

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Намакановой Ольги Александровны
на тему: «Роль TNF и IL-6 в патогенезе аллергического воспаления и
фиброзе легких у мышей»
по специальности 3.2.7. Иммунология**

Актуальность темы исследования

Хронические воспалительные заболевания легких, в первую очередь, бронхиальная астма и фиброз, остаются одной из ключевых проблем современной пульмонологии. Высокая гетерогенность астмы, наличие кортикостероид-резистентных форм с нейтрофильным инфильтратом и прогрессирующим ремоделированием дыхательных путей требуют поиска новых патогенетических мишеней для терапии. В этом контексте цитокины TNF и IL-6, обладающие широким спектром провоспалительных и профибротических эффектов, представляются очень перспективными мишенями, однако их вклад по отдельности в развитие воспалительного ответа на повреждение легких и ремоделирование легочной ткани был недостаточно изучен, а эффективность комбинированной блокады этих цитокинов в качестве потенциального терапевтического подхода оставалась неизвестной. В связи с этим диссертационная работа Намакановой О.А., направленная на экспериментальное обоснование комбинированной блокировки TNF и IL-6 для лечения тяжелых форм астмы и изучении вклада этих цитокинов на животных моделях HDM-индуцированной астмы и LPS-индуцированного фиброза легких, является безусловно актуальной и имеющей как фундаментальное, так и прикладное значение.

Научная новизна и теоретическая значимость

В работе впервые получен ряд результатов, имеющих существенное значение для иммунологии и регенеративной биомедицины. Так, на релевантной HDM-модели астмы показано, что одновременное ингибирование TNF и IL-6 превосходит монотерапию по эффективности, одновременно подавляя как Th2-опосредованную эозинофилию (эффект

блокады TNF), так и Th1/Th17-зависимую нейтрофилию (эффект блокады IL-6), а также вызывает снижение экспрессии *Tgfb1* и предотвращает патологическое ремоделирование дыхательных путей при тяжелой астме. Особенно важным является наблюдение, что нейтрализация TNF сама по себе ведет к компенсаторному накоплению Th17-клеток, а добавление антител против IL-6 предотвращает этот нежелательный эффект. С использованием оригинальной модели LPS-индуцированного фиброза и нокаутных мышей показано, что TNF важен преимущественно в острой фазе ответа на повреждение, тогда как IL-6 критичен для фибропролиферативной стадии и поддержания хронического воспаления. В работе впервые с помощью системы FlexiVent детально охарактеризованы функциональные нарушения легких у мышей с гиперэкспрессией IL-6 (hIL-6 tg CD4-Cre). Показано, что избыточная продукция IL-6 приводит к снижению эластичности и увеличению податливости легких, что напрямую указывает на его роль в необратимом ремоделировании и обструктивной патологии легких.

Практическая значимость

Предложенная в диссертационной работе стратегия комбинированной блокады TNF и IL-6 может рассматриваться как потенциально эффективный терапевтический подход для пациентов с тяжелой смешанной (эозинофильно-нейтрофильной) астмой, резистентной к стандартным глюкокортикоидам и существующим биологическим препаратам (анти-IL5/4/13). Кроме того, установление ключевой роли IL-6 в LPS-индуцированном фиброзе и нарушениях биомеханики легких обосновывает таргетирование этого цитокина для предотвращения долгосрочных структурных осложнений при хронических заболеваниях органов дыхания.

Обоснованность и достоверность выводов и положений, выносимых на защиту

Диссертация выполнена на высоком методическом уровне с использованием широкого спектра современных подходов: несколько линий

генетически модифицированных мышей, как с нокаутом, так и сверхэкспрессией целевых генов, фармакологическая блокада *in vivo*, проточная цитометрия, мультиплексный анализ, ПЦР в реальном времени, различные методы гистологического анализа, отдельно хочется отметить, что проведена детальная оценка нарушений дыхательной функции модельных животных в системе FlexiVent. Объем экспериментального материала и его адекватная статистическая обработка не вызывают сомнений и подтверждают достоверность полученных результатов. Заключение и выводы полностью соответствуют полученным результатам и обозначенным цели и задачам исследования.

Результаты опубликованы в ведущих рецензируемых журналах, представлены в 5 публикациях. Следует отметить, что ключевые экспериментальные результаты исследования опубликованы в ведущих журналах в области иммунологии, включая *Frontiers in Immunology*. Результаты диссертационного исследования были представлены автором в виде докладов на нескольких профильных международных и отечественных научных конференциях.

Положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют полученным результатам и логически вытекают из них. Выводы диссертации конкретны, доказательны и не содержат избыточных обобщений.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертация изложена на 105 страницах и построена по классическому принципу, включая введение, обзор литературы, материалы и методы, главу с результатами, обсуждение, заключение и список литературы. Работа хорошо структурирована, логика изложения последовательна и подчинена решению поставленных задач. Формулировки цели и задач работы являются конкретными и обоснованными. Каждая задача является полноценной, оригинальной и соответствует обозначенной цели.

