

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Павловой Екатерины Николаевны на тему: «Функциональная роль Р-гликопротеина в нормальных и инфицированных макрофагах человека при действии противотуберкулезных препаратов»

по специальности: 1.5.22 – клеточная биология.

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Диссертационное исследование Павловой Екатерины Николаевны посвящено исследованию функциональной роли белка множественной лекарственной устойчивости Р-гликопротеина в нормальных и инфицированных макрофагах человека при действии противотуберкулезных препаратов.

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, туберкулез является одной из десяти ведущих причин смертности в мире. Разработка и внедрение новых противотуберкулезных препаратов – процесс, продолжительность которого может достигать нескольких десятилетий. При этом остро стоит проблема не только резистентности самого возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* к антибиотикам, но и проблема множественной лекарственной устойчивости клеток самих пациентов. При этом наиболее остро стоит вопрос множественной лекарственной устойчивости макрофагов, в связи с их ключевой ролью в уничтожении *M. tuberculosis*. За лекарственную устойчивость клеток млекопитающих отвечают белки множественной лекарственной устойчивости, многие из которых относятся к суперсемейству АВС-транспортеров. Одним из таких белков является Р-гликопротеин. Учитывая наличие функционально активного Р-гликопротеина в макрофагах, вопрос взаимодействия противотуберкулезных препаратов с этим белком актуален для разработки новых стратегий повышения эффективности противотуберкулезной терапии.

Помимо этого в работе Павловой Е.Н. на операционном материале пациентов изучали взаимосвязь экспрессии гена Р-гликопротеина с различными факторами воспаления. Что также является чрезвычайно важной задачей, поскольку высокая активность Р-гликопротеина может затруднить достижение оптимальных концентраций противотуберкулезных препаратов в очагах туберкулезного воспаления и оказать влияние на эффективность лечения.

Все вышесказанное позволяет заключить, что тема диссертационного исследования Павловой Е.Н. является чрезвычайно актуальной проблемой современной медицины.

## Научная новизна полученных результатов

Основная часть результатов диссертационного исследования Павловой Е.Н. выполнена на макрофагах, дифференцированных с помощью форболового эфира из клеток линии моноцитарного лейкоза человека THP-1. Кроме того в работе использован резекционный материал, полученный из перифокальной области туберкулом легких больных туберкулезом, что еще больше увеличивает ценность полученных результатов. В качестве противотуберкулезных препаратов использовали бедаквилин и рифампицин, которые активно используются для терапии туберкулеза в настоящее время. В диссертационной работе Павловой Е.Н. впервые продемонстрирована взаимосвязь между высокой активностью специфического воспаления в легких больных туберкулезом и экспрессией гена *ABCB1*, кодирующего Р-гликопротеин. Так, было обнаружено, что экспрессия гена *ABCB1* неоднородна при высокой активности воспаления, и было выявлено существование двух различных молекулярно-генетических сигнатур, связанных с высокой активностью воспаления. Одна из сигнатур связана с высокой экспрессией гена *ABCB1*, а другая - с низкой. Кроме того было показано, что высокая экспрессия гена *ABCB1* в легких больных туберкулезом положительно коррелирует с экспрессией генов факторов транскрипции *HIF1a*, *STAT3*, *SOCS3*, геном цитокина *IL6*, а также геном *TGM2*, являющегося маркером низкой эффективности макрофагов в борьбе с *M. tuberculosis*. Взаимосвязь между высокими уровнями экспрессии генов *ABCB1* и *TGM2* указывает на важность Р-гликопротеина для выживания возбудителя. Данные результаты не только расширяют знания об иммунопатологии туберкулеза, но и важны для разработки новых терапевтических подходов в лечении.

В ходе выполнения данного диссертационного исследования, было получено первое доказательство, что новый противотуберкулезный антибиотик бедаквилин, в отличие от рифампицина, не вызывает индукцию экспрессии гена *ABCB1* в макрофагах человека при терапевтических концентрациях и обладает низкой субстратной специфичностью. Данный факт может быть одним из факторов, определяющих эффективность бедаквилина при лечении лекарственно-устойчивых форм туберкулеза. Помимо этого было показано, что бедаквилин является активатором фагоцитоза в макрофагах, что важно для их борьбы с возбудителем туберкулеза.

Еще одним интересным и важным результатом данной работы являются данные о различном влиянии бедаквилина и рифампицина на про- и противовоспалительные свойства макрофагов, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Помимо этого было показано, что фармакологическое ингибирование Р-гликопротеина влияет на провоспалительные свойства

макрофагов: снижает секрецию провоспалительных цитокинов на раннем сроке дифференцировки и увеличивает секрецию противовоспалительного цитокина IL10 на позднем сроке дифференцировки. Фармакологическое ингибирование Р-гликопротеина усиливает эффекты рифампицина и бедаквилина только на ранних сроках дифференцировки макрофагов. Поскольку в очагах воспаления при туберкулезе находятся моноциты и макрофаги на разных стадиях дифференцировки, то данные об иммуномодулирующих свойствах противотуберкулезных препаратов и Р-гликопротеина также представляют собой ценность для клинической практики.

