

**ШЕПЕЛЬКОВА ГАЛИНА СЕРГЕЕВНА**

**РЕГУЛЯЦИЯ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И  
КЛИНИКЕ**

3.2.7 Иммунология

**Автореферат**

Диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва, 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

**Научный консультант:** Еремеев Владимир Витальевич, доктор медицинских наук

**Официальные оппоненты:**

**Купраш Дмитрий Владимирович** – доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, член-корреспондент РАН, руководитель центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, заведующий лабораторией передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Министерства науки и высшего образования Российской Федерации;

**Пронин Александр Васильевич** – доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

**Дьякова Марина Евгеньевна** – доктор биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:** Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита состоится «\_\_»\_\_\_\_\_2025 г., в \_\_ часов на заседании диссертационного совета 68.1.002.01 на базе ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте <https://nrcii.ru/dissertatsionnyy-sovet/zashchity-dissertatsiy/>

**Автореферат разослан** «\_\_»\_\_\_\_\_2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Гудима Георгий Олегович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Воспаление является неотъемлемой частью биологии живых организмов. Оно обеспечивает критическую защиту от неблагоприятных факторов окружающей среды, способствуя поддержанию гомеостаза и сохранению функциональной и структурной целостности тканей и органов. Показано, что клеточные и молекулярные медиаторы воспаления вовлечены в разнообразные биологические процессы, такие как: метаболизм, ремоделирование тканей, термогенез и функции нервной системы (в том числе поведение) (Rankin L.C. et al., 2018; R. Medzhitov 2021). Общим фактором для развития воспалительного ответа является отклонение функционирования биологической системы от ее «нормального» состояния в ответ на некий стимул (Colaço H.G. et al., 2016; Kotas M.E. et al., 2015; Meizlish M. L. Et al., 2021). Воспалительные сигналы, включая цитокины, хемокины, биогенные амины и эйкозаноиды, вызывают бесчисленные изменения в различных биологических процессах, начиная от локальных сосудистых реакций и заканчивая изменением температуры тела. Разбалансировка процессов регуляции воспаления представляет собой центральную патогенетическую особенность многих опасных для жизни микробных инфекций, в том числе туберкулеза (ТБ).

Воспаление при туберкулезе динамично и может нести в себе как вред, так и пользу как для хозяина, так и для патогена. Различные клетки и медиаторы могут проявлять про- и противовоспалительную активность на разных стадиях ТБ. Эти эффекты могут даже сосуществовать (Dorhi A. Et al., 2014). Хронический аспект воспаления при ТБ обусловлен сложными стратегиями внутриклеточного выживания *M. tuberculosis* (Mtb). ТБ представляет собой континуум, включающий спектр поражений, как следствие сложной регуляции воспаления. Провоспалительные цитокины, включая интерфероны, фактор некроза опухоли и интерлейкин 1, а также микроРНК (miRs) и эйкозаноиды образуют интерактивную сеть при ТБ. Перекрестная регуляция между провоспалительными медиаторами оказывает сильное влияние на характер гибели инфицированных клеток. Эти процессы в сочетании с локальными концентрациями протеаз, таких как катепсины, серпины и матрикс-металлопротеиназы, влияют на целостность

тканей, формируют архитектуру гранулемы и модулируют восстановление тканей. С появлением дополнительной информации по организации сетей воспаления при туберкулезе становится более понятным значение некоторых путей для новых вмешательств. Задача состоит в том, чтобы выявить степень и тип воспаления, которое приносит пользу хозяину, и точно определить, когда следует применять специфические вмешательства, направленные на хозяина, чтобы изменить баланс в пользу хозяина. Двойственность воспаления должна быть раскрыта в мельчайших деталях, прежде чем терапия, направленная на медиаторы воспаления, дойдет до пациента (Kaufmann SH et al., 2014). 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. Таким образом, перспективными для исследования/изучения в настоящее время являются вопросы поиска факторов, коррелирующих с развитием хронического воспалительного процесса, факторов фиброобразования, факторов и регуляторов, определяющих переход воспалительного ответа при инфекции из хронической в острую фазу. Решению именно этих вопросов и посвящена наша работа.

### **Цель исследования**

Исследовать особенности развития воспаления, характеризующие различные варианты течения туберкулезной инфекции в эксперименте и клинике путем изучения таких регуляторных механизмов как: клеточная реакция и продукция факторов, регулирующих воспаление.

### **Задачи исследования**

1. На модели экспериментального ТБ у мышей *in vitro* исследовать взаимодействие механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответов, а именно – активацию макрофагов высокодифференцированными CD4<sup>+</sup> эффекторами Th1;
2. Оценить влияние механизмов врожденного иммунного ответа, опосредованного сапозинотом D на регуляцию туберкулезного воспаления *in vitro* и *in vivo* у мышей;

3. На модели экспериментальной туберкулезной инфекции изучить полный экспрессионный профиль легочной ткани мышей с оппозитной чувствительностью к ТБ: чувствительная линия I/St и резистентная линия A/Sn;
4. Изучить роль гранулоцитов в регуляции туберкулезного воспаления у мышей с различной чувствительностью к ТБ;
5. С помощью генетических конструкций, кодирующих синтетический ген IL11 дикого типа и его мутантную форму, а также соответствующих белков, оценить последствия локального блока IL11 в легких на модели экспериментального ТБ;
6. Оценить возможности регуляции локального туберкулезного воспаления в легочной ткани мышей чувствительной к ТБ линии I/St путем воздействия на один из ключевых факторов воспаления – NF-kB;
7. У пациентов с разными формами ТБ легкого (туберкулема без распада, туберкулема с распадом и фиброзно-кавернозный ТБ) изучить экспрессионный профиль зрелых регуляторных микроРНК в циркуляции;
8. У пациентов с различными формами ТБ легких (туберкулема без распада, туберкулема с распадом и фиброзно-кавернозный ТБ) исследовать особенности развития локальных воспалительных реакций по результатам гистологического анализа, а также по экспрессии генов и продукции цитокинов и хемокинов *in situ*;
9. Оценить особенности воспалительного процесса у больных с сочетанной инфекцией ТБ-COVID-19 по результатам гистологического анализа, а также по изменению экспрессии регуляторных зрелых микроРНК и генов цитокинов и хемокинов;
10. Изучить влияние гиперэкспрессии отдельных микроРНК на активацию макрофагов человека в модели туберкулезной инфекции *in vitro*.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Активация антимикобактериальной функции макрофагов (перитонеальных и интерстициальных легочных) не зависит от генерации активных форм азота. В то же время, эта функция макрофагов регулируется высокодифференцированными Th1 CD4<sup>+</sup> эффекторами с фенотипом CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>CD27<sup>low</sup> и зависит от экспрессии сапозина D.
2. 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. При этом анти-IL11 терапия или местное селективное ингибирование классического пути активации транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B у мышей линии I/St, инфицированных *M. tuberculosis*, приводит к уменьшению интенсивности воспаления.

3. Сформированный нами набор из 6 зрелых сывороточных микроРНК позволяет охарактеризовать нарастание интенсивности воспаления в зависимости от формы 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.

### **Научная новизна**

1. Установлено, что высокодифференцированные Th1 эффекторы с фенотипом CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup>CD27<sup>lo</sup> активируют как перитонеальные (соотношение макрофаг: Т клетка от 125:1 до 625:1), так и легочные интерстициальные макрофаги (соотношении макрофаг: Т клетка = 5:1). Механизм активации макрофагов не зависит от продукции NO<sup>•</sup>. Для активации Т лимфоцитами бактериостатической функции макрофагов необходимо контактное взаимодействие клеток (макрофага и Т-эффектора), после которого секретируется фактор с молекулярной массой от 3 до 10 кДа, активирующий макрофаги.

2. Показано, что Т лимфоциты CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup>CD27<sup>hi</sup> способны активировать бактериостатическую функцию макрофагов, но для эффективной активации им необходимо додифференцироваться до эффекторов с фенотипом CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup>CD27<sup>lo</sup>.

3. Впервые продемонстрировано, что лизосомальный мембранный гликопротеин - сапозин D - вовлечен в процесс элиминации *M. tuberculosis* макрофагами мыши в системе *in vitro*. Недостаток сапозина D способствует снижению антимикобактериальной активности как перитонеальных, так и интерстициальных макрофагов легкого. Восстановление дефицита сапозина D за счет инфицирования макрофагов лентивирусом, содержащим последовательность искусственного гена *sap d* человека, приводит к восстановлению бактериостатической активности до уровня макрофагов дикого типа. Механизм антибактериального действия сапозина D не связан с генерацией активных радикалов азота.

4. Впервые в модели экспериментальной ТБ инфекции на мышах нокаутах по сапозину D показано, что дефицит данного гликопротеина ведет к утяжелению процессов воспаления, а также способствует усилению предрасположенности к апоптозу клеток, инфильтрирующих легочную ткань.
5. Впервые при помощи анализа данных полногеномного микроаррея легочной ткани мышей с оппозитной чувствительностью к ТБ (I/St – чувствительные к ТБ; A/Sn – устойчивые к ТБ) установлено, что при инфицировании устойчивых к ТБ животных в очаге инфекции уровень экспрессии изменяется у большего числа генов, чем в случае с инфицированием чувствительных к ТБ мышей, что может быть связано с более сложным и многогранным ответом на инфекцию у резистентных к ТБ животных. Для чувствительных к ТБ мышей I/St продемонстрирована повышенная активация генов, вовлеченных в реакции воспаления ассоциированных с ответом нейтрофилов на *Mtb*. Для мышей I/St также показана специфическая постинфекционная регуляция ингибиторов цистеиновых протеаз.
6. На модели генетически гетерогенной популяции гибридов F2 (I/St x A/Sn) продемонстрирована прямая корреляционная зависимость прогрессирования *Mtb* инфекции и сильного воспалительного ответа, опосредованного фагоцитирующими клетками хозяина, повышением экспрессии факторов воспаления (IL1 $\beta$ , IL11, Cxcl2, Mmp-8) и сильной нейтрофильной инфильтрацией легочной ткани.
7. Показано, что терапия поликлональными IgG анти-IL11 антителами либо генетически модифицированным рекомбинантным IL11 инфицированных *M. tuberculosis* мышей I/St приводит к подавлению нейтрофильного воспаления, а также способствует пролонгированию времени жизни зараженных животных.
8. Установлено, что местное селективное ингибирование классического пути активации транскрипционного фактора NF-kB у инфицированных *M. tuberculosis* мышей линии I/St (NBD-пептидом, блокирующим сборку IKK комплекса) способствует уменьшению воспалительных реакций за счет понижения экспрессии провоспалительных цитокинов (IL6 и TNF), а также за счет уменьшения нейтрофильной и Т лимфоцитарной (CD4 и CD8) инфильтрации легочной ткани. Показано, что местная регуляция активации классического пути

активации NF-kB не влияет на уровень микобактериальной нагрузки легочной ткани.

9. Продemonстрировано, что выраженность воспалительных реакций в очаге инфекции пациентов с диагнозом ТБ легких (по данным гистологических исследований, а также по анализу экспрессии и продукции факторов воспаления и экспрессии miRs) нарастает в ряду туберкулема без распада → туберкулема с распадом → каверна.

10. Впервые сформирован набор из 6 зрелых сывороточным miRs (miR-155, miR-191, miR-223, miR-26a, miR-222, miR-320), по уровню экспрессии которых (в сыворотке крови) возможно охарактеризовать изменение степени деструкции и активности воспалительных процессов ТБ легких.

11. Впервые показано, что даже через три месяца после перенесенного COVID-19 в легких пациентов с туберкулезом сохранялись признаки воспаления (по результатам гистологических исследований, а также по анализу уровня экспрессии факторов воспаления и зрелых miRs), связанные с SARS-CoV2-инфекцией.

12. Впервые в модели *in vitro* продемонстрировано оппозитное действие miR-191-5p и miR-222-3p на антимикобактериальную активность инфицированных *M. tuberculosis* макрофагов человека. Модулирующее действие данных miRs опосредованно влиянием на экспрессию ряда факторов воспаления и других miRs и, вероятно, не связано с генерацией активных форм азота.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Диссертационное исследование выполнено в рамках темы НИР отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза». Несмотря на преимущественно экспериментальный характер работы, полученные результаты важны для понимания легочной патологии и определения динамики защитных и деструктивных тканевых реакций у больных туберкулезом.

Важное фундаментальное значение работы состоит в выявлении дополнительных сведений о механизмах взаимодействия врожденного и адаптивного иммунного ответов при ТБ, а именно – активации макрофагов высокодифференцированными CD4<sup>+</sup> эффекторами Th1. Определена субпопуляция Т лимфоцитов с фенотипом CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>CD27<sup>low</sup> активирующая



бактериостатическую функцию как перитонеальных, так и «наивных» интерстициальных легочных макрофагов, причем продемонстрировано, что данный механизм активации не зависит от генерации активных форм азота.

Исследовано влияние механизмов врожденного иммунного ответа, опосредованного сапозинотом D на регуляцию туберкулезного воспаления. Пр продемонстрировано влияние сапозина D на бактериостатическую активность макрофагов при ТБ, что в дальнейшем открывает перспективы для разработки новой противотуберкулезной терапии.

Изучение влияния гиперэкспрессии некоторых микроРНК на антимикобактериальную активность инфицированных *M. tuberculosis* макрофагов человека также вносит вклад в фундаментальное значение работы.

При исследовании развития воспалительного ответа у генетически чувствительных и резистентных к туберкулезу мышей была выявлена повышенная активация генов, вовлеченных в реакции воспаления ассоциированных с ответом нейтрофилов на *M. tuberculosis*. В модели с использованием генетически гетерогенной популяции гибридов F2 (чувствительных и устойчивых к ТБ линий мышей) показана ассоциация прогрессирования ТБ с острым воспалительным ответом, опосредованным повышением экспрессии факторов воспаления и сильной нейтрофильной инфильтрацией легочной ткани.

Научно-практическая ценность работы заключается в разработке новых подходов к регулированию развития воспаления в экспериментальной модели на мышах (блокирование IL11 и классического пути активации NF- $\kappa$ B). Основываясь на результатах исследования можно предположить, что применение данных подходов будет способствовать подавлению нейтрофильного воспаления 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. Пр продемонстрировано, что острота воспалительных реакций нарастает в ряду туберкулема без распада → туберкулема с распадом → каверна. В работе 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 изменения экспрессии которых в сыворотке крови пациентов с диагнозом туберкулема или ФКТ, возможно охарактеризовать изменение активности воспалительных процессов в легочной ткани.

В целом, полученные в работе знания существенны для разработки новых средств патогенетической терапии, в частности целенаправленной регуляции воспалительных реакций при туберкулезе.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Часть материалов данного исследования используется в курсе лекций по развитию иммунного ответа при ТБ и иммунодиагностике ТБ для аспирантов и ординаторов в учебном центре ФГБНУ «ЦНИИТ».

Благодаря диссертационному исследованию разработан набор из 6 зрелых сывороточных микроРНК, по степени и направлению экспрессии которых в сыворотке крови пациентов с диагнозом туберкулема или ФКТ, возможно охарактеризовать изменение активности воспалительных процессов в легочной ткани. Исследование данного набора микроРНК внедрено в практику во фтизиатрическом и хирургическом отделах ФГБНУ «ЦНИИТ»

### **Публикации по теме диссертации**

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.

