Химиотерапия при туберкулезе может длиться от 6 месяцев до нескольких лет в зависимости от факторов, включая объем поражения тканей, чувствительность изолятов микобактерий к антимикробным препаратам и, наконец, клинический ответ на фармацевтические препараты. Вспышки ТБ с лекарственной устойчивостью возбудителя фиксируются по всему миру. Лечение такого ТБ не всегда эффективно. При тяжелом течении заболевания патология ТБ в значительной степени обусловлена чрезмерным, неадекватно сильным иммунным ответом хозяина, направленным на элиминацию 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 микобактерий туберкулеза приводит к широкому спектру иммунопатологии, начиная от бессимптомной инфекции и заканчивая диссеминированным заболеванием и, в конечном итоге, смертью пациента.

Таким образом, для своевременной и правильной регуляции воспалительного ответа при ТБ необходимо получение новых знаний о механизмах подавления острого воспаления, массивной клеточной экспансии и, в целом, неконтролируемого иммунного ответа за счет ингибирования

продукции факторов воспаления, иммуномодулирующей терапии, направленной на хозяина, для регуляции иммунного ответа на микобактерии. Медиаторы и сигнальные механизмы, запускающие и усиливающие воспалительный ответ, изучены, однако мало известно о факторах, коррелирующих с развитием хронического воспалительного процесса, маркеров фиброобразования, маркеров, определяющих переход воспалительного ответа при инфекции из хронической в острую фазу. Решению этих вопросов и посвящена диссертационная работа Шепельковой Г.С.

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 исследуется активация антимикобактериальной функции макрофагов *in vitro* при экспериментальном ТБ у мышей. Установлено, что активация бактериостатической функции макрофагов (перитонеальных и

интерстициальных легочных) не зависит от генерации активных форм азота. В то же время, эта функция макрофагов регулируется высокодифференцированными Th1 CD4⁺ эффекторами с фенотипом CD44^{high}CD62L^{low}CD27^{low} и зависит от экспрессии сапозина D. Диссертантом продемонстрировано, что для активации Т лимфоцитами антимикобактериальной функции макрофагов необходимо контактное взаимодействие Т лимфоцита и макрофага, в результате которого секретируется фактор с молекулярной массой от 1 до 10 кДа, активирующий макрофаги. Кроме того, показано действие некоторых микроРНК на антимикобактериальную активность инфицированных *M. tuberculosis* макрофагов человека. Установлено, что miR-191 способствует активации бактериостатической функции макрофагов.

Благодаря использованию линий мышей с разной генетической предрасположенностью к ТБ, а также генетически гетерогенных потомков F2 в диссертации Галины Сергеевны показано, что инфекция *M. tuberculosis* устойчивых к ТБ мышей линии A/Sn регулируется большим числом генов по сравнению с инфекцией чувствительных к ТБ мышей линии I/St, что может указывать на более сложный и многогранный ответ на инфекцию у резистентных к ТБ животных. В гетерогенной популяции, у генетически гетерогенных потомков F2 (I/St x A/Sn), прогрессирование ТБ связано с развитием интенсивной воспалительной реакции, проявляющейся в повышенной экспрессии факторов воспаления (IL1 β , IL11, Cxcl2, mmp-8) и прогрессирующей нейтрофилии. В работе диссертанта продемонстрировано, что анти-IL11 терапия (с использованием поликлональных антител к IL11 либо рекомбинантной мутантной формы IL11) или местное селективное ингибирование классического пути активации транскрипционного фактора NF-kB у мышей чувствительной к ТБ линии I/St, инфицированных *M. tuberculosis*, приводит к уменьшению интенсивности воспаления.

Немаловажным результатом диссертационной работы Галины Сергеевны является разработка набора из 6 зрелых сывороточных микроРНК, применение которого позволяет охарактеризовать нарастание интенсивности

воспаления в зависимости от формы активного ТБ легких в ряду туберкулема без распада → туберкулема с распадом → каверна, а также оценить влияние коинфекции ТБ - COVID-19 на выраженность воспалительных реакций в легких пациентов. Продemonстрировано, что наличие активного SARS-CoV2 вируса способствует прогрессированию основного заболевания.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа Шепельковой Г.С. выполнена на высоком научно-методическом уровне. В диссертационной работе применены современные методы исследований, включающие генетические, молекулярно-биологические, биохимические и иммунологические. Результаты получены на сертифицированном калиброванном оборудовании. Полученные экспериментальные данные обработаны с применением адекватных статистических методов и достоверны.

