

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 68.1.002.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ
УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело №_____.

решение диссертационного совета от 23.04.2025 г., № 11/2025

О присуждении Шепельковой Галине Сергеевне, гражданке Российской Федерации, учёной степени доктора биологических наук.

Диссертация «Регуляция воспаления при туберкулезе в эксперименте и клинике» по специальности «3.2.7 Иммунология» принята к защите 14.01.2025 г. (протокол заседания № 03/2025) диссертационным советом 68.1.002.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Каширское шоссе, дом 24, приказ о создании диссертационного совета № 206/нк от 14.02.2023 г.

Соискатель Шепелькова Галина Сергеевна, 23 декабря 1981 года рождения, в 2005 году окончила Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Эффекторы CD4 при экспериментальной туберкулезной инфекции: фенотип и дифференцировка» защитила в 2009 году в диссертационном совете Д 001.007.01, созданном на базе Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Российской академии медицинских наук.

Работает в должности и.о. ведущего научного сотрудника, заведующего лабораторией биотехнологии отдела иммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-

исследовательский институт туберкулеза», Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ФГБУ ЦНИИТ Минобрнауки России).

Диссертация выполнена в ФГБУ ЦНИИТ Минобрнауки России.

Научный консультант – доктор медицинских наук, Еремеев Владимир Витальевич, главный научный сотрудник, заведующий отделом иммунологии ФГБУ ЦНИИТ Минобрнауки России.

Официальные оппоненты:

Купраш Дмитрий Владимирович – доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, руководитель центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, заведующий лабораторией передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии;

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

Дьякова Марина Евгеньевна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории микробиологии, биохимии и иммуногенетики – дали положительные отзывы на диссертацию.

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, г. Москва в своем положительном отзыве, подписанном Тихоновой Ниной Тимофеевной, доктором биологических наук, профессором, главным научным сотрудником

лаборатории цитокинов, и утвержденном и.о. директора Института доктором медицинских наук, профессором Борисовой Ольгой Юрьевной, указала, что «диссертационная работа Г.С. Шепельковой «Регуляция воспаления при туберкулезе в эксперименте и клинике» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение в области иммунологии: установлено, что для активации бактериостатической функции макрофагов необходим физический контакт между $CD4^+$ эффекторами с фенотипом $CD44^{high}CD62L^{low}CD27^{low}$ и макрофагом; продемонстрирована роль сапозина D в функционировании механизмов врожденного иммунитета, направленных на элиминацию микобактериальной инфекции; доказана роль IL11 в регуляции нейтрофильного воспаления, стимулированного заражением *M. tuberculosis*; показано влияние гиперэкспрессии некоторых микроРНК на антимикобактериальную активность инфицированных *M. tuberculosis* макрофагов человека; определен характер развития воспалительных реакций непосредственно в очаге инфекции у пациентов с диагнозом ТБ легких, а также у коморбидных пациентов с диагнозом ТБ и COVID-19; предложен способ диагностики активности туберкулезного воспаления по уровню экспрессии ряда сывороточных микроРНК, сформирован диагностический набор из 6 микроРНК, по степени экспрессии которых можно оценить активность специфического воспаления при туберкулезе легких.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям (п.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года в редакции постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. №1690, 26.01.2023 г. №101, 18.03.2023 г. №415, 26.10.2023 г. №1786, от 26.01.2023 г. №101, от 25.01. 2024

№ 62, от 16.10.2024 №1382)), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология».

Соискатель имеет 80 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 52 работы, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 23 работы, а также 28 публикаций в материалах научных конгрессов и конференций и глава в монографии. В диссертации и автореферате отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах. 23 статьи общим объемом 196 стр. опубликованы в рецензируемых журналах «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.». Авторский вклад составляет 80%.

