

На правах рукописи

**Линге
Ирина Андреевна**

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

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Научный консультант: Апт Александр Соломонович, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Купраш Дмитрий Владимирович – доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, член-корреспондент РАН, руководитель центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, заведующий лабораторией передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Министерства науки и высшего образования Российской Федерации;

Сапожников Александр Михайлович – доктор биологических наук, профессор, 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;

Шитиков Егор Александрович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина» Федерального медико-биологического агентства.

Ведущая организация: 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.

Защита состоится «___» _____ 20___ г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 68.1.002.01, созданного на базе ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте <https://nrcii.ru/dissertatsionnyysovet/dissertatsii-postupivshie-na-rassmotrenie/>

Автореферат разослан «___» _____ 20___ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Гудима Георгий Олегович

Общая характеристика работы

1.1. Актуальность темы и степень ее разработанности

Туберкулез (ТБ), вызываемый *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), и микобактериозы, индуцированные нетуберкулезными микобактериями, в том числе *Mycobacterium avium* (*M. avium*), занимают важнейшее место среди причин гибели людей от инфекционных заболеваний. Среди факторов, определяющих предрасположенность человека к развитию этих болезней, выделяются генетическая восприимчивость, диабет, табакокурение, возраст, иммунодефициты, включая ВИЧ-инфекцию и СПИД и внешние факторы.

Принято считать, что Т-лимфоциты CD4⁺, продуцирующие IFN- γ , и активированные им макрофаги – основные клетки, участвующими в борьбе с микобактериями [Russell, 2007; O'Garra et al., 2013]. Тем не менее, в ответ на микобактерии вовлекаются все клетки иммунной системы, в том числе нейтрофилы и В-лимфоциты, а взгляды на их вклад в борьбу с инфекцией и патогенез микобактериальных заболеваний остаются противоречивыми.

Нейтрофилы одними из первых мигрируют в очаг воспаления и фагоцитируют микобактерии. В части работ описана их защитная роль. Накопление нейтрофилов у людей, контактировавших с больными ТБ, считается фактором протекции, поскольку продуцируемые нейтрофилами пептиды сдерживают рост бактерий. В некоторых моделях ТБ на животных показано, что на ранней стадии развития иммунного ответа нейтрофилы прямо или опосредованно активируют Т-лимфоциты CD4⁺, усиливают миграцию дендритных клеток в лимфоузлы, а дефицит нейтрофилов нарушает образование гранулем. С другой стороны, избыточный приток нейтрофилов в легкие приводит к формированию некротических гранулем и быстрой гибели животных. Вместе с тем нейтрофилы, в отличие от макрофагов, не уничтожают *M. tuberculosis* и, вероятно, «экранируют» микобактерии от макрофагов-эффекторов [Eruslanov et al., 2005]. В случае гибели нейтрофилов в легких путем некроза в область воспаления привлекаются новые клетки, также подверженные некрозу и высвобождающие все больше медиаторов воспаления, что приводит к деструкции ткани легкого и терминальной стадии развития инфекции, что может иметь патогенный эффект. При этом остается

малоизученным, насколько зависит роль нейтрофилов в патогенезе ТБ от генетики хозяина и вирулентности бактерий. Остается непонятным, зависит ли степень развития легочной патологии в хронической стадии от интенсивности нейтрофильного ответа в первые дни после инфицирования.

В-лимфоциты также относят к популяции клеток, традиционно не основных в ответе на микобактерии, как внутриклеточную инфекцию. Тем не менее, во многих работах показано, что при микобактериальных инфекциях В-клетки мигрируют в легкие и формируют там скопления, напоминающие В-фолликулы вторичных лимфоидных органов [Tsai et al., 2006; Kondratieva E. et al., 2010]. В модели ТБ на мышах дефицит В-клеток приводит к избыточному нейтрофильному воспалению и нарушению структуры гранулем [Maglione P., et al., 2007]. Установлено, что наибольшему риску развития диссеминированного ТБ подвергаются дети, неспособные продуцировать антитела (АТ) к липоарабидоманану микобактерий [Costello A.M., 1992]. Вместе с тем, В-клетки могут не только выполнять свою основную функцию, образование АТ, но также секретировать различные цитокины и хемокины и презентировать антигены (АГ) Т-клеткам, воздействуя таким образом на окружающие клетки и развитие иммунного ответа. Однако, какой вклад в это вносят легочные В-клетки, находящиеся в непосредственном очаге инфекции, до сих пор остается малоизученным. Кроме того, так же, как и в случае с нейтрофилами, до конца не определено, зависит ли роль В-лимфоцитов от генетики хозяина, восприимчивости к инфекции, вирулентности микобактерий и стадии развития патологического процесса.

Таким образом, нейтрофилы и В-лимфоциты, не принимающие непосредственного участия в уничтожении микобактерий, влияют на общий характер воспаления, друг на друга и другие типы клеток, участвуют в формировании очагов воспаления и гранулем и, как следствие, вносят свой вклад в ответ на микобактериальные инфекции. В связи с этим необходимо провести гораздо больше контролируемых динамических экспериментальных исследований. Более того, это направление работ должно включать эксперименты на животных с различной генетически обусловленной восприимчивостью к разным микобактериям, поскольку уровень чувствительности принципиально влияет на

иммунный ответ и легочную патологию [Kondratieva E. et al., 2007, 2010; Logunova et al., 2015]. Этот аспект проблемы изучается в единичных лабораториях в мире. В связи с этим более глубокое исследование функций нейтрофилов и В-лимфоцитов, мигрирующих в значительном количестве в легочную ткань при микобактериальных инфекциях, а также влияние этих клеток на степень общего воспаления и друг на друга является актуальным.

1.2. Цель работы

Оценить роль В-лимфоцитов и нейтрофилов в обеспечении гуморального и клеточного иммунного ответа при заболеваниях, вызванных микобактериями *M. tuberculosis* и *M. avium*, в экспериментальных моделях на мышах с различной генетически обусловленной чувствительностью к инфекции.

1.3. Задачи исследования

1. Оценить влияние временного удаления нейтрофилов *in vivo* специфическими антителами на тяжесть течения инфекции и легочную патологию в модели ТБ на мышах генетически чувствительной линии I/St и более резистентной линии C57BL/6 (далее В6).
2. Сравнить уровень восприимчивости к инфекции, вызванной *M. avium*, у мышей двух конгенных по гену для β -цепи класса II комплекса H2 линий с разной чувствительностью к *M. tuberculosis* и оценить роль нейтрофилов при ответе на *M. avium*.
3. Определить продуцируемый нейтрофилами фактор, который подавляет включение [^3H]-тимидина в ДНК, вмешиваясь в оценку пролиферации Т-лимфоцитов.
4. Оценить динамику накопления В-лимфоцитов и формирования В-фолликулов в легких при микобактериальных инфекциях в моделях на мышах с различной чувствительностью к *M. tuberculosis* и *M. avium*.
5. Провести анализ фенотипа и функций (маркеры клеточной поверхности, профиль классов и специфичность продуцируемых антител, цитокинов, антиген-презентирующие функции) В-лимфоцитов, формирующих В-фолликулы в легких при заражении мышей *M. tuberculosis*.

6. Оценить влияние продуцируемых В-клетками провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α на формирование иммунного ответа и чувствительность при инфекциях, вызванными *M. tuberculosis* или *M. avium*, у мышей с избирательно выключенными генами для IL-6 или TNF- α в В-клетках.
7. Установить влияние удаления В-лимфоцитов в хронической стадии развития ТБ на течение инфекции у устойчивых мышей В6.
8. Определить причину неэффективного иммунного ответа при вакцинации BCG мышей CBA/N-xid с дефицитом В-лимфоцитов.

1.4. Положения, выносимые на защиту

1. Нейтрофилы являются патогенным фактором при инфекции, вызванной *M. tuberculosis*, и препятствуют развитию защитного эффекта вакцинации BCG против ТБ.
2. В-лимфоциты, образующие фолликулы в легочной ткани при ТБ, действуют как один из факторов эффективного иммунного ответа, участвуя в контроле избыточного воспаления.
3. Роль нейтрофилов и В-лимфоцитов в патогенезе и защите при микобактериальных заболеваниях зависит как от генетического контроля восприимчивости к инфекции, так и от вирулентности возбудителя.

1.5. Научная новизна

Впервые показано, что избирательная элиминация нейтрофилов на ранних этапах после заражения *M. tuberculosis* приводит к снижению темпа размножения *M. tuberculosis* в легких, тяжести легочной патологии на поздних стадиях развития инфекции и увеличению срока выживания у генетически чувствительных к ТБ мышей.

Установлено, что β -цепь молекулы МНС-II комплекса H2 гаплотипа j отвечает за более устойчивый фенотип при заражении *M. avium*, что является оппозиционным фенотипом по сравнению с заражением вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

Показано, что прибывающие в очаг воспаления нейтрофилы секретируют свободный тимидин, который может влиять на репликацию ДНК. Это явление описано впервые для данной популяции клеток.

Установлено, что при инфицировании высоковирулентными микобактериями *M. tuberculosis* большее число В-лимфоцитов и В-фолликулов характерно для мышей более устойчивой линии, тогда как при заражении менее вирулентными микобактериями *M. avium* такой фенотип наблюдается у мышей более чувствительной линии.

Выявлено, что при ТБ уход В-клеток и исчезновение В-фолликулов у чувствительной линии мышей предшествует развитию некротического воспаления в легком, а длительное присутствие В-фолликулов в хронической стадии ТБ у устойчивых животных сопровождает контролируемое воспаление. Удаление В-лимфоцитов в хронической стадии развития ТБ приводит к повышению тяжести течения инфекции.

Показано, что легочные В-клетки выполняют все классические функции – эффективно презентируют микобактериальные антигены (МАГ) Т-клеткам, продуцируют АТ и различные про- и противовоспалительные факторы. Впервые получены гибридомы из В-клеток туберкулезного легкого и установлено, что большая часть клонов легочных В-лимфоцитов, выделенных у чувствительных к ТБ мышей, продуцируют АТ, не реагирующие с антигенами *M. tuberculosis*.

Впервые исследованы последовательности В-клеточных рецепторов (BCR) легочных В-лимфоцитов при ТБ. Показано, что у мышей чувствительной линии I/St формируются некрупные кластеры с преобладанием клонотипов IgM/IgG, тогда как у мышей устойчивой линии В6 – больше крупных кластеров преимущественно клонотипа IgA более ориентированных на антигены микобактерий.

Обнаружено, что TNF- α , продуцируемый В-лимфоцитами, необходим для формирования легочных В-фолликулов, но не определяет уровень чувствительности к *M. tuberculosis* и *M. avium*.

Установлено, что при ТБ продукция IL-6 именно В-лимфоцитами определяет общий уровень IL-6 в легких, от которого зависит формирование своевременного и полноценного Т-клеточного ответа (уровень специфических Т-лимфоцитов CD4⁺IFN- γ ⁺ и CD4⁺IL-17⁺, а также дифференцировка фолликулярных клеток CD4⁺CXCR5⁺), обеспечивающего эффективную борьбу с туберкулезной инфекцией и резистентный фенотип.

Продemonстрировано, что В-лимфоциты тормозят миграцию нейтрофилов у мышей. В условиях дефицита В-клеток, ускоренный приток нейтрофилов в область введения вакцины BCG мешает формированию эффективной противотуберкулезной защиты. Восстановление В-клеточной популяции или удаление нейтрофилов приводит к восстановлению вакцинного эффекта BCG.

1.6. Теоретическая значимость исследования

Работа носит экспериментальный характер и посвящена фундаментальной проблеме уточнения различных сторон патогенеза и его регуляции при инфекциях, вызванных *M. tuberculosis* и *M. avium*. Полученные данные в значительной степени расширяют имеющиеся знания о роли В-лимфоцитов и нейтрофилов в развитии иммунного ответа на микобактерии, а именно об участии указанных популяций клеток в обеспечении устойчивого фенотипа или развитии патологии в зависимости от вирулентности патогена и генетических особенностей хозяина.

1.7. Научно-практическая значимость исследования

Полученные результаты используются в курсе «Инфекционная иммунология. Иммуногенетика» для аспирантов ФГБНУ «ЦНИИТ» и внедрены в лабораторную практику отдела иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ» и лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН.

