

Отзыв

официального оппонента, доктора биологических наук Шитикова Егора Александровича 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

Микобактериальные инфекции продолжают оставаться одной из ключевых проблем глобального здравоохранения. Туберкулез (ТБ) входит в число ведущих причин смертности от инфекционных заболеваний, а растущее распространение лекарственно-устойчивых штаммов создает дополнительные трудности для эффективной терапии. Наряду с туберкулезом, микобактериозы, вызываемые нетуберкулезными микобактериями, представляют серьезную угрозу для пациентов с ослабленным иммунитетом и становятся все более актуальными в клинической практике. Несмотря на прогресс в диагностике и терапии, глубокое понимание иммунных механизмов, лежащих в основе патогенеза этих заболеваний, остается недостаточным.

Диссертационная работа Линге И.А. посвящена исследованию особенностей регуляции патогенеза заболеваний, вызванных *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium avium*, в экспериментальных моделях на мышах с различной чувствительностью к инфекциям. Традиционно основное внимание уделяется роли Т-лимфоцитов и макрофагов, как ключевых участников иммунного ответа на микобактерии. Однако, как показано в настоящей работе, другие клетки иммунной системы, такие как нейтрофилы и В-лимфоциты, также играют значимую роль в развитии воспалительного процесса и патологии. В исследовании подробно рассматриваются влияние нейтрофилов на легочную патологию и их роль в эффективности вакцинации BCG против туберкулеза. Дополнительно изучены функции легочных В-лимфоцитов и В-фолликулов, а также их вклад в развитие иммунного ответа, воспаление и патологические изменения.

Избыточное, плохо контролируемое воспаление лёгочной ткани является одним из ключевых факторов патогенеза туберкулеза, которое приводит к её разрушению и снижает эффективность противобактериальной терапии. Понимание фундаментальных иммунологических процессов, регулирующих хроническое воспаление при туберкулезе и микобактериозах,

открывает новые перспективы для разработки или перепрофилирования препаратов, модулирующих специфическое воспаление. В этом контексте исследование функций нейтрофилов и В-лимфоцитов, которые составляют значительную часть клеточной популяции иммунной системы лёгких, представляет высокую научную и практическую ценность.

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

Диссертационная работа посвящена изучению роли двух неканонических при микобактериальных инфекциях участников воспаления — нейтрофилов и В-лимфоцитов.

Первый раздел посвящен изучению роли нейтрофилов в ответе на микобактерии. Исследование подтверждает гипотезу о патогенной роли нейтрофилов при туберкулезе. У мышей, чувствительных к *M. tuberculosis*, удаление нейтрофилов на ранних стадиях инфекции приводит к более эффективной продукции основного эффекторного при туберкулезе цитокина IFN- γ , контролю размножения микобактерий в органах и снижению чувствительности к инфекции. Кроме того, продемонстрировано, что нейтрофилы секретируют свободный тимидин, что может свидетельствовать, в том числе, об их массовой дегрануляции при воспалении или о производстве или деградации ДНК-ловушек.

Вакцинация BCG также зависит от взаимодействия нейтрофилов и В-лимфоцитов. Установлено, что дефицит В-лимфоцитов приводит к усиленному притоку нейтрофилов, что препятствует формированию защитного иммунного ответа. Восстановление популяции В-клеток или удаление нейтрофилов перед вакцинацией способствует формированию полноценного иммунного ответа.

Второй раздел работы посвящен роли В-лимфоцитов при микобактериальных инфекциях. Установлено, что при заражении *M. tuberculosis* более устойчивые к туберкулезу линии формируют более крупные

и длительно сохраняющиеся В-фолликулы в легких, что способствует контролю воспаления. В то же время у чувствительных линий расформирование В-фолликулов сопровождается неконтролируемым воспалением и повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-11, IL-17, TNF- α). При инфицировании *M. avium* большее количество В-фолликулов, напротив, ассоциируется с чувствительным фенотипом и уровнем воспаления.

Удаление В-лимфоцитов в хронической стадии туберкулеза у устойчивых животных приводит к усилению нейтрофильного воспаления, увеличению экспрессии провоспалительных генов (*cxc11*, *il17*, *mmp8*, *mmp9*, *s100a8*) и сокращению срока жизни. Анализ популяции легочных В-лимфоцитов показал, что она состоит преимущественно из клеток В2, однако также включает клетки В1а и В1b. При этом соотношение В1/В2 в легких не изменяется в ходе развития инфекционного процесса и составляет примерно 15/85%. При этом в плевральной полости интактных животных преобладают клетки В1 (В1/В2=65/35%), тогда как по мере прогрессирования инфекции в плевральную полость мигрируют клетки В2, и соотношение В1/В2 меняется и становится 35/65%.