Наиболее значительные научные работы по теме диссертации:

1. 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.
2. Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Tarasov R.V., Ergeshova A.E., Bagirov M.A., Yermeev V.V. MicroRNAs as Biomarkers of Active Pulmonary TB Course. *Microorganisms.* 2023. 11(3):626. doi: 10.3390/microorganisms11030626.
3. Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Berezovskiy Y.S., Ergeshova A.E., Tarasov R.V., Bagirov M.A., Yermeev 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>

На диссертацию и автореферат Шепельковой Г.С. поступили отзывы из Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отзыв составлен доктором медицинских наук, профессором, членом-корреспондентом РАН,

заведующей кафедрой патофизиологии О.И. Уразовой; из Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е. И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отзыв составлен доктором медицинских наук, профессором, главным научным сотрудником А.К. Тихазе; из Института клинической морфологии и цифровой патологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), отзыв составлен доктором медицинских наук, профессором Е.А. Коган

Отзывы положительные, замечаний не содержат.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их специализацией в области исследований, представленных в диссертационной работе, и отсутствием совместных работ и договорных обязательств с соискателем.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- разработана научно-обоснованная концепция связи экспрессии биомаркеров (микроРНК) и факторов, вовлеченных в регуляцию острого локального и системного хронического воспаления при инфицировании *M. tuberculosis*.
- предложена оригинальная научная гипотеза о существовании нитрит-независимого механизма активации макрофагов при туберкулезной инфекции.
- доказана перспективность, применения блокирования некоторых ключевых элементов воспаления (IL11 и основного пути активации NF-kB) для регуляции интенсивности воспаления при внутриклеточной бактериальной инфекции.
- введены новые критерии оценки изменения степени деструкции и активности воспалительных процессов ТБ легких путем определения уровня экспрессии шести зрелых сывороточных микроРНК (miR-155, miR-191, miR-223, miR-26a, miR-222, miR-320).

Теоретическая значимость исследований подтверждается тем, что:

- доказана роль субпопуляции Т-лимфоцитов с фенотипом CD44^{high}CD62L^{low}CD27^{low} в активации бактериостатической функции как перитонеальных, так и «наивных» интерстициальных легочных макрофагов. Продemonстрировано, что данный механизм активации не зависит от генерации NO[•].
- применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных иммунологических, биохимических и молекулярно-биологических методов исследования, а именно: работа с линиями мышей; выделение, культивирование и стимуляция клеток, получение высокодифференцированных субпопуляций клеток; наработки биомассы вирулентного штамма *M. tuberculosis*; определение бактериостатической активности макрофагов и жизнеспособности микобактерий в культурах макрофагов; проточная цитофлуорометрия, ИФА, гистологические исследования, работа с нуклеиновыми кислотами, клонирование, мутагенез, арреи, синтез и наработка белка, разнообразный биоинформатический анализ.
- изложена научная идея об ассоциации повышения активации генов, вовлеченных в реакции воспаления, связанных с ответом нейтрофилов, на фоне инфекции *M. tuberculosis*.
- раскрыто существование взаимосвязи прогрессирования ТБ инфекции с острым воспалительным ответом, опосредованным повышением экспрессии факторов воспаления и сильной нейтрофильной инфильтрацией легочной ткани.
- изучено влияние гиперэкспрессии некоторых микроРНК на антимикобактериальную активность инфицированных *M. tuberculosis* макрофагов человека.
- проведена модернизация экспериментальных подходов к изучению регуляции воспаления при ТБ инфекции у мышей.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

- разработаны и внедрены новые способы регулирования интенсивности воспаления (блокирование IL-11 и классического пути активации NF-kB) в экспериментальной модели ТБ на мышах.
- определен характер развития воспалительных реакций непосредственно в очаге инфекции у пациентов с диагнозом ТБ легких, а также у коморбидных пациентов с диагнозом ТБ + COVID-19.
- создан набор из 6 зрелых сывороточных микроРНК, по степени экспрессии которых в сыворотке крови пациентов с диагнозом ТБ легких возможно охарактеризовать изменение активности воспалительных процессов в легочной ткани.
- представлены научно-обоснованные предложения по направлениям разработки новой пациент-ориентированной противотуберкулезной терапии, способствующей подавлению избыточного нейтрофильного воспаления.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- результаты получены на сертифицированном оборудовании, эксперименты проведены по стандартизованным методикам, показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях.
- теория построена на достоверных и проверяемых фактах, согласуется с данными литературы по теме диссертации, результатами современных исследований отечественных и зарубежных авторов.
- идея базируется на анализе практики и обобщении передового опыта исследователей по данной тематике.
- использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее отечественными и зарубежными исследователями по рассматриваемой тематике, опубликованных к настоящему времени.
- установлено качественное и количественное совпадение результатов, полученных автором в ходе исследования, с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике.
- использованы современные методики сбора и обработки исходной информации, в работе использовано достаточное количество биобразцов, результаты исследования основаны на использовании целесообразных, в соответствии с поставленными задачами, моделях исследования; методологии

исследования, соответствуют поставленным задачам, для анализа полученных экспериментальных данных применены адекватные методы статистической обработки.