### **Апробация диссертации**

Результаты диссертационного исследования были представлены на конференции молодых ученых ФГБНУ «ЦНИИТ», посвященной всемирному дню борьбы с туберкулезом, г. Москва (2015, 2018, 2019, 2020, 2023); XV-XVII

Всероссийском научном форуме с международным участием им. академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», г. Санкт-Петербург (2015, 2017, 2023); VI-XI конгрессе «Национальной Ассоциации Фтизиатров», Санкт-Петербург (2017-2022 гг.); Форум Кох-Мечников по туберкулезу, г. Москва (2017 г.); Всероссийской научно-практической конференции фтизиатров с международным участием «Междисциплинарный подход в решении проблемы туберкулеза», г. Москва (2017 г.); ERS Congress, г. Париж, Франция (2018 г.); ERS Congress, г. Мадрид, Испания (2019 г.); ERS Congress, виртуальный (2020 г.); ERS Congress, виртуальный (2021 г.); 50th Union World Conference. TBScience 2019. Хайдерабад, Индия (2019 г.); Keystone Symposia. Tuberculosis: Science Aimed at Ending the Epidemic 2020, Силвертон, Колорадо, США (2020); Юбилейной научно-практической конференции с международным участием посвященной 100-летию ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва (2021 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной памяти академика РАМН М.И. Перельмана «Новые технологии в развитии фтизиатрии и инфекционных заболеваний», г. Москва (2021 г.); всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы туберкулеза и инфекционных заболеваний. Уроки пандемии», г. Москва (2022 г.); международной научно-практической конференции на тему “Фундамент отечественной фтизиатрии – истоки и перспективы инноваций в профилактике, диагностике и лечении”, посвященной 100-летию фтизиатрической службы Узбекистана и 90-летию научно-практической деятельности научно-практического Центра фтизиатрии и пульмонологии, Ташкент, Узбекистан (2022 г.); I и III научно-практической конференции с международным участием, посвященной 300-летию Российской академии наук «Роль фундаментальных исследований во фтизиатрии», г. Москва (2022 г. и 2024 г.); конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2024», г. Москва (2024 г.); Объединенном иммунологическом форуме 2024, Псковская область, Пушкинские горы (2024 г.).

### **Личный вклад автора**

Автор представленного диссертационного исследования, принимал непосредственное участие во всех этапах научной работы от планирования

экспериментов, до их постановки, анализа данных, а также написания научных статей по полученным результатам. Представленное диссертационное исследование полностью написано автором.

### **Объем и структура диссертации**

Объем диссертационного исследования 255 страницы. Рукопись состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и обсуждения полученных данных, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы состоит из 294 источников (6 русскоязычных и 288 англоязычных). Диссертация иллюстрирована 46 рисунками и 8 таблицами.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Лабораторные животные.** Экспериментальную работу проводили на мышах, поддерживаемых братско-сестринским скрещиванием в питомнике ФГБНУ «ЦНИИТ». В экспериментальную работу брали самок мышей в возрасте от 2 до 4 месяцев и весом от 20 до 25 г., содержащихся в условиях конвенционального вивария при фиксированном световом режиме 12:12 часов – день: ночь, с доступом к воде и корму *ad libitum*. В работе использовали мышей инбредных линий: C57BL/6Cit (B6), I/StYCit (I/St), A/JsnYCit (A/Sn), а также линии мышей дефицитных по SapD – C57BL/6-SapD<sup>-/-</sup>, гибридов второго поколения F2(I/StxA/Sn) – F2.

**Пациенты, вовлеченные в исследование.** В исследование, посвященное изучению развития воспаления у пациентов с диагнозом ТБ легких вошли 150 пациентов с активным ТБ (50 человек – с туберкулезом без распада, 50 человек – с туберкулезом с распадом и 50 человек – ФКТ). Группой сравнения в исследовании служила группа из 50 здоровых добровольцев без ТБ в анамнезе. В исследование по изучению развития воспаления при ко-инфицировании *M. tuberculosis* и SARS-CoV2 вирусом вошли 80 пациентов с активным туберкулезом легких (туберкулезом) (30 человек с туберкулезом, без COVID-19; 30 человек с туберкулезом, перенесшие COVID-19 за 3 месяца до включения в исследование; 20 человек с туберкулезом и активным COVID-19. Для исследований *in vitro* с получением культуры макрофагов из моноцитов крови человека использовали цельную венозную кровь здоровых добровольцев. Все лица, вошедшие в исследования, подписали бланк добровольного

информированного согласия участия в научном исследовании до момента начала исследования. Все исследования с использованием человеческого биоматериала соответствовали Хельсинкской декларации и были одобрены ЛЭК ФГБНУ «ЦНИИТ».

**Получение культуры *M. tuberculosis*, инфицирование мышей, антигены микобактерий.** Биомассу *M. tuberculosis* получали при помощи метода (Nikonenko B.V. et al., 2000) рутинно применяемого в лаборатории. Для моделирования ТБ процесса *in vivo* использовали внутривенное инфицирование ( $5 \times 10^5$  КОЕ/мышь или  $10^6$  КОЕ/мышь) либо аэрозольное инфицирование (100 КОЕ/мышь). Соникат *M. tuberculosis* (растворимая фракция ультразвукового дезинтеграта бактерий) использовали в качестве антигенов микобактерий в ряде экспериментов *in vitro* (Авдиенко и коллеги, 2006).

**Определение бактериальной нагрузки органов инфицированных мышей.** Десятикратные серийные разведения суспензий внутренних органов высевали на чашки Петри с агаром Мидлбука 7H10 (HyMedia, Индия). Подсчет образовавшихся колоний бактерий проводили через 21 день инкубации при 37°C.

**Динамика потери веса и построение кривой выживания инфицированных мышей.** Динамику потери веса инфицированных мышей оценивали путем взвешивания животных на лабораторных весах один раз в три дня на протяжении всего эксперимента. Динамику выживания инфицированных мышей отслеживали ежедневно, начиная со второй недели после заражения.

**Получение суспензии клеток селезенки.** Суспензию клеток селезенки мышей получали рутинным методом (Holt et al., 1985). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью раствора трипанового синего.

**Получение суспензии клеток легочной ткани.** Суспензию клеток легочной ткани готовили на льду в стерильных условиях при помощи модифицированной методики Holt и коллег (Holt et al., 1985; Lyadova et al., 1998). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью раствора трипанового синего.

**Получение суспензии макрофагов и культивирование макрофагов.** Суспензию интерстициальных легочных макрофагов получали на льду в стерильных условиях по методу, описанному Майоровым К.Б. и коллегами (Majorov KB et al., 2003). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью раствора трипанового синего. Содержание неспецифических

эстеразоположительных клеток составляло более 80%. Суспензию перитонеальных макрофагов получали на льду в стерильных условиях по методу, рутинно применяемому в лаборатории (Majorov KB et al., 2003). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью раствора трипанового синего. Культуру макрофагов человека получали из цельной венозной крови доноров методом, рутинно применяемом в лаборатории (Шепелькова ГС и коллеги, 2024). Культивирование макрофагов человека и мыши проводили как в присутствии, так и в отсутствии разного количества *M. tuberculosis* либо сониката микобактерий; а также как в присутствии, так и в отсутствии разного количества высокодифференцированных эффекторов. В ряде экспериментов в культуру к макрофагам мыши вносили рекомбинантный мышиный IFN $\gamma$  (MERCK, Sigma Aldrich, США) (100 Ед/лунка) и/или селективный ингибитор iNOS – L-NIL (R&D Systems, США) (0,5 mM/лунка).

**Получение субпопуляций высокоочищенных Т лимфоцитов CD4<sup>+</sup>.** Высокоочищенные субпопуляции Т лимфоцитов CD4<sup>+</sup> для серии экспериментов *in vitro* получали с помощью сортировки/выделения клеток в магнитном поле. Для выделения субпопуляций использовали наборы CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit, mouse и Anti-PE MicroBeads (Miltenyi Biotec, Германия), а также PE-anti-CD27 (клон LG.3A10), PE-anti-CD62L (клон MEL-14) (оба антитела BD bioscience, США) в соответствии с инструкцией фирмы. Чистоту полученных субпопуляций высокодифференцированных эффекторов оценивали с использованием метода проточной цитофлуорометрии.

**Определение бактериостатической активности макрофагов и жизнеспособности *M. tuberculosis* в культурах с макрофагами.** Бактериостатическую активность макрофагов оценивали по генерации NO<sup>•</sup> последними в модели *in vitro* по методу, описанному Majorov K.B. et al., рутинно применяемому в лаборатории биотехнологии ФГБНУ «ЦНИИТ» (Majorov K.B. et al., 2003). О жизнеспособности *M. tuberculosis* в смешанных культурах с макрофагами судили по избирательному включению бактериями урацила, меченного тритием ([<sup>3</sup>H]-урацил) (Majorov K.B. et al., 2003).

**Ультрафильтрация супернатантов смешанных культур.** Метод ультрафильтрации на ячейке Amicon 8010 с фильтрами milipore PLGC 10000 и

PLAC 3000 (MERCK, Millipore, США) использовали для получения растворов с разными по молекулярной массе органическими соединениями (кДа).

**Анализ поверхностного фенотипа клеток методом проточной цитофлуориметрии.** Анализ поверхностного фенотипа субпопуляций клеток проводили с использованием антител к поверхностным клеточным рецепторам CD4, CD8, CD19, CD11b, CD11c, CD27, CD62L, F4/80 и Ly6G, меченных FITC, PE, PerCP, APC (BD bioscience, США и Biolegend, США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (BD bioscience, США).

**Гистологические исследования.** При работе с использованием модели ТБ на мышах при помощи криотома (ThermoShandon, Великобритания) получали крио-срезы ткани легкого толщиной от 8 до 12 мкм. Для получения парафиновых блоков ткани легкого (мышь либо человек) использовали автоматический гистопроцессор Leica asp300 (Leica Microsystems GmbH, Германия). Для заливки ткани в парафин использовали модульную станцию Leica eg1150 (Leica Microsystems GmbH, Германия). Гистологические срезы из парафиновых блоков, толщиной 2-4 мкм, изготавливали на ротационном микротоме Leica rm2125 rts (Leica Microsystems GmbH, Германия). Для окрашивания срезов ткани легкого использовали гематоксилин и эозином. Для выявления соединительной ткани и оценки уровня фиброза в легочной ткани применяли гистологическую окраску по Ван Гизону. Иммуногистохимическое окрашивание нейтрофилов проводили с использованием анти-Ly-6G антител, конъюгированных с пероксидазой хрена.

**Определение концентрации цитокинов и хемокинов.** Для определения концентрации цитокинов и хемокинов в модели ТБ на мышах (TNF, IFN $\gamma$ , IL6, IL11, IL12, IL10, Cxcl2), а также в человеческом биоматериале (TNF, IFN $\gamma$ , IL6, IL11, IL17, IL38, Cxcl2, Cxcl1, G-CSF) использовали наборы ELISA MAX(TM) Deluxe Set (Biolegend, США) и DuoSet ELISA (R&D Systems, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

**Выделение геномной ДНК.** Геномную ДНК из крови здоровых доноров выделяли с помощью набора Genomic DNA purification kit (Promega, США) согласно рекомендациям фирмы изготовителя.

**Выделение суммарной РНК и получение кДНК.** Для выделения суммарной ДНК из легочной ткани и культуры клеток мыши использовали miRNeasy Tissue/Cells Advanced Kits (QIAGEN, Германия) в соответствии с

рекомендацией фирмы изготовителя. Выделение суммарной РНК из образцов сыворотки крови человека проводили с помощью TRIzol LS (ThermoFisher Scientific (Invitrogen), США) в соответствии с инструкцией производителя, без дополнительных модификаций. В дальнейшем эти образцы РНК использовали в качестве матрицы для miScript miRNA (QIAGEN, Германия) и ПЦР в реальном времени. TRIzol® Reagent (ThermoFisher Scientific (Ambion), США) использовали для выделения суммарной РНК из биопсийного материала легочной ткани человека. Для получения кДНК использовали набор SuperScript™ III Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями изготовителя. кДНК для miRs получали с помощью набора TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific (Applied Biosystems), США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

**Определение экспрессии генов.** Для определения уровня экспрессии генов использовали метод полуколичественного ПЦР в реальном времени (TaqMan®). Для постановки ПЦР использовали коммерческие наборы TaqMan™ Gene Expression Assay и TaqMan miRNA Assays (все наборы ThermoFisher Scientific (Applied Biosystems), США). В качестве контроля с постоянным уровнем экспрессии использовали GAPDH, miR-103 и miR-186.

Для определения профиля экспрессии генов факторов воспаления в легочной ткани мышей при экспериментальной ТБ инфекции использовали микрочип Agilent mouse 4x44k (Agilent Technologies, Германия). Для определения профиля экспрессии генов miRs в образцах сыворотки крови человека использовали набор miScript miRNA PCR Arrays (QIAGEN, США). Полученные данные были проанализированы с помощью специального программного обеспечения GeneGlobe от QIAGEN.

**Электрофорез.** Электрофорез нуклеиновых кислот (ДНК) проводили в агарозных гелях с концентрацией агарозы 2 и 4% в трис-ацетатном буфере. Для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля использовали набор CleanAmp (Евроген, РФ) в соответствии с рекомендациями производителя. Электрофорез белков проводили в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Лэммли.

**Трансформация и трансфекция.** Метод электропорации использовали для трансформации M15 штамма *E. coli*. Для стимулирования повышенной



экспрессии miR-222-3p и miR-191-5p использовали синтетические аналоги вышеупомянутых miRs. Для осуществления трансфекции использовали набор HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Германия) в соответствии с рекомендациями изготовителя.

**Металл-хелатная хроматография.** Для выделения и очистки исследуемых белков в ряде экспериментов использовали метод металл-хелатной хроматографии. Гомогенаты индуцированных культур M15 *E. coli* центрифугировали и полученный супернатант (содержит фракцию растворимых белков) вместе с NaCl наносили на колонку WorkBeads 40Ni (Pharmacia). Искомый белок элюировали с колонки в градиенте имидазола. Метод Бредфорда использовали при определении концентрации белков.

**Наработка антител к мышинному IL11.** Нарработку анти-IL11 IgG-антител проводили в соответствии с методикой, подробно описанной Капиной М.А. и коллегами (Karina MA et al., 2011).

**Биоинформатический анализ данных Agilent микроаррея.** Анализ данных проводили при помощи пакета программ R, а также в пакете программ от BioConductor (Gentleman RC et al., 2004) таких как: Agi4x44PreProcess, affycoretools, RankProd, GOstats. Предварительная обработка данных включала коррекцию фона («normexp»), нормирование, суммирование зондов и представление в виде log2. Для определения функциональной характеристики ЗИ-генов проводили оценку с использованием методов онтологии – GOstats. Уровни экспрессии генов сравнивали с тканеспецифичными паттернами, описанными в BioGPS.

**Анализ данных методом ROC кривых.** Для оценки диагностической ценности дифференциально экспрессированных miRs использовали пакет программ MedCalc версии 19.8.0 (MedCalc Software Ltd., Остенде, Бельгия) для построения ROC-кривых. Площади под ROC-кривыми (AUC) использовали для сравнения значимости тестов.

**Статистическая обработка данных.** Для статистического анализа полученных данных использовали пакет программ GraphPad Prism версии 8.0.1. Для сравнения изменений между группами использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением и *t*-тест. При сравнении более двух групп применяли поправку на множество Бонферрони; *p*-значения меньше или равные

0,05 считались значимыми. Данные представлены в виде  $M \pm SEM$  (стандартная ошибка среднего). Корреляции между количественными переменными проводили с помощью анализа Спирмена (GraphPad Software, Inc., США и программа R, <http://www.r-project.org>). Выбор наилучшей модели, предсказывающей прогрессирование заболевания, проводили с помощью множественного регрессионного анализа, используя F-тест для вложенных моделей и информационный критерий Акаике.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Микобактерия сосуществует с человеком на протяжении тысячелетий. Подавляющему большинству Mtb-инфицированных индивидов удается сдержать прогрессирование латентной ТБ инфекции до активного ТБ, однако, они несут пожизненный риск реактивации инфекции. Вопрос о том, насколько сильное воспаление и какие особенности воспаления уравнивают прогрессирование ТБ по сравнению с латентностью ТБ, является предметом интенсивных исследований. Ключевой элемент в протекции при ТБ – тканевой макрофаг. Именно эти клетки играют решающую роль в элиминации патогена, киллинге микобактерий. Следовательно, актуальность исследования процессов воспаления, опосредованных взаимодействием врожденных и адаптивных иммунных реакций, а именно – активация макрофагов Т-клетками – несомненна.

