

Отзыв

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора, Сапожникова Александра Михайловича 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» на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология»

Актуальность темы диссертации

Представленная диссертационная работа посвящена актуальной теме – исследованию малоизученной роли нейтрофилов и В-лимфоцитов в защите от микобактериальных инфекций, поскольку до сих пор туберкулез и микобактериозы являются тяжелым бременем здравоохранения. Контроль процесса воспаления и его завершение при многих инфекциях являются важным шагом к выздоровлению. Важно отметить, что в контексте туберкулеза длительное течение инфекции сопровождается неконтролируемым воспалением, что осложняет лечение туберкулеза, и может приводить к деструкции ткани легкого. В рассматриваемой диссертационной работе продемонстрировано, что нейтрофилы, необходимые для элиминации патогенов при множестве различных инфекций, являются патогенным фактором при туберкулезе и способствуют проявлению чувствительного к инфекции фенотипа. Вместе с тем, исследована и доказана положительная роль В-лимфоцитов при туберкулезе, в том числе направленная на сдерживание нейтрофильного воспаления, что свидетельствует об активном вовлечении В-клеток в иммунный ответ при внутриклеточной бактериальной инфекции. Понимание фундаментальных иммунологических процессов, лежащих в основе развития хронического неконтролируемого воспаления при туберкулезе и микобактериозах,

может способствовать разработке и созданию новых подходов и препаратов для иммунотерапии этого заболевания.

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

Рассматриваемое исследование посвящено двум неканоническим участникам воспаления, нейтрофилам и В-лимфоцитам, при туберкулезе и микобактериозах, вызванных высоковирулентными микобактериями *M. tuberculosis* и менее вирулентными *M. avium*, соответственно. В работе приводятся экспериментальные данные о патогенном действии нейтрофилов в ответе на микобактерии, что продемонстрировано в двух моделях. В частности, в случае инфекции вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv у мышей генетически чувствительной линии ранний приток нейтрофилов в легкие приводит к менее эффективной продукции основного эффекторного при туберкулезе цитокина IFN- γ , худшему подавлению размножения микобактерий в органах, развитию тяжелой легочной патологии с некротическими очагами, и, как следствие, ранней гибели зараженных животных. Патогенная роль нейтрофилов доказана в опытах с удалением нейтрофилов на ранних стадиях после заражения лабораторных животных. Интересно, что несмотря на то, что нейтрофилы быстро-восстанавливаемая популяция клеток, удаление

нейтрофилов на ранних сроках после заражения имело положительный эффект и в более поздние стадии развития инфекции и способствовало снижению патологии в легких. Другим примером патогенного действия избыточного притока нейтрофилов стала их вовлеченность в иммунный ответ при вакцинации BCG против туберкулеза в условиях дефицита В-клеток. Быстрый приток нейтрофилов в область введения вакцины и фагоцитоз бактерий BCG приводила к неспособности животных формировать защитный иммунный ответ при вакцинации против туберкулеза. Патогенная роль нейтрофилов и взаимосвязь избытка нейтрофилов с дефицитом В-клеток продемонстрирована в экспериментах с удалением нейтрофилов или восстановлением популяции В-клеток, что привело к восстановлению вакцинного эффекта у исследуемых животных. В работе также обнаружено ранее не описанное свойство нейтрофилов секретировать свободный тимидин при туберкулезном и неспецифическом воспалении.

Как отмечено выше, в работе показано, что одной из популяций клеток, тормозящих миграцию нейтрофилов, являются В-лимфоциты. Влияние дефицита В-клеток на нейтрофильное воспаление продемонстрировано и в модели хронического развития туберкулеза на мышцах генетически устойчивой линии. Интересно, что В-клетки, которым долгое время не уделялось особое внимание при исследовании туберкулезной инфекции, тем не менее, вовлекаются в иммунный ответ на микобактерии и формируют В-фолликулы в легком. В этом аспекте, важными данными является разница в ответе легочных В-клеток при туберкулезе в условиях генетически обусловленной чувствительности и устойчивости к инфекции. В работе выявлена не только количественная разница в ответе В-лимфоцитов у мышей с оппозитной чувствительностью к инфекции, но и принципиально разный характер формирования специфических к микобактериальным антигенам кластеров В-клеток и антител. Показано, что большее число В-клеток в