Экспериментальные данные, полученные 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 этих опасных заболеваний, а также могут служить теоретической основой для перепрофилирования имеющихся или разработки новых направленных на нейтрофилы препаратов для вспомогательной терапии ТБ. Данные о способности нейтрофилов секретировать свободный тимидин также должны учитываться при постановке пролиферативных тестов *in vitro* с участием нейтрофилов и исключить метод оценки пролиферации клеток по включению радиоактивно-меченного [³H]-тимидина.

1.8. Публикации по теме диссертации

По основным материалам диссертационного исследования опубликовано 36 печатных работ, в том числе 20 статей в рецензируемых международных и российских научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, 1 глава в монографии, 15 публикаций в сборниках материалов конференций.

1.9. Достоверность результатов исследований

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, позволяющих определить существенность полученных экспериментальных данных с использованием адекватных методов математической статистики. Научные положения и выводы логически вытекают из результатов исследования.

1.10. Апробация работы

Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на: Всемирном иммунологическом конгрессе (IUIS) 2023, Кейптаун, ЮАР; Научно-практических конференциях с международным участием, посвященных 300-летию Российской Академии Наук «Роль фундаментальных исследований во фтизиатрии» 2024, 2022, Москва, Россия; Всероссийских научных форумах с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» 2023, 2007, 2006, Санкт-Петербург, Россия; международных конференциях EMBO/Tuberculosis: From innovation to intervention 2022 и 2016, Париж, Франция; на онлайн-симпозиуме KeyStone Tuberculosis: Science Aimed at Ending the Epidemic, 2020; международной конференции, посвященной 110-летию со дня основания Санкт-Петербургского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и 95-летию со дня присвоения Институту имени Пастера, 2018, Санкт-Петербург, Россия; на международных форумах Кох-Мечников 2016 и 2017, Москва, Россия; IV конгрессе Национальной ассоциации фтизиатров в рамках конкурса на звание "Молодой ученый года", 2015, Санкт-Петербург, Россия; конференции «Новые

технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулёза взрослых и детей», 2014, Москва, Россия.

1.11. Личный вклад автора

Все научные результаты, содержащиеся в диссертации, получены при личном участии автора и представляют собой законченное самостоятельное научное исследование. Соискатель принимал непосредственное участие во всех этапах выполнения диссертационного исследования: дизайне, разработке и планировании исследований, проведении экспериментов, обработке, анализе и интерпретации данных, подготовке публикаций по теме и апробации результатов исследования.

1.12. Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 226 страницах, содержит 43 рисунка и 2 таблицы. Работа включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы». Список литературы содержит 392 источника, из них 5 отечественных и 387 зарубежных.

2. Материалы и методы

Для инфицирования использовали аэрозольное заражение вирулентными штаммами *M. tuberculosis* H37Rv (*substrain Pasteur*) и *M. avium* 724, а также подкожную вакцинацию бактериями BCG (*Pasteur*). Использовали мышей инбредных линий C57BL/6Y/Cit (B6), I/StSnEgYCit (I/St), CBA и CBA/N-xid, конгенных B6.I-100, B6.I-139., трансгенных C57BL/6.GFP, C57BL/6IL6^{-/-}, C57BL6CD19^{cre/-}IL6^{flox/flox} C57BL6CD19^{cre/-}TNF- α ^{flox/flox} (родительские линии любезно предоставлены профессором С.А. Недоспасовым). Оценку генотипа животных проводили методом ПЦР геномной ДНК. Удаление нейтрофилов и В-лимфоцитов осуществляли введением элиминирующих моноклональных АТ против Ly6G (внутрибрюшинно) и CD20 (внутривенно), соответственно. Клетки лёгкого получали методом ферментативной дезинтеграция ткани нуклеазопротеазным комплексом ферментов. Выделение клеток селезенки и лимфатических узлов проводили механической дезинтеграцией. Число

микобактерий в органах определяли методом посева гомогенатов органов на твердых средах. Разделение фракций и характеристику составляющих супернатанта нейтрофилов проводили методами ВЭЖХ, масс-спектрометрии и ЯМР. Жизнеспособность микобактерий оценивали по подсчету макроколоний и включению [³H]-урацила. Миграцию лимфоцитов оценивали в системе transwell. Обогащение популяции В- и Т-клеток осуществляли методом позитивной или негативной селекции с помощью магнитных бус и колонок. Специфические к мАГ Т-линии получали методом иммунизации животных с последующим выделением активированных Т-клеток и их повторных стимуляций *in vitro* до образования устойчивой Т-клеточной линии. Иммунологические характеристики изучали с использованием методов ELISA, ELISPOT, проточной цитометрии и антиген-специфических пролиферативных тестов, а экспрессию генов – методом qrt-PCR (полимеразная цепная реакция в реальном времени). Последовательности IGH CDR3 легочных В-клеток были извлечены из данных объемного профилирования транскриптома и проанализированы с помощью программного обеспечения MiXCR [Bolotin D. A., et al., 2015]. Структуру лёгочной ткани характеризовали с помощью световой и флуоресцентной микроскопии после окраски криопрепаратов легкого гистологическими и иммуногистохимическими методами.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Удаление нейтрофилов снижает тяжесть течения ТБ

Ранее в нашей лаборатории было показано, что нейтрофильное воспаление в легких проявляется сильнее у генетически чувствительной к ТБ линии мышей I/St по сравнению с устойчивыми линиями A/Sn [Nikonenko B.V., et al., 2000; Eruslanov E., et al., 2005] и B6 [Kondratieva E., et al., 2010]. При инфекции в легких чувствительных мышей образуются некротические очаги в местах скопления нейтрофилов. Фагоцитарная активность нейтрофилов сопоставима с макрофагами, однако в отличие от макрофагов, нейтрофилы не убивают *M. tuberculosis*. Было высказано предположение, что нейтрофилы выступают в качестве «Троянского коня», экранируя микобактерии от макрофагов, и служат фактором патогенеза, индуцируя излишнее воспаление [Eruslanov E., et al., 2005].

В развитие этих результатов мы проверили, снизится ли тяжесть ТБ, если элиминировать нейтрофилы в первые дни после заражения, и будет ли различаться эффект в генетически разных по чувствительности мышах. Для этого мышей линий I/St и B6 заражали аэрозольно вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в низкой дозе (100 КОЕ/мышь). Затем через 2 и 6 дней мышам вводили МАТ против нейтрофилов (клон 1A8). Оценка основных параметров тяжести течения ТБ выявила, что удаление нейтрофилов приводит к снижению бактериальной нагрузки в легких и селезенке, отсрочке в потере веса и увеличению срока жизни мышей чувствительной линии I/St (Рис. 1А, В), но не устойчивой B6 (Рис. 1Б, Г). Эти данные свидетельствуют о патогенной роли нейтрофилов именно у животных, склонных к массивной нейтрофилии и образованию некротических поражений. Действительно, и патология легких, во многом обусловленная массивным притоком нейтрофилов, снизилась после удаления нейтрофилов (Рис. 2).

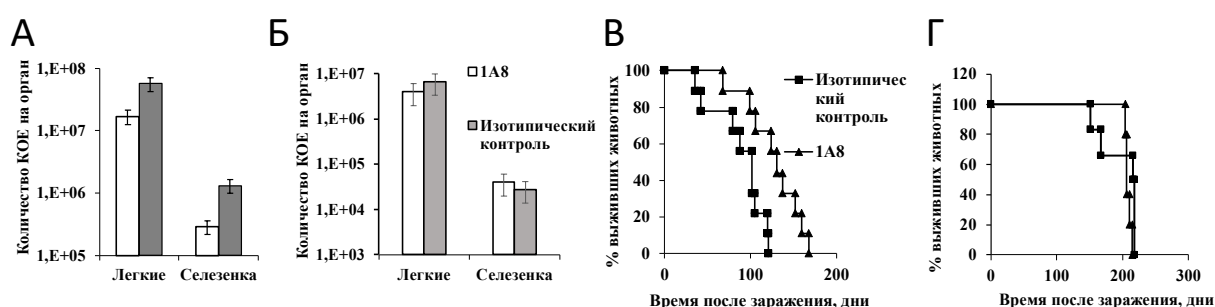


Рис. 1. Введение МАТ 1A8 приводит к снижению числа микобактерий в легких и селезенке (А, $P < 0,05$), увеличению продолжительности жизни (В, $P < 0,01$, критерий Гехана) мышей I/St, по сравнению с контрольными животными. Значимых различий в количестве микобактерий в органах (Б) и продолжительности жизни (Г) у мышей B6 выявлено не было.

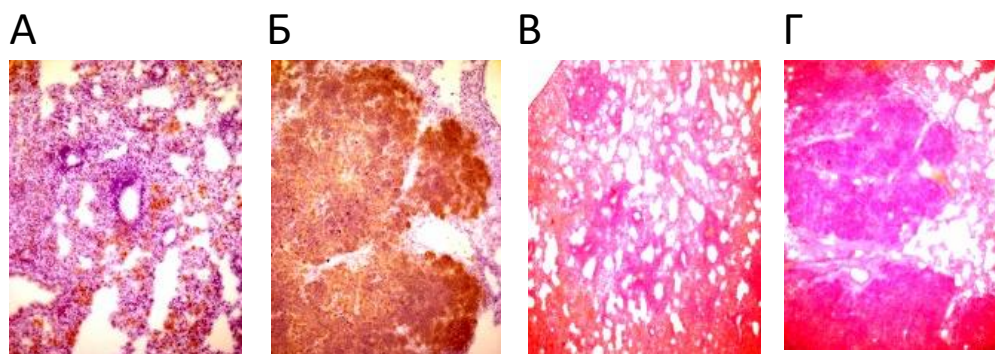


Рис. 2. Иммуногистохимическая (ИГХ) окраска МАТ анти-Ly6G (А, Б, коричневый) и общая патология (В, Г) криопрепаратов легкого через 5 недель после заражения мышей I/St с введенными МАТ (А, В) или изотипического контроля (Б, Г).

3.2. Истощение нейтрофилов способствует увеличению продукции IFN- γ

Ранее было показано, что IFN- γ , продуцируемый Т-клетками CD4⁺, способствует снижению притока нейтрофилов и опосредованной ими патологии [Nandi B., Behar S.M., 2011]. В связи с этим мы предположили, что удаление нейтрофилов на начальной фазе формирования Т-клеточного ответа может иметь зеркальный эффект и способствовать увеличению продукции IFN- γ . Действительно, количество IFN- γ -продуцирующих клеток было в 5 раз выше в селезенке у мышей с удаленными нейтрофилами по сравнению с контрольными животными (Рис. 3), что свидетельствует об антагонистском действии нейтрофилов и иммунных Т-лимфоцитов в ходе развития ТБ.

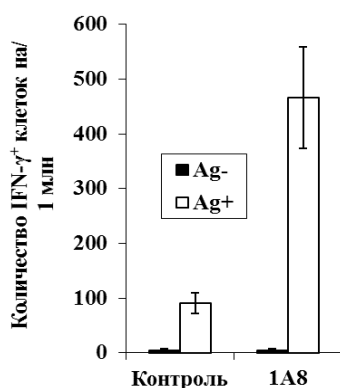


Рис. 3. Количество спленоцитов, специфически продуцирующих IFN- γ , у мышей I/St через 4 недели после заражения. ELISPOT, Т-тест, $P < 0,01$.

3.3. Нейтрофилы подавляют включение радиоактивного тимидина

В одном из наших исследований мы обнаружили, что специфические Т-клетки, пролиферирующие в ответ на презентацию микобактериальных АГ (мАГ) макрофагами, не включают радиоактивный тимидин, а значит, возможно, не делятся, если в культуре присутствуют нейтрофилы. В связи с этим мы стали изучать природу ингибирующего действия нейтрофилов.

Мы показали, что добавление супернатанта Нф (сНф), полученного от 48-часовых культур нейтрофилов, в совместную культуру макрофагов и специфических Т-клеток достоверно снижает включение [³H]-тимидина в пролиферирующие Т-клетки, и этот эффект зависит от дозы сНф (Рис. 4А). Используя систему Transwell, мы исключили влияние истощения среды, в которой культивировались нейтрофилы, на снижение пролиферативной активности Т-

лимфоцитов. В качестве контроля истощения среды были взяты спленоциты, макрофаги или чистая среда. Как показано на Рис. 4Б, именно помещенные в верхнюю камеру лунок нейтрофилы продуцируют ингибирующий фактор.

