

Отзыв

официального оппонента
на диссертационную работу Линге Ирины Андреевны

«Роль нейтрофилов и В-лимфоцитов в иммунном ответе на микобактерии у мышей с различной генетически обусловленной чувствительностью к инфекции»,

представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология»

Актуальность темы диссертации

Туберкулез и микобактериозы до сих пор являются нерешенной проблемой человечества, унося ежегодно более 1 млн жизней людей, при этом важным фактором патогенеза данного заболевания является уровень воспалительного процесса в легких, сопровождающего развитие инфекции. Понимание фундаментальных иммунологических процессов, способствующих длительному неконтролируемому воспалению при туберкулезе и микобактериозах, лежит в основе разработки и создания новых лекарственных препаратов, модулирующих воспаление.

В данной работе исследована роль двух популяций клеток, нейтрофилов и В-лимфоцитов, традиционно не считающихся основными участниками противомикобактериального иммунного ответа. Показано, что нейтрофилы являются патогенным фактором при ответе на микобактерии, тогда как В-лимфоциты, образующие В-фолликулы в легком, играют защитную роль. Механизмы участия нейтрофилов и В-лимфоцитов в ответе на микобактерии могут быть как основой для разработки таргетной терапии, способствующей разрешению воспаления, так и источником коррелятов эффективного лечения.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Тема диссертации соответствует паспорту научной специальности 3.2.7. Иммунология (биологические науки), а именно пунктам паспорта научной специальности: 2. Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии; 3. Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты.

Основные результаты диссертационной работы

В работе исследовано две мышинных модели, показавших патогенное участие нейтрофилов в ответе на микобактерии. В случае заражения вирулентными микобактериями *M. tuberculosis* H37Rv мышей чувствительной

линии I/St, ранний приток нейтрофилов в инфицированное легкое приводит к менее эффективному иммунному ответу на микобактерии, к развитию тяжелой легочной патологии, сопровождающейся формированием некротических очагов, и, как следствие, к ранней гибели зараженных животных. Удаление нейтрофилов в первые дни после заражения сопровождается повышением продукции ключевого при туберкулезе цитокина IFN- γ Т-лимфоцитами, что свидетельствует о негативном влиянии нейтрофилов на продукцию этого цитокина. Еще один пример патогенного участия нейтрофилов продемонстрирован в модели вакцинации BCG против туберкулеза. Показано, что у мышей CBA/N-xid с дефицитом В-лимфоцитов, более быстрый приток нейтрофилов в область введения вакцины четко коррелирует с неспособностью животных формировать защитный иммунный ответ. Как удаление нейтрофилов, так и восстановление В-клеток в данной модели приводит к восстановлению вакцинного эффекта.

В работе показано, что характер формирования и поддержания В-фолликулов в легких различается у оппозитных по чувствительности к инфекции линий мышей. Установлено, что при туберкулезе формирование и длительное поддержание структур В-фолликулов в легких резистентных мышей способствует сдерживанию инфекции. При этом уход В-лимфоцитов из легких и рассасывание В-фолликулов у чувствительных животных предшествует развитию тяжелой легочной патологии, воспалению с участием нейтрофилов и более быстрой гибели животных. Защитная роль В-лимфоцитов подтверждена тем, что удаление В-клеток в хронической стадии развития туберкулеза у устойчивых мышей B6 привело к развитию чувствительности к инфекции и более ранней гибели животных. Напротив, при сегрегационном генетическом анализе зараженных менее вирулентными микобактериями *M. avium* мышей F2 (I/St x B6) выявлено, что большее количество В-фолликулов ассоциировано с чувствительным фенотипом, за проявление которого отвечает аллель *s* гена *Slc11a1*, кодирующего помпу двухвалентных катионов в фагосомах макрофагов. Показана связь этих различий с особенностями генетического контроля инфекций, вызванных высоко вирулентными *M. tuberculosis* и низко вирулентными *M. avium*.

В работе также исследован репертуар В-клеточных рецепторов (BCR) легочных В-клеток при ТБ. Показано, что В-клетки в легких устойчивых к туберкулезу мышей B6 формируют кластеры преимущественно клонотипа IgA, специфичные к антигенам микобактерий, тогда как у чувствительных мышей I/St формируются меньшие по размерам и менее сфокусированные на антигены микобактерий кластеры клеток клонотипов IgM и IgG. Данный параметр соответствовал значимо более высокому уровню специфичных к микобактериальным антигенам антител IgM и IgG в сыворотке крови чувствительных животных, выявленных на этом же сроке после заражения, что может указывать на отсроченный или отвлеченный ответ В-клеток в легких чувствительных животных при туберкулёзной инфекции, и способствовать развитию чувствительного фенотипа.