Выяснение молекулярных и фенотипических событий, определяющих исход инфекции в макрофагах, имеет фундаментальное значение для понимания ключевых особенностей этих клеток, которые столь важны для борьбы с инфекцией.

В нашей работе мы использовали два подхода для исследования активации бактериостатической функции макрофагов при ТБ инфекции:

1. взаимодействие механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответов, а именно – активация макрофагов Т-клетками;
2. влияние механизмов врожденного иммунного ответа, опосредованного Сапозин D (Sap D).

С использованием *in vitro* модели ТБ было показано, что даже единичные высокодифференцированные лимфоциты  $CD4^+ CD62L^{lo} CD27^{lo}$  способны активировать бактериостатическую функцию макрофагов (Мф), что в итоге

приводит к существенному подавлению роста микобактерий. В результате изучения механизмов данной активации установлено, что высокодифференцированные Th1 эффекторы с фенотипом  $CD4^+ CD62L^{lo} CD27^{lo}$  намного эффективнее, чем эффекторы  $CD4^+ CD62L^{lo} CD27^{hi}$ , активируют как перитонеальные (соотношение Мф: Т клетка от 125:1 до 625:1) (рис. 1А, Б), так и легочные интерстициальные макрофаги (соотношении Мф: Т клетка = 5:1) (рис. 1Д, Е).

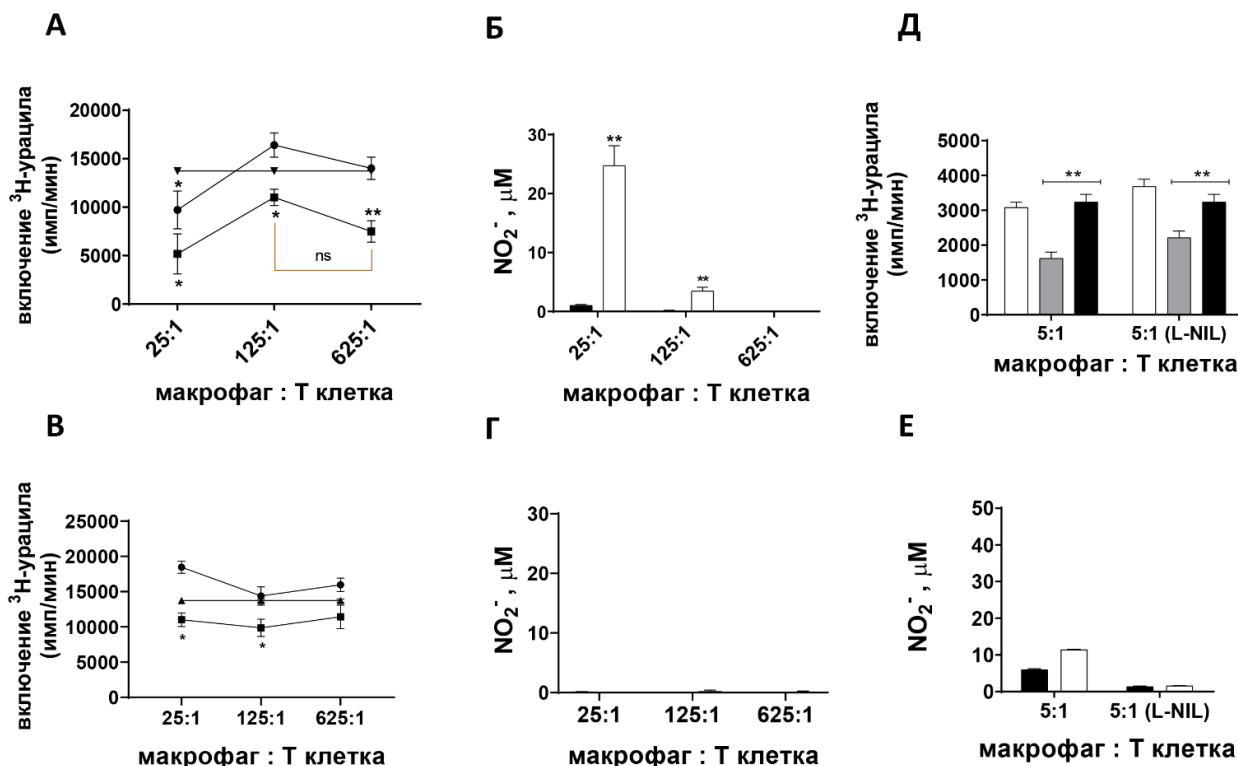


Рисунок 1. Селективное ингибирование iNOS не влияет на антимикобактериальную активность макрофагов

Мф перитонеального экссудата (А-Г) и интерстициальные Мф легочной ткани мышей линии В6 культивировали *in vitro* с Mtb (Mtb: макрофаг = 5:1) (▲, ■-столбики) и Т-лимфоцитами CD27<sup>hi</sup> (●, □-столбики) и CD27<sup>lo</sup> (■, ▨-столбики), а также в присутствии селективного ингибитора iNOS – L-NIL (В, Г). Через 72 часа в культурах измеряли включение 3Н-урацила (А, В, Д) и количество (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) – (Б, Г, Е). \* - достоверное отличие от контроля (p < 0,05); ns – отсутствие достоверных отличий.

Данный механизм активации не зависит от продукции активных форм азота (рис. 1В-Е). Причем для активации Т лимфоцитами антимикобактериальной функции макрофагов необходимо контактное взаимодействие клеток (макрофага и Т-эффектора), после которого секретируется фактор с молекулярной массой от 1 до 10 кДа, активирующий макрофаги (рис. 2).

Так как в нашей работе было продемонстрировано, что CD27<sup>lo</sup> Т клетки эффективнее запускают бактериостатическую функцию как перитонеальных (Мф: Т лимфоцит от 125:1 до 625:1), так и легочных макрофагов (Мф: Т лимфоцит = 5:1), возникло предположение, что меньшая эффективность CD27<sup>hi</sup> Т лимфоцитов в активации макрофагов при ТБ может быть связана с тем, что CD27<sup>hi</sup> должны додифференцироваться до CD27<sup>lo</sup>. Для проверки этой гипотезы нами была получена растворимая форма белка CD70 (sCD70). sCD70 не влиял на способность макрофагов продуцировать NO<sup>•</sup> и на активацию их бактериостатической функции в культурах, содержащих CD27<sup>lo</sup>. В культурах же, содержащих Th1 клетки CD27<sup>hi</sup> продукция (NO<sub>2</sub>)<sup>-</sup> не менялась, а включение микобактериями [<sup>3</sup>H]-урацила незначительно уменьшалось (табл. 1).

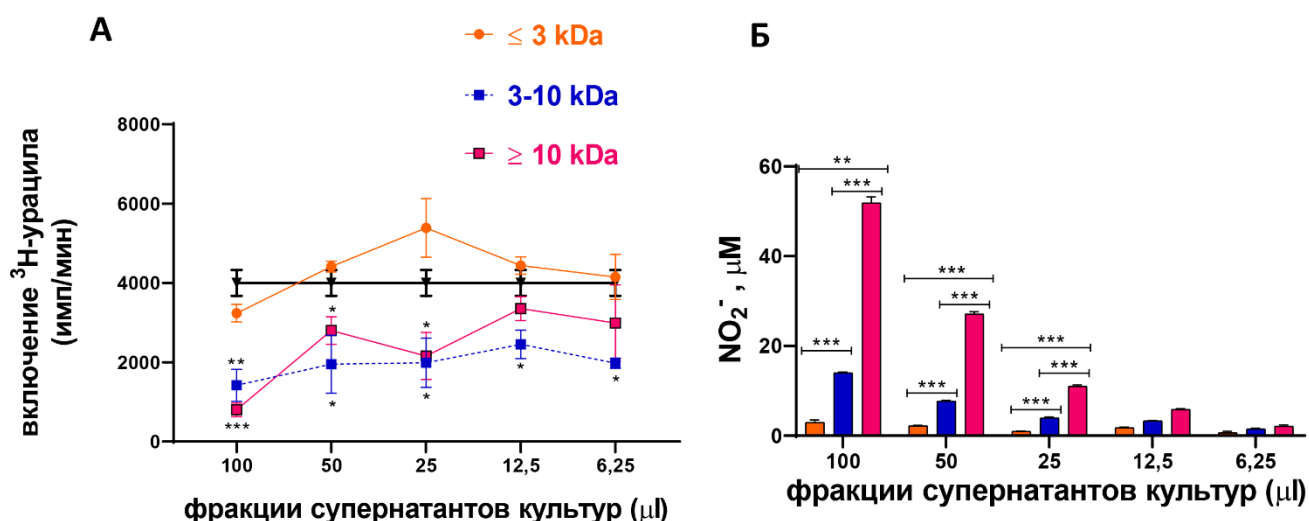


Рисунок 2. Фракция 24-часового супернатанта культуры (Мф+ Mtb + CD27<sup>lo</sup>), содержащая факторы с молекулярной массой 3-10 кДа запускает NO-независимый механизм бактериостатической активации макрофагов

Мф перитонеального экссудата мышей В6 культивировали с Mtb (▲) и супернатантами культур (Мф+Мtb+CD27<sup>hi</sup>) (●, □-столбики) и (Мф+Мtb+CD27<sup>lo</sup>) (■, ■-столбики) или с фракциями факторов культуры (Мф+Мtb+CD27<sup>lo</sup>). Через 72 часа культивирования в культурах измеряли включение <sup>3</sup>H-урацила (А) и концентрацию (NO<sub>2</sub>)<sup>-</sup> (Б). (\* - p < 0,05; \*\* - p < 0,001; \*\*\* - p < 0,0001).

Таким образом, Т лимфоциты CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup>CD27<sup>hi</sup> также способны активировать бактериостатическую функцию макрофагов, но для эффективной активации им необходимо додифференцироваться до эффекторов с фенотипом CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup>CD27<sup>lo</sup>.

Таблица 1. Активация бактериостатической функции макрофагов под действием сигналинга CD70-CD27

|                               | включение $^3\text{H}$ -урацила,<br>имп/мин |                          | $(\text{NO}_2)^-$ , $\mu\text{M}$ |                     |
|-------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------|
|                               | без sCD70                                   | + sCD70                  | без sCD70                         | + sCD70             |
| Mtb                           | 10874 $\pm$ 657                             | 11252 $\pm$ 1001         | 1,4 $\pm$ 0,6                     | 1,8 $\pm$ 0,8       |
| Мф+Mtb                        | 8471 $\pm$ 1251                             | 7123 $\pm$ 524           | 1,5 $\pm$ 0,2                     | 2,3 $\pm$ 0,7       |
| Мф+Mtb+Th1 CD27 <sup>lo</sup> | 3257 $\pm$ 853**                            | 3974 $\pm$ 549**         | 27 $\pm$ 3 ***                    | 26 $\pm$ 2,2<br>*** |
| Мф+Mtb+Th1 CD27 <sup>hi</sup> | 3962 $\pm$ 867**                            | 2020 $\pm$ 728<br>***(†) | 19 $\pm$ 5**                      | 18 $\pm$ 3<br>**(†) |

Мф – макрофаги перитонеального экссудата мышей В6; Mtb – *M. tuberculosis*; Th1 CD27<sup>hi</sup> – Т лимфоциты с поверхностным фенотипом CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>CD27<sup>hi</sup>; Th1 CD27<sup>lo</sup> – Т лимфоциты с поверхностным фенотипом CD4<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>CD27<sup>lo</sup>; \* - достоверное отличие от контроля, инфицированных Мф (\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\* -  $p < 0,0001$ ); † - достоверное отличие между группами с разными эффекторными Т лимфоцитами ( $p < 0,05$ ).

Иным подходом к исследованию активации бактериостатической функции макрофагов при ТБ инфекции является изучение влияние механизмов врожденного иммунного ответа, опосредованного сапозин D (Sap D). Основная функция сапозина – участие в индукции катаболизма и деградации мембран за счет представления липидов лизосомальным гидролазам (Kishimoto Y. Et al., 1992). Кроме того, Sap D вовлечен в процесс «киллинга» микобактерий, что и подтверждается результатами наших исследований. В нашей работе было продемонстрировано, что для макрофагов мышей В6-SapD-ko (Мф перитонеального экссудата и интерстициальные легочные) в сравнении с клетками мышей дикого типа характерна низкая бактериостатическая активность, на которую существенно не влияет наличие gmIFN $\gamma$  (рис. 3). Восстановление недостатка Sap D за счет инфицирования Мф лентивирусом, содержащим последовательность искусственного гена *sap d* человека, привело к восстановлению бактериостатической активности Мф до уровня Мф дикого типа (рис. 3Г). Исходя из результатов нашего исследования можно сделать предположение о том, что восстановление активности Мф в данном случае может

быть обусловлено как собственной бактерицидной способностью Sap D, так и вероятным сдвигом в катаболизме сфинголипидов.

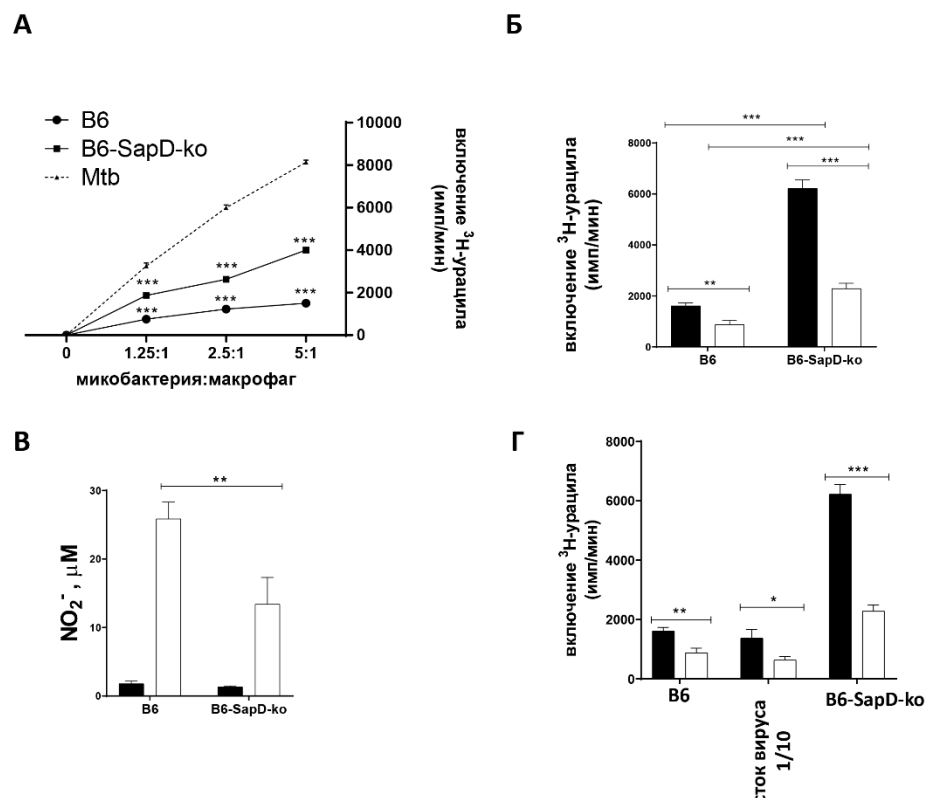


Рисунок 3. Макрофаги мышей B6-SapD-ko значительно уступают макрофагам мышей дикого типа в способности контролировать рост *M. tuberculosis* при инфицировании *in vitro*.

