

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора Федерального бюджетного учреждения
науки «Московский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека
доктор медицинских наук, профессор  О.Ю. Борисова
«17» апреля 2025 г.



Отзыв

о научно-практической значимости диссертационной работы
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

В условиях все возрастающей антибиотикорезистентности бактерий, и, в том числе, микобактерий, вызывающих туберкулез и микобактериозы, проблема воспаления в легких крайне актуальна, поскольку плохо контролируемое воспаление препятствует эффективной терапии упомянутых опасных заболеваний. В связи с этим, диссертация Линге И.А., посвященная исследованию роли иммунных клеток в воспалительных процессах и защите от микобактериальных инфекций решает задачи, актуальные для современной фтизиатрии. Генетическое разнообразие в популяциях человека велико, в связи с чем проведение экспериментальных исследований с применением животных с различной генетически обусловленной чувствительностью к инфекциям позволяет более адекватно подходить к решению вопросов обеспечения устойчивости к инфекции или реализации неэффективного иммунного ответа.

В работе исследованы случаи длительного течения туберкулезной инфекции, которое сопровождается неконтролируемым воспалением и разрушением легочной ткани. Установлено, что нейтрофилы, которые играют

ключевую роль в борьбе с патогенами при различных инфекциях, не эффективны против микобактерий и могут провоцировать развитие тяжелой патологии при туберкулезе у генетически чувствительных животных.

В то же время в работе подчеркивается положительное влияние В-лимфоцитов на течение заболевания, включая их способность сдерживать нейтрофильное воспаление. Это свидетельствует о важной роли В-клеток в иммунном ответе на внутриклеточные бактериальные инфекции. Глубокое понимание иммунологических механизмов, лежащих в основе хронического неконтролируемого воспаления при туберкулезе и микобактериозе, открывает новые горизонты для разработки инновационных препаратов или адаптации существующих, направленных на модуляцию нейтрофильного или специфического воспалительного ответа.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Тема диссертации соответствует паспорту научной специальности 3.2.7. Иммунология (биологические науки), и 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 диссертации подробно изучено вовлечение В-лимфоцитов и нейтрофилов в обеспечение защитного иммунного ответа и патогенез при туберкулезе и микобактериозе. Указанные две популяции клеток традиционно не считаются основными участниками воспаления при микобактериальных инфекциях, однако в работе установлена их значимая роль.

В работе продемонстрировано, что нейтрофилы играют негативную роль в иммунном ответе на микобактерии. Показано, что удаление нейтрофилов на ранних стадиях после заражения способствует снижению чувствительности к инфекции, что выражается в более эффективной продукции ключевого при туберкулезе цитокина IFN- γ , лучшему контролю

размножения микобактерий в органах, снижению легочной патологии и увеличению срока жизни зараженных животных.

Продemonстрировано также негативное влияние нейтрофилов в иммунном ответе на вакцинацию BCG против туберкулеза при нехватке В-клеток. Быстрый приток нейтрофилов в место введения вакцины и фагоцитоз ими бактерий BCG препятствуют формированию защитного иммунного ответа у животных. Патогенное действие нейтрофилов и их связь с дефицитом В-клеток была подтверждена в экспериментах, где удаление нейтрофилов или восстановление популяции В-клеток способствовало формированию вакцинного эффекта у исследуемых животных, что также указывает на способность В-лимфоцитов тормозить миграцию нейтрофилов. Также в ходе работы было выявлено, что при туберкулезном и неспецифическом воспалении нейтрофилы секретируют тимидин, что показано впервые.

В работе исследована роль В-лимфоцитов при микобактериальных инфекциях. Выявлены различия в ответе легочных В-клеток при туберкулезе и микобактериозе у генетически чувствительных и устойчивых мышей. Показано, что большее число В-клеток в легком и более длительное сохранение В-фолликулов при туберкулезе наблюдается у устойчивых к инфекции линий мышей. При этом снижение числа В-клеток в легких и распад В-фолликулов у чувствительных мышей предшествует развитию патологии с образованием некротических очагов в легких и быстрой гибели животных. Вместе с тем, заражение менее вирулентными микобактериями *M. avium* вызывает образование крупных фолликулов в легких у чувствительных линий мышей, но не у устойчивых животных.