Личный вклад соискателя состоит в его непосредственном участии во всех этапах научной работы от планирования экспериментов до их постановки, получении исходных данных, личном участии в апробации результатов исследования, обработке и интерпретации экспериментальных данных, анализа данных, подготовке основных публикаций по выполненной работе. Представленное диссертационное исследование полностью написано автором.

Соискатель Шепелькова Г.С. ответила на задаваемые ей ходе заседания вопросы и высказанные критические замечания и привела собственную аргументацию.

Вопрос: Скажите пожалуйста, Вы в качестве мишени для регуляции воспаления выбрали IL11. Были ли какие-то предпосылки, чтобы выбрать именно этот цитокин? Обычно в воспаление вовлечено много разных факторов. И второй тоже связанный вопрос. Для инактивации IL-1 Вы использовали не нейтрализующие антитела, а мутантный белок, как можно судить из презентации. Часто такие белки оказывают менее длительное действие на инактивацию мишени по сравнению с моноклональными антителами. Как Вы можете это прокомментировать?

Ответ: Я начну с первого вопроса по поводу того, почему мы выбрали именно IL11. IL11 в отделе иммунологии мы занимаемся уже достаточно давно; и еще в начале 2000-х годов в нашем отделе было продемонстрировано, что экспрессия IL11 намного выше у макрофагов, полученных от животных, чувствительных к туберкулезной инфекции, по сравнению с инфицированными макрофагами устойчивых к туберкулезу мышей A/Sn. Кроме того, в нашей работе мы продемонстрировали различия по экспрессии IL11 у инфицированных животных разных, с оппозитной чувствительностью к туберкулезу. Было показано, что у мышей, чувствительных к туберкулезу, экспрессия IL11 выше, чем у устойчивых. Также в нашей работе мы продемонстрировали, что экспрессия, усиление экспрессии IL11 коррелирует со степенью развития кахексии, то есть с патологией при туберкулезе. Поэтому

нам стало интересно посмотреть, как будет влиять блокирование этого цитокина на воспаление при туберкулезе.

По поводу того, почему мы выбрали именно мутант. Мы же смотрели блокирование не только с помощью мутанта, мы начали свои исследования с применения поликлональных антител к данному цитокину. Моноклональные мы не получали в своей работе, поэтому не исследовали специально. А поликлональные мы специально получали сами для нашей работы. Ранее в литературе были работы, где было продемонстрировано, что данный мутант обладает большим аффинитетом к рецептору и соответственно блокирует рецептор для IL11. При туберкулезе и вообще при регуляции воспаления выключение намертво какого-либо фактора, неизвестно приведет оно к протекции, либо наоборот, к патологии. Может быть как раз недлительное выключение в строго определенный момент играет большую роль, нежели полностью вырубить какой-то из цитокинов.

Вопрос: Первый вопрос касается микроРНК. Вы выделили набор из шести микроРНК, который характеризует степень воспаления. Могут ли эти микроРНК использоваться при диагностике туберкулеза? А второй вопрос связан с тем, что Вы использовали растворимый CD70 в своей работе. зачастую такого рода молекулы, их функциональная активность, довольно сильно зависят от того, в мономерной они форме или тримерной. Вот это Вы учитывали в своей работе? Или все-таки у Вас была мономерная форма или тримерная форма этой молекулы?

Ответ: Начну с первого вопроса по поводу того, можно ли использовать идентифицированный нами набор микроРНК для диагностики в клинике. Однозначно достаточно сложно ответить на этот вопрос, хотя мы проводили исследования на ограниченной выборке пациентов с другими заболеваниями легких: с саркоидозом, с раком легкого, с неспецифической интерстициальной пневмонией. В данных исследованиях наш набор себя показал как специфичный для туберкулеза. Из литературных данных тоже известно, что большинство микроРНК, которые входят в наш набор, обладают таким сродством именно к туберкулезу. Но для точного ответа на этот вопрос конечно же необходимо проведение клинических исследований, чем мы в настоящий

момент и заняты. После проведения полноценных клинических исследований уже можно будет сказать, возможно или невозможно.