Показано также, что лёгочные В-лимфоциты могут служить эффективными антигенпрезентирующими клетками, что подтверждается увеличением на их поверхности экспрессии молекул МНС класса II в ходе развития инфекции, эффективной активацией специфических к микобактериальным антигенам Т-лимфоцитов *in vitro*, а также взаимной пролиферацией Т- и В-лимфоцитов вблизи друг друга внутри В-фолликулов в легочной ткани.

В работе проведен анализ репертуаров BCR легочных В-лимфоцитов при туберкулезе у мышей чувствительной и устойчивой к туберкулезу линий. Установлено, что у устойчивых животных формируются крупные ориентированные на антигены микобактерий кластеры В-клеток, преимущественно клонотипа IgA, характерных для иммунитета слизистых оболочек. В свою очередь у чувствительных мышей образуется меньше и менее крупные кластеры клонотипов IgM и IgG, что совпадает с разницей в уровне специфических к микобактериям антител IgM и IgG в сыворотке крови этих же животных. Параллельно были созданы гибридомы из легочных В-лимфоцитов мышей чувствительной линии и показано, что лишь малая часть производимых ими антител специфична к микобактериальным антигенам.

В диссертации также проведен анализ продукции ряда цитокинов легочными В-клетками при туберкулезе. Выявлено, что они секретируют в больших количествах провоспалительные цитокины IL-6 и IL-11. При этом «выключение» гена *Il6* непосредственно в В-лимфоцитах приводит к приобретению более чувствительного фенотипа такими животными (C57BL6CD19cre/-IL6flox/flox) по сравнению с контрольными мышами устойчивой линии B6. В работе проведено исследование механизмов влияния дефицита IL-6 в В-клетках и установлено, что отсутствие IL-6 лишь в В-лимфоцитах приводит к снижению общей продукции IL-6 в легких зараженных животных, к уменьшению числа фолликулярных хэлперов Tfh CD4⁺CXCR5⁺, а также снижению числа Т-клеток CD4⁺, специфически продуцирующих эффекторные при туберкулезе цитокины IFN-γ и IL-17.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа «Роль нейтрофилов и В-лимфоцитов в иммунном ответе на микобактерии у мышей с различной генетически обусловленной чувствительностью к инфекции» выполнена на высоком научно-методическом уровне. Исследования проведены по стандартизованным современным методикам на специализированном оборудовании; эксперименты подробно и грамотно описаны. Достоверность результатов подтверждается достаточными объемами выборок, корректным статистическим анализом и воспроизводимостью данных.

Научная новизна диссертационной работы

В диссертации получены новые данные о роли В-лимфоцитов и нейтрофилов при туберкулезе и микобактериозе, вызываемых высоковирулентными *M. tuberculosis* H37Rv и менее вирулентными *M. avium*. Впервые проведено детальное сопоставление роли указанных клеток в моделях заболеваний на мышах с различной генетически обусловленной чувствительностью к инфекции, а также при вакцинации BCG против туберкулеза.

В первую очередь, в работе продемонстрирован новый взгляд на роль нейтрофилов при микобактериальных инфекциях – выявлена патогенная роль нейтрофилов при туберкулезе у чувствительных животных и при вакцинации BCG при генетически обусловленном иммунодефиците. В работе также получено множество данных, доказывающих положительную роль В-клеток при туберкулезе.

Впервые показано, что избирательное удаление нейтрофилов в первые дни после заражения туберкулезом приводит к более высокому уровню продукции IFN- γ и параллельному снижению параметров тяжести течения инфекции у чувствительных к туберкулезу линий мышей.

Впервые продемонстрировано, что на фоне общей генетически обусловленной чувствительности к инфекции *M. avium* в модели на мышах В.100 и В.139 конгенных по гену, кодирующему β -цепь молекулы МНС-II, β -цепь гаплотипа j от родительской линии I/St отвечает за проявление менее чувствительного фенотипа, что является оппозитивным 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 чувствительности.

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

Впервые проведено исследование и сопоставление репертуаров BCR легочных В-клеток при туберкулезе у мышей чувствительной и устойчивой линий. 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 изучен вклад продуцируемых В-клетками провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α в иммунный ответ и обеспечение устойчивости при микобактериальных инфекциях. Продemonстрировано, что секретируемый В-лимфоцитами IL-6 необходим для поддержания уровня IL-6 в легких, полноценного образования фолликулярных хелперов CD4+CXCR5+, а также своевременного формирования антиген-специфического ответа Т-клеток CD4+ и обеспечения устойчивого фенотипа.