Легочные интерстициальные Мф (А) и Мф перитонеального экссудата (■) (Б, В) культивировали совместно с *Mtb*. В культурах оценивали включение 5,6-[<sup>3</sup>H]-урацила (А, Б) и концентрацию (NO<sub>2</sub>)<sup>-</sup>. Мф+*Mtb*+rmIFN $\gamma$  (100 Ед/мл) (□). \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

В экспериментах *in vivo* на мышах B6-SapD-ko было продемонстрировано, что недостаток Sap D в организме снижает способность экспериментальных животных противостоять ТБ. Это выражается в существенных различиях микобактериальной нагрузки в органах инфицированных животных. Так, установлено, что микобактериальная нагрузка у SapD-ko инфицированных мышей достоверно выше, чем у животных дикого типа (wt) (рис. 4А), что полностью согласуется с нашими результатами экспериментов *in vitro*. Легочная ткань «наивных» SapD-ko мышей инфильтрирована большим количеством макрофагов по сравнению с wt животными. При инфицировании *Mtb* высокое содержание

нейтрофилов было показано для B6-SapD-ko мышей в отличие от мышей wt (рис. 4Б, В).

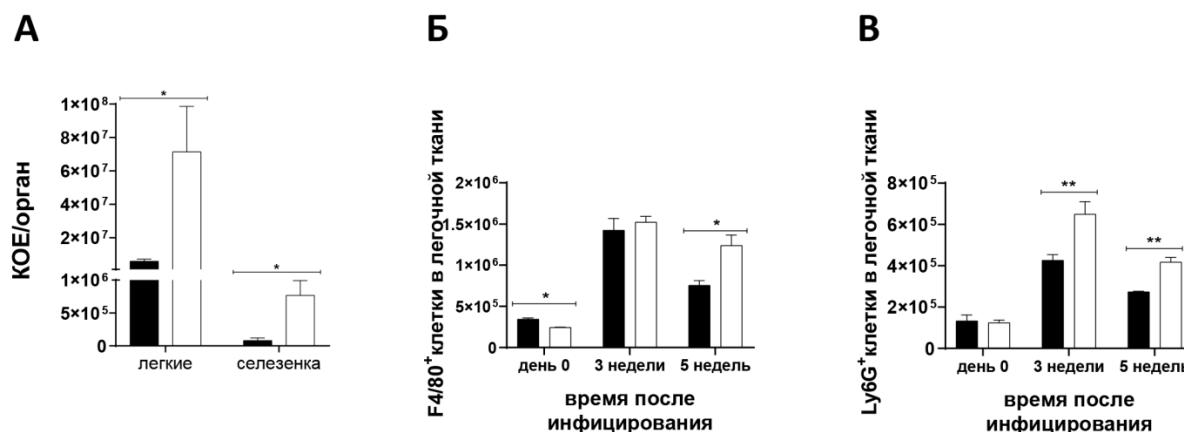


Рисунок 4. Влияние недостатка Sap D на формирование противотуберкулезного иммунного ответа при экспериментальном ТБ *in vivo*

А – бактериальная нагрузка органов мышей B6 (■) и B6-SapD-ko (□) после инфицирования *M. tuberculosis*; инфильтрация легочной ткани «наивных» и инфицированных Mtb мышей макрофагами F4/80<sup>+</sup> (Б) и нейтрофилами Ly6G<sup>+</sup> (Г). \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

Иными словами, недостаток в организме хозяина Sap D при ТБ инфекции ведет к усилению воспалительных реакций и влияет на предрасположенность к апоптозу клеток легкого.

Однако развитие воспалительного ответа, как и исход инфекции, определяются не только и не столько элиминацией патогена, но и генетической предрасположенностью хозяина, и качеством, и интенсивностью тканевого ответа. Эпидемиологические исследования начиная со второй трети XX века свидетельствуют о том, что у некоторых людей может происходить раннее очищение организма от Mtb (Mayer-Barber KD et al., 2014; Morrison J et al., 2008; Mahan CS et al., 2012). Тем не менее, до настоящего времени недостаточно информации о врожденном иммунитете и развитии воспаления у лиц, успешно предотвращающих Mtb-инфекцию. Открытым остается вопрос о том, какие врожденные или естественные механизмы способствуют такому благоприятному исходу. Отвечают ли за раннюю борьбу с ТБ различные воспалительные паттерны в пневмоцитах или их клеточно-клеточная коммуникация с резидентными иммунными клетками.

Для поиска различий в развитии воспалительного ответа при ТБ мы использовали линии мышей с оппозитной чувствительностью к ТБ (I/St – чувствительные к ТБ; A/Sn – устойчивые к ТБ) и гетерогенную по чувствительности к инфекции популяцию гибридов F2 (I/StxA/Sn). С помощью полногеномного микроаррея мы сравнили изменения в экспрессии генов в легочной ткани инфицированных мышей с оппозитной чувствительностью к ТБ. Оценка изменения экспрессии генов с использованием методов онтологии (GO-элементы), а также анализ путей активации воспаления выявили межлинейные различия в путях активации антигенной презентации, NK, Т и В клеток (табл. 2). Было продемонстрировано, что при инфицировании устойчивых к ТБ животных в очаге инфекции уровень экспрессии изменяется у большего числа генов, чем в случае с инфицированием чувствительных к ТБ мышей, что может указывать на более сложный и многогранный ответ на инфекцию у резистентных к ТБ животных (рис. 5А). Анализ также показал, что у мышей I/St наблюдалась повышенная активация генов, вовлеченных в реакции воспаления, ассоциированные с ответом нейтрофилов (табл. 2), что было подтверждено данными полуколичественной ПЦР в реальном времени и иммуногистохимии (рис. 5Б, Г, Д). Кроме того, у чувствительной к ТБ линии мышей I/St была обнаружена специфическая постинфекционная регуляция ингибиторов цистеиновых протеаз (рис. 5В).

Исследования на генетически гетерогенных потомках F2 (I/St x A/Sn) позволили нам использовать «естественную» генетически не модифицированную популяцию и напрямую связать межлинейные различия, выявленные у мышей I/St и A/Sn, с защитой или патологией при ТБ. Корреляционный анализ инфильтрации ткани легкого субпопуляцией нейтрофилов с фенотипом Gr-1<sup>dim</sup> со степенью развития кахексии при ТБ показал, что накопление данных клеток у мышей F2 коррелирует с прогрессированием инфекции. То есть мы установили, что в гетерогенной популяции мышей F2 основной характеристикой прогрессирования заболевания была не нагрузка ткани легкого микобактериями и не дефицит факторов, поддерживающих антибактериальный иммунитет. Скорее, прогрессирование ТБ было связано с интенсивной воспалительной реакцией, вызванной фагоцитирующими клетками хозяина, и проявлялось в повышенной



экспрессии факторов воспаления IL1 $\beta$ , IL11, Cxcl2, Mmp-8 и прогрессирующем накоплении нейтрофилов в легочной ткани (табл. 3).

Таблица 2. Анализ изменения экспрессии с использованием метода онтологии генов (GO-элементов)

| GO-элемент                                        | Количество<br>взаимосвя-<br>занных генов | I/St                   |        | A/Sn                   |        |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------|--------|------------------------|--------|
|                                                   |                                          | кол-во<br>ЗИ-<br>генов | р      | кол-во<br>ЗИ-<br>генов | р      |
| Гомеостаз нейтрофилов                             | 5                                        | 2                      | 0,029  |                        |        |
| Положительная регуляция<br>процесса биосинтеза NO | 20                                       | 6                      | 0,001  |                        |        |
| Процессинг и презентация<br>антигенов             | 43                                       | 13                     | 0,0001 | 27                     | 0,0001 |
| Иммунитет,<br>опосредованный NK-<br>клетками      | 22                                       | 6                      | 0,001  | 10                     | 0,0001 |
| Активация $\gamma\delta$ Т-клеток                 | 8                                        |                        |        | 4                      | 0,003  |
| Активация Т-клеток                                | 184                                      | 25                     | 0,0001 | 53                     | 0,0001 |
| Пролиферация Т-клеток                             | 87                                       | 11                     | 0,011  | 23                     | 0,0001 |
| Регуляция<br>дифференцировки Т-клеток             | 46                                       | 6                      | 0,046  | 17                     | 0,0001 |
| Активация В-клеток                                | 109                                      | 12                     | 0,022  | 24                     | 0,0001 |
| Дифференцировка В-клеток                          | 49                                       |                        |        | 11                     | 0,003  |
| Пролиферация В-клеток                             | 37                                       |                        |        | 8                      | 0,012  |

ЗИ – значимые изменения уровня экспрессии генов

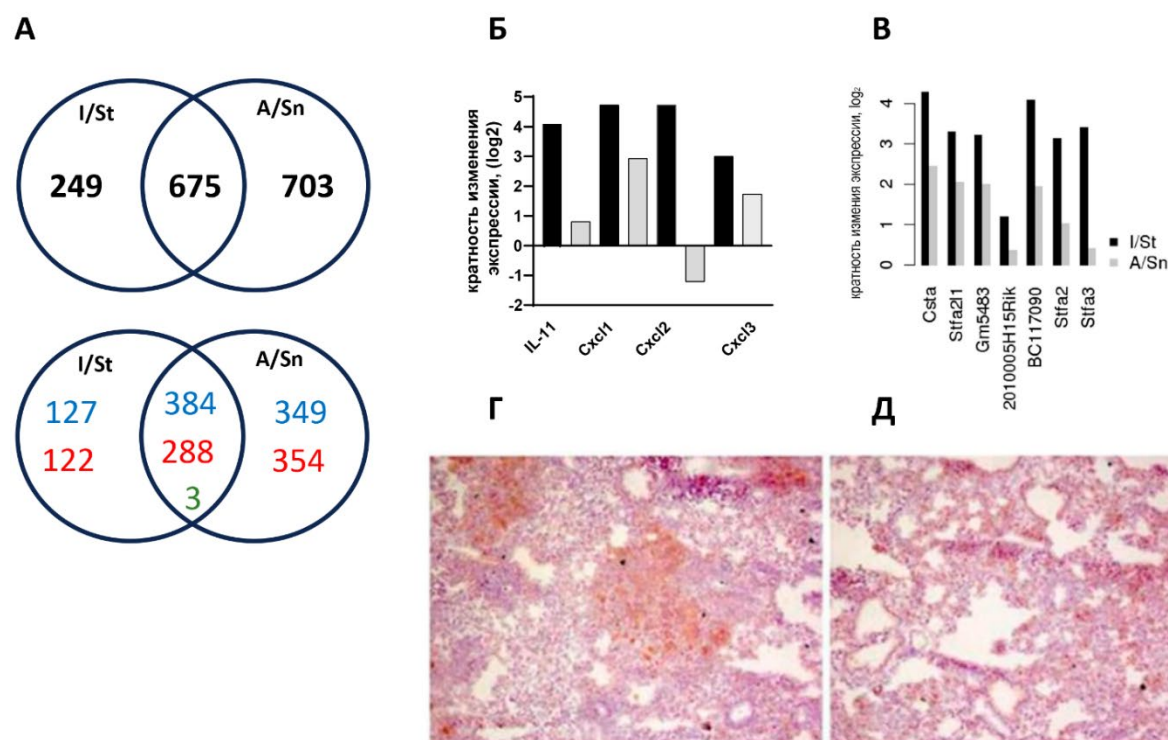


Рисунок 5. Различия в развитии воспалительного ответа в легочной ткани инфицированных *M. tuberculosis* устойчивых (A/Sn) (■) и чувствительных (I/St) (■) к ТБ линий мышей

А - Диаграмма Венна для генов со значимыми изменениями уровня экспрессии после инфицирования *Mtb* в легочной ткани мышей линий A/Sn и I/St. Гены с увеличенным уровнем экспрессии - синие, гены с пониженным уровнем экспрессии - красные, противоположно регулируемые гены у линий мышей с оппозитной чувствительностью к ТБ – зеленые. Б – изменения экспрессии (log2) генов в легочной ткани мышей I/St и A/Sn после инфицирования *Mtb* относительно «наивного» контроля; В – изменения экспрессии генов цистатинов 1 типа (стефины); Г-Д – нейтрофильная инфильтрация (окраска на маркер Ly6G) легких мышей I/St (Г) и A/Sn (Д) после заражения (увеличение x125) (гематоксилин-эозин).

Таблица 3. Корреляция между потерей веса, микобактериальной нагрузкой и экспрессией провоспалительных факторов, а также инфильтрацией нейтрофилов в легких мышей F2(I/St x A/Sn)

| переменная характеристика                               | r           | p                 |
|---------------------------------------------------------|-------------|-------------------|
| микобактериальная нагрузка легочной ткани               | <b>0.33</b> | <b>0.0038</b>     |
| IL1 $\beta$                                             | <b>0.51</b> | <b>&lt;0.0001</b> |
| IL11                                                    | <b>0.42</b> | <b>0.0002</b>     |
| Cxcl2                                                   | <b>0.36</b> | <b>0.013</b>      |
| Mmp-8                                                   | <b>0.46</b> | <b>&lt;0.0001</b> |
| количество Gr-1 <sup>dim</sup> -клеток в легочной ткани | <b>0.65</b> | <b>&lt;0.0001</b> |

Учитывая важность функции легких для гомеостаза млекопитающих и относительно низкий потенциал регенерации респираторной паренхимы, восстановление функции данного органа без повреждений следует рассматривать как перспективную цель для будущих стратегий терапевтического вмешательства.

Лучшее понимание путей, приводящих к некрозу легочной ткани и кавитации, может способствовать разработке пациент-ориентированной терапии, направленной на спасение органа. Для таких исследований необходимы более совершенные экспериментальные модели, развитие ТБ воспалительного ответа в которых сходно с таковым у человека. Кроме того, требуется более детальная оценка степени нарушения дыхательных функций во время болезни и разработка новых вариантов противотуберкулезной терапии с целью заживления патологических очагов в легких. Новые стратегии терапии, помимо уничтожения *Mtb*, должны учитывать влияние долгосрочной химиотерапии на функциональную целостность легких. В наших исследованиях на модели *Mtb* инфекции у мышей линии I/St, чувствительной к ТБ, мы рассмотрели несколько вариантов регуляции развития ТБ воспаления *in vivo*. В качестве мишени для регуляции был выбран провоспалительный цитокин IL11, чья экспрессия и продукция, как было показано в наших исследованиях, ассоциировалась с прогрессированием развития воспаления, и как следствие, самой *Mtb* инфекции. Для регулирования уровня данного цитокина *in vivo* были использованы разные подходы: терапия поликлональными антителами к IL11 мыши и применение мутантной формы IL11.

Блок продукции IL11 на ранней стадии развития *Mtb* инфекции, а именно терапия поликлональными анти-IL11 IgG-антителами, приводил к значительному снижению уровня нейтрофилии ткани легкого и, как следствие, к уменьшению уровня микобактериальной нагрузки органов инфицированных мышей (рис. 6).

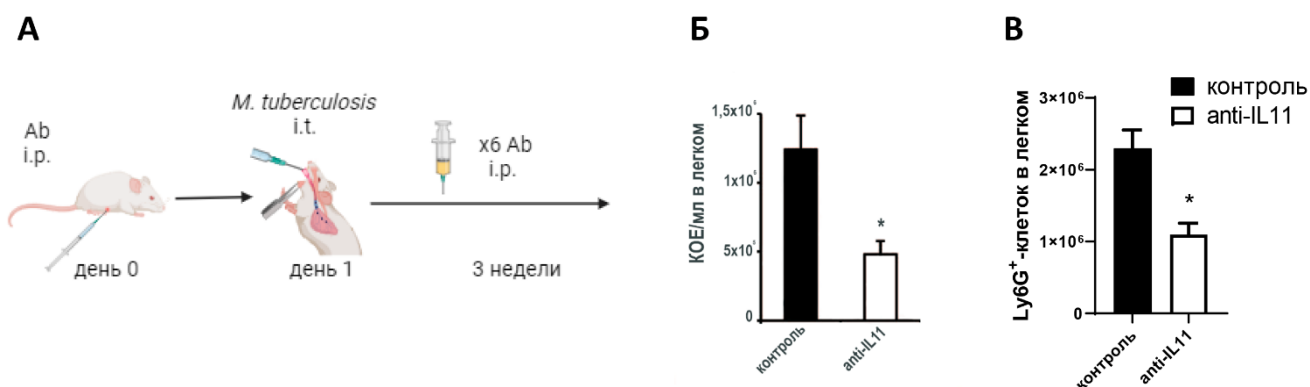


Рисунок 6. Применение анти-IL-11 антител значительно ослабляет интенсивность локального ТБ воспаления у чувствительных к ТБ мышей линии I/St (А) Схема блока IL-11 поликлональными антителами; (Б) микобактериальная нагрузка ткани легкого мышей I/St контрольной группы (■) и группы, получавший анти-IL-11 антитела (□); (В) нейтрофильная инфильтрация легочной ткани мышей I/St контрольной группы (■) и группы, получавший анти-IL-11 антитела (□).