Что касается растворимой формы CD70. Мы использовали мономер и можно сказать, что нам просто повезло. В нашей работе он действительно работал, мы наблюдали обогащение лимфоцитов CD27^{low} в культуре Т лимфоцитов CD27^{high}, куда мы добавляли этот вот рекомбинантный белок. Специально мы не смотрели, в какой форме.

Вопрос: Работа называется «Регуляция воспаления при туберкулезе в эксперименте и клинике». Клиническое внедрение какое планируется? Можете более подробно рассказать.

Ответ: Прежде всего это наш набор микроРНК. Тут я, наверное, возьму на себя слишком много сказав, что мы в данном случае являемся первопроходцами, потому что есть много различных тест-систем, которые говорят о том туберкулез это или не туберкулез. Они широко применяются в клинике. Но нет ни одной тест-системы, которая говорила бы о прогрессировании процесса, и нет ни одной тест-системы, которая именно говорила бы о прогрессировании воспалительного процесса и прогрессировании инфекции. Это наше ноу-хау в регуляции и именно вот этим сейчас и заняты. Мы занимаемся сейчас идентификацией функциональной активности каждой из этих микроРНК. И поняв, что делает конкретная микроРНК. можно будет судить о том, возможна ли разработка какого-то пациент-ориентированного подхода.

Вопрос: Насчет IL11 у меня продолжение вопроса. Смотрели ли вы влияние блокады классической триады IL1, IL6, IFN γ . А второй вопрос – для того, чтобы получить модель, Вы скрестили мышей чувствительных и устойчивых к туберкулезу, как я поняла. Это видимо было сделано преднамеренно. А если бы Вы использовали мышей C57BL/6, они бы не подошли для этой же цели?

Ответ: По поводу блокады основной триады, нет, в нашей работе мы специально этим не занимались и не смотрели. Хотя в нашем отделе ведутся исследования по влиянию блокирования IL6 на разных стадиях туберкулезного процесса. При развитии туберкулеза всё сильно зависит от того, на какой

именно стадии развития воспаления конкретный путь, конкретный цитокин заблокировать, чтобы, прежде всего, не навредить хозяину, потому что каждый из этих цитокинов, которые Вы сказали, он необходим при формировании протекции при туберкулезе, и полное его отсутствие, оно, конечно же, будет скорее во вред, нежели в пользу для хозяина.

Что касается гибридов второго поколения. Мы же использовали не просто гибриды, мы использовали гибриды второго поколения, потому что при скрещивании чувствительных и устойчивых к туберкулезу животных мы получаем сначала гибриды первого поколения, которые будут устойчивы к туберкулезной инфекции. Скрещивание гибридов первого поколения дает нам получение гибридов второго поколения, такую гетерогенную популяцию по чувствительности к процессу. То есть мы стремились смоделировать модель человеческой популяции, где бы у нас были особи с разной чувствительностью к инфекции. И уже на этой генетически гетерогенной популяции можно было бы ответить на вопрос о корреляции с тяжестью течения инфекции, либо с протекцией, и как раз верифицировать те данные, которые мы получили на животных, чувствительных и устойчивых к туберкулезу. По поводу того, можно ли было бы использовать мышей C57BL/6. Можно было, вместо A/Sn. Думаю, что вполне возможно, но для своей модели, вот так исторически сложилось, что мы выбрали мышей A/Sn, потому что уже достаточно долго в нашем подразделении использовалась вот именно такая модель на мышах. В принципе, вообще практически все линии мышей, за некоторым исключением, устойчивы к туберкулезу, и замена снеллов, да, она была бы возможна любой другой.

Вопрос: Вы показали, что в бактериостатической функции макрофагов нет роли активных форм азота. Если их какое-то влияние на киллинг микобактерий в макрофагах, или нет? Такое известно?

Ответ: Есть и роль достаточно большая. Мы показали, что нет роли в активации непосредственно при активации Т-лимфоцитами CD27^{low}, что получается нитрит-независимый механизм. А в принципе для мышинной модели туберкулеза показана одна из ключевых ролей оксида азота, радикала оксида азота, в киллинге микобактерий. То есть оксид азота начинает секретироваться

индуцибельной NO-синтазой при активации, после фагоцитоза при активации макрофагов M1. Эта молекула в свою очередь взаимодействует с супероксид-радикалом с формированием пероксинитрита, который является уже одним из ключевых факторов киллинга микобактерий. Но в наших экспериментах непосредственно с высокодифференцированными эффекторами CD27^{low}, мы показываем наличие альтернативного запуска киллинга, не зависящего от генерации оксида азота.