легком и более длительное сохранение В-фолликулов в ходе развития инфекции характерно для устойчивого к туберкулезу фенотипа, тогда как уход В-лимфоцитов из легких и рассасывание В-фолликулов у чувствительных животных сопровождается развитием тяжелой легочной патологии и более быстрой гибели животных. При этом, при инфицировании менее вирулентными микобактериями *M. avium* наблюдается обратная ситуация – практически полное отсутствие В-фолликулов у устойчивых животных и крупные фолликулы у чувствительных линий мышей. По анализу репертуаров В-клеточных рецепторов выявлено, что у устойчивых к туберкулезу животных формируются крупные ориентированные на антигены кластеры, направленных на продукцию специфических антител класса IgA, характерных для мукозального иммунитета. При этом у чувствительных линий мышей было меньше и менее крупных кластеров клонотипов IgM и IgG, что свидетельствует о менее эффективном ответе легочных В-клеток на антигены микобактерий у таких животных. Таким образом, в нескольких разделах работы продемонстрировано, что при микобактериальных инфекциях в легких формируются третичные лимфоидные органы, характер иммунного ответа которых зависит от генетической основы животных и вирулентности патогена.

В следующем разделе автор показывает, что в формирующихся в легком В-фолликулах, В-клетки служат антиген-презентирующими клетками для Т-лимфоцитов. Это подтверждается нарастанием уровня экспрессии молекул МНС-II на поверхности легочных В-клеток в ходе развития инфекции, а также пролиферацией контактирующих в В-фолликулах В-, и Т-лимфоцитов CD4+ *in situ*.

В проведенном исследовании также продемонстрировано, что при туберкулезе легочные В-клетки секретируют провоспалительные цитокины IL-6 и TNF-α. В модели на мышах с 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-клетками способствует развитию чувствительности к туберкулезу. При этом дефицит продукции В-клетками TNF- α влияет на эффективность формирования В-фолликулов в легком при заражении и *M. tuberculosis* и *M. avium*, но не влияет на общую восприимчивость к инфекции. В этих разделах подтверждается, что функции цитокинов, продуцируемых определёнными типами клеток, могут значительно различаться и иметь влияние на характер течения инфекции.

Достоверность полученных результатов

Рассматриваемая диссертационная работа выполнена на современном научном уровне. В работе использовано большое число разнообразных методологических подходов, в том числе молекулярно-генетических, экспериментальных тестов *in vitro* и *in vivo*, работа с различными органами и тканями. Эксперименты подробно и грамотно описаны и воспроизведены в нескольких повторях. Исследования проведены по стандартизованным современным методикам на специализированном сертифицированном оборудовании, которое проходит регулярную проверку и калибровку. Достоверность результатов определяется достаточным объемом выборки анализируемых данных, воспроизводимостью данных и корректно используемыми методами 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. В первую очередь, продемонстрирован новый взгляд на роль нейтрофилов при микобактериальных инфекциях, а именно их патогенная роль, а также большое количество данных, доказывающих положительную роль В-лимфоцитов при туберкулезе у животных с генетически-обусловленной устойчивостью к инфекции.

Впервые показано, что избирательное удаление нейтрофилов в первые дни после заражения туберкулезом приводит к более высокому уровню продукции IFN- γ , более эффективному контролю микобактерий в легких, к снижению тяжести легочной патологии на поздних стадиях развития инфекции и увеличению срока жизни чувствительных к туберкулезу мышей.

Впервые в модели на мышах B.100 и B.139 конгенных по гену, кодирующему β -цепь молекулы MHC-II, продемонстрировано, 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. При этом более массивный приток нейтрофилов в первые недели после заражения не ассоциирован с проявлением более чувствительного фенотипа.

Впервые обнаружено свойство нейтрофилов секретировать свободный тимидин при туберкулезном и неспецифическом воспалении.

Впервые проведено исследование репертуаров В-клеточных рецепторов легочных В-клеток, выделенных из легких зараженных туберкулезом мышей с оппозитной чувствительностью к инфекции. Наряду с этим, впервые были получены гибридомы из В-клеток инфицированных легких чувствительных животных, 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, и формировании крупных, ориентированных на антигены кластеров В-клеток у устойчивых животных.

Впервые изучено участие продуцируемых В-клетками провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-а в защитном иммунном ответе против туберкулеза и показано, что секретируемый В-лимфоцитами IL-6 необходим для своевременного формирования антиген-специфического ответа Т-клеток и обеспечения устойчивого фенотипа.

