

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук Пащенко Михаила Владимировича на диссертационную работу Павловой Екатерины Николаевны «Функциональная роль Р-гликопротеина в нормальных и инфицированных макрофагах человека при действии противотуберкулезных препаратов», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – клеточная биология

Актуальность темы диссертационной работы

Рост числа случаев лекарственно-резистентного туберкулеза является серьезной проблемой для здравоохранения во всем мире. Когда возбудитель становится устойчивым ко многим доступным антибиотикам, остаются ограниченные варианты лечения, которые могут быть менее эффективными, более токсичными или требовать более длительного лечения, что может увеличить риск осложнений и смертности. В связи с этим актуален поиск способов повышения эффективности существующей противотуберкулезной терапии. Устойчивость к лекарственным препаратам может формироваться не только у бактерий, но и у клеток человека за счет функциональной активности различных транспортных белков, в том числе Р-гликопротеина. В связи с этим привлекательной стратегией для повышения эффективности антибиотиков – субстратов Р-гликопротеина – является ингибирование активности данного белка. Автор в литературном обзоре приводит свидетельства того, что Р-гликопротеин не только опосредует транспорт различных лекарственных препаратов, но и может быть вовлечен в регуляцию иммунного ответа. Тем самым, ингибирование Р-гликопротеина может вызывать различные иммунологические эффекты, при этом роль Р-гликопротеина в макрофагах – одном из ключевых типов клеток иммунной системы, участвующих с возбудителем туберкулеза, – изучена недостаточно. Таким образом, настоящая диссертационная работа, посвященная исследованию функций Р-гликопротеина в макрофагах человека, является весьма актуальной.

Научная новизна полученных результатов

Работа обладает несомненной научной новизной. Впервые обнаружена гетерогенность экспрессии гена *ABCB1*, кодирующего Р-гликопротеин, в легочной ткани у пациентов с высокой активностью туберкулезного воспаления; впервые обнаружены взаимосвязи между экспрессией гена *ABCB1* и экспрессией генов, кодирующих белки – регуляторы воспаления, играющие значимую роль в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции (цитокины, факторы транскрипции, поверхностные маркеры макрофагов). Впервые обнаружено, что высокая экспрессия *ABCB1* в легочной ткани сочетается с высокой экспрессией генов *IL6*, *STAT3*, *HIF1A* и низкой экспрессией *TNF* и *CD163*. Выявлены две подгруппы пациентов, характеризующиеся реципрокными изменениями экспрессии указанных генов. Представленные данные могут быть важны для понимания механизмов формирования резистентности к противотуберкулезным препаратам.

В развитие данных *in vivo*, в работе впервые показано, что фармакологическое ингибирование Р-гликопротеина с помощью верапамила и рифампицина подавляет продукцию провоспалительных цитокинов интерлейкина-1бета и интерлейкина-6 дифференцирующимися макрофагами человека *in vitro*.

Кроме того, впервые получена моноцитарная клеточная линия со стабильным нокдауном экспрессии *ABCB1*. Вновь созданная генетическая модель представляется важным инструментом для оценки вклада Р-гликопротеина в формирование антибиотикорезистентности.

Теоретическая и практическая значимость

Важным результатом диссертации, имеющим не только фундаментальное, но и практическое значение, является характеристика модулирующего влияния фармакологических ингибиторов Р-гликопротеина на цитокиновый профиль макрофагов, в том числе в присутствии противотуберкулезных препаратов рифампицина и бедаквилаина.

Паттерны экспрессии генов, в том числе *ABCBI*, обнаруженные в легочной ткани больных с высокой активностью туберкулезного воспаления, в перспективе могут учитываться при подборе наиболее адекватной терапии.

Монокитарная клеточная линия со стабильным нокдауном по гену *ABCBI* может использоваться для оценки вклада Р-гликопротеина в формирование резистентности как к противотуберкулезным препаратам, так и к лекарственным препаратам других групп. Преимуществом генетической модели по сравнению с традиционно используемыми фармакологическими ингибиторами Р-гликопротеина является ее большая специфичность в отношении целевого белка.

Степень обоснованности научных положений и выводов и достоверность полученных результатов

Представленная работа грамотно спланирована. Экспериментальные исследования выполнены на хорошем научном и методическом уровне с использованием адекватных молекулярных, цитологических и гистологических методов, а также современного оборудования. Исследование экспрессии генов в легочной ткани проведено у достаточно больших групп пациентов. Эксперименты *in vitro* выполнены в достаточно большом количестве повторностей. Выбор концентраций препаратов, использованных в работе, обоснован литературными данными и результатами предварительных экспериментов. Результаты были обработаны с применением адекватных методов математической статистики. Полученные результаты являются достоверными. Научные положения и выводы являются обоснованными и вытекают из полученных результатов.

Оценка структуры и содержания диссертационной работы

Работа составлена по традиционному плану. Она состоит из «Введения», глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы»,

«Публикации по теме работы» и «Список литературы». Работа изложена на 124 страницах, содержит 46 рисунков и 6 таблиц. Список литературы включает 226 источников, в том числе 10 отечественных и 216 зарубежных.

Во «Введении» убедительно показана актуальность проблемы, которой посвящена работа, обозначена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Цель диссертационной работы сформулирована четко и понятно, формулировка задач способствует достижению поставленной цели. Положения, выносимые на защиту, отражают основное содержание работы.