Автор последовательно исследует функции легочных В-клеток при туберкулезе. По анализу репертуаров BCR установлено, что у устойчивых к туберкулезу животных формируются крупные ориентированные на антигены микобактерий кластеры с преобладанием клонотипов IgA, характерных для иммунной системы слизистых, тогда как в легких чувствительных линий мышей образовывалось меньше менее крупных кластеров клонотипов IgM и IgG. Разница в образовании клонотипов В-клеток в лёгких соответствовала разнице в уровне специфических к микобактериальным антигенам антител в

сыворотке крови этих же животных. Исходя из полученных данных можно полагать, что отсрочка гуморального ответа и формирование антител в меньшей степени ориентированных на антигены микобактерий вносят вклад в формирование чувствительного к туберкулезу фенотипа.

В работе продемонстрировано, что в легочных В-фолликулах В-клетки презентруют микобактериальные антигены Т-лимфоцитам CD4⁺ и активируют их, что соотносится с увеличением уровня экспрессии молекул МНС-II на легочных В-клетках на более поздних стадиях туберкулезной инфекции и пролиферацией В- и Т-лимфоцитов CD4⁺, расположенных в контакте в В-фолликулах, а также подтверждено в опытах *in vitro*.

Анализ продукции цитокинов легочными В-клетками при туберкулезе выявил преимущественную секрецию ими провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-11, а также в небольших количествах TNF- α . Оценка роли при туберкулезе продуцируемого В-клетками IL-6 выявила его необходимость для своевременной активации специфических к микобактериальным антигенам Т-лимфоцитов CD4⁺IFN- γ ⁺ и CD4⁺IL-17⁺. Отсутствие продукции IL-6 В-клетками приводит к развитию более чувствительного фенотипа. В аналогичном исследовании, недостаток TNF- α в В-клетках повлиял на эффективность формирования В-фолликулов в легком при заражении и *M. tuberculosis* и *M. avium*, но не на чувствительность к инфекции, что отличает важность продукции этого цитокина В-клетками от Т-клеток и макрофагов. Таким образом, в работе подтверждается, что функции цитокинов, продуцируемых конкретными типами клеток, могут по-разному влиять на реализацию иммунного ответа и исход инфекции.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа выполнена на современном научном уровне. В работе использовано множество методик, в том числе молекулярно-генетические, биохимические, ЯМР-спектроскопия, постановка тестов *in vitro* и проведение опытов *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. Достоверность результатов определяется достаточным объемом выборки анализируемых данных, воспроизводимостью данных и корректно используемыми методами статистики.

Научная новизна диссертационной работы

В диссертационном исследовании приведены новые данные о роли В-лимфоцитов и нейтрофилов при туберкулезе и микобактериозе, вызываемых высоковирулентными микобактериями *M. tuberculosis* H37Rv и менее вирулентными *M. avium*, соответственно, при заражении линий мышей с различной чувствительностью к инфекции и при вакцинации BCG против туберкулеза. Продемонстрирован новый взгляд на роль нейтрофилов при туберкулезе и вакцинации BCG против туберкулеза, а именно их патогенная роль, а также данные, доказывающие позитивную роль В-лимфоцитов при туберкулезе у животных с генетически-обусловленной устойчивостью к инфекции.

Впервые показано, что удаление нейтрофилов в первые дни после заражения туберкулезом приводит к более высокому уровню продукции IFN- γ , более эффективному контролю размножения микобактерий в органах, снижению тяжести легочной патологии и увеличению продолжительности жизни чувствительных к туберкулезу линий мышей.

Впервые в модели на мышах конгенных по гену β -цепи молекулы MHC-II, продемонстрировано, что β -цепь гаплотипа j от родительской линии I/St отвечает за более устойчивый фенотип при инфицировании *M. avium*. Вместе с тем, повышенное число нейтрофилов в первые недели после заражения не связано с приобретением чувствительности к инфекции.

Впервые продемонстрировано, что нейтрофилы при туберкулезе и неспецифическом воспалении массово секретируют свободный тимидин.