Обзор литературы включает в себя пять разделов и представляет собой глубокий и систематический анализ современного состояния проблемы. В

ней последовательно рассмотрены механизмы патогенеза астмы с разделением на эозинофильный (Th2-опосредованный) и нейтрофильный (Th1/Th17-опосредованный) эндотипы, что подчеркивает гетерогенность заболевания. Отдельно разобраны процессы ремоделирования дыхательных путей и фиброза. Далее автор подробно анализирует роль TNF и IL-6 в патогенезе астмы, а также критически рассматривает результаты клинических испытаний антицитокиновой терапии (анти-TNF, анти-IL-6, анти-IL-4/13, анти-алармины), обосновывая необходимость поиска комбинированных стратегий. Обзор написан хорошим научным языком, содержит актуальные ссылки (включая работы 2024-2025 гг.) и завершается четкой формулировкой цели и задач исследования.

Глава «Материалы и методы» включает достаточно аккуратное и полное описание всех многочисленных использованных в работе методических подходов. Диссертационное исследование выполнено с применением современных и актуальных биомедицинских методов, включая методы клеточной и молекулярной биологии, генной инженерии и биохимии. Методологические подходы обоснованы и адекватны поставленным задачам. Использованы релевантные методы статистической обработки данных, также соответствующие поставленным задачам. В этой главе подробно описаны использованные линии мышей (BALB/c, C57BL/6, IL-6 KO, TNF KO, hIL-6 tg CD4-Cre), протоколы индукции острой и тяжелой HDM-индуцированной астмы, а также оригинальная модель LPS-индуцированного фиброза с ингаляционным методом введения. Детально представлены методы проточной цитометрии (включая стратегии гейтирования в Приложении), мультиплексного анализа, ПЦР в реальном времени и гистохимического анализа.

Описание результатов и их обсуждение логичны и последовательны. Первый подраздел посвящен изучению комбинированной блокировки TNF и IL-6 при острой HDM-индуцированной астме. Показано, что комбинация снижает инфильтрацию как эозинофилов, так и нейтрофилов в БАЛ, тогда

как монотерапия влияет лишь на одну из популяций. Также установлено, что нейтрализация TNF (но не IL-6) способствует восстановлению пула альвеолярных макрофагов. Во втором подразделе продемонстрировано, что комбинированная блокировка эффективно подавляет Th2-, Th1- и Th17-клеточные ответы в легких, причем блокада IL-6 снижает Th17, а блокада TNF — Th2. Важно, что нейтрализация IL-6 предотвращает вызванное анти-TNF терапией накопление Th17-клеток. Третий подраздел посвящен описанию результатов, полученных на модели тяжелой астмы с ремоделированием. Гистологический анализ показал, что комбинированная блокировка цитокинов снижает инфильтрацию, гиперплазию бокаловидных клеток и экспрессию *Tgfb1*. В четвертом подразделе представлено описание и ключевые характеристики LPS-индуцированной модели фиброза легких. Установлено, что через 5 недель после однократного ингаляционного введения LPS сохраняется повышенная продукция IL-6 (но не TNF) в БАЛ, накапливается коллаген и повышается экспрессия профибротических генов в легочной ткани. В пятом подразделе на моделях трансгенных мышей с использованием мышей с делецией IL-6 и TNF показано, что инактивация IL-6, но не TNF, улучшает параметры сопротивления дыхательных путей на фоне фиброза, однако при этом наблюдается накопление коллагена и, по-видимому, связанное с этим снижение эластичности легочной ткани. В заключительном подразделе на мышах с гиперэкспрессией hIL-6 в CD4+ клетках продемонстрировано, что хроническая системная продукция IL-6 вызывает воспаление, образование бронхоассоциированной лимфоидной ткани и значительное снижение эластичности и повышение податливости легких.

Глава «Обсуждение» содержит критический анализ полученных данных в контексте современных представлений по тематике исследования. Автор грамотно осмысливает и обосновывает преимущества комбинированной блокады TNF и IL-6 перед монотерапией, обсуждает роль альвеолярных макрофагов, перекрестные взаимодействия Th1/Th2/Th17-

клеток, а также механизмы фиброза с акцентом на IL-6 и TGF- β -зависимые пути.

Раздел «Заключение» описывает основные выводы работы и содержит оценку возможности использования полученных результатов в клинической практике. Выводы четко опираются на полученные в рамках диссертационной работы результаты.

Работа прекрасно проиллюстрирована, содержит 23 рисунка (и 2 дополнительных в приложении) и 5 таблиц. Использованные литературные источники приведены в должном объеме (266 ссылок) и оформлены корректно.

Вопросы и замечания по работе

Несмотря на высокое качество диссертационного исследования, в процессе ознакомления с работой возникли следующие вопросы и комментарии.