Вопрос: Первый вопрос у меня был по эффектам CD70 на дифференцировку CD27-положительных лимфоцитов. Если внимательно прочитать вопрос, становится понятно, что я не вполне понял соответствующий сюжет в диссертации. Мы с Галиной Сергеевной это подробно обсудили, претензий по существу у меня не осталось совсем, осталось пожелание, чтобы этот момент был бы в тексте проговорен более четко, чтобы читателю, наподобие меня, было понятно каким образом пришли к выводу о том, что там важна додифференцировка CD27-положительных T лимфоцитов в эффекторы, на которых экспрессия CD27 низкая. Галина Сергеевна, если хочет, может для вас это тоже пояснить, а в принципе можно просто согласиться с этим замечанием.

Ответ: Что касается всех Ваших замечаний, мы, конечно же, это всё учтём в наших дальнейших исследованиях, по поводу реакции, по поводу дифференцировки CD27^{high} и CD27^{low}. Мы должны были более подробно расписать как это всё происходит. И, конечно, мы это учтём в будущем, особенно теперь, когда мы готовим эти данные к публикации.

Вопрос: Второй вопрос про пептидный ингибитор NF- κ B, он в докладе проскочил довольно кратко. Есть ли у него перспективы в качестве противовоспалительного средства? Потому что эффект на мышцах был яркий, это рисунок 21 в диссертации, и, однако, как сама Галина Сергеевна указывает в обсуждении на странице 183, мышечная модель туберкулеза, хотя и информативная, сильно отличается от того, что наблюдается у людей, поэтому вопрос интересный. Можно ли из этого пептида сделать какое-то лекарство?

Ответ: Что же касается NBD-пептида, есть ли у него будущее в клинике? Я считаю, что да, наверное, оно, несомненно, есть. Хотя большинство работ по

регуляции основного пути активации NF-kB NBD-пептидом – оно только на мышинных моделях. Продемонстрированы блок воспаления при ревматоидном артрите, блок прогрессирования глиобластомы, рака молочной железы. По поводу использования в клинике, вероятно, да, но надо думать над тем, какая это будет лекарственная форма, способы доставки. Естественно, использовать антенопедию, как мы использовали в нашей работе, в клинике не представляется возможным.

Вопрос: Следующий вопрос был про чувствительность и специфичность набора микроРНК. Этот вопрос был полностью отражен в докладе. В диссертации, по-моему, можно было бы его отразить чётче. Вопросов никаких нет, все с чувствительностью и специфичностью этого набора понятно, но дополнительный вопрос к нему – какие на него планы? Планируются ли у него клинические испытания для последующей регистрации в качестве медицинского изделия или, может быть, таких планов нет, или, может быть, по объективным причинам это не рассматривается?

Ответ: Что касается набора микроРНК, который мы создали. В настоящий момент мы как раз занимаемся получением приоритетной справки и оформлением патента на изобретение на способ диагностики разной степени воспаления при туберкулезном процессе. И, естественно, в перспективе нам бы хотелось зарегистрировать данный набор как клинический диагностический набор.

Вопрос: И вот один вопрос по оформлению. Некоторые изображения состоят из слишком крупных пикселей. Не очень понятно почему, было ощущение, что, может быть, конвертор в PDF как-то не очень хорошо с ним обошелся. Особенно на рисунке 21, просто было полное ощущение, что на оригиналах детали были, а в PDF уже не рассмотреть.

Ответ: По поводу пикселизации изображений. Да, Вы несомненно правы. К сожалению, у PDF-конвертора есть такой огрех, потому что все наши гистологические картинки, они даже не 300 dpi, они 600 dpi и какие-то даже побольше для того, чтобы получилось качественное изображение. Но, к сожалению, конвертор при переводе живёт немножечко своей жизнью. Так, ещё раз огромное спасибо и, конечно же, мы учтём все Ваши замечания.

