

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент



А. Эргешов

2024 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»
о диссертации Шепельковой Г.С.
«Регуляция воспаления при туберкулезе в эксперименте и клинике»
на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности «3.2.7. Иммунология»

Диссертационное исследование «Регуляция воспаления при туберкулезе в эксперименте и клинике» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» выполнялось на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (далее ФГБНУ «ЦНИИТ»). В период работы над диссертацией соискатель работал в ФГБНУ «ЦНИИТ».

Соискатель: Шепелькова Галина Сергеевна, 1981 года рождения, в 2005 году с отличием закончила Биологический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова (биохимик по специальности биохимия). С 2005 по 2008 гг. обучалась в очной академической аспирантуре ФГБНУ «ЦНИИТ» по специальности «аллергология и иммунология». В 2009 г. в диссертационном совете на базе НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи успешно защитила диссертационное исследование на

базе НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи успешно защитила диссертационное исследование на соискание степени кандидата биологических наук, на тему «Эффекторы CD4 при экспериментальной туберкулезной инфекции: миграция, фенотип, и дифференцировка» по специальности «14.00.36 – иммунология и аллергология». С 2009 года по настоящее время Шепелькова Г.С. работает в отделе иммунологии последовательно в должностях м.н.с. – н.с. – с.н.с. С 2017 по 2019 г. Галина Сергеевна занимала должность ученого секретаря ФГБНУ «ЦНИИТ». С 2022 года заведует лабораторией биотехнологии ФГБНУ «ЦНИИТ».

Научный консультант: доктор медицинских наук Еремеев Владимир Витальевич, заведующий отдела иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ».

Слушали:

1. Выступление Шепельковой Г.С. об основных результатах диссертационного исследования.
2. Выступление рецензента д.м.н. Никоненко Б.В.
3. Выступление рецензента д.м.н., профессора Абдуллаева Р.Ю.
4. Выступление рецензента д.б.н., профессора Черноусовой Л.Н.

По результатам рассмотрения диссертации принято следующее

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Актуальность исследования

Актуальность диссертации Шепельковой Г.С. «Регуляция воспаления при туберкулезе в эксперименте и клинике» на соискание степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» не вызывает сомнения. В настоящее время туберкулез лидирует среди бактериальных инфекций по смертности. По данным ВОЗ за год в мире регистрируется около 10 миллионов новых случаев заболевания активным туберкулезом и около 2 миллионов человек ежегодно гибнут от этой инфекции.

Размножение и количество микобактерий в органах далеко не всегда определяет тяжесть течения болезни. Об этом свидетельствуют как клинические данные [Kaufmann SHE, 2008], так и отсутствие корреляции между количеством микобактерий в легких и сроком выживания мышей после заражения ТБ [Kaushal D et al., 2002]. Скорее, острота

течения заболевания, деструкция легочной ткани и развитие кахексии в большей степени определяются воспалительными процессами, контролируемыми организмом хозяина, чем токсическим воздействием микобактерий и их продуктов. Неспособность организма хозяина ограничить диссеминацию микобактерий и патологически высокая реактивность могут вызывать значительные повреждения структуры инфицированных тканей [Dannenberga A.J., 1982; Cardona et al., 1999; Hernandez-Pando et al., 1996].

Основные механизмы протекции и патогенеза ТБ определены, однако все еще недостаточно сведений о деталях тонкой настройки иммунитета. Так, ряд исследований посвящен динамике формирования гранул, а также установлению общих закономерностей взаимодействия и функционирования различных клеток, принимающих участие в формировании гранул. Процесс образования гранул ограничивает размер очага инфекции, однако, при нарушенном контроле воспалительных процессов может начаться деструкция легочной ткани в результате интенсивного клеточного иммунного ответа. Неконтролируемые реакции иммунитета из защитных становятся патогенными. В результате распада очагов воспаления начинается дальнейшее распространение инфекции через лимфатическую и кровеносную системы. Провоспалительные цитокины, включая интерфероны, фактор некроза опухоли и интерлейкин 1, а также микроРНК и эйкозаноиды образуют интерактивную сеть при ТБ. Перекрестная регуляция между провоспалительными медиаторами оказывает сильное влияние на характер гибели инфицированных клеток.