1. Крайне интересными являются данные по возможности восстановления регенеративного потенциала альвеолярных макрофагов при повреждении легких с помощью антицитокиновой терапии. В работе показано, что комбинированная блокировка TNF/IL-6 и монотерапия анти-TNF поддерживают популяцию резидентных альвеолярных макрофагов (SiglecF+CD11c+), тогда как блокада IL-6 не приводит к такому результату. К сожалению, в результатах приведены только относительные цифры содержания альвеолярных макрофагов – вероятно, стоило бы указывать какой-то параметр, отражающий общее содержание CD45+ клеток, на графиках для лучшего понимания изменений абсолютных значений содержания альвеолярных макрофагов. Но и относительные данные очень любопытны. Можно ли предположить, какой именно механизм (выживаемость, пролиферация в тканях или рекрутирование моноцитов с последующим перепрограммированием) лежит в основе этого эффекта? Связано ли это со специфическим участием TNF в поддержании популяции тканевых макрофагов?

2. В модели LPS-индуцированного фиброза использовано однократное ингаляционное введение LPS, что хорошо воспроизводит воспаление, но фиброзные изменения, судя по результатам гистохимического окрашивания легочных срезов, носят умеренный и, возможно, обратимый характер. Хочется также отметить не очень высокое качество микрофотографий, что затрудняет анализ результатов гистологии, так, на рис. 16 (рис. 5 автореферата) для разных экспериментальных групп представлены микрофотографии с разными масштабными линейками и несопоставимыми по морфологии полями зрения, а на рис 20 масштабные изображения с очень низким разрешением, поэтому по этим данным трудно оценить реальное накопление коллагена и состояние легочной ткани. Тем не менее, совокупность полученных данных указывает, что для моделирования более стойкого фиброза, характерного для интерстициальных заболеваний легких или поздних стадий астмы, возможно, стоит рассмотреть изменение дизайна экспериментов, например, курсовое введение LPS. Повлияло бы это на вклад TNF vs. IL-6 в развитие воспалительного ответа и ремоделирование легочной ткани?

3. В работе подробно обсуждена роль IL-6 в патогенезе ответа тканей на повреждение, но не проводится разделение между его классическим сигналингом и транс-сигналингом через растворимый рецептор (эти типы передачи сигнала упомянуты только в обзоре литературы). Учитывая, что именно транс-сигналинг чаще связывают с патологическим ремоделированием тканей и фиброзом, планируется ли в будущем использовать специфические ингибиторы транс-сигналинга для более точной оценки вклада IL-6 в патогенез тяжелых форм астмы и фиброза? Как это соотносится с полученными в работе данными о клеточно-специфических эффектах IL-6?

4. Для моделирования HDM-индуцированной аллергической астмы у BALB/c были использованы только самки. С чем был связан такой выбор? Стоит ли обсуждать влияние пола на эффективность комбинированной

блокировки TNF и IL-6 с учетом известных различий в тяжести протекания астмы между полами у человека?

5. В выводах (п. 4) говорится о снижении сопротивления дыхательных путей и легочной ткани и потере эластичности легких у IL-6 КО мышей на фоне LPS-индуцированного фиброза, что в такой формулировке несколько противоречит полученным данным о повышенном отложении коллагена. В диссертации автор обсуждает это наблюдение в контексте разнонаправленности процессов в разных компартментах легких, однако в итоговом выводе представляется корректной более осторожная формулировка, например, с указанием на изменение эластичности отдельных отделов дыхательной системы, а не общей эластичности.

6. Результаты диссертационной работы являются научным обоснованием перспективности комбинированной терапии тяжелых форм астмы с помощью блокады TNF и IL-6. Автор справедливо критикует риски системных побочных эффектов при блокировке TNF. Как в этом аспекте возможно рассматривать переход от системной комбинированной блокировки к локальной доставке (например, ингаляционное введение антител или малых интерферирующих РНК) в использованных моделях, чтобы минимизировать риски побочных эффектов? Хотелось бы услышать более подробный комментарий о перспективах развития работы в этом направлении.

Высказанные комментарии и замечания имеют рекомендательный характер и не умаляют высокой значимости и достоинств представляемой к защите диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Намакановой О.А. является завершенным, самостоятельным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание иммунопатологии астмы и фиброза легких, а предложенная комбинированная стратегия блокады TNF и IL-6 представляется интересным

и перспективным терапевтическим подходом. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 3.2.7. Иммунология (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. Диссертационное исследование оформлено 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 Намаканова Ольга Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук, доцент, профессор РАН,
зав. лаб. репарации и регенерации тканей
Центра регенеративной медицины
Медицинского научно-образовательного института,
доцент каф. биохимии и регенеративной биомедицины
факультета фундаментальной медицины
Медицинского научно-образовательного института
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»

_____ ЕФИМЕНКО Анастасия Юрьевна

Дата подписания: 18.05.2026 г.

Подпись д.м.н., доцента Ефименко А.Ю. заверяю:

ученый секретарь факультета фундаментальной медицины
Медицинского научно-образовательного института
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова» _____

ЩЕРБАКОВА Лия Ниязовна

Контактные данные:

тел.: _____, e-mail: efimenkoay@my.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация: 1.5.5 – Физиология человека и животных (медицинские науки)

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
Медицинский научно-образовательный институт 119234, г. Москва, Ломоносовский пр-т.,
д. 27, корп. 10., Тел.: +7 (495) 531-27-27; e-mail: info@mc.msu.ru