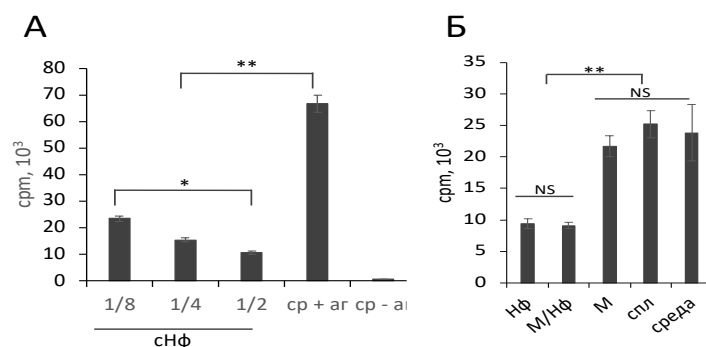


Рис. 4. **А** – Оценка включения [³H]-тимидина в пролиферирующие Т-клетки в присутствии макрофагов и АГ («ср+аг») с добавлением сНф в разведении 2, 4 и 8 раз (1/2, 1/4, 1/8). **Б** – Подавление включения метки наблюдается после прохождения «фактора нейтрофилов» через мембрану в системе Transwell, а не за счет истощения среды. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Наиболее известные ингибиторы Т-клеток – это IL-10, TGF- β , PGE2 и аргиназа. Однако, их блокирование с помощью мАТ к цитокинам, индометацина и *norNOHA*, соответственно, не отменяло наблюдаемого нами подавления включения метки (Рис. 5А). Кроме того, исследуемый фактор был устойчив к кипячению и неоднократному замораживанию/оттаиванию (Рис. 5Б). Последующий диализ сНф показал, что размер исследуемого компонента меньше 10 кДа (Рис. 5В).

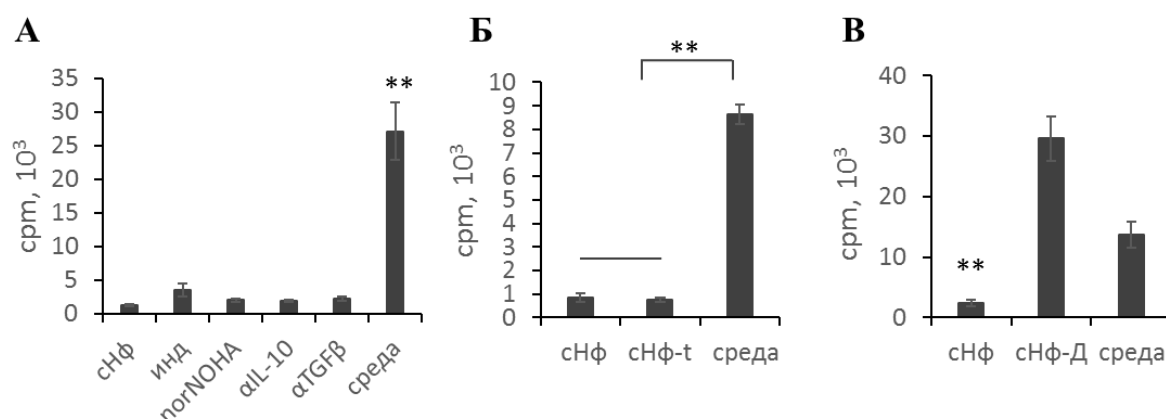


Рис. 5. **А** – действие «фактора нейтрофилов» не отменяется блокированием основных ингибиторов пролиферации Т-клеток: простагландина E2 (индометацин), аргиназы (*norNOHA*), IL-10 и TGF- β (блокирующие АТ). **Б** – фактор не теряет активности после кипячения (сНф-т). **В** – По результатам диализа м.м. фактора не превышает 10 кДа. ** $P < 0,01$.

Кроме того, мы показали, что фактор нейтрофилов подавляет включение метки в Т-клетки, стимулированные АТ к CD3, конканавалином А и в спонтанно пролиферирующие опухолевые клетки миеломы (Рис. 6А). Стоит отметить, что анализ включения [³H]-тимидина – это стандартный способ оценки пролиферации клеток. Параллельный анализ деления клеток с помощью CFSE выявил полноценную пролиферацию клеток миеломы в присутствии сНф (Рис. 6Б). Таким образом, исследуемый нами ингибитор влиял не на пролиферацию клеток, а лишь на включение радиоактивной метки.

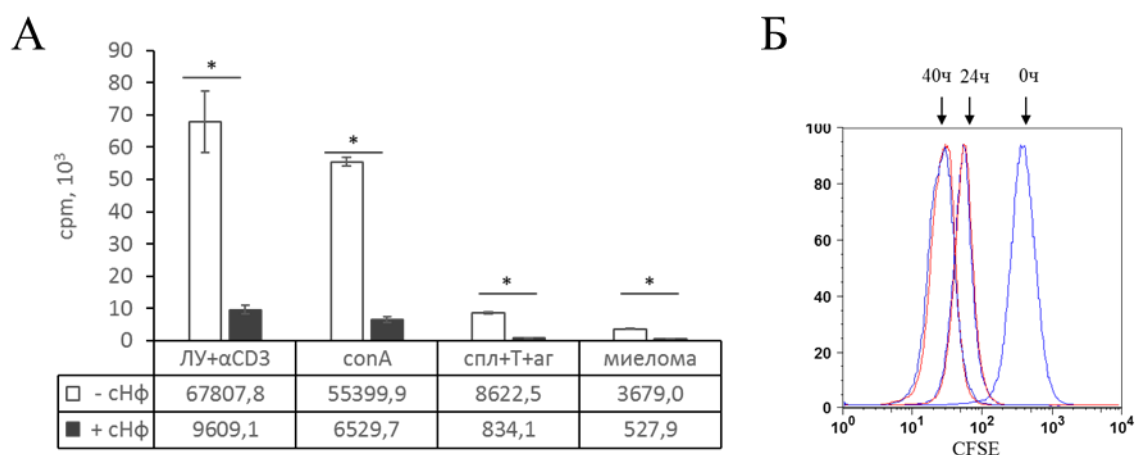


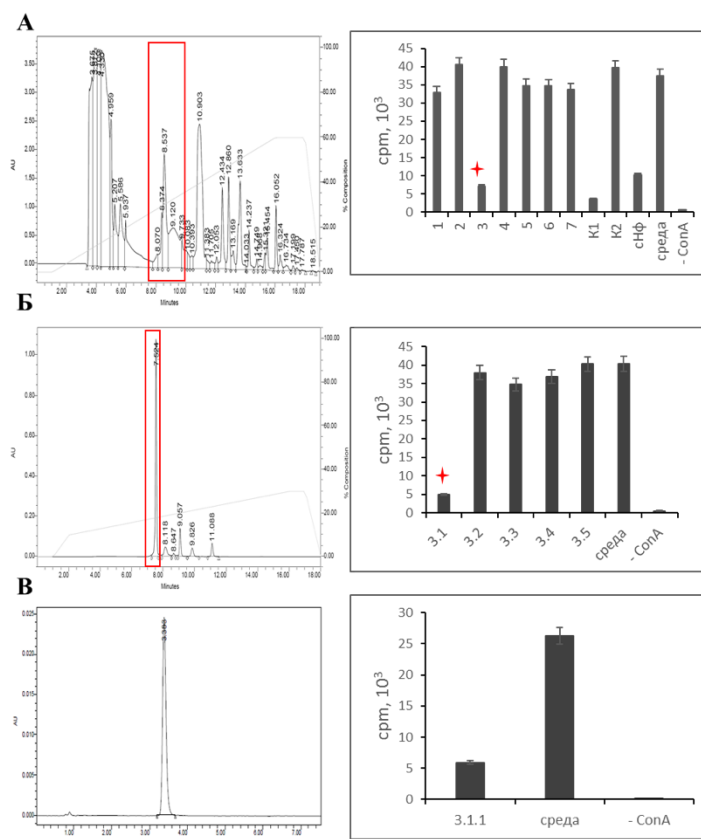
Рис. 6. А – Оценка включения [³H]-тимидина в пролиферирующие клетки в присутствии сНф (+сНф) или без него (-сНф). Б – Оценка пролиферации клеток миеломы через 24 и 40 ч культивации в присутствии (красная линия) или без сНф (синяя линия) с помощью проточной цитометрии по разбавлению метки CFSE. Приведены выбранные данные 2-3 независимых экспериментов каждого типа. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$.

3.4. Фактор, подавляющий включение [³H]-тимидина – это тимидин

Для идентификации искомого компонента мы фракционировали сНф с помощью ВЭЖХ. Последовательное разделение получаемых образцов (Рис. 7, левая часть) с параллельным исследованием активности включения [³H]-тимидина стимулированными Т-лимфоцитами (Рис. 7, правая часть) позволило выделить монофракцию, содержащую ингибирующий компонент.

По анализу методом масс-спектрометрии единственный пик фракции 3.1.1 соответствовал массе 242 Да. Методом ЯМР было определено строение исследуемого фактора. Спектр протонного резонанса (Рис. 8А), а также двумерные

спектры DQF COSY (Рис. 8Б) и ^{13}C - ^1H HSQC (Рис. 8В) однозначно свидетельствуют о том, что исследуемый фактор, подавляющий включение ^3H -тимидина – это тимидин, секретируемый нейтрофилами. Подобным свойством обладали и легочные нейтрофилы инфицированных ТБ мышей (Рис. 9).



Рису. 7. А – сНф разделен на хроматографической колонке на 7 фракций (слева), проверенные затем на способность подавлять включение ^3H -тимидина в пролиферирующие Т-клетки, стимулированные conA (справа). Фракцию 3, обладающую ингибирующей активностью (помечена звездочкой справа, и выделено в рамке на спектре HPLC слева), подвергали дальнейшему разделению на колонках (Б, В). К1 – фильтрат до разделения на колонке (компоненты $<10\text{кДа}$), К2 – концентрат (компоненты $>10\text{кДа}$).

Физиологическая роль этого явления до конца не ясна. Неизвестно, секретируют ли нейтрофилы 3 другие нуклеозида, входящих в состав ДНК, но выброс из клетки хотя бы одного из четырех заставляет задуматься о возможной связи этого процесса с образованием и(или) деградацией ДНК-ловушек [Vorobjeva N.V., Pinegin B.V., 2014].

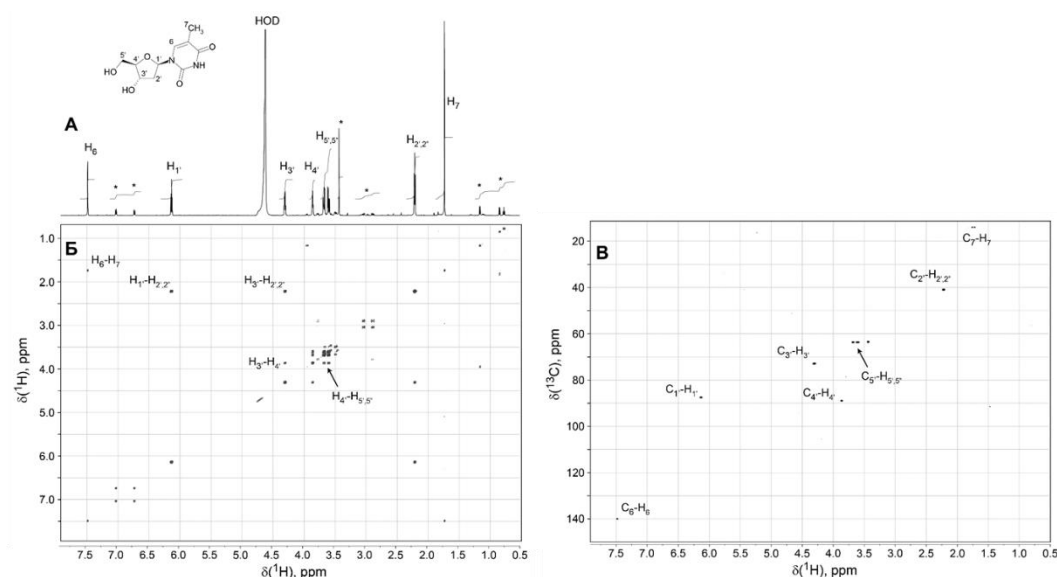


Рис. 8. Спектры ЯМР «фактора нейтрофилов», использованные для установления его строения: 1D спектр протонного резонанса (А), 2D спектр DQF COSY (Б) и 2D спектр гетероядерной корреляции ^{13}C - ^1H HSQC (В). Вверху приведена структурная формула тимидина. На спектрах показано отнесение сигналов ^1H и ^{13}C тимидина.