Отдельно стоит отметить, что в ходе выполнения диссертационного исследования Екатериной Николаевной была впервые получена стабильная линия клеток ТНР-1 со сниженной экспрессией гена *ABCB1*. Создание данной линии клеток позволит продолжить исследования, направленные на определение роли белка Р-гликопротеина в макрофагах человека.

#### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты расширяют представления о роли Р-гликопротеина в туберкулезном воспалении и макрофагах человека. Это имеет важное значение, как для фундаментальной науки, так и для клинической практики, поскольку проблема множественной лекарственной устойчивости макрофагов к противотуберкулезным препаратам является чрезвычайно острой. Макрофаги являются основной клеточной мишенью противотуберкулезных препаратов, поскольку именно в инфицированных макрофагах персистирует возбудитель туберкулеза *M. tuberculosis*. Обнаруженные Павловой Е.Н. результаты о различных молекулярно-генетических сигнатурах, связанных с высокой активностью воспаления у пациентов с туберкулезом, расширяют наши представления об иммунопатологии этого заболевания. Кроме того данные сведения могут быть применены в клинической практике, когда на основании анализа экспрессии генов в операционном материале или его иммуногистохимического анализа, можно будет подобрать более подходящее лечение для конкретного пациента. Это ускорит подход к персонализированной медицине.

Полученные сведения о различиях в иммуномодулирующих свойствах противотуберкулезных препаратов на макрофаги на разных стадиях дифференцировки, а также данные о влиянии ингибирования Р-гликопротеина на провоспалительные свойства макрофагов и иммуномодулирующие эффекты противотуберкулезных препаратов также представляют собой большую ценность для клинической практики, поскольку в очаге туберкулезного воспаления находятся моноциты и макрофаги на разных стадиях дифференцировки. Кроме того, эти данные расширяют сведения о

биологической роли Р-гликопротеина в дифференцировке макрофагов и секреции ими цитокинов.

### **Степень обоснованности научных положений и выводов и достоверность**

#### **полученных результатов**

Степень достоверности полученных результатов подтверждается четким планом исследования, использованием адекватных методов современной клеточной и молекулярной биологии, а также получением достаточного для статистической обработки данных повторности экспериментов. Результаты работы опубликованы в рецензируемых изданиях, в том числе зарубежных рейтинговых, а также представлены на российских и международных конференциях. Все выводы и положения, выносимые на защиту, четко сформулированы, соответствуют поставленным задачам, обоснованы и логично вытекают из представленных результатов.

#### **Оценка структуры и содержания диссертационной работы**

Диссертационная работа имеет традиционную структуру и изложена на 124 страницах. Список литературы включает 226 литературных источников. Диссертация содержит 46 рисунков и 6 таблиц. По теме диссертации опубликовано 6 статей, 4 из которых опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. Автореферат соответствует тексту диссертации и дает полное представление об объеме, всех этапах экспериментальной работы, полученных результатах и выводах.

#### **Замечания, комментарии и вопросы к представленной работе**

По результатам ознакомления с представленной работой возникло несколько замечаний и вопросов, нуждающихся в уточнении.

1) Метод трансформации клеток с помощью лентивирусных частиц корректнее называть трансдукцией, а не трансфекцией (в подписи к рис. 44).

2) Поскольку используемый в качестве фармакологического ингибитора Р-гликопротеина верапамил является также индуктором аутофагии, трудно определить, чем вызвано влияние верапамила на провоспалительные свойства макрофагов – ингибированием Р-гликопротеина или индукцией аутофагии. Тем более, что в настоящее время существует немало сведений о роли аутофагии в секреции цитокинов. Быть может в дальнейшем стоит попробовать использовать ингибиторы аутофагии одновременно с верапамилем, чтобы исключить фактор аутофагии из экспериментальной системы.

3) Проверялось ли влияние противотуберкулезных препаратов на экспрессию Р-гликопротеина уже дифференцированных макрофагов? То есть что будет, если добавить противотуберкулезные препараты к уже

дифференцированным макрофагам? Окажет ли это влияние на экспрессию Р-гликопротеина?

4) Почему в большинстве опытов исследовали макрофаги на 3-и и 7-е сут дифференцировки, а в опытах с инфицированием *M. tuberculosis* использовали макрофаги на 5-е сут дифференцировки?

### **Заключение**

Вместе с тем, указанные замечания не являются критическими и не умаляют значимости диссертационного исследования. 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:**

кандидат биологических наук,  
научный сотрудник отдела математических методов в биологии,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
Челомбитько Мария Александровна

16  
7 /

23.10.2023

Контактные данные: Тел.: +7 \_\_\_\_\_ 8; e-mail: \_\_\_\_\_@

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Адрес места работы: 119992, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр.40

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

МГУ имени М.В. Ломоносова, отдел математических методов в биологии

Тел: +7 (495) 939-53-59; e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru

Подпись сотрудника НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

МГУ им. М.В. Ломоносова М.А. Челомбитько удостоверяю

Заведующая канцелярией НИИ ФХБ: Сидорова Наталия Николаевна