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 нейтрофильного воспаления в хронической стадии туберкулеза и контролю туберкулезной инфекции у устойчивых животных.

Теоретическая значимость диссертационной работы

Полученные автором данные имеют большую теоретическую значимость, поскольку расширяют фундаментальные знания о формировании и реализации иммунного ответа и воспаления при инфекциях, вызванных патогенами *M. tuberculosis* и *M. avium*, а также вакцинации BCG против туберкулеза. Рассмотрены две популяции клеток, нейтрофилы и В-лимфоциты, которые традиционно не считаются основными популяциями иммунных клеток в борьбе с микобактериями, в отличие от макрофагов и Т-лимфоцитов CD4+. Тем не менее, данная работа демонстрирует, что и нейтрофилы, и В-лимфоциты, вовлекаются в иммунный ответ, влияют друг на друга и на исход инфекционного процесса, что может быть использовано для дальнейшего исследования

воспаления при туберкулезе и микобактериозах, эффективности вакцинации BCG, поиска новых подходов к лечению и к разработке таргетных препаратов, направленных на борьбу с локальным воспалением.

Важным теоретическим выводом является то, что нейтрофилы, успешно справляющиеся с множеством инфекций и патогенов, не эффективны в отношении микобактерий, но проявляют стереотипный механизм миграции и активации, что в случае туберкулеза и вакцинации BCG против туберкулеза являются негативным фактором. Помимо этого, нейтрофилы опосредованно, за счет экранирования бактерий от профессиональных фагоцитов, могут препятствовать формированию эффективного иммунного ответа, что показано, на примере нарушения формирования специфических Т-лимфоцитов CD4+, секретирующих эффекторный цитокин IFN- γ .

Интересной в теоретическом плане оказалась способность В-лимфоцитов сдерживать нейтрофильное воспаление, что продемонстрировано в двух моделях – при вакцинации BCG и при хроническом воспалении при туберкулезе. Полученные данные могут свидетельствовать о сходных механизмах воздействия В-клеток, участников адаптивного иммунного ответа, на нейтрофилы, клетки врожденной иммунной системы, и могут быть полезны для дальнейшего исследования регуляции нейтрофильного воспаления клетками адаптивной системы.

Кроме того, важным теоретическими данными являются доказательства защитной роли В-лимфоцитов и В-фолликулов при внутриклеточной инфекции, туберкулезе, у животных с генетически обусловленной устойчивостью к инфекции. В серии экспериментов показано, что защитные функции реализуются на нескольких уровнях – способность продуцировать специфические антитела, презентировать микобактериальные антигены и активировать Т-лимфоциты,

секретировать цитокины, способствующие своевременной активации специфических Т-клеток, а также сдерживать нейтрофильное воспаление. Нарушение части этих функций у чувствительных животных приводит к неэффективному ответу В-клеток, распаду В-фолликулов, что сопровождается тяжелой патологией в легком и гибелью животных. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшего выявления биомаркеров тяжести течения инфекции и контроля воспаления при туберкулезе.

Стоит отметить, что диссертационное исследование проведено с использованием мышей различных гаплотипов и с генетически обусловленной различной чувствительностью к микобактериальным инфекциям. Таким образом, полученные в работе данные могут служить теоретической основой для последующих фундаментальных исследований контроля иммунного ответа и воспаления при туберкулезе и микобактериоза в популяции, с учетом различий в экспрессии тех или иных аллелей HLA.

Научно-практическая значимость диссертационной работы

Научно-практическая значимость работы заключается в получении новых данных о функциях нейтрофилов и В-лимфоцитов при туберкулезе и микобактериозах, что может служить разработке новых таргетных препаратов или перепрофилированию уже имеющихся для контроля избыточного воспаления. В первую очередь, в работе продемонстрировано, что излишнее нейтрофильное воспаление играет патогенную роль при туберкулезе. Разработка, подбор и модернизация имеющихся препаратов, направленные на локальное уничтожение нейтрофилов или изменение их функций, может способствовать снижению воспаления и более эффективной терапии с применением противомикобактериальных средств.

Значимым в научно-практическом смысле является результат о массивной продукции тимидина нейтрофилами. В связи с этим, при исследовании влияния нейтрофилов на пролиферативную активность клеток следует исключить метод оценки пролиферации клеток *in vitro* по включению радиоактивно меченного тимидина, применяемый во многих лабораториях.