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 разработке новой концепции связи экспрессии биомаркеров (микроРНК) и факторов, вовлеченных в регуляцию острого локального и системного хронического воспаления при инфицировании *M. tuberculosis*. Диссертантом получены новые знания о механизмах активации бактериостатической активности макрофагов *in vitro* при экспериментальном ТБ. Шепельковой Г.С. 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 гипотеза о существовании нитрит-независимого механизма активации макрофагов; сделано и обосновано предположение о влиянии механизмов врожденного иммунного ответа, опосредованного сапозинном D, на регуляцию туберкулезного воспаления, что в дальнейшем открывает перспективы для разработки новой противотуберкулезной терапии. Разработаны новые критерии оценки изменения степени деструкции и активности воспалительных процессов ТБ легких путем определения уровня экспрессии шести зрелых сывороточных микроРНК: miR-155, miR-191, miR-223, miR-26a, miR-222, miR-320.

Научно-практическая значимость работы

В диссертации разработаны способы регуляции процессов воспаления при экспериментальном ТБ у мышей *in vivo* за счет системного и местного (непосредственно в очаге инфекции) блокирования провоспалительного цитокина IL11, а также за счет локального блокирования классического пути активации транскрипционного фактора NF-κB. Основываясь на полученных в диссертационной работе результатах, можно полагать, что применение данных подходов будет способствовать снижению уровня нейтрофильного воспаления. Полученные диссертантом данные создают предпосылки к возможной разработке новой пациент-ориентированной противотуберкулезной терапии.

В диссертационной работе определен характер развития воспалительных реакций непосредственно в очаге инфекции у пациентов с диагнозом активный ТБ легких (туберкулема без распада, туберкулема с распадом и фиброзно-кавернозный туберкулез), а также у коморбидных пациентов с диагнозом ТБ + COVID-19. Доказано, что коинфекция SARS-CoV-2 у больных ТБ утяжеляет течение основного заболевания. Даже через 3 месяца после перенесенной вирусной инфекции в легочной ткани пациентов с диагнозом ТБ легких сохраняются признаки воспаления, связанные с

вирусной инфекцией. Такая ситуация требует от хирурга повышенного внимания к возможности интраоперационного кровотечения и должна учитываться при принятии решения об объеме удаляемой легочной ткани при проведении оперативного вмешательства по поводу удаления туберкулемы.

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, 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 имеет традиционную структуру, изложена на 255 машинописного текста и включает следующие главы: «введение», «обзор литературы», «материалы и методы исследования», «результаты», «обсуждение», «заключение», «выводы» и «список литературы». Работа иллюстрирована 46 рисунками и 8 таблицами. «Список литературы» состоит из 294 источников, из них 6 отечественных и 288 зарубежных.

Во разделе «Введение» обоснована актуальность темы, аргументированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Содержание раздела «Обзор литературы» полностью соответствует теме диссертации, материалами обзора литературы обоснована необходимость проведения настоящего исследования. Полнота изложения

материала подтверждает знание диссертантом современных научных данных по изучаемой проблематике.

Глава «Материалы и методы» посвящена подробному описанию методик, используемых в работе. В своей работе Галина Сергеевна использует комплекс современных иммунологических, биохимических и молекулярно-биологических методов исследования, а именно: работа с линиями мышей; выделение, культивирование и стимуляция клеток, получение высокодифференцированных субпопуляций клеток; наработки биомассы вирулентного штамма *M. tuberculosis*; определение бактериостатической активности макрофагов и жизнеспособности микобактерий в культурах макрофагов; проточная цитофлуорометрия, ИФА, гистологические исследования, работа с нуклеиновыми кислотами, клонирование, мутагенез, арреи, синтез и наработка белка, разнообразный биоинформатический анализ.

В материалах главы «Результаты» представлены результаты собственных исследований. Автор приводит данные об активации бактериостатического механизма макрофагов при экспериментальной ТБ инфекции у мышей; о роли сапозина D в формировании противотуберкулезного иммунного ответа в модели экспериментальной ТБ инфекции у мышей; по поиску маркеров воспаления в модели ТБ на линиях мышей с оппозитной чувствительностью к инфекции; о регуляции воспаления при экспериментальной ТБ инфекции (при помощи поликлональных анти-IL11 IgG-антител; при помощи мутантной формы IL11 и за счет блока пути активации одного из основных транскрипционных факторов NF-kB). Большая часть главы «Результаты» посвящена регуляции туберкулезного воспаления в клинике. Автор проводит анализ экспрессии генов зрелых сывороточных микроРНК у пациентов с диагнозом активный ТБ легких а также анализ маркеров прогрессирования воспаления в легочной ткани пациентов с диагнозом активный ТБ легких; анализ маркеров прогрессирования воспаления в легочной ткани пациентов с диагнозом

активный ТБ легких и COVID-19; анализ регуляторного действия выявленных микроРНК *in vitro*.