Вопрос: Были в работе некоторые неточности в подписях к рисункам. Например, сокращение $gmIL11$ используется как для рекомбинантного мышинового IL11, так и рекомбинантного мутантного IL11, что в общем-то вводит в некоторые заблуждения. Еще мне показалось, что очень не хватает в главе, где описывается эксперимент на сапозин-дефицитных мышах, какого-то введения о том, почему был выбран именно сапозин. Об этом очень хорошо рассказано в обсуждении, но какого-то введения нет. Этого, мне кажется, не хватает.

Ответ: По поводу всех Ваших замечаний, конечно, Вы правы, мы всё это учтём, и, естественно, следовало бы в описании, в литературном обзоре дать какую-то характеристику сапозинам и объяснить, почему мы именно выбрали сапозин для регуляции. Да, это наше упущение, спасибо. Мы это обязательно учтём в дальнейшем.

Вопрос: Но у меня возник вот такой вопрос. Ведь сапозинов всего четыре. Они все из одного предшественника возникают. И вот как у этих мышей с другими сапозинами, потому что разные сапозины, они в общем-то в какой-то степени взаимозаменяемы. И если те и другие работают, а сапозин D не работает, и это вызывает вот такие изменения, то это очень важно, тогда можно говорить о том, что у сапозина D особая роль при туберкулезе.

Ответ: Что касается взаимозаменяемости сапозинов, в нашей работе мы смотрели именно нокауты по сапозину D. Недостаток сапозина D и недостатки других сапозинов не изучалось. Хотя для создания этих мышей из генома вырезался именно кусок, который отвечает за продукцию сапозина D. А в гене просапозина все сапозины идут подряд. И там был вырезан именно этот вот кусок. Сапозины, они вообще в широком смысле шапероны, и каждый из них взаимодействует со своими липидами. Такая взаимозаменяемость именно с липидами не показана четко. И недостаток каждого из сапозинов приводит к формированию своего определенного синдрома.

Вопрос: Мне очень понравилась первая глава, и когда я ее читал, все возникала такая мысль, что все эти клетки, которые легко выстраиваются в такой ряд — центральные клетки памяти, эффекторные клетки памяти и эффекторы просто. Но потом я центральные клетки памяти отбросил,

поскольку CD62L не экспрессируется. А вот, что касается эффекторных клеток памяти и просто эффекторов: дифференцировка отсюда сюда с потерей CD27, по-моему, вполне укладывается. Хотелось бы спросить у автора, такая интерпретация проходит или не проходит.

Ответ: Что же касается клеток памяти эффекторов. по поводу CD27^{high} и CD27^{low}. Да в качестве центральных клеток памяти их, естественно, рассматривать нельзя. Они теряют L-селектин и уже назад его не приобретают никаким образом. По поводу эффекторных клеток памяти и эффекторов и возможного перехода: в наших предварительных исследованиях было продемонстрировано, что дифференцировка CD27^{high} и CD27^{low}, высокодифференцированные эффекторы, при туберкулезе происходит непосредственно в легочной ткани, куда приходят CD27^{high}. Там они додифференцируются до CD27^{low}. Эти высокодифференцированные эффекторы, это уже конечная стадия дифференцировки. Они начинают секретировать большое количество различных провоспалительных цитокинов и тут же уходят в апоптоз. То есть обратная дифференцировка, по крайней мере в нашей работе что мы показали, невозможна при туберкулезе. В качестве эффекторных клеток памяти, наверное, CD27^{high} рассматривать можно, хотя маркеры памяти на них специально мы не смотрели, но вот эти CD27^{high} клетки — это достаточно гетерогенная популяция. Там не только эффекторы, там и регуляторные Т клетки тоже присутствуют.

Вопрос: И третий вопрос, он такой немножко провокационный, может быть. Касается как раз ингибитора NF-κB. Был показан действительно очень хороший эффект от применения этого ингибитора, но при этом микобактериальная нагрузка оставалась на прежнем уровне у животных. Так вот, такой вопрос, а не в какой-то степени это не подрывает основную идею диссертации?