В главе «Обзор литературы» представлено современное состояние проблематики, которой посвящена диссертационная работы; в заключении к главе дается краткое резюме. Из литературного обзора логично вытекает постановка цели и задач диссертационного исследования. В главе «Материалы и методы» даны характеристики групп пациентов, подробно описаны экспериментальные подходы и статистические методы, использованные в диссертационной работе.

Глава «Результаты» состоит из 6 разделов. В первом разделе представлены результаты исследования экспрессии генов в перифокальной ткани туберкулом у пациентов с легочным туберкулезом с умеренной и высокой активностью воспаления. Это наиболее ценная часть работы, т.к. исследования резекционного материала дают важную информацию о процессах, происходящих непосредственно в органе-мишени туберкулезной инфекции, однако по понятным причинам такие работы проводятся редко. Проанализирована экспрессия 3 генов множественной лекарственной устойчивости. Выявлена повышенная экспрессия одного из них – гена *ABCB1*, кодирующего Р-гликопротеин, у части пациентов с высокой активностью воспаления по сравнению с пациентами с умеренно активным воспалением. Обнаружена прямая корреляция экспрессии *ABCB1* с экспрессией генов *IL6*, *STAT3* и *HIF1A*, обратная – с экспрессией *TNF* и *CD163*. К сожалению, автор не приводит данных о том, различаются ли клинические характеристики и эффективность медикаментозного лечения в подгруппах пациентов с высокой и

низкой экспрессией *ABCB1*. Во втором разделе изучено влияние двух противотуберкулезных препаратов, рифампицина и бедаквилина, на функциональную активность Р-гликопротеина в макрофагах ТНР-1 *in vitro*. Показано, что рифампицин, в при его инкапсуляции в наночастицы, существенно ингибирует эту активность, тогда как бедаквилин в терапевтических концентрациях гораздо менее эффективен. В третьем разделе проанализировано влияние рифампицина и бедаквилина на экспрессию гена *ABCB1* макрофагами *in vitro*. Оба препарата оказывали довольно слабое действие на экспрессию *ABCB1* (изменение экспрессии менее чем в 2 раза). В четвертом разделе описано модулирующее действие ингибитора Р-гликопротеина (верапамила) на цитокиновый профиль макрофагов в присутствии / отсутствии рифампицина и бедаквилина *in vitro*. Показано, что ингибирование Р-гликопротеина приводит к снижению экспрессии и/или секреции провоспалительных цитокинов. Также обнаружено, что бедаквилин повышает экспрессию генов фагоцитарных рецепторов (*CD64*, *CD209*) и усиливает поглотительную активность макрофагов. В пятом разделе представлены данные по влиянию инфицирования макрофагов туберкулезной палочкой на экспрессию генов, кодирующих Р-гликопротеин и ряд других про- и противовоспалительных медиаторов. В шестом разделе дана характеристика линии моноцитов ТНР-1 со стабильным нокдауном экспрессии *ABCB1* / Р-гликопротеина. Как отмечено автором, модель нокдауна может быть более специфична по отношению к целевому белку, чем фармакологические ингибиторы. В целом, полученные результаты изложены четко, структурированно, хорошо проиллюстрированы рисунками и таблицами.

В разделе «Обсуждение результатов» проводится анализ и сопоставление полученных данных с данными мировой научной литературы. В разделе «Заключение» резюмированы основные моменты проведенных исследований. «Выводы» отражают главные результаты работы, полностью обоснованы представленными данными, корректно сформулированы.

По теме диссертации опубликовано 6 статей, 4 из них – в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова.

В целом, диссертационная работа изложена грамотным языком, логична и последовательна. Диссертация соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием методологически обоснованного плана научного исследования и соответствием решенных задач общей цели исследования. Диссертация соответствует специальности 1.5.22 – клеточная биология.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет.

Заключение

Диссертация Павловой Екатерины Николаевны на тему: «Функциональная роль Р-гликопротеина в нормальных и инфицированных макрофагах человека при действии противотуберкулезных препаратов» является законченной научно-квалификационной работой, в которой осуществлено решение актуальной научной задачи, имеющей существенное значение для клеточной биологии: обнаружена гетерогенность экспрессии гена *ABCB1* в легочной ткани у пациентов с высокой активностью туберкулезного воспаления; выявлены взаимосвязи экспрессии *ABCB1* и других маркеров воспаления в легочной ткани; обнаружено модулирующее влияние ингибирования Р-гликопротеина на цитокиновый профиль макрофагов человека; создана моноцитарная клеточная линия со стабильным нокдауном гена *ABCB1*.

Диссертация Павловой Екатерины Николаевны отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М. В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.22 – клеточная биология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите

диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Таким образом, соискатель Павлова Екатерина Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – клеточная биология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук,

и.о. заведующего

лабораторией клинической

иммунологии ФГБУ «ГНЦ

Институт иммунологии»

ФМБА России

Паценков Михаил Владимирович

Контактные данные: Тел.: +7 _____ ; e-mail: _____ @

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.03.03 – иммунология, медицинские науки.

Адрес места работы: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д.24, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, лаборатория клинической иммунологии

Тел: +7 (499) 311-67-78; e-mail: info@nrcii.ru