В проведенном исследовании также продемонстрировано, что при ТБ легочные В-клетки секретируют провоспалительные цитокины IL-6 и IL-11, а также небольшое количество TNF. В модели на мышах с кондиционным нокаутом IL-6 в В-клетках показано, что продуцируемый В-лимфоцитами IL-6 необходим для своевременной активации специфических к антигенам микобактерий Т-лимфоцитов CD4⁺IFN- γ ⁺ и CD4⁺IL-17⁺. Отсутствие продукции IL-6 в В-клетках способствует развитию чувствительности к туберкулезу. При этом дефицит продукции В-клетками TNF влияет на эффективность формирования В-фолликулов в легком при заражении и *M. tuberculosis* и *M. avium*, но не влияет на общую восприимчивость к инфекции.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа выполнена на современном научном уровне. Дизайн экспериментов грамотно описан и воспроизведен. Эксперименты проведены по стандартизованным методикам на специализированном сертифицированном оборудовании, которое проходит регулярную проверку и калибровку. Полученные результаты воспроизводимы, достоверность подтверждена с применением адекватных методов математической статистики.

Научная новизна диссертационной работы

В рассматриваемом диссертационном исследовании получены новые данные о роли В-лимфоцитов и нейтрофилов при внутриклеточных инфекциях, вызванных высоковирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv и менее вирулентными микобактериями *M. avium*, при заражении линий мышей с оппозитной генетически обусловленной чувствительностью к инфекции, а также при вакцинации BCG против туберкулеза.

Впервые продемонстрировано, что избирательное удаление нейтрофилов на ранних этапах после заражения *M. tuberculosis* приводит более эффективному сдерживанию размножения микобактерий в легких, и как следствие, к снижению, тяжести легочной патологии на поздних стадиях развития инфекции и увеличению срока жизни чувствительных к туберкулезу мышей, что дает теоретическую основу для разработки препаратов, направленных на подавление нейтрофильного воспаления.

В модели на мышах В.100 и В.139 конгенных по гену, кодирующему β -цепь молекулы МНС-II, показано, что β -цепь гаплотипа j от родительской линии I/St отвечает за более устойчивый фенотип при заражении *M. avium*, что является оппозитным фенотипом по сравнению с заражением вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Интересно, более массивный приток нейтрофилов в первые недели после заражения не ассоциирован с проявлением более чувствительного фенотипа, что вероятно является следствием различий в генах вирулентности патогенов, и невозможности микобактерий *M. avium* выходить из фагосом в цитозоль.

В работе также выявлено, что участие нейтрофилов в туберкулезном и неспецифическом воспалении приводит к появлению больших количеств свободного тимидина. Для нейтрофилов это явление описано впервые. Конкретный механизм генерации тимидина нейтрофилами требует дальнейшего изучения, однако и безотносительно механизма, данный результат следует учитывать при постановке пролиферативных тестов с участием радиоактивно-меченного тимидина.

Впервые проведено исследование репертуаров BCR легочных В-лимфоцитов, выделенных из легких зараженных туберкулезом мышей устойчивой и чувствительной линий В6 и I/St, соответственно. Параллельно с этим впервые были получены гибридомы из В-клеток инфицированных легких чувствительных животных и изучен состав и специфичность продуцируемых ими антител. Полученные данные свидетельствуют о несвоевременном и неполноценном формировании специфических к микобактериальным антигенам антител у мышей чувствительной к туберкулезу линии I/St.

Впервые изучено участие продуцируемых В-клетками провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α в защитном иммунном ответе против туберкулеза.

Впервые проведено детальное изучение формирования и поддержания В-фолликулов при инфекциях, вызванных вирулентными *M. tuberculosis* и менее вирулентными микобактериями *M. avium*, при заражении линий мышей с оппозитной генетически обусловленной чувствительностью к инфекции. Продемонстрировано, что сохранение структур В-фолликулов способствует сдерживанию туберкулезной инфекции у устойчивых животных.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в первую очередь в получении новых экспериментальных данных, продвигающих понимание фундаментальной проблемы развития чрезмерного воспаления, при инфекциях, вызванных *M. tuberculosis* и *M. avium*. Полученные данные в значительной степени расширяют имеющиеся знания о действии В-лимфоцитов при внутриклеточных инфекциях и о патогенной роли нейтрофилов при туберкулезе и вакцинации BCG против туберкулеза.