Кроме того, к научно-практической значимости работы относятся данные о соответствии значений уровня специфических к микобактериальным антигенам антител в сыворотке крови животных и уровня формирования в легких соответствующих кластеров В-клеток. Эти данные свидетельствуют о вкладе легочных В-лимфоцитов и производимых ими антител в циркуляцию в крови, что позволяет разрабатывать тесты для детекции уровня воспаления в легком по анализу крови пациентов.

Таким образом, полученные в рассматриваемом диссертационном исследовании экспериментальные данные на мышах с оппозитной чувствительностью к *M. tuberculosis* и *M. avium*, указывают на возможные механизмы прогрессирующего течения инфекции у генетически чувствительных пациентов и определяют, какие новые параметры следует учитывать при иммунодиагностике и оценке эффективности лечения этих опасных инфекций.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа написана в традиционном стиле в соответствии установленными требованиями. Диссертация изложена на 226 страницах и включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «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.

Обзор литературы обоснованно разделен на три части, в которых последовательно рассматриваются современные данные о генетическом контроле микобактериальных инфекций, используемых генетических моделях туберкулеза и микобактериозов на животных, затем описано состояние проблемы нейтрофильного воспаления при микобактериальных инфекциях, изложен современный взгляд на положительную и отрицательную их роль в развитие инфекции. В третьем разделе изложены имеющиеся на сегодняшний день данные об участии В-лимфоцитов в ответе на микобактериальные инфекции, рассмотрены некоторые несоответствия и противоречия в результатах по данной тематике. В главе «Материалы и методы» подробно описаны используемые в работе методологические подходы, а также линии мышей, в том числе трансгенные и с полным или кондиционным нокаутом определенных генов. В главе «Результаты» приведены данные изучения роли нейтрофилов, В-лимфоцитов и их взаимодействия 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.

В главе «Обсуждение» проводится тщательный анализ полученных диссертантом данных и сопоставление их с данными, полученными в других лабораториях и при других инфекциях, или воспалениях другой природы. В диссертации подводится итог главой «Заключение», в которой обобщаются полученные данные, их актуальность и значимость. Выводы обосновывают результаты 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.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

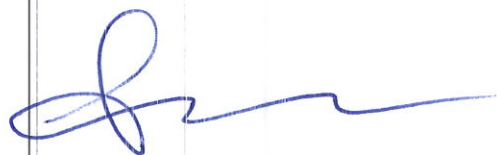
Заключение

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 области иммунологии: показана негативная роль нейтрофилов в патогенезе туберкулеза и при вакцинации BCG против туберкулеза; установлены защитные функции В-клеточного звена иммунного ответа при туберкулезе, в том числе роль В-клеток в своевременной индукции специфического к микобактериям ответа Т-клеток, продукции специфических к микобактериальным антигенам антител в легком, а также в сдерживании нейтрофильного воспаления в хронической стадии развития туберкулеза; экспериментальные данные, полученные на мышах с генетически обусловленной оппозитной чувствительностью к *M. tuberculosis* и *M. avium*, указывают на механизмы прогрессирования инфекции у восприимчивых пациентов и определяют, какие новые параметры следует учитывать при иммунодиагностике и оценке эффективности лечения, а также служат основой для разработки или адаптации препаратов, направленных на подавление воспаления при туберкулезе и микобактериозе.

Диссертация 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 30.07.2014 г. № 723, 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».

Главный научный сотрудник, руководитель лаборатории клеточных взаимодействий отдела иммунологии ФГБУН ГНЦ «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

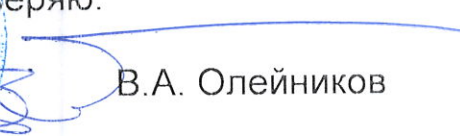
Д.б.н., профессор,



Сапожников Александр Михайлович

Подпись д.б.н., профессора А.М. Сапожникова заверяю:

Ученый секретарь ИБХ РАН,
доктор физико-математических наук
« 19 » 05 2025 г.



В.А. Олейников

Контактная информация: 117997, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10 Телефон: 7 (495) 335-01-00. Сайт: <https://www.ibch.ru/>. Адрес электронной почты: office@ibch.ru.