В связи с вышеизложенным, при угрозе серьезных патологических изменений в легочной ткани одним из перспективных направлений «правильной» регуляции ответа представляется подавление интенсивного воспаления, клеточной инфильтрации и неконтролируемого иммунного ответа путем блокирования синтеза медиаторов воспаления. 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. Однако данных о том, как регуляция воспаления в клинике влияет на течение ТБ очень мало. Не известно на каких стадиях процесса противовоспалительные или контр-воспалительные воздействия могут способствовать уменьшению степени патологических изменений, а на каких – способствовать диссеминации микобактерий. Диссертационное исследование Шепельковой Г.С.

посвящено экспериментальной разработке решений этих проблем, что и определяет актуальность данной работы.

Соответствие диссертации специальности

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

Связь темы диссертации с планом научных исследований ФГБНУ «ЦНИИТ»

Диссертационное исследование Шепельковой Г.С. выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБНУ «ЦНИИТ» (темы НИР отдела иммунологии: 0515-2019-0018 «Изучение механизмов врожденного и адаптивного звеньев иммунного ответа при туберкулезе и интерстициальных заболеваниях легких» и FURE-2022-0010 «Исследование иммунологических и иммуногенетических аспектов заболеваний органов дыхания в клинике и эксперименте»).

Тематика исследования диссертационной работы Галины Сергеевны была поддержана грантами:

- РНФ 14-15-00029 «Роль нейтрофилов в патогенезе туберкулеза»;
- РФФИ (Россия) – Объединение им. Гельмгольца (Германия) 09-04-91321 «Генетическая чувствительность к туберкулезу»;
- РФФИ 13-04-01358 «Взаимодействие легочных макрофагов и Т-клеток CD4⁺ при туберкулезной инфекции у мышей»;
- РФФИ 15-04-05519А «Врожденный противотуберкулезный иммунитет: роль сапозина D– кофактора деградации мембранных гликосфинголипидов»;

- РФФИ 16-15-10242 «микроРНК при туберкулезе – биомаркеры активности заболевания и регуляторы воспаления»;
- РФФИ 18-15-00332 «Малые некодирующие РНК *Mycobacterium tuberculosis* как регуляторы взаимодействия «патоген-хозяин»».

Тема диссертации Шепельковой Г.С. утверждена на заседании Ученого совета ФГБНУ «ЦНИИТ», протокол №12 от 27.11.2017 года.

Основные результаты диссертационного исследования

В своем диссертационном исследовании на модели экспериментальной туберкулезной инфекции у мышей Галина Сергеевна продемонстрировала, что высокодифференцированные Th1 CD4⁺ эффекторы с фенотипом CD44^{high}CD62L^{low}CD27^{low} активируют бактериостатическую функцию как перитонеальных, так и «наивных» интерстициальных легочных макрофагов; данный механизм активации не зависит от генерации активных форм азота. Для активации антимикобактериальной функции макрофагов необходимо контактное взаимодействие Т-лимфоцита и макрофага, в результате которого секретируется фактор с молекулярной массой от 1 до 10 кДа, активирующий макрофаги.

Также в мышинной модели экспериментального туберкулеза было показано, что дефицит сапозина D ведет к снижению антимикобактериальной бактериостатической активности макрофагов (перитонеальных и интерстициальных легочных) в системе *in vitro*; данный механизм антибактериального действия сапозина D не связан с продукцией активных форм азота. У инфицированных *M. tuberculosis* мышей недостаток сапозина D приводит к обострению процессов воспаления и способствует усилению предрасположенности к апоптозу клеток легочной ткани.