Важным теоретическим выводом является то, что нейтрофилы, клетки врожденного иммунитета, призванные уничтожать патогены, тем не менее не способны эффективно убивать микобактерии и являются негативным фактором при туберкулезе и вакцинации BCG против туберкулеза. Кроме того, нейтрофилы могут препятствовать формированию эффективного иммунного ответа, что показано на примере нарушения формирования специфических Т-лимфоцитов CD4⁺, продуцирующих ключевой при туберкулезе цитокин IFN γ .

Весьма интересным в теоретическом плане оказалась взаимосвязь В-лимфоцитов и нейтрофилов, показанная в двух мышинных моделях. Это может

свидетельствовать о сходных механизмах взаимодействия клеток адаптивного и врожденного иммунитета и является теоретической основой для дальнейшего исследования механизмов нейтрофильного воспаления.

В работе подтверждена гипотеза о защитной роли В-лимфоцитов при туберкулезе. Интересно, что в зависимости от генетической основы и, по-видимому, формирующегося микроокружения способность В-клеток продуцировать специфические защитные антитела в зараженном легком может весьма различаться. Исследование репертуаров BCR легочных В-клеток устойчивых животных демонстрирует формирование крупных ориентированных на антигены микобактерий кластеров клонотипов IgA. В ряде работ показано, что антитела изотипа IgA, характерные для мукозального иммунитета, в том числе направлены на сдерживание микобактериальной инфекции. При этом у чувствительных к туберкулезной инфекции животных В-клетки легких формируют кластеры преимущественно клонотипов IgM и IgG, что совпадало с более высоким с уровнем специфических к микобактериальным антигенам антител в сыворотке крови этих же животных, что дает указывает на возможный вклад легочных В-клеток в уровень циркулирующих антител.

Теоретическую значимость также имеют исследования функций провоспалительных цитокинов, производимых В-лимфоцитами, при туберкулезе. Хорошо известно, что одни и те же цитокины, продуцируемые разными типами клеток, могут выполнять различные функции и по-разному влиять на течение инфекции. Так, в данной работе в модели на мышах с кондиционным нокаутом гена для IL-6 в В-лимфоцитах показано, что продуцируемый ими IL-6 необходим для эффективного и своевременного формирования специфических Т-лимфоцитов CD4+, продуцирующих IFN- γ и IL-17 при туберкулезе, что в свою очередь влияет на чувствительность к инфекции.

Научно-практическая значимость работы

В работе показано, что значимо более высокий уровень специфических к микобактериальным антигенам антител в сыворотке крови соответствует более высокому уровню формирования кластеров репертуаров BCR легочными В-клетками. Это позволяет предполагать вклад производимых легочными В-лимфоцитами антител в циркуляцию в крови. Полученные данные позволяют полагать, что при обследовании крови пациентов, как наиболее легкодоступного материала, можно в том числе судить о характере воспаления, реализуемого В-клетками в легком.

Также научно-практическим значением обладают данные о массивной продукции тимидина нейтрофилами. Это означает, что необходимо исключить метод оценки пролиферации клеток *in vitro* по включению радиоактивно меченного тимидина при работе с участием нейтрофилов, и в литературе уже

есть примеры исследований, авторы которых учитывали данное обстоятельство при планировании работы (<https://etheses.bham.ac.uk/id/eprint/12965/>).

Наконец, данные, полученные на мышах, указывают на возможные механизмы прогрессирующего течения инфекции у генетически чувствительных пациентов и подсказывают, на какие параметры следует обратить внимание при иммунодиагностике и оценке эффективности лечения.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа написана в традиционном стиле в соответствии установленными требованиями. Диссертация изложена на 226 страницах и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, раздел результатов исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений и список литературы. В диссертации представлено 43 рисунка и 2 таблицы. Список литературы содержит 392 источника, из них 5 отечественных и 387 зарубежных.