Ответ: Что касается вопросов по поводу ингибирования NF-κB в нашей работе. Мы ингибировали классический путь активации NF-κB, естественно, не ингибировали ни в коем случае NF-κB полностью. И с помощью NBD-пептида такого полного ингибирования транскрипционного фактора достичь невозможно. Вы абсолютно правы, полное ингибирование NF-κB скорее будет

приводить к травматическим событиям, нежели к протекции при туберкулезе. По поводу того, что мы не получили зависимость, что у нас не было разницы в микобактериальной нагрузке в легких. Когда мы блокировали IL11, блокирование мы начинали на ранней стадии формирования противотуберкулезного иммунного ответа. Антитела вообще в первый день после инфицирования мы начинали вводить, а мутантную форму белка использовали через 1,5–2 недели после инфицирования. NF-kB мы блокировали уже через 3 недели после инфицирования, когда формируется гранулематозное воспаление при туберкулезной инфекции и, вероятно, на данной стадии блокирование NF-kB не приводило к регуляции микобактериальной нагрузки легочной ткани. То есть регуляция микобактериальной нагрузки на данной стадии развития инфекции по нашим данным была уже невозможна. Вероятно, это надо было бы делать раньше, но мы пробовали в наших экспериментах раньше начинать блокировать NF-kB, и в данном случае это способствовало не протекции, а наоборот, патологии, развития инфекции. Также в нашей работе мы использовали в качестве способа доставки антепедию. Благодаря антепедии аэрозоль проникала во все клетки в месте ведения, не только в макрофаги. Может быть, еще и с этим было связано снижение регуляции уровня микобактериальной нагрузки. Также продемонстрировано, что микобактериальная нагрузка не всегда коррелирует со степенью развития воспаления при туберкулезной инфекции. Например, крысы туберкулезом вообще не болеют, микобактерии у них развиваются и размножаются в неограниченном количестве и жизни это их никак не мешает. Конечно, в будущем все Ваши замечания мы учтем.

Вопрос: На рисунке 7А прерывистой линией обозначено включение ^3H -урацила чистой культурой микобактерий, а по оси абсцисс отложено отношение количества микобактерий к числу макрофагов. Наверное, правильнее было бы по оси написать число микобактерий, а в подписях к рисунку обозначить количество макрофагов?

Ответ: Во всех наших экспериментах с инфицированными макрофагами мы использовали одно и то же количество микобактерий, 50 000 КОЕ/лунку 96-луночного планшета, менялось лишь количество макрофагов в лунке. Таким

образом, мы посчитали возможным указать включение ^3H -урацила чистой культурой микобактерий на графике.

Вопрос: В подписях к рис. 8 не указано, разведение чего добавляли в культуру макрофагов.

Ответ: Спасибо за замечание, в описании рисунка нами указано, что макрофаги перитонеального экссудата мышей B6-SapD-ko инфицировали различными разведениями концентрированного раствора вирусных частиц, содержащей вирусные частицы с искусственным геном SAPD человека. Но Вы абсолютно правы, нам следовало это указать и в подписи к рисунку.

Вопрос: На стр.99, по-видимому, ошибочно написано, что у мышей дикого типа (а не у дефицитных по SapD) не удастся выделить зону макрофагального скопления, т.к. чуть выше написано, что «[у мышей B6]... в отличие от гистологической картины для мышей B6-SapD-ko (3 недели после заражения) это макрофагальное скопление четко выражено, а на его периферии формируется классический лимфоидный вал туберкулезной гранулемы»?

Ответ: Спасибо за замечание. Это опечатка.

Вопрос: На стр.104 написано: «Для мышей I/St было выявлено 249 (15%) ЗИ-генов (127 генов с повышенным уровнем экспрессии относительно «наивного» контроля, 122 гена с повышенным уровнем экспрессии)». Очевидно, 122 – с пониженным уровнем экспрессии?

Ответ: Да, спасибо за замечание. Это опечатка.

Вопрос: Что вы имеете ввиду: «переход воспалительного ответа при инфекции из хронической в острую фазу»?