По результатам диссертационной работы Шепельковой Г.С. установлено, что инфицирование *M. tuberculosis* устойчивых к ТБ мышей линии A/Sn приводит к изменению экспрессии в очаге инфекции большего числа генов, чем в случае с инфицированием чувствительных к ТБ мышей линии I/St. Для чувствительных к ТБ мышей I/St продемонстрирована повышенная активация ассоциированных с ответом нейтрофилов на Mtb генов, вовлеченных в реакции воспаления. У генетически гетерогенной популяции гибридов F2 (I/St x A/Sn) прогрессирование микобактериальной инфекции коррелирует с острым воспалительным ответом,

опосредованным фагоцитирующими клетками хозяина, повышением экспрессии факторов воспаления и сильной нейтрофильной инфильтрацией легочной ткани.

В результате исследования выявлено, что терапия поликлональными анти-IL11 антителами класса IgG либо генетически модифицированным рекомбинантным IL11 мышей I/St, инфицированных *M. tuberculosis*, способствует подавлению нейтрофильного воспаления и пролонгированию времени жизни зараженных животных. Местное селективное ингибирование классического пути активации транскрипционного фактора NF-κB у мышей линии I/St, инфицированных *M. tuberculosis*, приводит к уменьшению воспалительных реакций за счет понижения экспрессии провоспалительных цитокинов и клеточной (нейтрофилы и Т лимфоциты) инфильтрации ткани легкого.

При исследовании хирургического аутопсийного материала, полученного от пациентов с диагнозом ТБ легких показано, что интенсивность (острота) воспалительных реакций в очаге инфекции у данных пациентов (по данным гистологических исследований, а также по результатам анализа экспрессии и продукции факторов воспаления, а также экспрессии miRs) нарастает в ряду туберкулема без распада → туберкулема с распадом → каверна.

Как результат диссертационного исследования – сформирован набор из 6 зрелых сывороточным miRs (miR-155, miR-191, miR-223, miR-26a, miR-222, miR-320), по уровню и направлению экспрессии которых возможно охарактеризовать изменение степени деструкции и активности воспалительных процессов ТБ легких.

Исследование биоматериала пациентов с ко-инфекцией ТБ-COVID19 показало, что даже через три месяца после перенесенного COVID-19 в легких пациентов с туберкулезом сохраняются признаки воспаления (по результатам гистологических исследований, а также по анализу уровня экспрессии факторов воспаления и зрелых miRs), связанные с SARS-CoV2-инфекцией.

В модели *in vitro* было изучено действие гиперэкспрессии miR-191-5p и miR-222-3p. Продемонстрировано, что повышенная экспрессия вышеупомянутых микроРНК характеризуется оппозитным действием на антимикобактериальную активность инфицированных *M. tuberculosis* макрофагов человека. Модулирующее действие данных микроРНК опосредовано влиянием на экспрессию ряда факторов воспаления и других микроРНК и, вероятно, не связано с генерацией активных форм азота.

Достоверность результатов диссертационного исследования

Должная степень достоверности результатов исследования основана на использовании целесообразных, в соответствии с поставленными задачами, моделей исследования; методологии исследования, соответствующей поставленным задачам; достаточном количестве биообразцов, а также на применении адекватных методов статистической обработки, полученных экспериментальных данных. Выводы представленного исследования обоснованы результатами исследования.

Научная новизна

В диссертационном исследовании Шепельковой Г.С. четко показана научная новизна.

1. Установлено, что высокодифференцированные Th1 эффекторы с фенотипом $CD4^+ CD62L^{low}CD27^{low}$ 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^* . Для активации Т лимфоцитами бактериостатической функции макрофагов необходимо контактное взаимодействие клеток (макрофага и Т-эффектора), после которого секретируется фактор с молекулярной массой от 1 до 10 кДа, активирующий макрофаги.

2. Показано, что Т лимфоциты $CD4^+ CD62L^{low}CD27^{high}$ способны активировать бактериостатическую функцию макрофагов, но для эффективной активации им необходимо додифференцироваться до эффекторов с фенотипом $CD4^+ CD62L^{low}CD27^{low}$.