В главе «Обсуждение» приведены результаты анализа полученных данных, проведено сопоставление их с имеющимися в настоящее время данными, опубликованными в мировой литературе. Выводы обоснованы результатами исследования и четко сформулированы.

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 в тексте есть несколько неточностей:

1. Важным разделом работы является исследование роли сапозина в поддержании бактериостатической функции макрофагов. Автором показано, что генетический дефект по этому фактору существенно снижает бактериостатическую активность, а введение гена сапозина с помощью лентивирусной трансдукции восстанавливает эту активность. Сапозины активно участвуют в презентации липидных антигенов через CD1 и в деградации мембран за счет представления липидов лизосомальным гидролазам, но впервые о роли сапозина читатель узнает только из обсуждения. Ни в обзоре литературы, ни в вступительной части главы 3.1.2 о причинах выбора этого активатора сфинголипидов, к сожалению, ничего не сказано.

2. На Рис. 7А прерывистой линией обозначено включение H^3 -урацила чистой культурой микобактерий, а по оси абсцисс отложено отношение количества микобактерий к числу макрофагов. Наверное, правильное было бы по оси написать число микобактерий, а в подписях к рисунку обозначить количество макрофагов.
3. В подписях к Рис. 8 не указано разведение чего добавляли в культуру макрофагов.
4. На стр. 99, по-видимому, ошибочно написано, что у мышей дикого типа (а не у дефицитных по SapD) не удастся выделить зону макрофагального скопления, т.к. чуть выше написано, что «[у мышей B6]...в отличие от гистологической картины для мышей B6-SapD-ko (3 недели после заражения) это макрофагальное скопление четко выражено, а на его периферии формируется классический лимфоидный вал туберкулезной гранулемы.»
5. На стр. 104 написано: «Для мышей I/St было выявлено 249 (15%) ЗИ-генов (127 генов с повышенным уровнем экспрессии относительно «наивного» контроля, 122 гена с повышенным уровнем экспрессии).» Очевидно, 122 – с пониженным уровнем экспрессии.
6. На стр. 118 возникла некоторая путаница с обозначением мутантного, рекомбинантного IL-11 и IL11 дикого типа. На Рис. 16 указан IL11 и mIL11 (мутантный), а в пояснении к этому рисунку есть wtIL11 (дикого типа) и rmIL11 (по смыслу, очевидно, мутантный). Однако на стр. 115 дано пояснение, что rmIL11 – это рекомбинантный мышинный IL11, который аутокринно стимулировал продукцию IL11.
Кроме того есть несколько вопросов, на которые хотелось бы получить ответы автора:
7. Можно ли рассматривать клетки $\text{CD27}^{\text{high}}$ в качестве центральных Т-клеток памяти, а клетки CD27^{low} в качестве эффекторных Т-клеток памяти?
8. Что происходит у мышей дефицитных по SapD с другими сапозинами (А, В и С), которые могут частично замещать его функции ?

9. Блокировка NFκB снижает воспаление, но не уменьшает бактериальную нагрузку. Есть ли какое-нибудь объяснение этому?

Однако все указанные замечания либо технического характера, либо дискуссионные и не в коей мере не снижают общую положительную оценку работы.

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: показано влияние механизмов врожденного иммунного ответа, опосредованного сапозинотом D на регуляцию туберкулезного воспаления *in vitro* и *in vivo*; установлено, что для активации бактериостатической функции макрофагов необходим физический контакт между CD4⁺ эффекторами с фенотипом CD44^{high}CD62L^{low}CD27^{low} и макрофагом, причем продемонстрировано, что данный механизм активации не зависит от генерации NO[•]; разработаны новые способы регулирования интенсивности воспалительных реакций в экспериментальной модели ТБ путем блокирования IL11 и классического пути активации NF-κB; предложен новый подход к оценке изменения степени деструкции и активности воспалительных процессов ТБ легких путем определения уровня экспрессии шести зрелых сывороточных микроРНК; доказано, что острота воспалительных реакций нарастает в ряду туберкулема без распада → туберкулема с распадом → каверна. Кроме того, произведена оценка влияния вирусной инфекции (COVID-19) на развитие воспаления у пациентов с диагнозом ТБ 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,
заместитель директора по научной работе ФГБУ
"НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени
почетного академика Н.Ф.Гамалеи" Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
д.б.н., профессор

Подпись профессора Пронина А.В. заверяю

Ученый секретарь,
к.б.н.

Пронин А.В.



Сысолятина Е.В.

« 27 » марта 2025 г.

Контактная информация: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18 ФГБУ
«НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; телефон: +7 (499) 193-30-01; e-mail:
info@gamaleya.org; https://gamaleya.org/