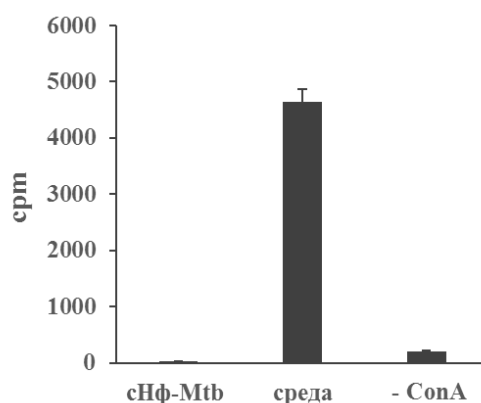


Рис. 9. Оценка включения ^3H -тимидина в пролиферирующие Т-лимфоциты в присутствии супернатанта нейтрофилов, выделенных из легких мышей, зараженных ТБ (сНф-Mtb). В качестве контроля клетки культивировались в среде без добавления сНф (среда) или без стимулятора пролиферации (-ConA).

3.5. Нейтрофилы при воспалении, вызванном микобактериями *M. avium*

Недавно в нашей лаборатории были получены конгенные линии мышей B6.I-100 (B100) и B6.I-139 (B139), отличающиеся β -цепью молекулы класса II *H2-A* [Logunova N., et al., 2015]. Генетическая основа у этих линий одинакова, включая аллель *s* гена *Slc11a1*, отвечающий за чувствительность к *M. avium*. Мы оценили,

будет ли влиять различие только по МНСII дополнительно на чувствительность к *M. avium*, и играют ли в этом какую-то роль нейтрофилы.

Мы показали, что мыши B100 и B139, как и родительские линии B6 и I/St, проявляют зеркальный фенотип по чувствительности к *M. avium*, по сравнению с *M. tuberculosis*. Это выражается в более быстрой потере веса и более ранней гибели мышей B139 (Рис. 10). При этом более сильный приток нейтрофилов в легкие наблюдался у более устойчивых мышей B100 (Рис. 11 А, Б). Это было ассоциировано с повышенной экспрессией генов хемоаттрактантов нейтрофилов CXCL1, CXCL2, IL-17 (Рис. 11В). Возможное объяснение столь разного влияния нейтрофилов на течение двух инфекций может лежать в области различий во внутриклеточной жизни двух возбудителей и явно выраженной низкой вирулентностью *M. avium*.

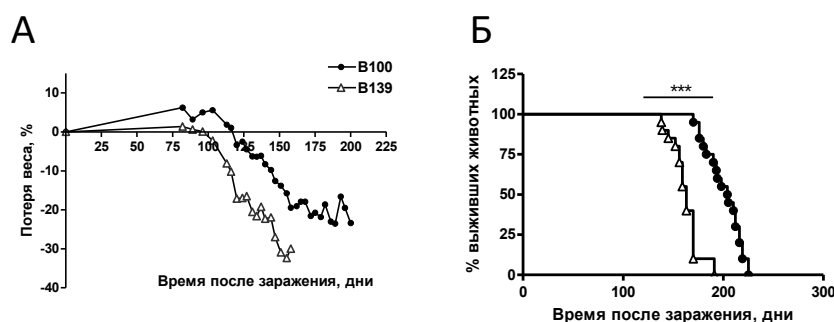


Рис. 10. Потеря веса (А) и продолжительность жизни (Б) мышей B100 и B139 после заражения *M. avium*. Выживание, Log-rank test, *** $P < 0,001$.

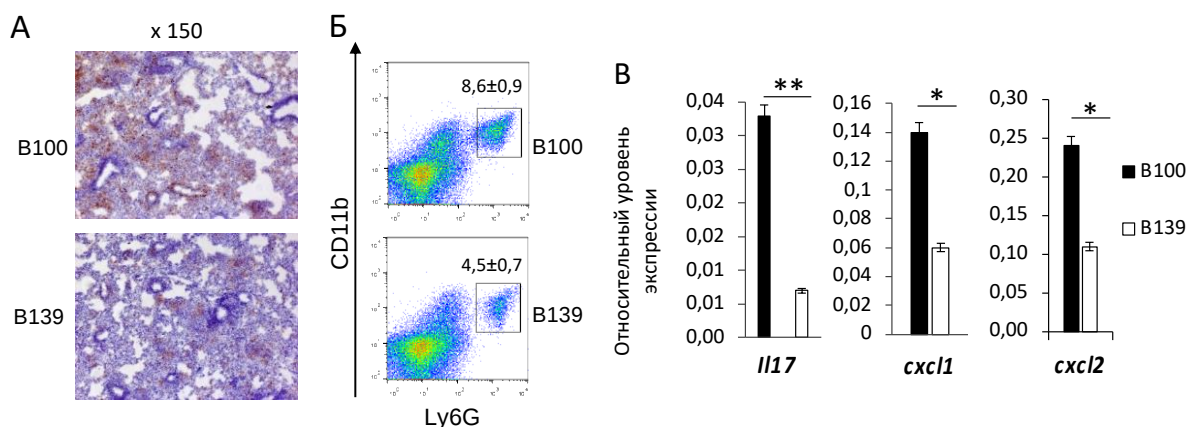


Рис. 11. А – ИГХ окрашивание нейтрофилов (анти-Ly6G) в легких через 8 недель после заражения *M. avium* мышей B100 и B139. Б – Анализ числа нейтрофилов в легком с помощью проточной цитофлуориметрии. В – Оценка экспрессии генов хемоаттрактантов нейтрофилов методом ПЦР в реальном времени. Стьюдент тест, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

3.6. Динамика накопления В-лимфоцитов и формирования В-фолликулов у мышей с разной генетической чувствительностью к *M. tuberculosis*

Роль В-лимфоцитов при ТБ остается довольно загадочной. В-клетки формируют в легком скопления, напоминающие В-фолликулы вторичных лимфоидных органов. Эти структуры обнаруживаются у больных ТБ [Ulrichs T., et al., 2005, Ulrichs T., et al., 2004] и в экспериментальных моделях на животных [см. обзор Linge I., et al., 2016]. Несмотря на обилие данных, физиологическая роль легочных В-фолликулов при ТБ исследована недостаточно, а при инфекции, вызванной *M. avium*, не исследована вообще.

Для более глубокого понимания роли В-клеток и фолликулов в патологии микобактериальных инфекций для начала мы оценили динамику накопления В-клеток в легких мышей чувствительной и устойчивой к *M. tuberculosis* линий I/St и B6, соответственно. Число В-клеток в легких достигает своего максимума через 8-10 недель после заражения. Однако, если у мышей I/St, относительное содержание В-клеток снижается до 3-5 %, а В-фолликулы расформировываются, то число В-лимфоцитов у мышей B6 сохраняется на уровне ~20% и в хронической стадии ТБ (Рис. 12), а В-клетки у них располагаются и в В-фолликулах (Рис. 13А), и рассеяны по всей ткани легкого наравне с Т-клетками CD4⁺ (Рис. 13Б)

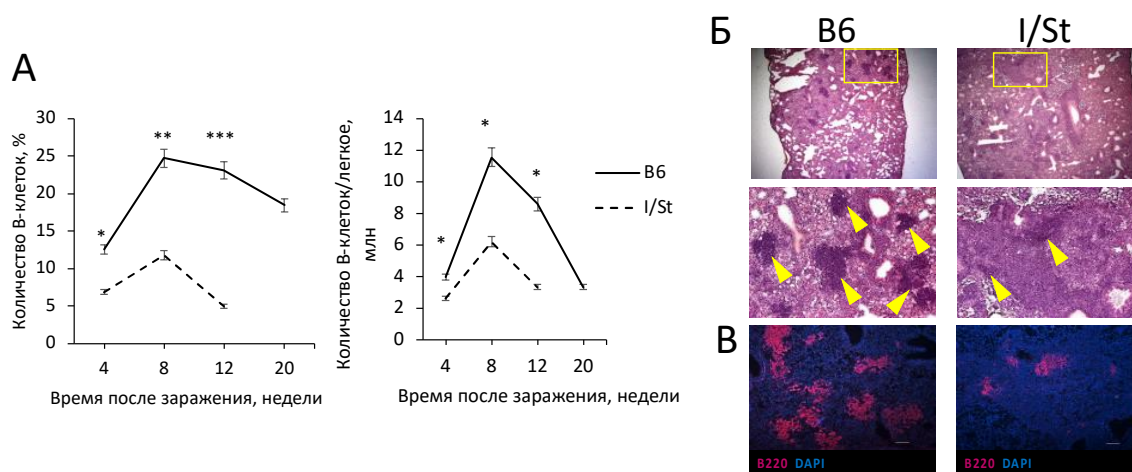


Рис. 12. А – Накопление В-клеток B220⁺CD19⁺ в легких мышей B6 и I/St после заражения *M. tuberculosis*. Б – патология легких через 16 недель после заражения. В-фолликулы указаны желтыми стрелками. В – ИГХ окрашивание В-лимфоцитов (анти-B220, розовый), DAPI (синий) – окраска ядер клеток.

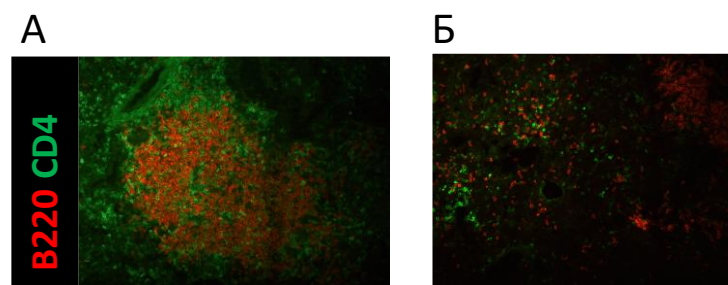


Рис. 13. ИГХ окрашивание криопрепаратов легкого мышей устойчивой линии В6 через 25 недель после аэрозольного заражения *M. tuberculosis* H37Rv. B220 (красный) – В-лимфоциты, CD4 (зеленый) – Т-лимфоциты CD4⁺. Увеличение, x20.

По оценке накопления в органах В-клеток GFP⁺, введенных внутривенно зараженным ТБ мышам дикого типа В6, мы продемонстрировали, что В-клетки активно мигрируют в легкие, плевральную полость и селезенку, обнаруживаются там в течение 4 недель после введения, после чего их количество снижается (Рис.14А). ИГХ окрашивание криопрепаратов легкого МАТ к маркеру пролиферации Ki67 выявило, что формирование В-фолликулов сопровождается локальной пролиферацией тесно контактирующих В- и Т-лимфоцитов CD4⁺ (Рис. 14Б, В), что свидетельствует о формировании зародышевых центров.

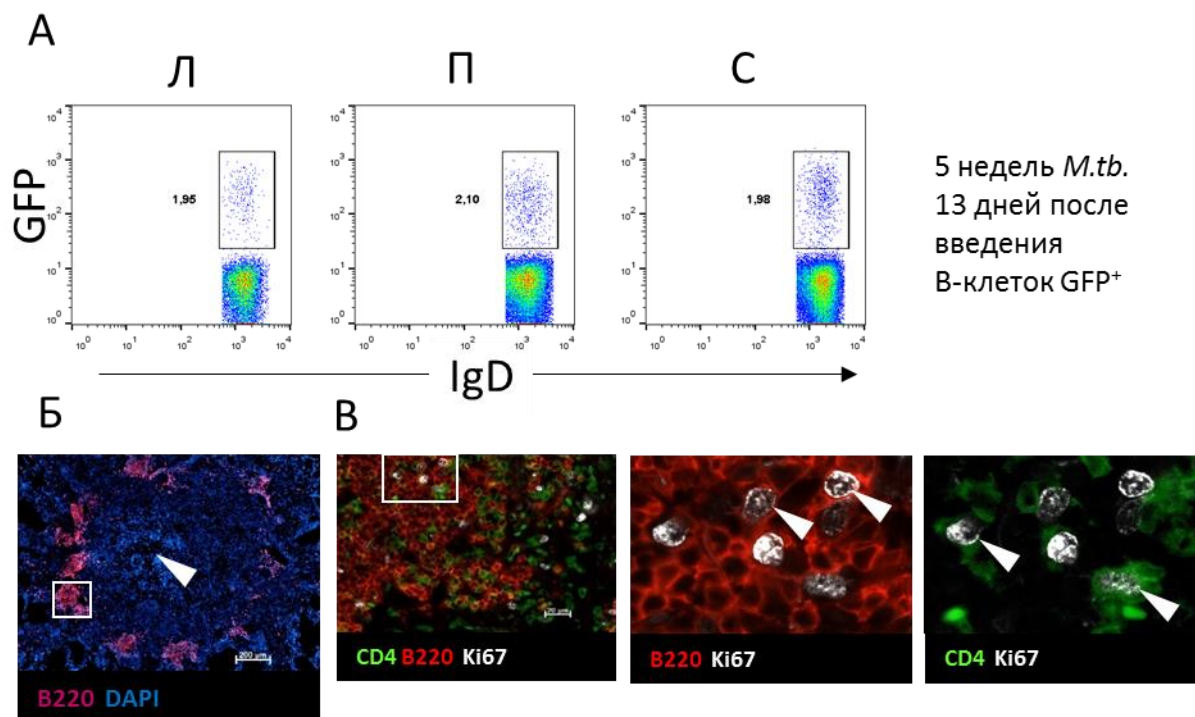


Рис. 14. А – После заражения ТБ В-лимфоциты мигрируют в легкое (Л), плевральную полость (П) и селезенку (С). Б, В – пролиферация (Ki67, белый) В-лимфоцитов (B220, красный) и Т-клеток CD4⁺ (зеленый) *in situ*.