Впервые проведено детальное изучение формирования и поддержания легочных В-фолликулов при туберкулезе. Продemonстрировано, что сохранение структур В-фолликулов способствует сдерживанию нейтрофильного воспаления в хронической стадии туберкулеза и контролю туберкулезной инфекции.

Теоретическая значимость диссертационной работы

Полученные автором данные расширяют фундаментальные знания о формировании и реализации иммунного ответа и воспаления при инфекциях,

вызванных *M. tuberculosis* и *M. avium*, а также вакцинации BCG против туберкулеза. В диссертации подробно исследованы нейтрофилы и В-лимфоциты — клеточные популяции, которые долгое время не считались ключевыми участниками борьбы с микобактериальными инфекциями. Работа автора демонстрирует активное участие нейтрофилов и В-лимфоцитов в иммунном ответе, их взаимное влияние, а также их роль в исходе инфекционного процесса. Эти данные могут быть использованы для дальнейших исследований воспаления при туберкулезе и микобактериозах, изучения механизмов формирования иммунного ответа при вакцинации BCG в условиях иммунодефицита, а также для разработки маркеров тяжести заболевания и оценки эффективности лечения.

Одним из важных теоретических выводов является выявление особенностей участия нейтрофилов в иммунном ответе на микобактерии. Несмотря на их ключевую роль в защите от многих инфекций, при микобактериальных инфекциях нейтрофилы оказываются малоэффективными. При этом нейтрофилы физически отделяют микобактерии от профессиональных антигенпрезентирующих клеток (макрофагов и дендритных клеток) и препятствуют формированию специфических эффекторных Т-лимфоцитов CD4⁺, секретирующих цитокин IFN-γ. Одновременно нейтрофилы усугубляют воспаление, способствуют образованию некротических очагов и разрушению ткани легкого.

Важным в теоретическом отношении являются данные о защитной роли В-лимфоцитов и В-фолликулов при внутриклеточной инфекции. В серии экспериментов доказано, что защитные функции реализуются на нескольких уровнях — способность продуцировать специфические антитела, презентировать микобактериальные антигены и активировать Т-клетки, секретировать цитокины, способствующие своевременной активации специфических Т-клеток и, как следствие, сдерживанию инфекции, а также регулировать нейтрофильное воспаление. Полученные данные могут быть использованы для последующего более детального изучения вовлечения В-клеточного ряда в контроль внутриклеточных инфекций, а также выявления коррелятов контроля воспаления при туберкулезе.

Научно-практическая значимость диссертационной работы

Научно-практическая значимость данной работы заключается в получении новых знаний о роли нейтрофилов и В-лимфоцитов в контексте туберкулеза и микобактериозов. Эти данные могут служить основой для

разработки новых таргетных препаратов для контроля избыточного воспалительного ответа. В частности, в исследовании показано, что чрезмерная активность нейтрофилов имеет патогенное значение при туберкулезе. Создание, выбор и модификация уже доступных препаратов, направленных на локальное уничтожение нейтрофилов или коррекцию их функций, могут способствовать снижению воспаления и повышению эффективности терапии с использованием противомикобактериальных средств.

В научно-практическом контексте важным является обнаружение значительного объема продукции тимидина нейтрофилами. Учитывая это, при изучении влияния нейтрофилов на пролиферативную активность клеток, следует избегать использования метода оценки пролиферации клеток *in vitro*, основанного на включении радиоактивно меченного тимидина, который широко применяется в различных лабораториях.

Также стоит отметить, что работа имеет практическое значение, поскольку она показывает связь между уровнем антител к микобактериальным антигенам в крови животных и количеством образуемых клонотипов В-клеток в легких. Эти данные могут помочь в создании тестов, которые позволят определять уровень воспаления в легких по анализу крови пациентов – наиболее доступного материала для врачей.

Таким образом, результаты исследования на мышах, которые по-разному реагируют на *M. tuberculosis* и *M. avium*, показывают, как может развиваться инфекция у людей с определенной генетической предрасположенностью. Эти данные помогают понять, на что стоит обратить внимание при диагностике и оценке лечения этих серьезных инфекций.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация написана в традиционном стиле в соответствии установленными требованиями. Работа 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.

Введение раскрывает актуальность выбранной темы, включает формулировку целей и задач исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, информацию о личном вкладе автора в представленную работу.

Обзор литературы по смыслу разделен на три части, в которых последовательно рассматриваются 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 их положительную и отрицательную роль в развитии 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 получаемых учеными результатах.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны используемые современные методы, а также линии мышей, в том числе трансгенные и с полным или кондиционным нокаутом определенных генов. Тщательность описания методик может служить дополнительным подтверждением высокого методического уровня представленной работы.