Впервые установлено, что В-лимфоциты тормозят миграцию нейтрофилов у мышей. У мышей с дефицитом В-клеток, ускоренный приток нейтрофилов в область введения вакцины BCG препятствует формированию эффективного противотуберкулезного иммунного ответа. Восстановление В-

клеточной популяции или удаление нейтрофилов перед вакцинацией приводит к формированию вакцинного эффекта BCG.

Впервые проведен анализ репертуаров BCR В-клеток, инфильтрирующих легкие при туберкулезе, у мышей с оппозитной чувствительностью к инфекции. Впервые были получены гибридомы из В-клеток, выделенных из инфицированных легких чувствительных животных, проведена оценка состава и специфичности секретируемых ими антител. По приведенным данным сделан вывод, что несвоевременное и неполноценное образование специфических к антигенам микобактерий антител способствует развитию чувствительного к туберкулезу фенотипа. Устойчивый фенотип обеспечивается формированием крупных, ориентированных на антигены кластеров В-клеток.

Впервые оценена роль секретируемых В-клетками цитокинов IL-6 и TNF- α в иммунном ответе при туберкулезе и показано, что секретируемый В-лимфоцитами IL-6 необходим для своевременного формирования антиген-специфического ответа Т-клеток и обеспечения устойчивого фенотипа.

Впервые показано, что более длительное сохранение В-лимфоцитов и поддержание структур В-фолликулов в легком 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 и расширяют фундаментальные знания о формировании и реализации иммунного ответа и воспаления при туберкулезе и микобактериозе, вызываемых внутриклеточными патогенами *M. tuberculosis* и *M. avium*, соответственно, а также вакцинации BCG против туберкулеза. Диссертационное исследование проведено в моделях на мышах с различной генетически обусловленной чувствительностью к микобактериальным инфекциям. В связи с этим, представленные данные могут использоваться как теоретическое обоснование для новых фундаментальных исследований, направленных на изучение иммунного ответа и воспаления при туберкулезе и

микобактериозе у людей, принимая во внимание генетические различия в популяции.

В контексте иммунного ответа на указанные инфекции изучена роль двух популяции клеток, нейтрофилов и В-лимфоцитов, которым не уделялось достаточно внимания в контексте иммунного ответа против микобактерий. Данная работа демонстрирует, что и нейтрофилы, и В-лимфоциты, вовлекаются в иммунный ответ, составляют значительную часть иммунных клеток в очаге инфекции, в легком, влияют друг на друга и на исход инфекционного процесса, что может быть использовано для дальнейшего исследования воспаления при туберкулезе и микобактериозе, эффективности вакцинации BCG, поиска коррелятов лечения и разработке препаратов, направленных на борьбу с локальным воспалением.

Существенным теоретическим выводом является то, что нейтрофилы, действие которых направлено на борьбу с патогенами, не эффективны в отношении микобактерий, вследствие выработки последними в процессе эволюции множества защитных механизмов. Таким образом, нейтрофилы мигрируют и фагоцитируют микобактерии, но не справляются с инфекцией, а экранируют микобактерии от профессиональных фагоцитов, препятствуя формированию эффективного иммунного ответа, что в том числе выражается в сниженной продукции IFN- γ и нарушении контроля воспаления.

Важным теоретическим результатом являются доказательства защитной роли В-лимфоцитов и В-фолликулов при внутриклеточной инфекции, туберкулезе, у животных с генетически обусловленной устойчивостью к инфекции. В частности, показано, что В-лимфоциты подавляют миграцию нейтрофилов при вакцинации BCG и нейтрофильное воспаление при хронической туберкулезной инфекции. В модели туберкулеза на устойчивых линиях мышей с применением элиминирующих В-клетки антител показано повышение экспрессии в легком генов *Cxcl1*, *Il17*, *S100a8*, *Mmp8*, *Mmp9* после удаления В-лимфоцитов в хронической стадии развития инфекции. Интересно также, что удаление В-клеток на фоне установившегося и прогрессирующего адаптивного иммунного ответа, практически не влияло на специфический ответ Т-лимфоцитов. Полученные данные могут быть использованы для более

глубокого исследования ингибирования излишнего воспаления клетками адаптивной иммунной системы.