По результатам наших исследований можно сделать вывод о том, что в организме чувствительных к ТБ мышей, на начальных этапах развития воспалительного противотуберкулезного ответа, сильно повышается и аутокринно поддерживается секреция IL11. Данное повышение продукции цитокина способствует развитию раннего воспаления с преобладанием нейтрофильных реакций → формированием в легочной ткани некротических гранул → развитию цитокинового шторма (Bonf FG et al., 2022), то есть к прогрессированию ТБ. Терапия антителами к мышинному IL11 способна модулировать данный процесс. Однако основным недостатком применения данной методики является иммуногенность «чужеродных» антител, которую невозможно полностью нивелировать (W.Y.K. Hwang and J. Foote, 2005; Laustsen A.H. et al., 2018; S. Oliveira et al., 2013; S. Muyltermans et al., 2001; U. Zavrtanik et al., 2018). Поскольку IL11 играет важную роль в модуляции ряда физиологических путей (Ernst M. Et al., 2014), его системное блокирование может иметь серьезные побочные эффекты; таким образом, местное введение блокирующего терапевтического агента в дыхательные пути может иметь очевидные преимущества в плане возможного клинического применения.

В следующей серии экспериментов для регуляции действия IL11 мы использовали генетический конструкт (rmIL11). rmIL11 – инактивированный вариант белка дикого типа способный взаимодействовать с рецепторным

комплексом gp130/IL11R с большим аффинитетом в сравнении с интактным IL11 (Underhill-Day N. Et al., 2003). Было показано, что местное, аэрозольное, введение rmIL11 оказывает более выраженное ингибирующее действие на клеточную инфильтрацию легочной ткани по сравнению с системным введением анти-IL11 IgG-антител; в последнем случае снижение числа клеток наблюдалось лишь только для субпопуляции нейтрофилов. При хронической инфекции *M. tuberculosis*, при которой чрезмерное накопление нейтрофилов в пораженных легких является скорее патогенным, чем защитным свойством (Eruslanov E.B. et al., 2005; Yermeev V.V. et al., 2015), селективное блокирование IL11 обеспечивает защитный эффект, возможно, в первую очередь за счет уменьшения притока нейтрофилов. Терапия мутантной формой IL11 способствует пролонгированию времени жизни инфицированных мышей. Также местная терапия rmIL11 приводила к подавлению экспрессии (IL6, mmp8, Cxcl1, TNF, IFN $\gamma$ , IL12) и продукции (IL6, TNF, IFN $\gamma$ ) основных факторов воспаления и самого IL11 (рис. 7), притом, что терапия немодифицированным цитокином, напротив, увеличивала выработку этих факторов.

В совокупности наши результаты наглядно демонстрируют патогенное влияние гиперпродукции IL11 в ответ на воздействие микобактерий и позволяют предположить его ключевую роль в патогенезе инфекции, вызванной *M. tuberculosis*.

Иной способ регуляции воспаления *in vivo* – регуляция, связанная с продукцией и активацией ряда транскрипционных факторов, задействованных в формировании воспалительного ответа. Эти сигнальные регуляторы контролируют интенсивность и продолжительность последующего ответа, такого как выработка различных цитокинов. В нашей работе в качестве мишени был выбран транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B – один из факторов, играющих ключевую роль в протекции при ТБ. NF- $\kappa$ B участвует в регуляции врожденного иммунного ответа против *Mtb*, а некоторые продукты *Mtb* способны модулировать ответ, опосредованный данным транскрипционным фактором. NF- $\kappa$ B регулирует продукцию воспалительных цитокинов фагоцитами (например, IL6, IL1 $\beta$  и TNF) (Poladian N. Et al., 2023). Таким образом, регуляция активации данного фактора может влиять на протекцию при ТБ.

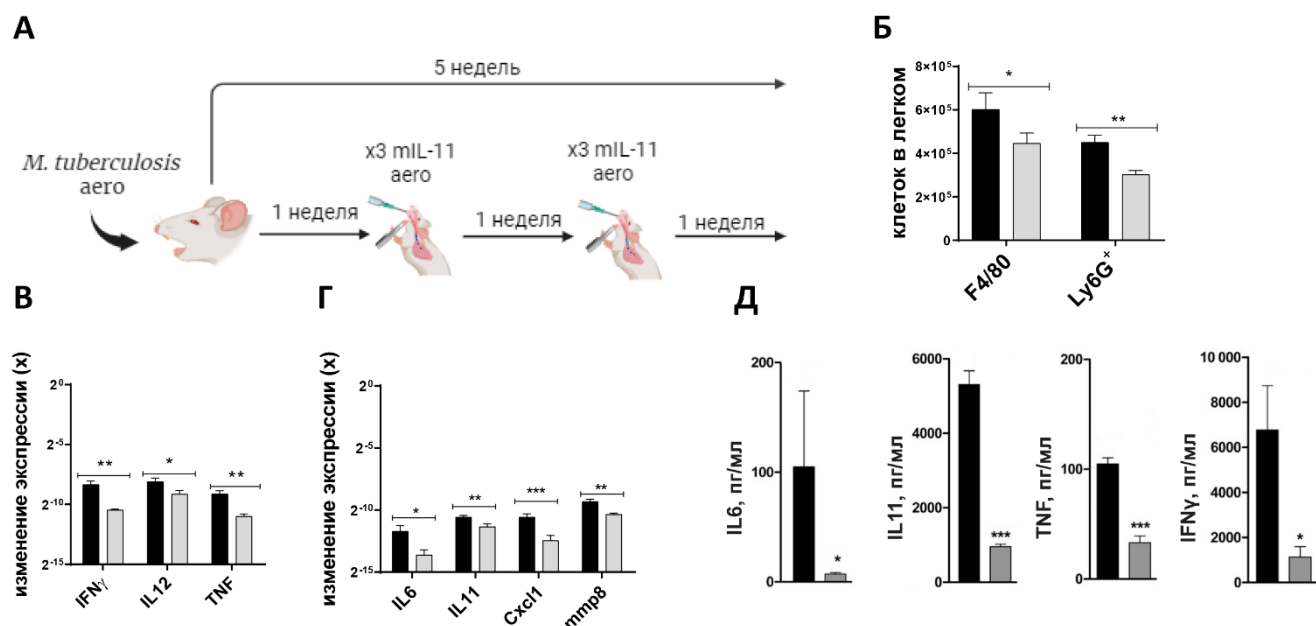


Рисунок 7. Действие rmIL11 на регуляцию уровня воспаления в легких мышей инфицированных *M. tuberculosis*

А – схема эксперимента; Б – инфильтрация легочной ткани Мф (клетки с фенотипом F4/80<sup>+</sup>) и нейтрофилами (клетки с фенотипом Ly6G<sup>+</sup>) в контрольной группе (■) и в группе мышей, получавших rmIL11 (■) после инфицирования; В-Г – экспрессия цито- и хемокинов в легочной ткани инфицированных Mtb мышей; Д – продукция цитокинов в легочной ткани инфицированных Mtb мышей.  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,0001$

В нашей работе было использовано селективное ингибирование классического пути активации NF- $\kappa$ B с помощью NBD-пептида, конкурентно взаимодействующего с NEMO субъединицей, и, тем самым блокирующего сборку IKK комплекса. Местный селективный блок активации транскрипционного фактора способствовал снижению интенсивности воспалительных реакций у инфицированных Mtb мышей линии I/St непосредственно в очаге инфекции (легком). Терапия инфицированных I/St мышей NBD-пептидом приводила к снижению экспрессии провоспалительных цитокинов (IL6, TNF) в легочной ткани; а также к уменьшению инфильтрации легочной ткани нейтрофилами, CD4 и CD8 Т-клетками (рис. 8). Стоит отметить, что местная регуляция активации NF- $\kappa$ B не влияла на уровень микобактериальной нагрузки легочной ткани, что полностью согласуется с нашими результатами, полученными на генетически гетерогенной популяции мышей F2 (I/St x A/Sn) (рис. 8).

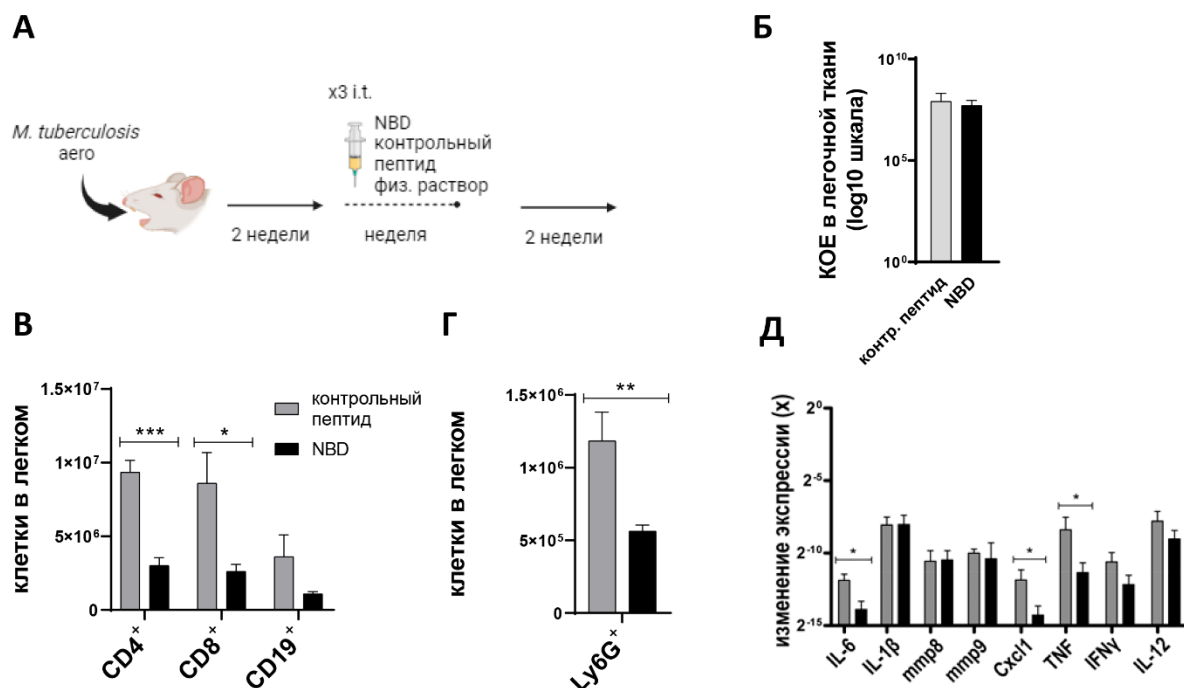


Рисунок 8. Локальное блокирование пути активации NF-κB не влияет на рост микобактерий, но ведет к снижению инфильтрации легочной ткани мышей чувствительных к ТБ через 5 недель после инфицирования

А – схема эксперимента; Б – микобактериальная нагрузка легочной ткани инфицированных *Mtb* мышей контрольной группы и группы (□), получавшей NBD-пептид (■); В-Г – субпопуляционный состав легочной ткани инфицированных *Mtb* мышей контрольной группы и группы (□), получавшей NBD-пептид (■); Д - экспрессия цито- и хемокинов в легочной ткани инфицированных *Mtb* мышей.  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,0001$ .

Таким образом, на сегодняшний день экспериментальные модели позволяют получить ответы на вопросы, касающиеся большинства аспектов физиологических и патологических реакций, развивающихся в инфицированном организме. И все же, окончательный ответ нуждается в подтверждении результатами, полученными в исследованиях с клетками человека, выделенными *ex vivo*, либо данными клинических исследований. Необходимо понимание того, как развивается воспаление у больных активным ТБ людей на периферии и непосредственно в очаге инфекции. Компоненты воспалительного ответа, регулирующие развитие туберкулезного воспаления (цитокины/хемокины/энзимы, а также клетки врожденного и адаптивного иммунного ответа) способны как подавлять, так и стимулировать локальные реакции иммунной системы.

ТБ гранулемы (туберкулемы) характеризуются динамичным поведением (Hussell T. Et al., 2014; Russell DG et al., 2010). Каждая гранулема проявляет автономность, и предсказать прогрессирование или изменение воспалительных паттернов в одной гранулеме сложно. Нарастание воспаления может приводить к прогрессированию процесса, «разжижению» области центрального некроза, образованию казеоза, формированию каверн, и, как следствие, распространению инфекции. Отдельные медиаторы воспаления способны ограничивать, либо потенцировать распространение ТБ в зависимости от времени и места их действия. Определенные компоненты системы защиты хозяина способны оказывать влияние не только на формирование гранулем, но также на их последующую трансформацию в каверны и, в конечном итоге, на распространение ТБ. Лучшее понимание путей, приводящих к прогрессированию болезни, может проложить путь к разработке рациональной терапии, направленной на хозяина. Необходимо понимание того, на каком этапе развития воспалительных процессов в очаге инфекции возможно применение хирургического лечения. Успех в применении данного типа лечения, как и отсутствие постоперационных осложнений, прежде всего зависят от уровня развития воспаления в легочной ткани пациента с ТБ. В связи с этим остро встает вопрос выявления маркеров, характеризующих тяжесть развития местного воспалительного ответа, а также свидетельствующих о прогрессировании ТБ. В наших исследованиях мы использовали зрелые сывороточные miRs в качестве таких маркеров. Нам не удалось найти ни одной публикации, в которой бы прослеживалась взаимосвязь между различной степенью активности деструктивных и воспалительных процессов при разных формах активного ТБ легких и уровнем экспрессии miRs. В нашем исследовании мы оценили различия в профилях экспрессии miRs в группах хирургических больных ТБ (туберкулема без распада; туберкулема с распадом; ФКТ) и соотнесли их с активностью и распространенностью туберкулеза. Таким образом, мы попытались найти биомаркеры, которые могли бы помочь врачу определить степень активности ТБ процесса и оценить целесообразность запланированной операции. В результате исследования был получен паттерн из 6 miRs (miR-155, miR-191, miR-223, miR-26a, miR-222, miR-320), по степени экспрессии которых можно охарактеризовать



изменение степени деструкции и активности воспалительных процессов ТБ легких (рис. 9). Изменение экспрессии сывороточных miR-155, miR-191 и miR-223 является признаком прогрессирования воспаления, перехода к туберкулезе с распадом от туберкулеза без распада. Другая комбинация (miR-26a, miR-191, miR-222 и miR-320) образует набор для дифференциации туберкулеза с распадом и ФКТ. Чувствительность и специфичность метода, основанного на использовании вышеуказанных miRs в качестве биомаркеров активности туберкулеза, варьирует в диапазоне 71-100% (рис. 10).

Стратегии пациент-ориентированной терапии включают в себя аспекты иммунной модуляции, направленные на снижение непродуктивных воспалительных реакций и усиление антимикробных эффекторных механизмов для минимизации легочной патологии и ускорения разрешения симптомов. Подобная терапия в сочетании с существующими антимикобактериальными препаратами представляет собой потенциально перспективную стратегию улучшения долгосрочных результатов лечения больных ТБ. Для разработки такого терапевтического вмешательства необходимо понимание того в какой момент развития воспаления и на какие мишени будет направлена данная терапия; понимание процессов развития воспаления непосредственно в легочной ткани пациентов с диагнозом ТБ.