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 *M. tuberculosis*. 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 β , 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 ИКК 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 микроРНК (miR-155, miR-191, miR-223, miR-26a, miR-222, miR-320), по уровню и направлению 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 микроРНК опосредовано влиянием на экспрессию ряда факторов воспаления и других микроРНК и, вероятно, не связано с генерацией активных форм азота.

Теоретическая значимость работы

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⁺ эффекторами Th1. Определена субпопуляция Т лимфоцитов с фенотипом CD44^{high}CD62L^{low}CD27^{low} 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. Продemonстрировано 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 значимость работы

Научно-практическая значимость работы заключается в разработке новых подходов к регулированию развития воспаления при туберкулезе в экспериментальной модели на мышах. В качестве мишени для регуляции был выбран провоспалительный цитокин IL11, чья экспрессия и продукция, как было показано в работе Шепельковой Г.С., ассоциируется с прогрессированием развития специфического воспаления, и как следствие, самой микобактериальной инфекции. Для регулирования уровня данного цитокина *in vivo* были использованы два подхода, а именно: терапия поликлональными антителами к IL11 мыши и введение мутантной формы rIL11. Иной способ регуляции воспаления *in vivo*, использованный в работе Шепельковой Г.С., заключается в модуляции продукции и активации транскрипционных факторов, задействованных в формировании воспалительного ответа, путем местной селективной ингибиции классического пути активации транскрипционного фактора NF- κ B.

Применение вышеупомянутых способов блокирования позволило подавить избыточную нейтрофилию в легких и увеличить срок выживания экспериментальных животных, зараженных туберкулезом. Таким образом, полученные результаты создают

предпосылки для разработки нового направления пациент-ориентированной противотуберкулезной терапии.

Еще одним научно-практически важным аспектом работы является характеристика развития воспалительных реакций непосредственно в очаге инфекции, в легочной ткани, у пациентов с диагнозом ТБ легких. Так, продемонстрировано, что острота воспалительных реакций нарастает в ряду туберкулема без распада → туберкулема с распадом → каверна. Кроме того, в работе произведена оценка влияния вирусной инфекции (COVID-19) на развитие воспаления у пациентов с диагнозом ТБ легких (туберкулема легких). Доказано, что коинфекция SARS-CoV-2 у больных ТБ утяжеляет течение основного заболевания. Установлены соответствующие иммунологические корреляты (микроРНК).

В работе Шепельковой Г.С. впервые идентифицированы биомаркеры (микроРНК), позволяющие врачу оценить степень активности ТБ процесса и оценить целесообразность запланированной операции. В результате исследования разработан набор из 6 зрелых сывороточных микроРНК, по степени и направлению изменения экспрессии, которых в сыворотке крови пациентов с диагнозом туберкулема или фибрознокавернозный ТБ, возможно охарактеризовать изменение активности воспалительных процессов в легочной ткани.

В диссертационном исследовании получено экспериментальное подтверждение гипотезы о модулирующем действии miR-191-5p и miR-222-3p на экспрессию ряда факторов воспаления, а также других микроРНК в инфицированных микобактериями макрофагах. Продemonстрировано, влияние вышеупомянутых микроРНК на бактериостатическую активность макрофагов.

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

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

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.

Список работ, опубликованных по теме диссертационного исследования

Научные статьи

1. **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.
2. 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.
3. **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.
4. **Шепелькова Г.С.**, Майоров К.Б., Евстифеев В.В., Апт А.С. Взаимодействие Т-лимфоцитов CD4⁺CD27^{hi} и CD4⁺CD27^{lo} с макрофагами при туберкулезной инфекции у мышей. *Туберкулез и болезни легких*. 2015; (12):57-60.
5. **Shepelkova G.**, Evstifeev V., Kondratieva T., Bocharova I., Averbakh M., Apt A. Local targeting NF- κ B 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.
6. **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.
7. 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.