3.7. Фенотип В-лимфоцитов легких при ТБ

Популяция В-лимфоцитов состоит из разных клеток, отличающихся по функциям и маркерам. Мы детально охарактеризовали поверхностный фенотип В-лимфоцитов легкого, непосредственного очага инфекции при аэрозольном заражении, а также клеток примыкающей к легкому плевральной полости.

Как показано на Рис. 15, примерно 85% популяции В-лимфоцитов легкого составляют клетки В2 ($CD19^+B220^{hi}IgM^{lo}IgD^{hi}CD21/35^+$), тогда как 15% составляют клетки В1а ($CD19^+B220^{lo}IgM^{hi}IgD^{lo}CD23^-CD43^+CD11b^+CD5^+$) и В1б ($CD19^+B220^{lo}IgM^{hi}IgD^{lo}CD23^-CD43^+CD11b^+CD5^-$) (Рис. 15Б).

В плевральной полости незараженных животных популяция В-лимфоцитов представлена преимущественно клетками В1 (Рис. 15А, Б). Однако после инфицирования доля минорной популяции В2 возрастает с 25 до 60%.

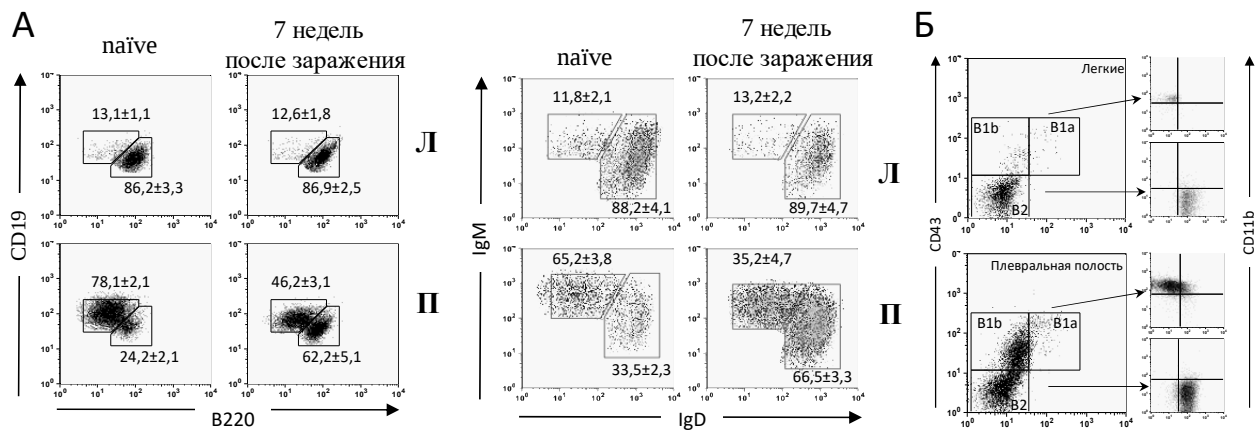


Рис. 15. Поверхностный фенотип В-лимфоцитов легких (Л) и плевральной полости (П) при ТБ у мышей линии I/St. Анализ методом проточной цитофлуориметрии.

Мы также обнаружили, что уровень экспрессии характерного для лимфоцитов В2 маркера CD23 различается у линий мышей и зависит от уровня активации В2-клеток (Рис. 16).

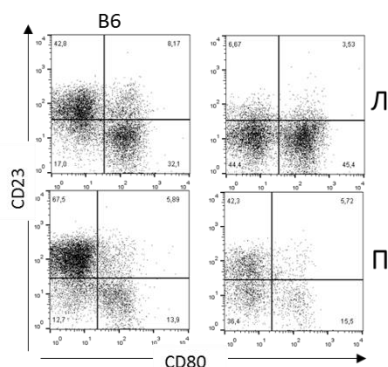


Рис. 16. Экспрессия характерного для лимфоцитов В2 маркера CD23 у линий B6 и I/St снижена на активированных клетках CD80⁺.

3.8. Иммунологические характеристики легочных В-лимфоцитов

Далее мы провели оценку функциональной активности легочных В-клеток – способность продуцировать специфические АТ, основные про- и противовоспалительные цитокины, а также оценили антиген-презентирующую функцию для Т-лимфоцитов.

Уровень экспрессии молекул МНСII на поверхности легочных В-лимфоцитов нарастал по мере развития инфекционного процесса, достигая уровня на В-клетках селезенки (Рис. 17А). Кроме того, обогащенные легочные В-клетки, выделенные из инфицированного легкого мышей I/St, так же эффективно, как В-клетки селезенки, презентировали АГ микобактерий специфичным к ним Т-лимфоцитам CD4⁺ и активировали их пролиферацию *in vitro* (Рис. 17Б).

Мы также детектировали, что легочные В-лимфоциты секретируют большое количество провоспалительного цитокина IL-6, умеренное количество IL-11 и TNF- α , но не IFN- γ , IL-10 и TGF- β (Рис. 17В, Г).

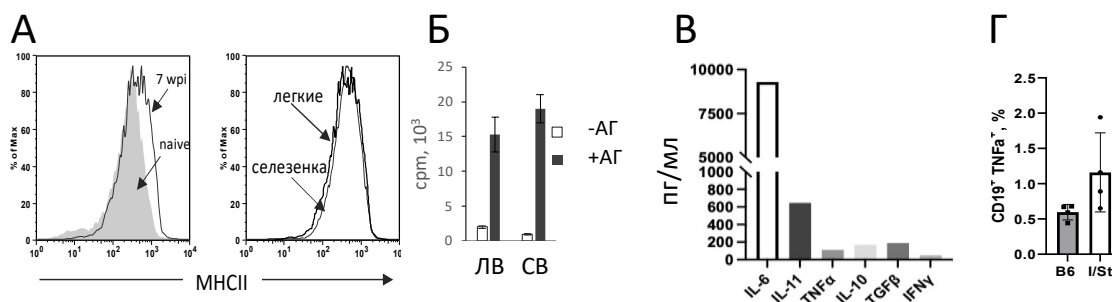


Рис. 17. А – Уровень экспрессии МНСII (анти-IAp) на легочных В-клетках CD19⁺. Б – Пролиферация специфических Т-линий в ответ на презентацию мАГ В-клетками легких (ЛВ) и селезенки (СВ) зараженных мышей I/St. В – продукция цитокинов легочными В-клетками, выделенными из зараженного легкого мышей I/St, ELISA. Г – относительное количество В-клеток CD19⁺TNF- α ⁺ в легком мышей B6 и I/St после заражения ТБ.

Методом ELISA мы выявили, что легочные В-лимфоциты мышей I/St секретируют АТ всех подклассов, кроме IgM и IgE. Интересно, что полученные АТ не реагировали с АГ микобактерий или экстрактом здоровой легочной ткани. Антитела IgA и IgG1 обладали слабой реактивностью с экстрактом из зараженного легкого (Таблица 1).

Таблица 1. Продукция иммуноглобулинов легочными В-лимфоцитами мышей I/St.

Реактивность	Классы иммуноглобулинов						
	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgE
Общее количество	0.71 ± 0.02*	1.06 ± 0.01	0.48 ± 0.03	1.05 ± 0.00	0.18 ± 0.02	<0.1	<0.1
Соникат микобактерий	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	NT	NT
Культуральный фильтрат (КФ) микобактерий	0.06 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.00 ± 0.00	NT	NT
Экстракт легочной ткани	0.13 ± 0.08	0.09 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.01	NT	NT

* Результаты представлены, как средняя оптическая плотность (OD) ± SD.

3.9. Определение специфичности моноклональных АТ, продуцируемых легочными В-лимфоцитами

Полученные данные свидетельствуют о том, что АТ, продуцируемые легочными В-лимфоцитами зараженных ТБ мышей I/St, практически не имеют специфичности к МАГ. Тем не менее, мы проверили, способны ли вообще легочные В-клетки продуцировать АТ, специфичные к АГ микобактерий или ткани легкого. Для этого была создана панель гибридом путем слияния выделенных из инфицированного легкого В-клеток с клетками миеломы. Из 288 лунок было получено 66 пролиферирующих клонов, 26 из которых продуцировали АТ. Лишь 5 гибридом из последних продуцировали АТ, распознающие смесь АГ микобактерий или экстракта инфицированного легкого (1 IgG1, 2 IgGa, 2 IgGb). Большая часть гибридом продуцировала АТ, не имеющие специфичности ни к микобактериям, ни к собственным АГ (11 IgM, 8 IgG2a и 2 IgG1).

3.10. Различные изотипы иммуноглобулинов участвуют в иммунном ответе у чувствительных и резистентных к ТБ мышей

Мы также провели сопоставление последовательностей CDR3 IGH легочных В-лимфоцитов CD19⁺ через 8 недель после аэрозольного заражения *M. tuberculosis* устойчивой и чувствительной к ТБ линий В6 и I/St, соответственно. Используя MiXCR [Bolotin D. A., et al., 2015], мы извлекли репертуары IGH CDR3 из данных

секвенирования РНК и оценили количество и состав изотипов в образцах из каждой группы мышей. Мы обнаружили, что уровни экспрессии IgM и IgG были выше в транскриптомных данных от мышей I/St по сравнению с мышами B6 (Рис. 18А). В репертуарах IGH легочных В-клеток I/St доминирующим изотипом иммуноглобулинов был IgG, тогда как у мышей B6 преобладал IgA (Рис. 18Б). Интересно, что извлеченные из транскриптомных данных более высокие уровни IgM и IgG в В-лимфоцитах мышей I/St соотносились со значимо большей концентрацией специфичных к МАГ антител IgG, IgG1 и IgM в сыворотке крови этих же животных, по сравнению с мышами B6 (Рис. 18Г).

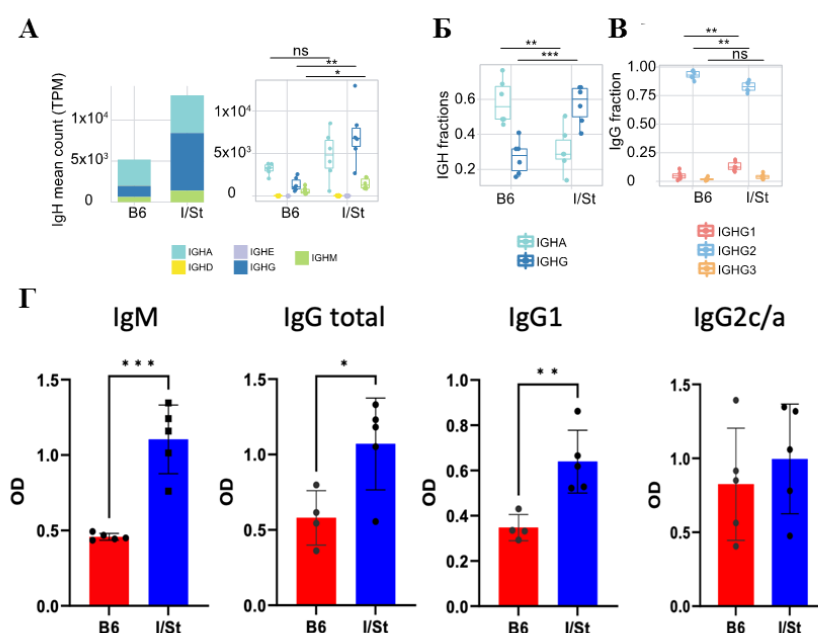


Рис. 18. А – Сопоставление уровня транскриптов IGH, нормализованное по общему количеству транскриптов и разбитое по изотипам. Б – Частота IgG и IgA в репертуаре IGH. В – частота IgG1, IgG2, IgG3 в репертуаре IgG у мышей B6 и I/St (N = 6 каждой линии). Г – Уровень специфичных к МАГ АТ в сыворотке крови этих же животных, ELISA. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,005$.