Ответ: Туберкулёз, прежде всего, это хроническая инфекция. Но мы рассматривали туберкулёз с точки зрения развития воспалительного ответа, с точки зрения развития воспалительных реакций. Под хроническим воспалением мы понимали такое состояние динамического равновесия, когда не идет прогрессирования процесса, но также не идет и выздоровление, то есть процесс находится на каком-то достаточно стабильном уровне. Однако возможно же прогрессирование данного процесса. Прогрессирование данного процесса приводит к усилению миграции клеток в очаг инфекции. Прежде всего идет усиление миграции нейтрофилов в очаг инфекции. Таким образом, при более

сильной миграции нейтрофилов в очаг инфекции усиливается экспрессия ряда факторов, которые вовлечены в воспаление, как провоспалительные цитокины, так и хемокины, которые, в свою очередь, опять-таки усиливают инфекцию. Нейтрофилы начинают уходить в апоптоз, появляется зона некроза, разрастание этой зоны некроза, тем самым происходит диссеминация инфекции. Именно вот этот процесс мы и имели в виду, когда говорили об остром воспалительном ответе. И в нашей работе для нас было важно найти те самые пусковые механизмы и маркеры, которые бы говорили о том, когда именно и при каких условиях происходит уход организма от этого состояния равновесия в острую фазу, что естественно очень важно, особенно при формировании пациент-ориентированной терапии, где мы понимаем, что основной вред мы имеем не столько от микобактерий, сколько от, скажем так, неправильного иммунного ответа организма хозяина, от усиленного воспаления при микобактериальной инфекции.

Вопрос: Вы оценивали зависимость экспрессии изучаемых микроРНК от количества микобактерий туберкулеза в стенке туберкулемы и легочной ткани, удаленной от туберкулемы?

Ответ: Специально этот вопрос нами изучен не был. В нашей работе мы не определяли высеваемость из лёгочной ткани у пациентов с диагнозом туберкулез лёгких. Это было связано с несколькими причинами, основной из которых является, конечно, этическая причина, где мы получали только крайне небольшой участок туберкулемы, либо стенки туберкулемы, либо каверны и парехиматозной ткани. Основной биоматериал уходил в клинические лаборатории, которые работают строго по своему разработанному сценарию. И они не могут отклоняться никуда и использовать этот материал для чего-либо другого. Тот материал, который мы получали из операционной, его уже в операционной клали в фиксатор РНКаз, RNALater, и для посева он был уже не пригоден. У нас был материал в физиологическом растворе, но, к сожалению, он тоже был не пригоден для посева. Также хочу обратить внимание на то, что все пациенты, которые вошли в наше исследование, это хирургические пациенты. И прежде чем попасть в хирургическое отделение института, каждый из этих пациентов прошел достаточно длительный курс химиотерапии,

поэтому предсказать, какова была бы микобактериальная нагрузка, достаточно тяжело, и вообще антимикобактериальная терапия достаточно сильно осложняет изучение этой микобактериальной нагрузки. Оно возможно, и, конечно, спасибо огромное за идею, мы об этом подумаем, на мышинной модели, где мы сейчас будем пытаться понять функциональную активность каждой из этих микроРНК. Мы, конечно же, исследуем корреляционную зависимость микобактериальной нагрузки лёгочной ткани от экспрессии либо ингибирования различных микроРНК, которые мы идентифицируем.

Диссертация Шепельковой Г.С. «Регуляция воспаления при туберкулезе в эксперименте и клинике» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение в области иммунологии: установлено, что для активации бактериостатической функции макрофагов необходим физический контакт между $CD4^+$ -эффекторами с фенотипом $CD44^{high}CD62L^{low}CD27^{low}$ и макрофагом; продемонстрирована роль сапозина D в функционировании механизмов врожденного иммунитета, направленных на элиминацию микобактериальной инфекции; доказана роль IL-11 в регуляции нейтрофильного воспаления, стимулированного заражением *M. tuberculosis*; предложен способ диагностики активности туберкулезного воспаления по уровню экспрессии ряда сывороточных микроРНК; продемонстрирована возможность определения степени деструкции и активности воспалительных процессов в легочной ткани при ТБ по экспрессии набора из 6 зрелых сывороточных микроРНК.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. №1690, 26.01.2023 г. №101, 18.03.2023 г.

№415, 26.10.2023 г. №1786, от 25.01.2024	№ 62, от 16.10.2024	№1382), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор достоин присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология».
--	---------------------	---

На заседании 23.04.2025 г. диссертационный совет принял решение за разработку теоретических положений, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение в области иммунологии, присудить Шепельковой Г.С. ученую степень доктора биологических наук по специальности «3.2.7 Иммунология».

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 18 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовал: за – 18, против – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель диссертационного совета
член-корр. РАН, д. мед. наук, проф.

М.Р. Хаитов

Ученый секретарь диссертационного совета
д. биол. наук

Гудима Г.О.

24.04.2025