8. 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>
9. **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-ТЕО-1386>
10. **Shepelkova G.**, Evstifeev V., Averbakch 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>
11. **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
12. **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.
13. **Shepelkova G.S.**, Evstifeev V.V., Berezovskiy Y.S., Tarasov R.V., Bagirov M.A., Yermeev V.V. Lung Inflammation Signature in Post-COVID-19 TB Patients. Int J Mol Sci. 2023. 24(22):16315. doi: 10.3390/ijms242216315.
14. **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
15. 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
16. 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.

17. Reshetnikov V., Terenin I., **Shepelkova G.**, Yeremeev V., Kolmykov S., Nagornykh 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*. Опубликовано online 20 августа 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 рецензируемой монографии

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

Публикации в материалах конгрессов и 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- κ B 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., Матракин 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. Yeremeev V., Evstifeev V., **Shepelkova G.**, Ergeshova A., Bagirov M. MicroRNAs in serum of post primary TB patients. *European Respiratory Journal* 52 (suppl 62) PA4725; DOI: 10.1183/13993003.congress-2018.PA4725
12. **Shepelkova G.**, Evstifeev V., Yeremeev 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., Yeremeev 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., Yeremeev 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., Yeremeev 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

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на:

1. Конференции молодых ученых ФГБНУ «ЦНИИТ», посвященной всемирному дню борьбы с туберкулезом, г. Москва (2015, 2018, 2019, 2020, 2023);
2. XV-XVII Всероссийском научном форуме с международным участием им. академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», г. Санкт-Петербург (2015, 2017, 2023);
3. VI-XI конгрессе «Национальной Ассоциации Фтизиатров», Санкт-Петербург (2017-2022 гг.);
4. Форум Кох-Мечников по туберкулезу, г. Москва (2017 г.);
5. Всероссийской научно-практической конференции фтизиатров с международным участием «Междисциплинарный подход в решении проблемы туберкулеза», г. Москва (2017 г.);
6. ERS Congress, г. Париж, Франция (2018 г.); ERS Congress, г. Мадрид, Испания (2019 г.); ERS Congress, виртуальный (2020 г.); ERS Congress, виртуальный (2021 г.);
7. 50th Union World Conference. TBScience 2019. Хайдерабад, Индия (2019 г.);
8. Keystone Symposia. Tuberculosis: Science Aimed at Ending the Epidemic 2020, Силвертон, Колорадо, США (2020);
9. Юбилейной, научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва (2021 г.);
10. 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.);
11. Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы туберкулеза и инфекционных заболеваний. Уроки пандемии», г. Москва (2022 г.);
12. 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.);

13. 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.);

14. Конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2024», г. Москва (2024 г.);

15. Объединенном иммунологическом форуме 2024, Псковская область, Пушкинские горы (2024 г.).

Участники заседания отдела иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ» отмечают, 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 результатов 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 и направлению изменения 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.

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации:

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.

Соответствие диссертации предъявляемым требованиям и рекомендация к защите

Исходя из вышеизложенного, **постановили:**

Диссертационная работа Шепельковой Галины Сергеевны на тему: «Регуляция воспаления при туберкулезе в эксперименте и клинике», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7 Иммунология», является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований сформулированы теоретические положения, которые могут быть квалифицированы 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 Галины Сергеевны соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (с актуальными изменениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук и может быть представлена к защите в диссертационный совет по специальности «3.2.7 Иммунология».

Заключение принято на заседании отдела иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ». На заседании присутствовали 38 человек, в том числе 17 докторов наук и 12 кандидатов наук, и них 5 докторов наук и 7 кандидатов наук по специальности рассматриваемой диссертации.

Результаты голосования: «за» — 38 человек, «против» — 0 человек, «воздержалось» — 0 человек

Протокол №1 от «10» июля 2024 года.

Председатель заседания,
д.м.н., профессор

В.Я. Гергер

Секретарь заседания

Е.Н. Адамовская

Подпись д.м.н., проф. В.Я. Гергера и
Е.Н. Адамовской заверяю.

Ученый секретарь ФГБНУ ЦНИИТ,
к.п.н. И.В. Золотова