Далее мы оценили количество уникальных нуклеотидных последовательностей районов CDR3, кодирующих идентичные аминокислотные последовательности, т. е. степень конвергентности иммуноглобулинов. Этот показатель также отражает активность реакций соматических гипер-мутаций. Примечательно, что этот показатель был значительно выше в репертуаре IgA, но не в репертуаре IgG мышей B6 по сравнению с мышами I/St (Рис. 19А). Мы также

провели кластерный анализ 20 самых крупных кластеров. Оказалось, что в В-клетки В6 образуют крупные кластеры IGH с высокой плотностью, преимущественно клонотипа IgA (Рис. 19Б). Напротив, у мышей I/St образовывались значительно меньшие кластеры в основном IgM (Рис. 19Б). Эти данные указывают на интенсивную подстройку антител IgA под воздействием АГ возбудителя в легочных В-клетках мышей В6, тогда как у мышей I/St В-клетки, видимо, генерируют менее целенаправленный ответ, что соотносится с данными полученными в ELISA и при анализе гибридом. Кроме того, более высокий уровень IgM через 8 недель после заражения мышей может указывать на отсроченный и/или отвлеченный гуморальный ответ на мАГ у мышей I/St.

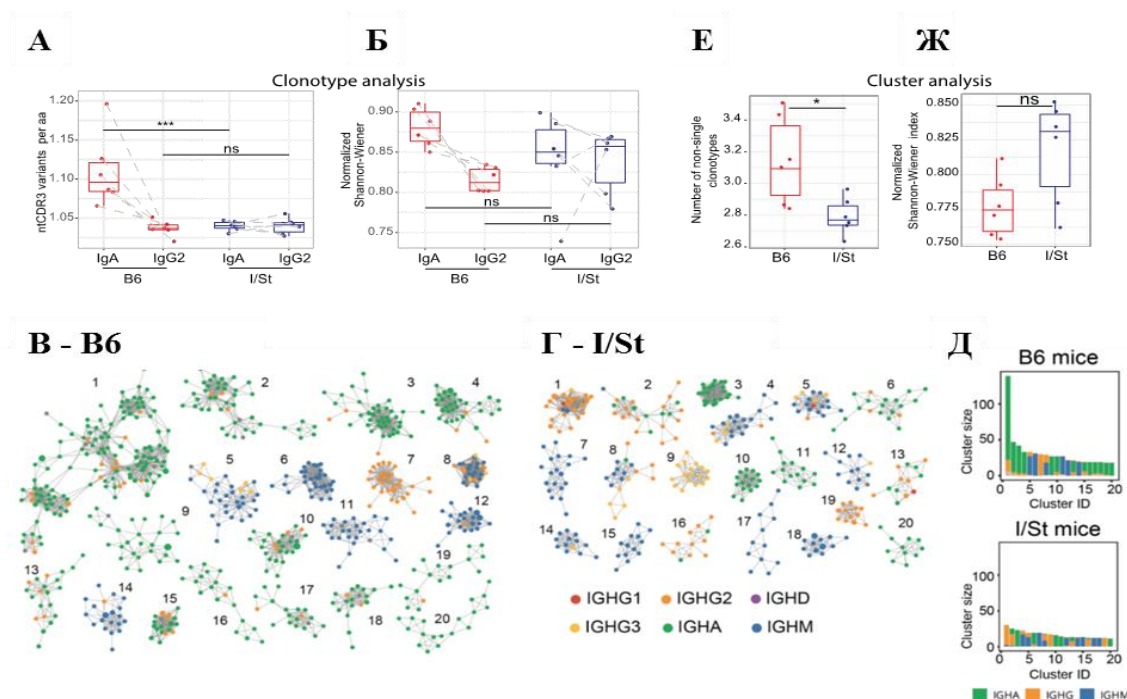


Рис. 19. А – Среднее количество уникальных нуклеотидных последовательностей CDR3 на 1 ак последовательность для 330 лучших функциональных клонотипов каждого изотипа каждой мыши. Б – Равномерность распределения размеров клонотипов. Точки данных IgA и IgG2 от одной и той же мыши, связаны пунктирными линиями ($N = 6$). * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,005$. В, Г – 20 крупнейших кластеров клонотипов IGH для мышей В6 и I/St. Каждый узел представляет клонотип в объединенном репертуаре. Д – Распределение клонотипов в 20 крупнейших кластерах панелей В и Г. Е – Среднее количество клонотипов в кластерах, содержащих два или более клонотипов. Ж – Равномерность совокупного размера клонотипа в каждом кластере (нормализованный индекс Шеннона-Винера) среди 3000 лучших функциональных клонотипов IGH от каждой мыши.

3.11. Продуцируемый В-лимфоцитами TNF- α необходим для формирования В-фолликулов, но не влияет на чувствительность мышей к микобактериям

TNF- α — один из ключевых цитокинов в иммунном ответе против микобактерий на разных этапах развития инфекционного процесса [Russell D.G., 2007]. TNF- α крайне необходим для формирования и поддержания структуры гранулем, разрушение которых приводит к диссеминации бактерий [Rook G.A.W., and Hernandez-Pando R., 1996]. Показано, что продуцируемый В-клетками TNF- α необходим для правильной организации вторичных лимфоидных органов [Tumanov A.V., et al., 2010]. В связи с этим мы решили оценить вклад этого цитокина, секретируемого В-клетками, в формирование В-фолликулов в легких и чувствительность к *M. tuberculosis* и *M. avium*.

Мы использовали мышей со специфически выключенным геном *Tnfa* в В-лимфоцитах (B6.CD19^{cre+/-}TNF α ^{flox/flox}, далее В-TNF-KO), а также мышей дикого типа В6. Мы показали, что в отсутствие TNF- α , продуцируемого В-клетками, в легких образуется меньше В-фолликулов при заражении ТБ (Рис. 21 А, Б), а при заражении *M. avium* этот цитокин оказался критическим для формирования В-фолликулов (Рис. 20В, Г).

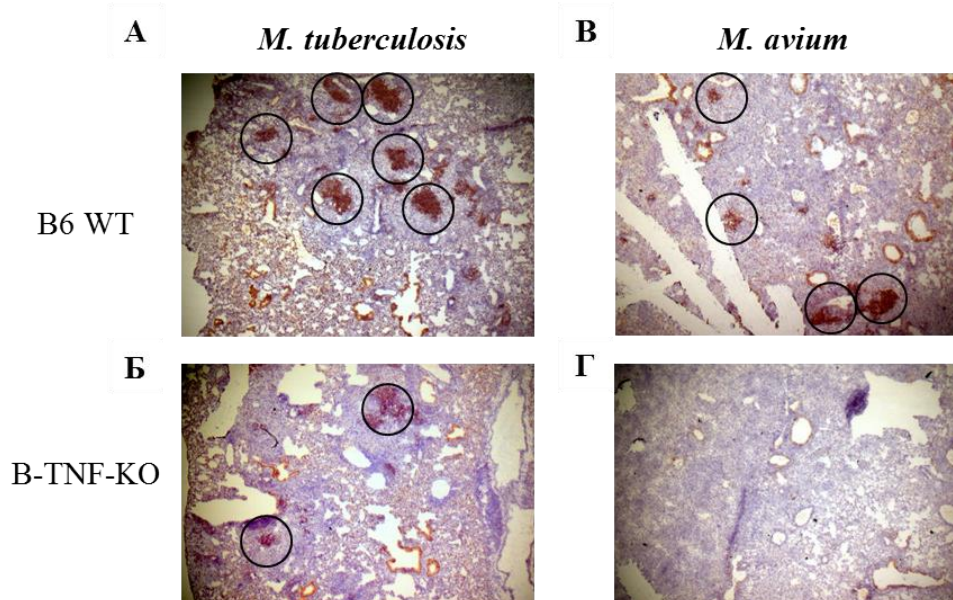


Рис. 20. ИГХ окрашивание криопрепаратов легкого мышей дикого типа B6 WT и В-TNF-KO после заражения *M. tuberculosis* (А, Б) и *M. avium* (Б, Г) МАТ анти-CD19 (коричневый) с контрастным окрашиванием гематоксилином. Увеличение $\times 20$.

Вместе с тем, несмотря на важность при ТБ $\text{TNF-}\alpha$, продуцируемого Т-лимфоцитами и миелоидными клетками, секреция $\text{TNF-}\alpha$ В-лимфоцитами не влияла на способность животных контролировать размножение бактерий в легких и селезенке, а также на продолжительность жизни животных ни при заражении микобактериями *M. tuberculosis*, ни *M. avium*.

3.12. Дефицит IL-6, продуцируемого В-клетками, приводит к повышению чувствительности к ТБ

Как описано выше, при ТБ легочные В-лимфоциты мышей I/St секретируют большое количество IL-6. IL-6 – цитокин плеiotропного действия. Показано, что системный нокаут гена *Il6* приводит к ухудшению контроля ТБ [Ladel C.H., et al., 1997, Saunders B. M., et al., 2000]. Мы решили оценить вклад продуцируемого В-лимфоцитами IL-6 в иммунный ответ и чувствительность к *M. tuberculosis*.

Для этого были выведены мыши $\text{B6.CD19cre}^{+/-}\text{IL6}^{\text{flox/flox}}$ (далее В-IL-6КО) с кондиционным нокаутом гена *Il6* в В-клетках. Сначала мы оценили вклад дефицита производимого В-клетками IL-6 на тяжесть течения ТБ. Срок жизни мышей В-IL-6КО после заражения была достоверно меньше, чем у мышей дикого типа WT, но больше, чем у мышей IL-6КО с системным нокаутом гена *Il6* (Рис. 22А). При этом мы не обнаружили разницы между мышами В-IL-6КО и WT по количеству микобактерий в органах на исследуемых сроках (Рис. 22Б, В).

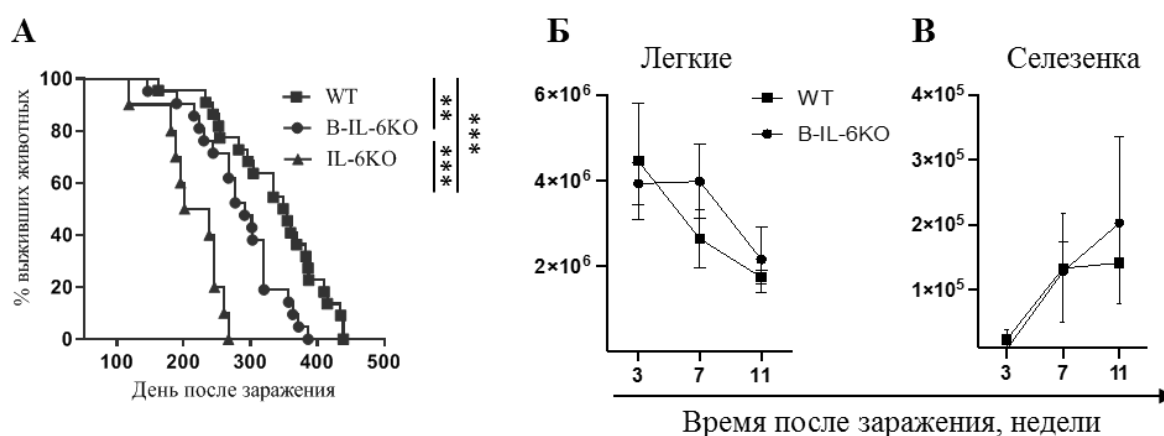


Рис. 22. Мыши с дефицитом IL-6 в В-лимфоцитах более чувствительны к заражению ТБ. **А** – Время жизни мышей IL-6КО, В-IL-6КО и мышей В6 дикого типа (WT). Logrank тест, ** $P=0,0045$; $P < 0,0001$. **Б, В** – Бактериальная нагрузка в легких (Б) и селезенке (В) мышей В-IL-6КО и WT.