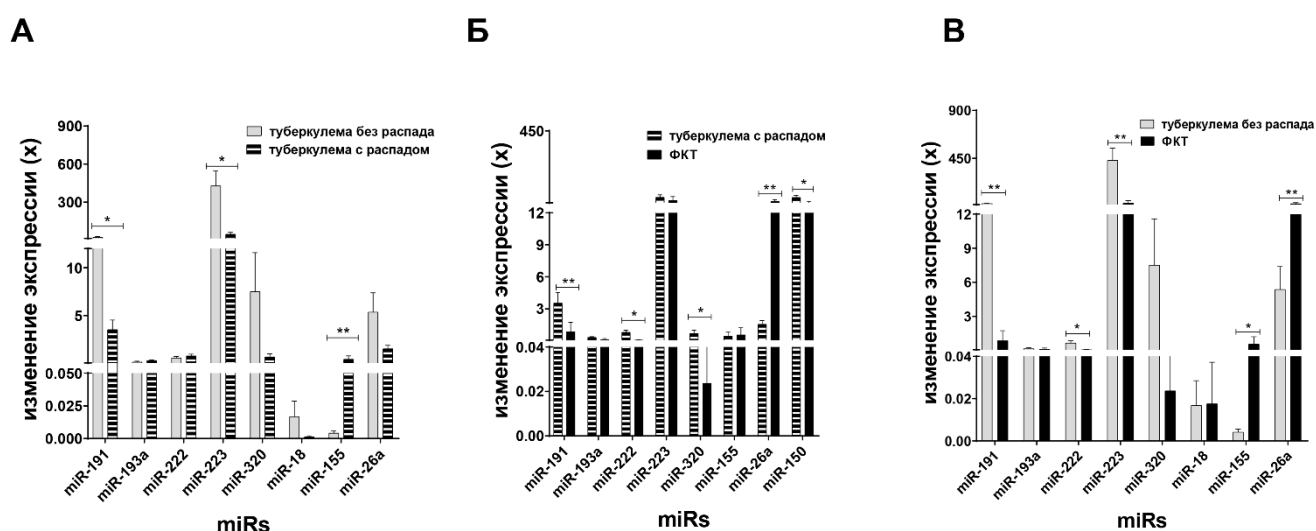


Рисунок 9. Экспрессия генов, кодирующих зрелые miRs, в сыворотке крови пациентов с диагнозом активный ТБ легких

Сравнение экспрессии зрелых miRs в сыворотке крови пациентов с диагнозом туберкулема без распада и туберкулема с распадом (А), туберкулема с распадом и ФКТ (Б), а также ФКТ и туберкулема без распада (В). \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .

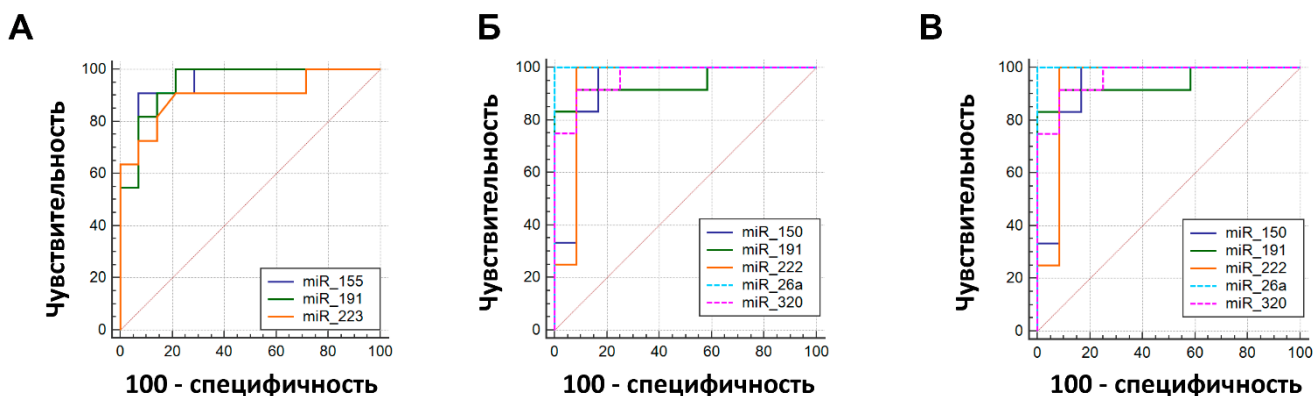


Рисунок 10. Анализ ROC-кривых, показывающий диагностическую ценность miR-155, miR-191, miR-223 для дифференцировки туберкулемы без распада от туберкулемы с распадом (А); miR-150, miR-191, miR-222, miR-26a, miR-320 для дифференцировки туберкулемы с распадом и ФКТ (Б); miR-155, miR-191, miR-222, miR-26a, miR-320 для дифференцировки туберкулемы без распада и ФКТ (В).

Основываясь на полученных нами данных гистологических исследований хирургического биопсийного материала пациентов с активным ТБ легкого, можно сделать предположение, что непосредственно в очаге инфекции (туберкулемы без распада) представлен минимальный уровень развития воспалительных реакций. Прогрессирование процесса приводит к появлению распада и усилению воспаления. Ускоряется миграция лейкоцитов и макрофагов в очаг инфекции. В стенке туберкулемы развивается обильная гранулематозная реакция, которая распространяется на «здоровую» ткань легкого. И, наконец, максимума воспалительные реакции достигают при образовании каверны (ФКТ) (рис. 11). Рентгенологические исследования больных активным туберкулезом показывают, что наличие полостей коррелирует с повышенным количеством бацилл в мокроте (Ko JM et al., 2015). Полости снижают эффективность антимикробных препаратов и ассоциируются с развитием устойчивости к антибиотикам и неудачей лечения (Kempker RR et al., 2012; Visser ME et al., 2012; Dorhoi A. et al., 2016). Полости являются следствием агрессивного воспаления. Анализ экспрессии и продукции факторов воспаления в легочной ткани также согласуется с гистологическими данными. Нарастание воспалительных процессов идет в направлении от туберкулемы без распада → туберкулема с распадом → ФКТ.

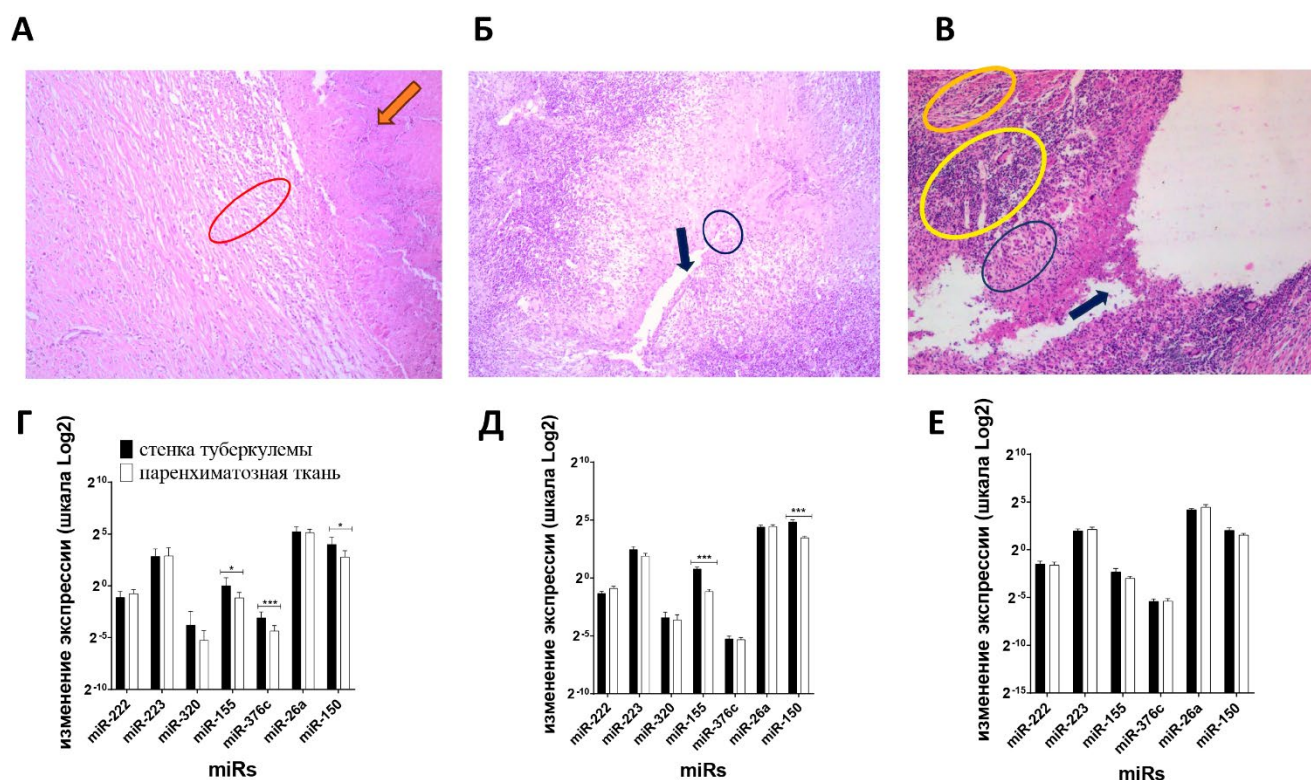


Рисунок 11. Оценка характера воспаления в очаге инфекции в легочной ткани пациентов с диагнозом активный ТБ легких

Гистологическая картина очага инфекции в легочной ткани пациентов с диагнозом (А) – туберкулема без распада; (Б) – туберкулема с распадом; (В) – каверна (ФКТ). Гематоксилин/эозин. Профиль экспрессии генов зрелых miRs в легочной ткани больных ТБ легких с диагнозом: туберкулема без распада (Г), туберкулема с распадом (Д) и ФКТ (Е). \* -  $p < 0,05$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

У пациентов с диагнозом туберкулема без распада регистрировался минимальный уровень развития воспаления (по экспрессии и продукции факторов воспаления) в стенке туберкулемы. У пациентов с диагнозом туберкулема с распадом шло нарастание воспаления в стенке туберкулемы. Показано увеличение экспрессии и продукции IL6, IL-11, IL17 и  $INF\gamma$  (рис. 12). У пациентов с диагнозом ФКТ различий в продукции основных факторов воспаления между стенкой каверны и паренхимой легкого зарегистрировано не было. Это связано с расширением границ воспалительных реакций. В легочной ткани пациентов с ФКТ воспалительный процесс не отграничивается стенкой каверны, а в следствие диссеминации инфекции, переходит на «здоровую» паренхиматозную ткань легкого.

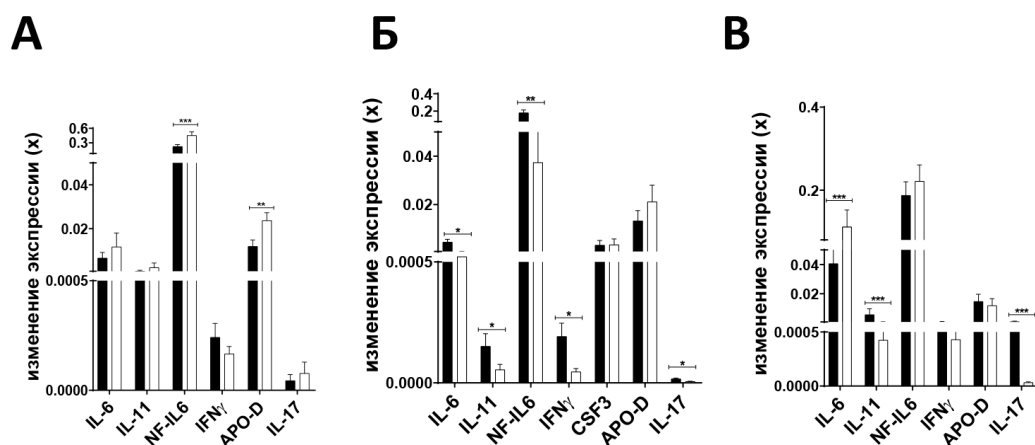


Рисунок 12. Профиль экспрессии генов факторов воспаления в легочной ткани пациентов с диагнозом туберкулема без распада (А), туберкулема с распадом (Б) и ФКТ (В)

■ – стенка туберкулемы/каверны; □ – паренхиматозная ткань. \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Анализ экспрессии зрелых miRs также позволяет говорить об усилении процессов деструкции и воспаления в ткани легкого в направлении от туберкулемы без распада к ФКТ. Уровень экспрессии miRs, участвующих в процессах воспаления (miR-155, miR-376с и miR-150), выше в стенке туберкулемы, чем в «здоровой» паренхиматозной ткани легкого. У пациентов с ФКТ уровень экспрессии определяемых miRs достоверно не отличался в стенке каверны и ткани легкого, что также стало дополнительным подтверждением распространения воспалительных и деструктивных процессов за пределы очага инфекции (рис. 11Г-Е).

На прогрессирование воспаления при ТБ также может оказывать влияние и наличие вирусных ко-инфекций. Продемонстрировано, что более частые негативные исходы характерны для пациентов с ко-инфекцией ТБ и COVID-19 (Motta I. et al., 2020; Tadolini M. et al., 2020; Kumar M.S. et al., 2021; Gao Y. et al., 2021). При этом разбалансировка иммунных реакций, общих для ТБ и COVID-19, может приводить как к утяжелению течения COVID-19, так, и прогрессированию ТБ (Sheerin D. et al., 2020; Mousquer G.T. et al., 2021). Наши исследования показали, что даже через три месяца после перенесенного COVID-19 в легких пациентов с туберкулезом сохранялись признаки воспаления, связанные с SARS-CoV2-инфекцией. Гистологические данные биопсийного хирургического материала этих пациентов свидетельствовали о реактивации ТБ воспаления. У

больных ТБ через три месяца после перенесенного COVID-19 в легочной ткани не было выявлено различий в уровнях экспрессии генов провоспалительных цитокинов/хемокинов между стенкой туберкулемы и окружающей паренхимой (рис. 13). Данное наблюдение также свидетельствовало о наличии более широкого локального воспалительного процесса, нежели в легочной ткани пациентов с ТБ без COVID-19 в анамнезе. У пациентов с туберкулезом при наличии активной SARS-CoV-2 инфекции мы наблюдали резкое понижение экспрессии ранее определенного нами паттерна miRs (miR-191, miR-193a, miR-222, miR-223, miR-155, miR-26a и miR-150), что свидетельствовало о разбалансировке регуляторных реакций воспаления хозяина в этот период (рис. 14). Сразу после прекращения выделения вируса в мокроте уровни экспрессии большинства miRs возвращались к показателям туберкулемы без COVID-19. В целом наши данные свидетельствуют об изменении способности хозяина реагировать на Mtb и/или SARS-CoV-2 и контролировать их при совместном заражении, что побуждает к дальнейшему изучению иммунологических путей, лежащих в основе иммунопатогенеза этой сочетанной патологии.

Вовлечение определенного нами паттерна miRs (miR-191, miR-222, miR-223, miR-155, miR-26a и miR-150) в процесс развития/регуляции воспаления подводит к вопросу о функциональной активности каждой miRs. До настоящего времени не существует четкого представления о том, в какие процессы воспаления при ТБ вовлечены данные малые некодирующие РНК. Немаловажен вопрос установления функциональных взаимосвязей между экспрессией miRs в различных условиях и их биологическим эффектом для более точного понимания их роли в патогенезе ТБ, установления мишеней их действия. В нашей работе на культуре макрофагов человека, активированных Mtb антигенами, было показано влияние гиперэкспрессии miR-191-5p и miR-222-3p на ряд функций данных клеток. Была продемонстрирована взаиморегуляция зрелых miRs. Так, гиперэкспрессия miR-191 усиливала действие антигенов Mtb на экспрессию miR-320, а также способствовала снижению экспрессии miR-223 в культуре «наивных» макрофагов человека и нивелировала действие антигенов микобактерий на ее экспрессию (рис. 15).