Другим важным теоретическим выводом относительно защитных при туберкулезе функций В-клеток является способность продуцировать специфические антитела непосредственно в очаге инфекции в легком, причем специфичность и класс антител зависят от генетической основы животного. У устойчивых к туберкулезу линий мышей в легких формируются кластеры В-клеток, направленные на производство специфических к микобактериям антител класса IgA, что, по-видимому, дополнительно способствует сдерживанию развития инфекции в легком. При этом на фоне генетически обусловленной чувствительности к инфекции В-клетки в легких в меньшей степени секретируют антиген-специфические антитела.

Теоретическую ценность представляют данные о роли провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α , секретируемых В-лимфоцитами при туберкулезе. Показано, что в условиях дефицита IL-6, производимого В-клетками, нарушается своевременная активация специфической продукции IFN- γ и IL-17 Т-клетками CD4⁺, что приводит к развитию более чувствительного фенотипа. Таким образом продемонстрировано, что В-клетки не только выполняют свою наиболее изученную функцию, производство антител, но также необходимы и для своевременной активации специфических Т-клеток.

Научно-практическая значимость диссертационной работы

Работа выполнена на моделях туберкулеза и микобактериоза, вызываемых высоковирулентными микобактериями *M. tuberculosis* и менее вирулентными *M. avium*, соответственно, на мышах с оппозитной чувствительностью к инфекциям, и обладает высокой научно-практической значимостью. Проведенные исследования позволили по-новому взглянуть на роль нейтрофилов и В-лимфоцитов в иммунном ответе и воспалении при микобактериальных инфекциях, что открывает новые возможности для разработки индивидуальной терапии и уточнения диагностических маркеров лечения и стадий развития инфекции.

В работе выявлено, что излишний приток нейтрофилов препятствует формированию эффективного иммунного ответа Т-лимфоцитов и сдерживанию инфекции. Эти результаты подчеркивают важность нейтрофилов как потенциальной мишени для терапии, что открывает возможность разработки препаратов, которые могли бы модулировать нейтрофильный ответ, снижая его патогенные эффекты и улучшая исходы лечения, что особенно важно для длительных курсов химиотерапии, характерных для лечения туберкулеза.

Кроме того, показана патогенная роль нейтрофилов при вакцинации BCG против туберкулеза. Эффективность вакцинации зависит от многих параметров, в том числе, от генетических особенностей и иммунного статуса человека. Полученные в диссертации данные имеют важное научно-практическое применение, поскольку их можно использовать для модификации методов вакцинации и повышению их эффективности, особенно у пациентов с нарушением иммунного ответа.

Научно-практический результат для исследований в области иммунологии и клеточной биологии заключается в выявлении, что нейтрофилы секретируют значительные количества тимидина. Это следует учитывать при анализе влияния нейтрофилов на пролиферацию других типов клеток и отказаться от простого и быстрого метода определения пролиферации по включению радиоактивно меченного тимидина *in vitro*.

В работе показано, что уровень специфичных к микобактериальным антигенам антител в сыворотке крови животных соответствует уровню образования в легких кластеров В-клеток, направленных на образование антиген-специфических иммуноглобулинов. Этот результат имеет непосредственную научно-практическую значимость, поскольку указывает на вклад легочных В-лимфоцитов и вырабатываемых ими антител в циркуляцию в крови. Это открывает возможности для поиска новых маркеров и разработки тестов для оценки степени активности воспалительного процесса в легких по анализу крови пациентов.

В работе также проведен анализ репертуаров BCR легочных В-клеток. Сравнение этих показателей у резистентных и чувствительных мышей и

понимание того, какие антитела и клональные группы наиболее эффективны против *M. tuberculosis*, может помочь в разработке более точных диагностических тестов для определения стадии и тяжести инфекции.