Мы также исследовали, как повлияет нарушение продукции IL-6 В-клетками на общий уровень IL-6 в легких после инфицирования. Несмотря на то, что через 3 недели после заражения В-клетки составляют примерно 10% от всех клеток легкого (Рис. 23А), отсутствие продукции ими IL-6 приводит к снижению общего уровня экспрессии *Il6* более, чем в 10 раз (Рис. 23Б), что было ассоциировано со снижением общего числа В-клеток в легком через 7 недель после заражения (Рис. 23А).

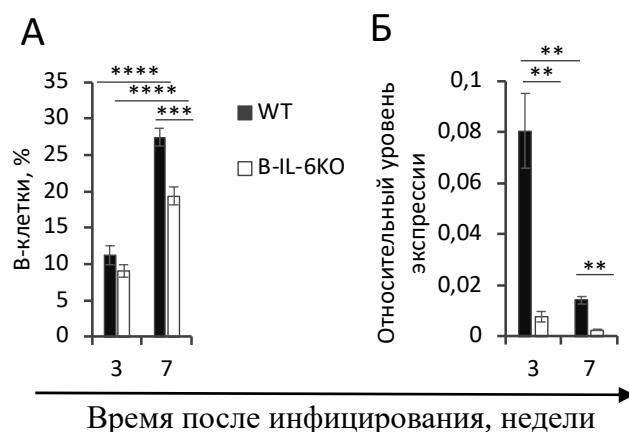


Рис. 23. А – Анализ числа В-лимфоцитов CD19⁺ в легких мышей В-IL-6КО и WT через 3 и 7 недель после заражения *M. tuberculosis*. Б – Уровень экспрессии гена *Il6* в легких мышей В-IL-6КО и WT через 3 и 7 недель после заражения. Анализ экспрессии генов методом qPCR относительно экспрессии гена домашнего хозяйства *hprt*. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Поскольку дефицит IL-6 может влиять на функции Т-клеток CD4⁺, в том числе на продукцию IFN- γ , IL-17, и на функции фолликулярных хелперов T_{FH}CXCR5⁺, мы оценили эти параметры у мышей В-IL-6КО и WT после заражения ТБ. Число Т-клеток CD4⁺ в легких возрастало по мере развития ТБ, но не различалось между мышами линий В-IL-6КО и WT (Рис. 24А). Количество специфических Т-клеток CD4⁺IFN- γ ⁺ было ниже у мышей дефектной линии через 3 недели после заражения (Рис. 24Б), после чего их число в легком мышей В-IL-6КО возрастало и не отличалось от мышей дикого типа. Уровень специфических Т-клеток Th17 также возрастал по мере развития инфекции и был ниже через 3 и 7 недель после заражения у мышей В-IL-6КО по сравнению с WT (Рис. 24В).

Мы также показали, что число T_{FH}CXCR5⁺ у мышей В-IL-6КО снижено в 2 раза в легком через 3 и 7 недель после заражения (Рис. 24Г). Экспрессия гена

характерного для T_{FH} цитокина IL-21 в легких мышей B-IL-6KO также снижена по сравнению с мышами WT через 3 недели после заражения (Рис. 24Д), после чего, видимо, влияние продукции IL-6 В-клетками компенсируется другими источниками и/или другими цитокинами.

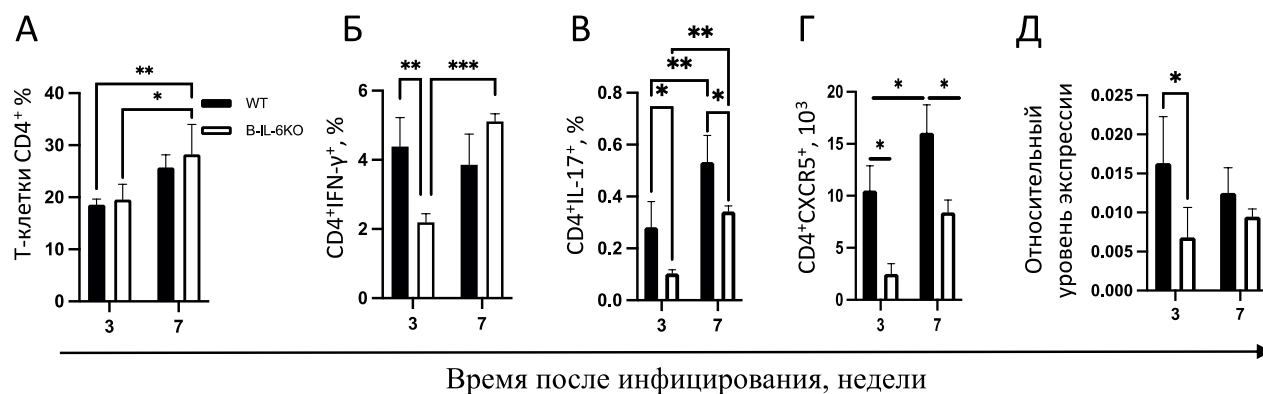


Рис. 24. А – Относительное количество Т-лимфоцитов $CD4^+$ в легких через 3 и 7 недель после аэрозольного заражения мышей B6(WT) и B-IL-6KO. Б, В – Анализ числа легочных Т-клеток $CD4^+$, специфически продуцирующих IFN- γ (Б) и IL-17 (В) после культивирования в присутствии МАГ (10 мкг/мл) *in vitro*. Г – Количество $T_{FH}CD4^+CXCR5^+$ в легких через 3 и 7 недель после заражения мышей WT и B-IL-6KO. Д – Относительный уровень экспрессии гена *Il21* в легких через 3 и 7 недель после заражения мышей B6 и B-IL-6KO. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3.13. Скопление В-фолликулов – признак патогенеза или протекции?

По многим параметрам патогенез заболеваний чувствительных к *M. tuberculosis* и *M. avium* линий мышей похож на патогенез ТБ человека. Так, и у людей, и у животных образуются некротические гранулемы с гипоксией и формируются В-фолликулы в легких. Если при заражении *M. tuberculosis* разница в образовании В-фолликулов между чувствительными и устойчивыми мышами количественная, то при заражении *M. avium* у чувствительных мышей B6 обнаруживается множество фолликулов, тогда как у устойчивых мышей I/St они не образуются вовсе [Kondratieva E., et al., 2010]. В связи с этим возник вопрос, является скопление В-фолликулов при инфекции, вызванной *M. avium*, фактором излишнего воспаления и патогенеза или иммунологической протекции.

Поскольку восприимчивость к *M. avium* линий B6 и I/St обусловлена экспрессией аллелей s или r гена *slc11a1*, соответственно [Kondratieva E., et al.,

2010], мы провели сегрегационный анализ в мышах F2 (B6xI/St). Мы сопоставили общее количество В-фолликулов в легком и площадь, занимаемую ими, с расщеплением по гену *slc11a1*. Поскольку ген *slc11a1* экспрессируется исключительно в макрофагах, то мы оценивали количество микобактерий в легких, как маркер контроля сдерживания инфекции.

Генотип *slc11a1*^{s/s} определял достоверно худшую эффективность контроля размножения микобактерий в легких по сравнению с генотипом *slc11a1*^{r/r} (Рис. 25А). Качественная и количественная оценка гистологической картины показала, что у мышей *slc11a1*^{s/s} формировалось больше В-фолликулов, чем у мышей с генотипом *slc11a1*^{r/r} (Рис. 25), а количество В-фоликулов в легких мышей *Slc11a1*^{s/s} прямо коррелировало с числом высеваемых бактерий ($r = 0.82$, $P < 0,0001$).

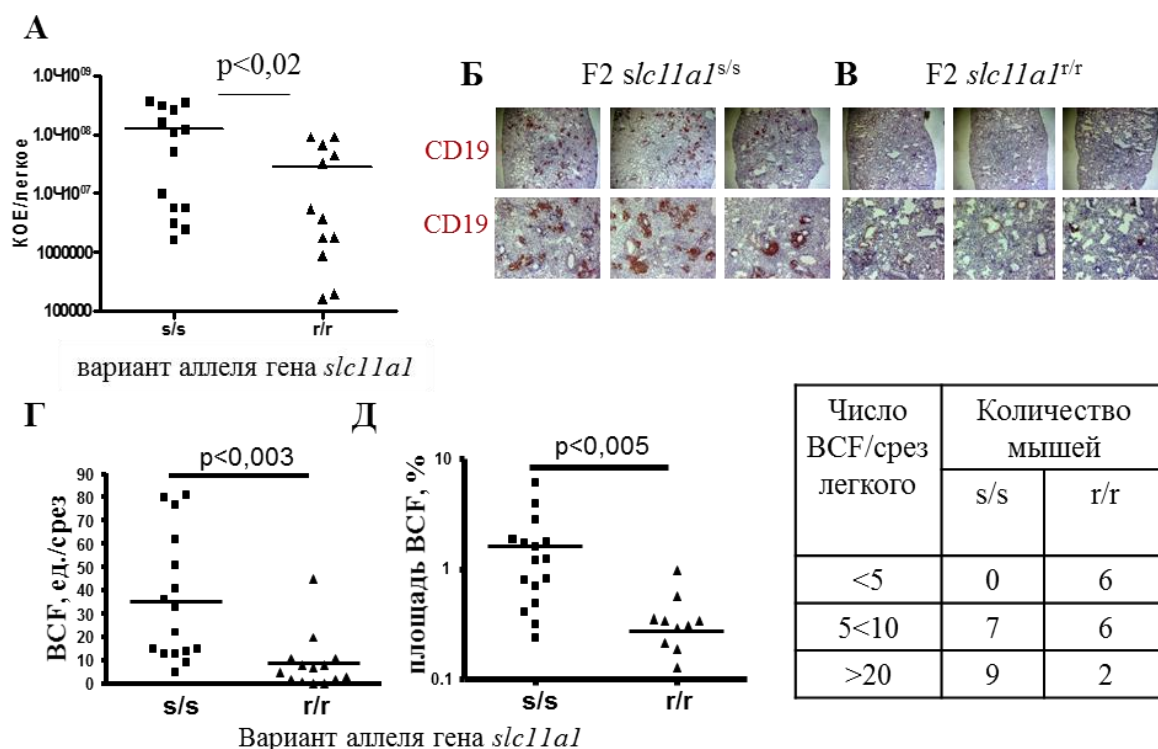


Рис. 25. Количество В-фолликулов при заражении *M. avium* ассоциировано с экспрессией чувствительного аллеля s гена *Slc11a1*.

Таким образом, мы получили генетическое свидетельство того, что образование В-фолликулов в легких при заражении *M. avium* является фактором патогенеза, а не дополнительным способом защиты от инфекции, а уровень генетической восприимчивости к конкретному виду микобактерий во многом

определяет характер легочной патологии, что позволяет считать генетику хозяина важнейшим фактором патогенеза.

3.14. Удаление В-лимфоцитов у мышей В6 в хронической стадии развития ТБ приводит к повышению чувствительности к инфекции

Ранее было показано, что мыши, лишённые В-клеток, проявляют повышенную восприимчивость к ТБ. Поскольку у устойчивых мышей В6 В-фолликулы сохраняются длительное время после заражения, мы предположили, что поддержание таких структур может быть ассоциировано со сдерживанием инфекционного процесса. Чтобы проверить эту гипотезу мы оценили, повлияет ли удаление В-клеток в хронической стадии ТБ на тяжесть течения инфекции.

Для этого мы ввели элиминирующие мАТ против CD20 (250 мкг/мышь) внутривенно мышам В6 трижды: через 16 недель после заражения *M.tuberculosis*, а затем через 10 и 20 дней после первой инъекции (Рис. 26А). Введение мАТ аCD20 привело к снижению числа В-клеток в крови до 2-3%, а также к исчезновению рассеянных В-клеток в ткани легкого и практически полной деградации В-фолликулов в легких через 7 дней после инъекции (Рис. 26Б).