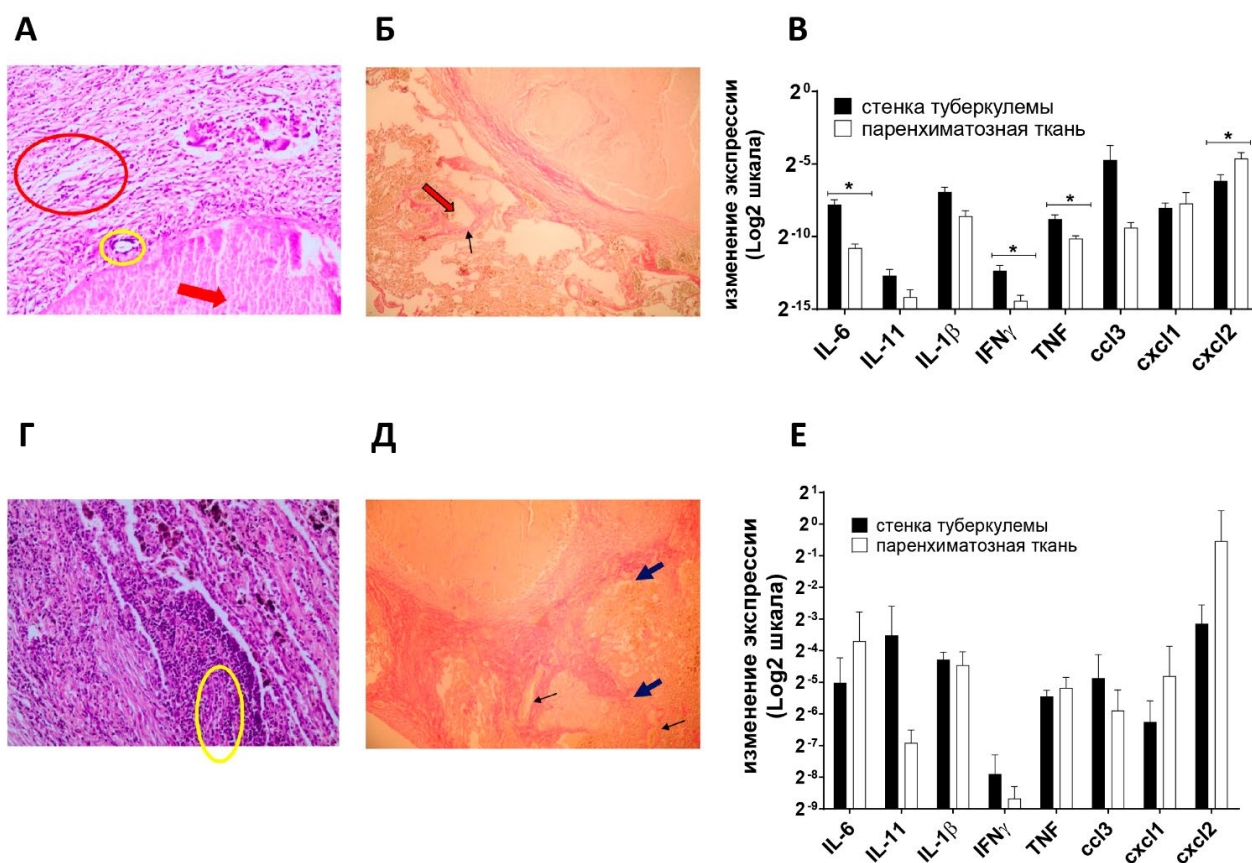


Рисунок 13. Ко-инфекция ТБ-COVID-19 приводит к усилению воспаления в легочной ткани пациентов с активным туберкулезом даже через 3 месяца после вирусной инфекции

Гистопатология легочной ткани пациентов с диагнозом туберкулема (А, Б) и пациентов с диагнозом туберкулема через 3 месяца после перенесенного COVID-19 (Г, Д). А, Г – гематоксилин/эозин; Б, Д – окрашивание по Ван-Гизону. Экспрессия факторов воспаления в стенке туберкулемы (■) и паренхиматозной ткани (□) пациентов с туберкулезом (В) и пациентов с туберкулезом через 3 месяца после перенесенного COVID-19 (Е).

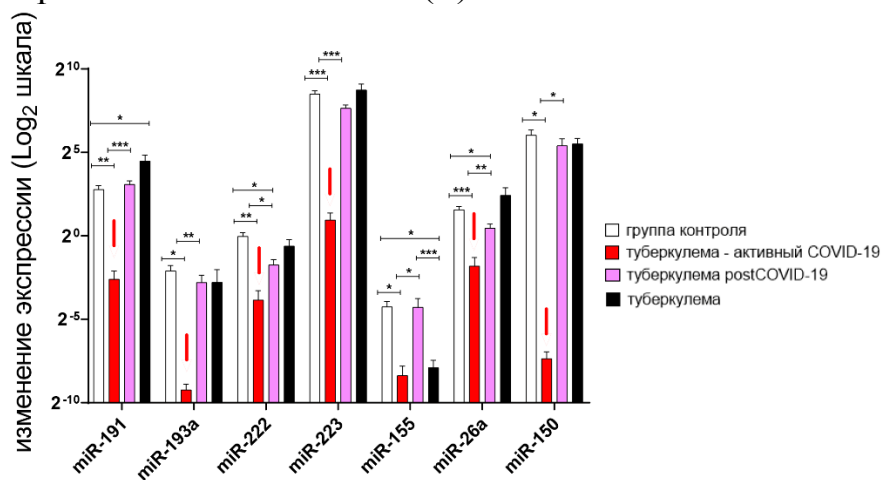


Рисунок 14. Экспрессия генов, кодирующих зрелые миРНК, в сыворотке крови больных активным туберкулезом легких и контрольной группы

\*-  $p < 0,05$ ; \*\*-  $p < 0,01$ ; \*\*\*-  $p < 0,001$

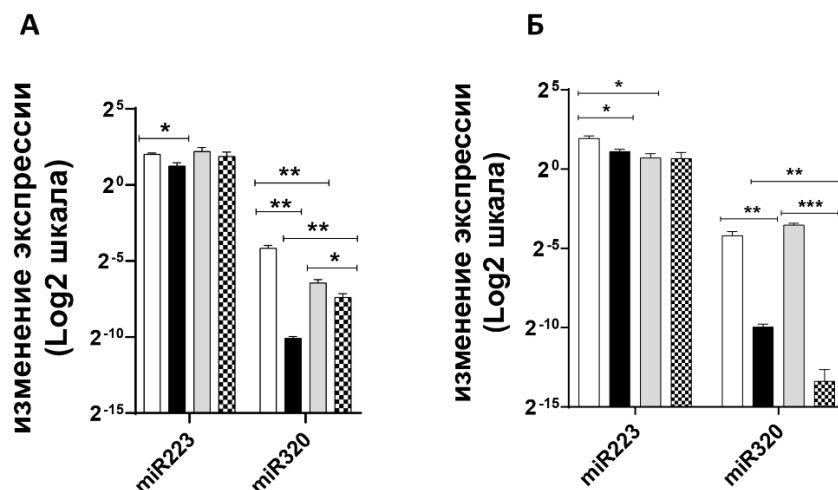


Рисунок 15. Влияние гиперэкспрессии miR-222 (А) и miR-191 (Б) на экспрессию miRs в культуре «наивных» (□, ■) и инфицированных макрофагов человека (■, ▨) (□, ■) – культуры без синтетических аналогов miR; (■, ▨) – с синтетическими аналогами miR. \*-  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

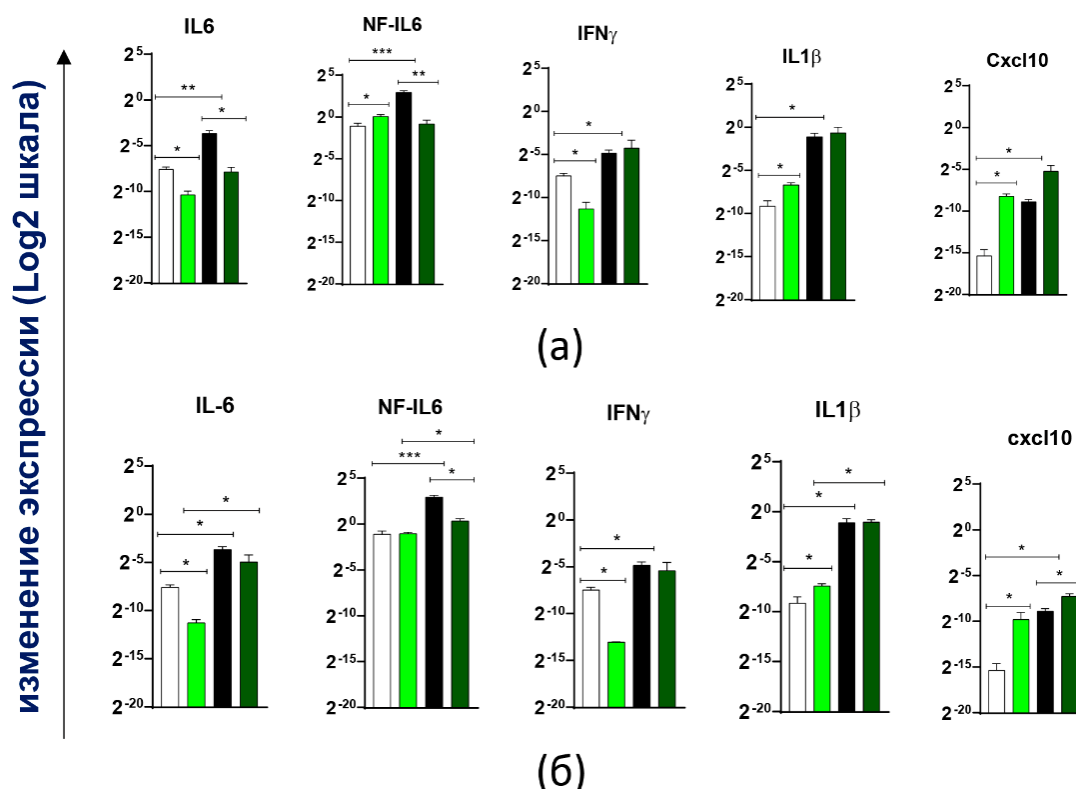


Рисунок 16. Влияние гиперэкспрессии miR-191 (а) и miR-222 (б) на экспрессию факторов воспаления в культуре «наивных» и инфицированных макрофагов человека (□) – «наивные» Мф; (■) – «наивные» Мф + синтетический аналог miR; (■) – Мф + *M. tuberculosis*; (■) – Мф + *M. tuberculosis* + синтетический аналог miR. \*-  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

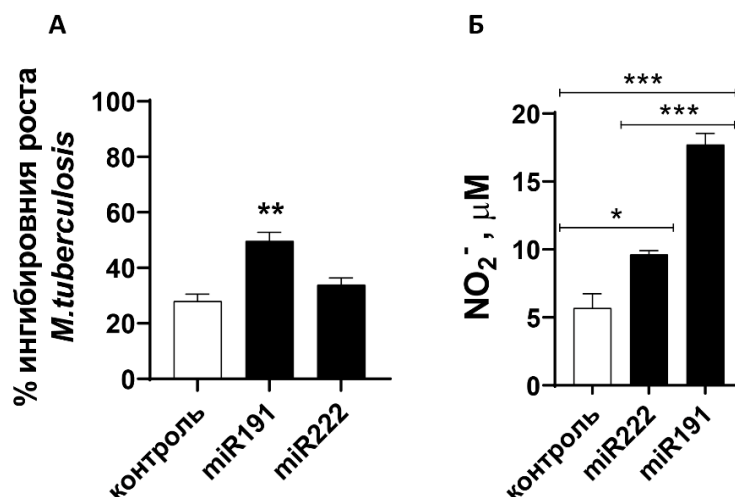


Рисунок 17. Влияние гиперэкспрессии miR-191 и miR-222 на бактериостатическую функцию макрофагов при экспериментальной ТБ инфекции (А) по уровню ингибирования роста *M. tuberculosis* и (Б) по уровню продукции Мф NO<sup>-</sup>  
 \*- p < 0,05; \*\* - p < 0,01

Гиперэкспрессия miR-191 и miR-222 не влияет на экспрессию IFN $\gamma$  инфицированными макрофагами (рис. 16), однако, увеличенная экспрессия каждой из этих miRs по-разному влияет на бактериостатическую функцию макрофагов (рис. 17). Так, в случае гиперэкспрессии miR-191 показана активация бактериостатической функции макрофагов и увеличение продукции NO<sup>-</sup>; в то время как повышение экспрессии miR-222 не приводило к существенному изменению бактериостатической активности, но стимулировало увеличение продукции NO<sup>-</sup>. То есть, miR-191 и miR-222 являются антагонистами по своему действию на бактериостатическую активность макрофагов.

Наше исследование закладывает основу для интеграции miRs в клиническую практику для обогащения персонализированных и креативных диагностических стратегий, и дальнейшего принятия решений о лечении ТБ, особенно при лечении пациентов с лекарственной устойчивостью Mtb.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что высокодифференцированные Th1 эффекторы CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup> CD27<sup>lo</sup> способны активировать бактериостатическую функцию как перитонеальных, так и интерстициальных макрофагов легких. Данный механизм активации не зависит от продукции активных форм азота. Для активации Т



лимфоцитами антимикобактериальной функции макрофагов необходимо контактное взаимодействие макрофага и Т-эффектора.

2. Установлено, что дефицит Sap D приводит к снижению бактериостатической активности как интерстициальных макрофагов легких, так и перитонеальных макрофагов в системе *in vitro*. Компенсация дефицита Sap D с помощью лентивирусной трансдукции макрофагов соответствующим геном ведет к восстановлению антимикобактериальной активности данных клеток. При этом, механизм антимикобактериального действия Sap D не связан с продукцией активных форм азота.

3. Дефицит Sap D при экспериментальном ТБ у мышей ведет к нарастанию воспалительных процессов, а также усиливает предрасположенность клеток, инфильтрирующих легкие зараженных *M. tuberculosis* мышей к апоптозу.

4. Продemonстрировано, что при инфицировании устойчивых к ТБ мышей A/Sn в очаге инфекции уровень экспрессии изменяется у большего числа генов, чем в случае с инфицированием чувствительных к ТБ мышей I/St. Показано, что у мышей I/St наблюдалась повышенная активация генов, вовлеченных в реакции воспаления ассоциированных с ответом нейтрофилов на инфекцию. Кроме того, у чувствительной к ТБ линии мышей I/St было обнаружено специфическое постинфекционное усиление экспрессии ингибиторов цистеиновых протеаз.

5. На модели ТБ у генетически гетерогенных потомков F2 (I/St x A/Sn) было показано, что прогрессирование ТБ связано с интенсивной воспалительной реакцией, опосредованной фагоцитирующими клетками хозяина, и проявляющейся в повышенной экспрессии факторов воспаления IL1 $\beta$ , IL11, Cxcl2, Mmp-8 и прогрессирующим накоплением нейтрофилов в легочной ткани инфицированных животных.

6. Установлено, что подавление продукции IL11 у зараженных *M. tuberculosis* мышей с помощью поликлональных IgG-антител к IL11 или генетически модифицированного белка, рекомбинантной мутантной формы IL11, ведет к подавлению нейтрофильного воспаления и способствует пролонгированию времени жизни инфицированных мышей.

7. 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*

мышей линии I/St посредством снижения экспрессии провоспалительных цитокинов (IL6, TNF), а также уменьшения инфильтрации легочной ткани нейтрофилами, а также CD4 и CD8 Т-клетками.

8. Сформирован набор из 6 miRs (miR-155, miR-191, miR-223, miR-26a, miR-222, miR-320), по степени экспрессии которых можно охарактеризовать степень деструкции и активность воспалительных процессов в легких пациентов с диагнозом ТБ.

9. 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.

10. По результатам гистологических исследований, а также по данным определения цитокинов/хемокинов и miRs установлено, что через три месяца после перенесенного COVID-19 в легких пациентов с туберкулезом сохраняются признаки воспаления, связанные с вирусной инфекцией.