В обзоре литературы излагаются современные данные о генетическом контроле микобактериальных инфекций, используемых генетических моделях туберкулеза и микобактериозов на животных, рассмотрены исследования роли нейтрофилов при микобактериальных инфекциях, причем проведено сравнение результатов, свидетельствующих о положительном или отрицательном их вкладе в развитие инфекции. Кроме того, обобщены имеющиеся на сегодняшний день данные об участии В-лимфоцитов в ответе на микобактерии. В главе «Материалы и методы» подробно описаны используемые методы, а также линии мышей, в том числе трансгенные и с полным или кондиционным нокаутом определенных генов. В главе «Результаты» последовательно приведены данные изучения роли нейтрофилов, В-лимфоцитов и их взаимосвязи при инфекциях, вызванных *M.tuberculosis* и *M. avium*, а также при вакцинации BCG против туберкулеза, в моделях на мышах с оппозитной чувствительностью к инфекции, исследования *in vitro*, данные молекулярно-генетического анализа. Выводы обоснованы результатами исследования и соответствуют поставленным задачам.

Основное содержание диссертационной работы опубликовано в 36 печатных работах, в том числе в 20 статьях в рецензируемых международных и российских научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты докторских и кандидатских диссертаций, в 1 главе в монографии и 15 публикациях в сборниках материалов отечественных и международных конференций и конгрессов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Замечания и дискуссионные вопросы.

1. На микрофотографиях на ряде рисунков (например, на рис. 2, 14, 15, 21, 28, 42) не указан масштаб.

2. Данные на рис. 3 по количеству $IFN\gamma^+$ клеток было бы интересно сравнить с аналогичными результатами на мышах C57BL/6.

3. На рис. 6Б наблюдается довольно удивительная картина пролиферации клеток, окрашенных CFSE. Пики не «двоятся», как это обычно бывает, а лишь сдвигаются влево, и создается впечатление, что клетки идеально синхронизированы по клеточному циклу. Как можно прокомментировать это наблюдение?

4. Был ли в эксперименте, результат которого показан на рис. 9, контроль с CFSE, чтобы убедиться, что в присутствии супернатанта нейтрофилов Т-клетки действительно пролиферировали?

5. Как в эксперименте, результаты которого показаны на рис. 38, можно убедиться, что антиген-презентирующие клетки мышей CBA/N не производят тимидина, который блокирует включение [3H]-тимидина в соответствующих образцах?

6. Что можно сказать о значимости наблюдений на рис. 40? На данном рисунке показаны результаты одного эксперимента, статистика не приведена.

7. Эксперименты с «фактором нейтрофилов» ставились какое-то время назад. Какова современная точка зрения на происхождение тимидина в этой системе, подтверждается ли гипотеза о том, что тимидин является продуктом деградации внеклеточных нейтрофильных ловушек?

8. Когда говорят о нейтрофилах в контексте ТБ, в первую очередь упоминают нейтропению как нежелательное побочное явление при лечении ТБ. Можно ли предположить, что нейтропения при ТБ играет определенную позитивную роль за счет снижения поражения легочной ткани? Или же этим снижением можно пренебречь в сравнении с повышенной опасностью других бактериальных инфекций?

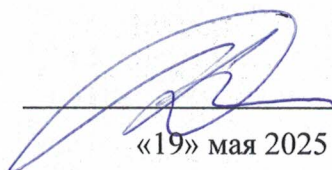
Указанные вопросы и замечания не являются принципиальными и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Заключение

Диссертация Линге Ирины Андреевны «Роль нейтрофилов и В-лимфоцитов в иммунном ответе на микобактерии у мышей с различной генетически обусловленной чувствительностью к инфекции» 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 иммунологии: охарактеризована негативная роль нейтрофилов в патогенезе туберкулеза и при вакцинации BCG против туберкулеза, расширено понимание защитных функций В-клеточного звена иммунного ответа, в том числе в хронической стадии развития туберкулеза; на мышах с оппозитной чувствительностью к *M. tuberculosis* и *M. avium* получены данные о возможных механизмах прогрессирующего течения инфекции у генетически чувствительных пациентов и определяющие, какие новые параметры следует учитывать при иммунодиагностике и оценке эффективности лечения туберкулеза и микобактериоза.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям (п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 в редакциях постановления Правительства РФ 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».


«19» мая 2025 г.

Купраш Дмитрий Владимирович

доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Подпись Купраша Д.В. заверяю

Ученый секретарь

ИМБ РАН

к.ф.-м.н.



Коновалова Елизавета Владимировна

«19» мая 2025 г.

Контактная информация: ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32. ИМБ РАН.
Тел.: 8(499)135-23-11. Сайт: <https://www.eimb.ru>. e.mail: isinfo@eimb.ru.