Полученные автором данные о роли продуцируемых В-клетками цитокинов TNF- α и IL-6 крайне важны, поскольку терапия, направленная на подавление провоспалительных цитокинов, успешно применяется в последние десятилетия при лечении различных заболеваний, в том числе ревматоидного артрита и COVID-19. При этом, хорошо известно, что анти-TNF- α терапия во многих случаях приводит к реактивации туберкулеза. Таким образом, понимание того, что секретируемый В-клетками IL-6 важен для установления и поддержания иммунного ответа при туберкулезе, а дефицит в В-клетках TNF- α не столь существенен, может быть применено для усовершенствования существующих протоколов лечения воспалительных заболеваний.

Таким образом, полученные в диссертационном исследовании экспериментальные данные открывают новые пути для исследований, которые могут привести к значительным улучшениям в профилактике этих серьезных заболеваний и созданию индивидуализированных стратегий лечения, учитывающих генетические особенности пациентов.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация написана в традиционном стиле в соответствии с 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, включая 5 отечественных и 387 зарубежных.

Обзор литературы повествует о современном состоянии исследований в области генетического контроля микобактериальных инфекций, используемых экспериментальных генетических моделях туберкулеза и микобактериоза на животных. В последующих разделах обзора литературы детально изложены современные данные о роли нейтрофилов при

микобактериальных инфекциях, в том числе сопоставлены данные об их положительной и отрицательной роли. Третий раздел посвящен участию В-лимфоцитов в ответе на микобактерии, описанию их известных функций при туберкулезе. В главе «Материалы и методы» подробно описаны используемые современные методы и подходы, в том числе, методы исследования клеток *in vitro*, патологического и иммуногистохимического анализа тканей, методов современной молекулярной биологии, а также используемые линии мышей, в том числе, трансгенные и с полным или кондиционным нокаутом определенных генов. Глава «Результаты» подразделяется на 3 тематических части, посвященных исследованиям нейтрофилов, В-лимфоцитов и их взаимодействию при инфекциях, вызванных *M. tuberculosis* и *M. avium*, а также при вакцинации BCG против туберкулеза, в моделях на мышах с оппозитной чувствительностью к инфекции. В главе «Обсуждение» проводится детальный анализ полученных диссертантом данных, сопоставление их с данными других исследователей, полученных при туберкулезе или других инфекциях или воспалениях другой природы. Итог по диссертационному исследованию подводится в главе «Заключение», где обобщены все полученные данные, обозначена их актуальность и значимость. Выводы соответствуют поставленным задачам и обосновывают результаты исследования.

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 кандидатский диссертаций, в 1 главе в монографии и 15 публикациях в сборниках материалов отечественных и международных конференций и конгрессов.

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 при туберкулезе и вакцинации BCG против туберкулеза; продемонстрировано, что легочные В-лимфоциты, образующие В-фолликулы в легком, осуществляют защитные функции при туберкулезе, что проявляется в продукции специфических к микобактериальным антигенам антител непосредственно в легком, участии в своевременном формировании специфического к микобактериям ответа Т-лимфоцитов, регуляции нейтрофильного воспаления и сдерживании инфекции; экспериментальные данные, полученные на мышях с генетически обусловленной оппозитной чувствительностью к *M. tuberculosis* и *M. avium*, указывают на возможные механизмы сдерживания или прогрессирования инфекции у пациентов и позволяют выявить, какие новые параметры следует рассматривать при диагностике и оценке эффективности лечения, а также служат основой для разработки таргетных препаратов, направленных на тонкое регулирование воспаления, при таких опасных заболеваниях, как туберкулез и микобактериозы.

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 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 № 1382),

а ее автор, Линге Ирина Андреевна, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология».

Отзыв обсужден и утвержден на заседании секции «Общая и прикладная иммунология» Ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (протокол № 2 от «11» апреля 2025 г.).

Главный научный сотрудник лаборатории биологии бифидобактерий
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
доктор биол. наук, профессор  Шмелева Елена Александровна

Подпись доктора биологических наук, профессора Шмелевой Елены Александровны заверяю:

Ученый секретарь ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора,

Кандидат биологических наук  Гудова Наталья Владимировна
«17» апреля 2025 г.



Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора).
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.
Тел.: +7 (495) 452-18-16,
e-mail: info@gabrich.ru, официальный сайт: www.gabrich.ru