11. Продemonстрировано оппозитное влияние гиперэкспрессии miR-191 и miR-222 на бактериостатическую активность инфицированных *M. tuberculosis* макрофагов, полученных из периферической крови человека, *in vitro*. Модулирующее действие этих miRs опосредовано влиянием на экспрессию ряда факторов воспаления и связано с продукцией NO.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

#### **Работы в сборниках материалов конференций**

1. **Shepelkova G.** Pommerenke C., Alberts R., Geffers R., Evstifeev V., Apt A., Schughart K. Genetic susceptibility to tuberculosis. Helmholtz-Russia Joint Research Groups (HRJRG). 03.2014.39-41
2. **Шепелькова Г.С.,** Евстифеев В.В., Апт А.С. Генетическая чувствительность к туберкулезу. Научно-практическая конференция молодых ученых с международным участием, посвященная всемирному дню борьбы с туберкулезом. 2015. с.224-226
3. **Шепелькова Г.С.,** Майоров К.Б., Евстифеев В.В., Апт А.С. Активация макрофагов при экспериментальном туберкулезе включает нитрит-независимый путь. Медицинская иммунология, 2015. 17(спец. выпуск):143

4. Евстифеев В.В., **Шепелькова Г.С.**, Бочарова И.В., Апт А.С. Роль NF-kB в развитии воспаления при экспериментальном туберкулезе. Медицинская иммунология, 2015. 17(спец. выпуск):133
5. Рог К.В., Евстифеев В.В., **Шепелькова Г.С.**, Телепнев М.В., Матракшин А.Г., Чудаан-оол Р.М., Русакова Л.И., Гергерт В.Я., Еремеев В.В. Разработка метода определения полиморфизма гена сапозина D человека. Вестник ЦНИИТ. 2017. 1:35-38
6. Апт А.С., **Шепелькова Г.С.**, Евстифеев В.В., Капина М.А., Кондратьева Т.К., Майоров К.Б. IL11 при туберкулезной инфекции у мышей и его терапевтический эффект. Вестник ЦНИИТ. 2017. 1:39-41
7. Еремеев В.В., **Шепелькова Г.С.**, Евстифеев В.В., Эргешова А.Э., Багиров М.А. Перспективы использования микроРНК в направленной на хозяина терапии туберкулеза. Всероссийская научно-практическая конференция фтизиатров с международным участием «Междисциплинарный подход в решении проблемы туберкулеза» Москва 2017. с.16-17
8. Евстифеев В.В., **Шепелькова Г.С.**, Еремеев В.В. Влияние сапозина D на формирование противотуберкулезного иммунитета при экспериментальной туберкулезной инфекции. Медицинская иммунология. 2017. 19 (спец. выпуск):27-28
9. **Шепелькова Г.С.**, Майоров К.Б., Логунова Н.Н., Апт А.С. Полиморфизм молекулы H2-A Класса II главного комплекса гистосовместимости определяет протективный ответ хозяина при экспериментальной туберкулезной инфекции. Медицинская иммунология. 2017. 19 (спец. выпуск):74-75
10. **Шепелькова Г.С.**, Евстифеев В.В., Эргешова А.Э., Багиров М.А., Еремеев В.В. МикроРНК в диагностике туберкулеза. Сборник трудов Российской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием, посвященный всемирному дню борьбы с туберкулезом. 2018. с:159-162
11. Yermeev V., Evstifeev V., **Shepelkova G.**, Ergeshova A., Bagirov M. MicroRNAs in serum of post primary TB patients. European Respiratory Journal 52 (supl 62) PA4725; DOI: 10.1183/13993003.congress-2018.PA4725
12. **Shepelkova G.**, Evstifeev V., Yermeev V., Ergeshova A., Bagirov M. Cytokines/chemokines gene expression in the lungs of fibrous-cavernous TB patients.

- European Respiratory Journal 52 (suppl 62) PA4731; DOI: 10.1183/13993003.congress-2018.PA4731
13. Гуськов А.М., **Шепелькова Г.С.**, Эргешова А.Э. Перспектива использования сывороточных микроРНК в качестве маркеров распада у больных туберкулезом с диагнозом туберкулема легкого. Вестник ЦНИИТ. 2019. специальный выпуск 1:13. doi: 10.7868/S2587667819050029
14. **Шепелькова Г.С.**, Адамовская Е.Н. МикроРНК – маркеры формирования фиброза у больных ИБЛ. Вестник ЦНИИТ. 2019. специальный выпуск 1:34. doi: 10.7868/S2587667819050133
15. Evstifeev V., **Shepelkova G.**, Ergeshova A., Guskov A., Bagirov M., Yermeev V. Serum microRNA markers of tuberculoma decoy. European Respiratory Journal. 2019. 54 (suppl 63) PA4596; DOI: 10.1183/13993003.congress-2019.PA4596
16. **Shepelkova G.**, Evstifeev V., Ergeshova A., Guskov A., Bagirov M., Yermeev V. Lung microRNAs as biomarkers of post primary TB variants. European Respiratory Journal 54 (suppl 63) PA3012; DOI: 10.1183/13993003.congress-2019.PA3012
17. **Shepelkova G.**, Zaytseva A., Evstifeev V., Stepanyan I., Shmelev E., Yermeev V. Micro Array screening of microRNA markers of interstitial lung diseases for differential diagnostics. European Respiratory Journal. 2019. 54 (suppl 63) PA1358; DOI: 10.1183/13993003.congress-2019.PA1358
18. Адамовская Е.Н., Гуськов А.М., **Шепелькова Г.С.** МикроРНК в сыворотке крови больных интерстициальными болезнями легких. Вестник ЦНИИТ. 2020. специальный выпуск 1:7-8. doi: 10.7868/S2587667820050015
19. **Шепелькова Г.С.**, Гуськов А.М., Эргешова А.Э. Факторы регуляции воспаления в тканях пораженного легкого хирургических больных туберкулезом. Вестник ЦНИИТ. 2020. специальный выпуск 1:25-26. doi: 10.7868/S2587667820050106
20. Evstifeev V., **Shepelkova G.**, Ergeshova A., Guskov A., Bagirov M., Yermeev V. A set of microRNA markers of active tuberculosis. European Respiratory Journal 56 (suppl 64) 536; DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.536
21. Evstifeev V., Adamovskaya E., **Shepelkova G.**, Zaytseva A., Shmelev E., Yermeev V. Serum markers of acute sarcoidosis. European Respiratory Journal. 2020. 56 (suppl 64) 1091; DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.1091

22. **Shepelkova G.**, Evstifeev V., Zaytseva A., Adamovskaya E., Guskov A., Stepanyan I., Shmelev E., Yermeev V. MicroRNAs in serum of Interstitial lung diseases patients. *European Respiratory Journal*. 2020. 56 (suppl 64) 1082; DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.1082
23. **Шепелькова Г.С.**, Тарасов Р.В., Эргешова А.Э. Сывороточные микроРНК как маркер заболеваний легких различной этиологии. *Вестник ЦНИИТ*. 2021. специальный выпуск 1:29-30. doi: 10.7868/S2587667821050101
24. Адамовская Е.Н., **Шепелькова Г.С.** Определение роли различных биомаркеров в диагностике активности саркоидоза. *Вестник ЦНИИТ*. 2021. специальный выпуск 1:47-49. doi: 10.7868/S2587667821050198
25. **Shepelkova G.**, Evstifeev V., Tarasov R., Aliev V., Bagirov M., Berezovskiy Y., Isaeva M., Yermeev V. COVID19 coinfection exacerbates lung inflammation in TB patients. *European Respiratory Journal*. 2021. 58 (suppl 65) PA1027; DOI: 10.1183/13993003.congress-2021.PA1027
26. **Shepelkova G.**, Evstifeev V., Tarasov R., Bagirov M., Yermeev V. Inflammation regulating cytokines in TB affected tissues. *European Respiratory Journal*. 2021. 58 (suppl 65) PA2466; DOI: 10.1183/13993003.congress-2021.PA2466
27. **Shepelkova G.**, Evstifeev V., Sivokozov I., Azhikina T., Ergeshov A., Yermeev V. Mycobacterial small noncoding RNAs MTS0997 and MTS1338 are novel virulence factors of *M. tuberculosis*. *European Respiratory Journal*. 2021. 58 (suppl 65) PA2465; DOI: 10.1183/13993003.congress-2021.PA2465
28. **Шепелькова Г.С.**, Евстифеев В.В., Еремеев В.В. МикроРНК ассоциированные с туберкулезом: от патогенеза к биомаркерам инфекции. Сборник трудов I Научно-практической конференции с международным участием, посвященной 300-летию Российской академии наук. Роль фундаментальных исследований во фтизиатрии. 2022

### **Научные статьи**

1. Lyadova I.V., Tsiganov E.N., Kapina M.A., **Shepelkova G.S.**, Sosunov V.V., Radaeva T.V., Majorov K.B., Shmitova N.S., van den Ham H.J., Ganusov V.V., De Boer R.J., Racine R., Winslow G.M. In mice, tuberculosis progression is associated with intensive inflammatory response and the accumulation of Gr-1 cells in the lungs. *PLoS One*. 2010 May 4;5(5):e10469. doi: 10.1371/journal.pone.0010469.

2. **Shepelkova G.**, Pommerenke C., Alberts R., Geffers R., Evstifeev V., Apt A., Schughart K., Wilk E. Analysis of the lung transcriptome in Mycobacterium tuberculosis-infected mice reveals major differences in immune response pathways between TB-susceptible and resistant hosts. *Tuberculosis (Edinb)*. 2013; 93(2):263-269. doi: 10.1016/j.tube.2012.11.007.
3. Капина М.А., **Shepelkova G.S.**, Avdeenko V.G., Guseva A.N., Kondratieva T.K., Evstifeev V.V., Apt A.S. Interleukin-11 drives early lung inflammation during Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible mice. *PLoS One*. 2011;6(7):e21878. doi: 10.1371/journal.pone.0021878.
4. **Шепелькова Г.С.**, Евстифеев В.В., Апт А.С. Исследование молекулярных механизмов патогенеза туберкулеза на экспериментальных моделях. *Туберкулез и болезни легких*. 2012. 89(7):3-11.
5. **Шепелькова Г.С.**, Майоров К.Б., Евстифеев В.В., Апт А.С. Взаимодействие Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>CD27<sup>hi</sup> и CD4<sup>+</sup>CD27<sup>lo</sup> с макрофагами при туберкулезной инфекции у мышей. *Туберкулез и болезни легких*. 2015; (12):57-60.
6. **Shepelkova G.**, Evstifeev V., Kondratieva T., Bocharova I., Averbakh M., Apt A. Local targeting NF-κB in the lung tissue of TB-infected mice diminishes the level of pathology. *Tuberculosis*. 2017. 103: 92-96. doi: 10.1016/j.tube.2016.12.001.
7. **Shepelkova G.**, Evstifeev V., Majorov K., Bocharova I., Apt A. Therapeutic Effect of Recombinant Mutated Interleukin 11 in the Mouse Model of Tuberculosis. *J Infect Dis*. 2016. 214(3):496-501. doi: 10.1093/infdis/jiw176.
8. Logunova N.N., **Shepelkova G.S.**, Apt A.S. Regulatory T-Cells: Mechanisms of Immune Response Inhibition and Involvement in the Control of Tuberculosis Infection. *J Autoimmune Disord*. 2017. Vol 3 No 4: 51.
9. Еремеев В.В., Евстифеев В.В., **Шепелькова Г.С.**, Эргешова А.Э., Багиров М.А. МикроРНК и туберкулез. *Инфекция и иммунитет*. 2018. 8(3): 309-315. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-3-309-315>
10. **Шепелькова Г.С.**, Евстифеев В.В., Эргешов А.Э., Еремеев В.В. Влияние Сапозина Д на бактериостатическую функцию макрофагов при экспериментальной туберкулезной инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2020. 11(3):473-480. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-TEO-1386>
11. **Shepelkova G.**, Evstifeev V., Averbakh Jr. M., Sivokozov I., Ergeshov A., Azhikina T., Yermeev V. Small Noncoding RNAs MTS0997 and MTS1338 Affect the

Adaptation and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology Research. 2021; 12(1):186-195. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12010014>

12. **Шепелькова Г.С.**, Евстифеев В.В., Авдиенко В.Г., Бочарова И.В., Еремеев В.В. Влияние сапозина D на течение туберкулезной инфекции у мышей // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, No 3. С. 439–445. doi: 10.15789/2220-7619-ТЕО-2029

13. **Shepelkova G.S.**, Evstifeev V.V., Tarasov R.V., Ergeshova A.E., Bagirov M.A., Yeremeev V.V. MicroRNAs as Biomarkers of Active Pulmonary TB Course. Microorganisms. 2023. 11(3):626. doi: 10.3390/microorganisms11030626.

14. **Shepelkova G.S.**, Evstifeev V.V., Berezovskiy Y.S., Tarasov R.V., Bagirov M.A., Yeremeev V.V. Lung Inflammation Signature in Post-COVID-19 TB Patients. Int J Mol Sci. 2023. 24(22):16315. doi: 10.3390/ijms242216315.

15. **Шепелькова Г.С.**, Черных Н.А., Косякова В.К., Черных С.С., Эргешов А., Еремеев В.В. Влияние туберкулеза на формирование иммунного ответа к SARS-CoV-2. Вестник РГМУ. 2024. DOI: 10.24075/vrgmu.2024.023

16. Еремеев В.В., **Шепелькова Г.С.**, Эргешов А.Э. Неспецифическая составляющая вакцинации BCG. Медицинская иммунология. 2019. 21(6):1015-1022. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1015-1022

17. Reshetnikov V., Terenin I., **Shepelkova G.**, Yeremeev V., Kolmykov S., Nagornyykh M., Kolosova E., Sokolova T., Zaborova O., Kukushkin I., et al. Untranslated Region Sequences and the Efficacy of mRNA Vaccines against Tuberculosis. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 888. <https://doi.org/10.3390/ijms25020888>

18. **Шепелькова Г.С.**, Зайцева А.С., Евстифеев В.В., Адамовская Е.Н., Шмелев Е.И., Еремеев В.В. МикроРНК как маркеры фиброзирования у пациентов с гиперчувствительным пневмонитом // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, No 3. С. 607-612. doi: 10.15789/1563-0625-MAF-2913

19. **Шепелькова Г.С.**, Евстифеев В.В., Еремеев В.В. Гиперэкспрессия miR-222-3p в культуре инфицированных *Mycobacterium tuberculosis* макрофагов не оказывает влияние на их бактериостатическую активность. Инфекция и иммунитет. 2024. 14(2):1 DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-ТЕО-2029>

20. **Шепелькова Г.С.**, Евстифеев В.В., Адамовская Е.Н., Шмелев Е.И., Еремеев В.В. Биологические маркеры фиброобразования у больных саркоидозом легких.

Вестник современной клинической медицины. 2024. 17(2):85-90. DOI: 10.20969/VSKM.2024.17(2).85-90

21. Еремеев В.В., **Шепелькова Г.С.** Иммуноterapia туберкулеза. Вестник ЦНИИТ. 2023. 4(25):5-11. Doi: 10.57014/2587-6678-2023-7-4-5-11

22. Щепихин Е.И., **Шепелькова Г.С.**, Шмелев Е.И., Еремеев В.В., Эргешов А.Э. Матриксные металлопротеиназы и пропептид коллагена при интерстициальных заболеваниях легких: предварительные результаты пилотного исследования. Доктор.Ру. 2024. DOI: 10.31550/1727-2378-T(1)1.24

23. **Shepelkova G.S.**, Evstifeev V.V., Berezovskiy Y.S., Ergeshova A.E., Tarasov R.V., Bagirov M.A., Yeremeev V.V. Characteristics of Pulmonary Inflammation in Patients with Different Forms of Active Tuberculosis. International Journal of Molecular Sciences. 2024; 25(21):11795. <https://doi.org/10.3390/ijms252111795>

#### **Глава в монографии**

Туберкулез органов дыхания. Руководство для врачей. /Под редакцией профессора А.Э. Эргешова. – М., 2017. – 524 с.:ил.