В разделе «Результаты» последовательно 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 результатов и сопоставление их с данными, полученными в других лабораториях и при других инфекциях или воспалениях другой природы.

Работу завершает раздел «Заключение», обобщающий все полученные данные. Выводы объективно отражают суть представленных исследований и соответствуют поставленным экспериментальным 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.

Дополнительно, финансирование исследования Российским научным фондом подчеркивает высокую значимость и признание работы научным сообществом.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

Диссертационная работа Линге И.А. выполнена на очень высоком уровне. Представленные ниже вопросы скорее носят характер дискуссии и возможного продолжения исследований.

1) В работе детально рассмотрена роль нейтрофилов и В-лимфоцитов в патогенезе микобактериальной инфекции. Однако неоднократное упоминание этих клеток как «неканонических» участников иммунного ответа вызывает вопрос: насколько наблюдаемые эффекты можно считать значимыми в масштабе всей иммунной реакции? Не укладываются ли описанные феномены в условные 5% от общих изменений, связанных с основными участниками иммунного ответа, такими как макрофаги и Т-лимфоциты CD4+?

2) Следующий вопрос еще более дискуссионный и касается понятия вирулентности бактерий, а именно её меры. В работе используются выражения: «высоковирулентными микобактериями *M. tuberculosis*», «менее вирулентными микобактериями *M. avium*», «вирулентными лабораторными штаммами *M. tuberculosis* H37Rv и Erdman», «более вирулентный для мышей штамм микобактерий *M. tuberculosis* Erdman или клинический гипервирулентный изолят HN878», «инфекция высоковирулентными микобактериями *M. tuberculosis* H37Rv» (отмечу, штаммы H37Rv и Erdman переходят между условными группами вирулентности по ходу текста). Однако критерии, по которым оценивается вирулентность, не всегда очевидны. Это доза заражения, степень патологических изменений, выживаемость животных или способность бактерий избегать иммунного ответа? Тут же возникает дополнительный вопрос: можно ли однозначно утверждать, что любой представитель *M. avium* будет менее вирулентным, чем *M. tuberculosis* H37Rv, и наоборот? В этом контексте также стоит обратиться к используемому штамму *M. avium* 724: проводилось ли исследование, к какому подвиду относится указанная культура?

Дополнительно стоит отметить определенный диссонанс в восприятии работы. Несомненным достоинством является её чёткая структура: автор концентрируется на ключевых вопросах, приводя обзор литературы исключительно по теме исследования, а представленные результаты логично

выстроены в соответствии с поставленными задачами. Однако для менее глубоко погружённого в тему специалиста может быть сложно ориентироваться в научном контексте, в котором работает автор. Так, в работе отсутствует общее описание иммунного ответа на микобактериальные инфекции, а также базовая информация о самих микобактериях. Например, не упоминается, что туберкулез вызывается не только *M. tuberculosis*, но и другими представителями микобактерий туберкулезного комплекса. Кроме того, выбор *M. avium* как объекта исследования не объясняется, хотя микобактериозы могут вызываться множеством других видов бактерий. Дополнительную сложность восприятия вызывает отсутствие иллюстраций в разделе обзора литературы. Первый рисунок появляется только на 78 странице в разделе результатов, что снижает наглядность и доступность представленного материала.

Также в тексте встречаются небольшие редакторские недочёты. Например, в разделе «Материалы и методы» не приведены праймеры для ПЦР в реальном времени, а некоторые ссылки, упомянутые в тексте, не включены в список литературы.

В заключение стоит подчеркнуть, что перечисленные замечания никоим образом не снижают высокий научный уровень 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 области иммунологии: установлена патогенная роль нейтрофилов при туберкулезе и вакцинации BCG против туберкулеза; выявлены защитные функции В-клеточного звена иммунного ответа при туберкулезе, что выражается в обеспечении 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 чувствительных и устойчивых к *M. tuberculosis* и *M. avium* линиях мышей, позволяют раскрывать механизмы

прогрессирования инфекции у восприимчивых пациентов и определяют, какие новые факторы важно учитывать при иммунодиагностике и оценке эффективности лечения.

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 ред. 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».

Заведующий лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»

д. б. н.
тел 89168352432
почта: eshitikov@mail.ru

Шитиков Егор Александрович

Подпись Шитикова Е.А. заверяю
ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Лопухина ФМБА России

к.б.н.



Кострюкова Е.С.

«19» мая

2025 г.

Контактная информация: 119435, г. Москва ул. Малая Пироговская дом 1а,
Телефон: +7 (499) 246-44-09. Сайт: <https://rcpcm.ru/science/>. Адрес электронной почты: niifhm@fmbamail.ru.