Оценка основных показателей тяжести течения инфекции показала, что через 4 недели после первичного введения мАТ аCD20 бактериальная нагрузка в легких

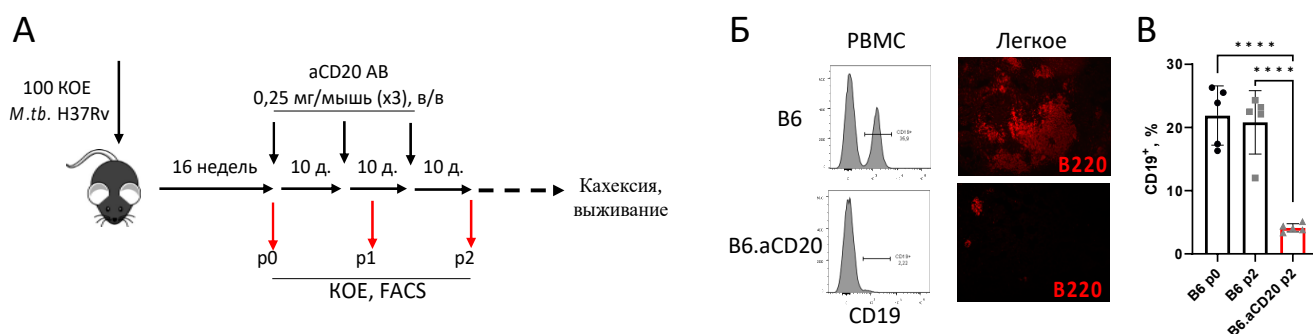


Рис. 26. А – Схема эксперимента по оценке влияния удаления В-лимфоцитов в хронической стадии развития ТБ у устойчивых мышей В6. Б – Контроль удаления В-клеток по анализу клеток CD19⁺ периферической крови с помощью проточной цитофлуориметрии (левые панели), а также ИГХ окраски легких мАТ против B220 (красный) через 7 дней после введения первой дозы мАТ. В – Цитометрический анализ легочных В-лимфоцитов CD19⁺ через 16 недель после заражения до (p0) и через 1 месяц после введения мАТ аCD20 (p2).

и селезенке достоверно увеличилась по сравнению с контрольными животными (Рис. 27А, Б). Кроме того, удаление В-лимфоцитов в хронической стадии развития ТБ привело к более быстрой потере массы тела (Рис. 27 В) и сокращению срока жизни (Рис. 27 Г) животных по сравнению с контрольными мышами В6. В результате мы продемонстрировали, что удаление В-лимфоцитов в хронической стадии развития ТБ приводит к развитию чувствительного фенотипа.

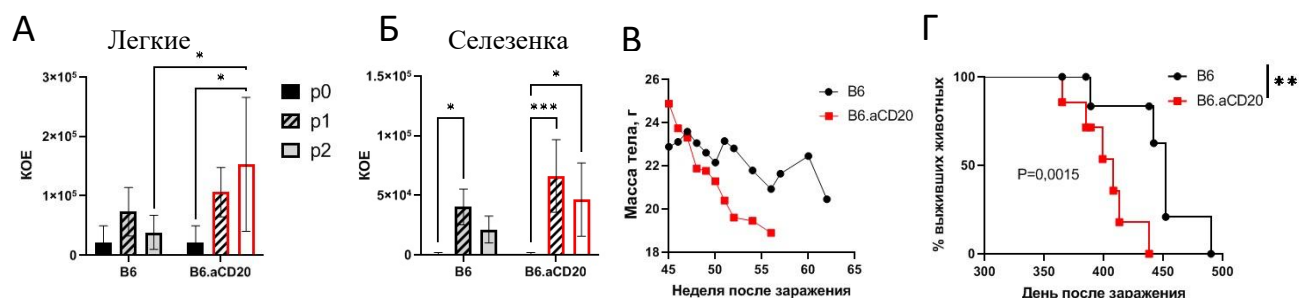


Рис. 27. А, Б – Анализ количества микобактерий в легких (А) и селезенке (Б) через 16 недель после заражения до удаления В-клеток (p0), и через 2 (p1) и 4 (p2) недели после 1-ой инъекции мАТ aCD20. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. **В** – потеря веса зараженных мышей В6 (контроль) и мышей без В-клеток (В6.aCD20). **Г** – Продолжительность жизни зараженных мышей В6 и В6.aCD20, Logrank-тест.

3.15. Удаление В-лимфоцитов в хронической стадии ТБ у мышей В6 влияет на Т-клетки CD8⁺, но не CD4⁺

На следующем этапе исследований мы оценили, на какие параметры иммунного ответа повлияло удаление В-лимфоцитов. Как описано выше, в хронической стадии развития ТБ В-лимфоциты расположены в воспаленной ткани легкого и собраны в фолликулах, где тесно контактируют с Т-лимфоцитами CD4⁺, одними из главных игроков в борьбе с микобактериями. В связи с этим мы проверили, влияет ли элиминация В-клеток на количество и активацию Т-лимфоцитов, а также на специфическую продукцию ими провоспалительных цитокинов. К нашему удивлению, удаление В-лимфоцитов практически не повлияло на ветвь ответа Т-клеток CD4⁺ – ни частота, ни уровень их активации не изменились. Количество Т-клеток CD4⁺, продуцирующих цитокины IFN- γ , TNF- α или IL-17 в ответ на стимуляцию мАГ, также сохранялся на одном уровне. Вместе с тем мы наблюдали небольшое повышение частоты Т-лимфоцитов CD8⁺, но

уровень их активации не различался у контрольных мышей В6 и с удаленными В-клетками. В отличие от Т-клеток CD4⁺, число Т-лимфоцитов CD8⁺, специфически секретирующих TNF-α или IL-17, снизилось после удаления В-клеток (Рис. 28 В).

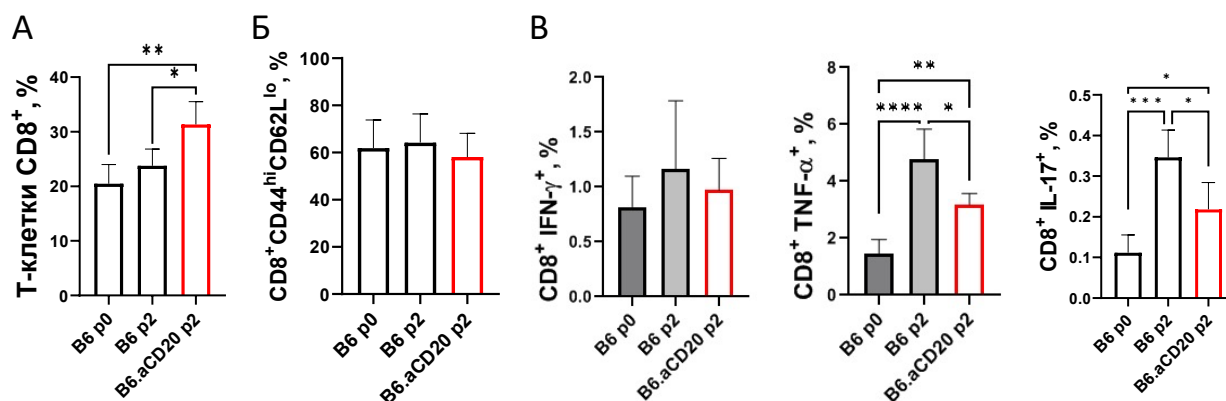


Рис. 28. Анализ изменения относительного количества Т-клеток CD8⁺ (А) и уровня их активации (Б) в легких до (В6р0) и через 4 недели после введения МАТ аCD20 (В6.аCD20.р2) в сопоставлении с контрольными животными В6.р2. В – Относительное количество легочных Т-клеток CD8⁺, специфически секретирующих цитокины IFN-γ, TNF-α и IL-17 после культивации в присутствии МАГ (10 мкг/мл). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

3.16. Удаление В-лимфоцитов в хронической стадии заражения устойчивых мышей В6 приводит к усилению нейтрофил-ассоциированного ответа

Как было отмечено, на фоне дефицита В-клеток приток нейтрофилов в место инфицирования усиливается на ранних сроках после заражения ТБ [Maglione P., et al., 2007]. В используемой нами модели по удалению В-клеток в хронической стадии ТБ, число нейтрофилов увеличилось не значимо (Рис. 29А). Однако на уровне мРНК в легком достоверно увеличилась экспрессия генов хемоаттрактантов нейтрофилов – CXCL1 и IL-17 (Рис. 29Б), а также генов, кодирующих факторы, ассоциированные с нейтрофил-индуцированным воспалением и разрушением ткани – S100A8 и матриксных металлопротеиназ MMP8 и MMP9 (Рис. 29Б, В). Вероятно, в условиях дефицита В-лимфоцитов в легком создается микроокружение благоприятное для реализации ассоциированного с нейтрофилами воспаления.

Таким образом полученные нами данные являются дополнительным свидетельством, что длительное поддержание В-фолликулов в легких соотносится со сдерживанием инфекции и устойчивым фенотипом при ТБ.

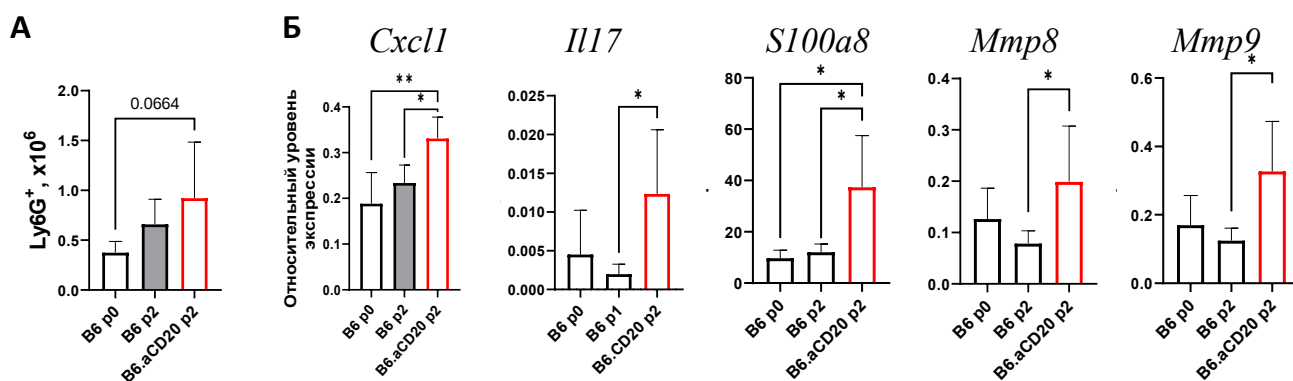


Рис. 29. А – Анализ числа нейтрофилов Ly6G⁺ в легких мышей до (B6.p0) и через и через 4 недели после введения мАТ аCD20 (B6.aCD20.p2) по сравнению с контрольными мышами B6.p2. Б – Уровень экспрессии генов факторов, ассоциированных с нейтрофильным воспалением. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

3.17. Перенос клеток эмбриональной печени восстанавливает способность мышей CBA/N к ответу на BCG

Ранее было показано, что мыши линии CBA и CBA/N-xid обладают одинаковой чувствительностью к первичному заражению ТБ, но мыши CBA/N-xid не отвечают на вакцинацию BCG против ТБ, в отличие от линии CBA. Генетически линия CBA/N-xid отличается от родительской линии CBA миссенс-мутацией в гене *btk*, кодирующем тирозинкиназу Бруттона, что приводит к X-сцепленному иммунодефициту [Rawlings D.J., et al., 1993, Thomas J.D., et al., 1993]. Это выражается в нарушении развития всего звена В-лимфоцитов. Мутации в этом же гене у людей приводят к развитию тяжелого иммунодефицита – X-сцепленной агаммаглобулинемии (XLA, X-linked agammaglobulinemia) [Tsukada S., et al., 1993, Vetrie D., et al., 1993]. Поскольку оставалось неясным, как именно связаны нарушения функций В-клеток с отсутствием эффекта вакцинации у мышей CBA/N, мы решили исследовать клеточные механизмы этого явления.

Поскольку основной эффект мутации в гене *btk* нарушает функции В-клеток и, в частности, лимфоцитов В1, мы решили проверить восстановит ли избирательный перенос предшественников В-клеток дефект вакцинации у мышей CBA/N. Для этого мы выделили клетки эмбриональной печени (ЭП, основного источника В-лимфоцитов в эмбриогенезе) мышей CBA на 17-18 день внутриутробного развития и ввели их мышам CBA/N (10×10^6 /мышь) за 4 недели до

вакцинации. Затем всех животных заразили *M. tuberculosis*. Оказалось, что восстановление В-клеток (Рис. 30А) достаточно для эффективной вакцинации мышей СВА/Н, что выражалось в снижении числа микобактерий в органах (Рис. 30В, Г) и увеличении срока жизни вакцинированных зараженных животных СВА/Н с введенными клетками ЭП по сравнению с контрольными мышами (Рис. 30Б).

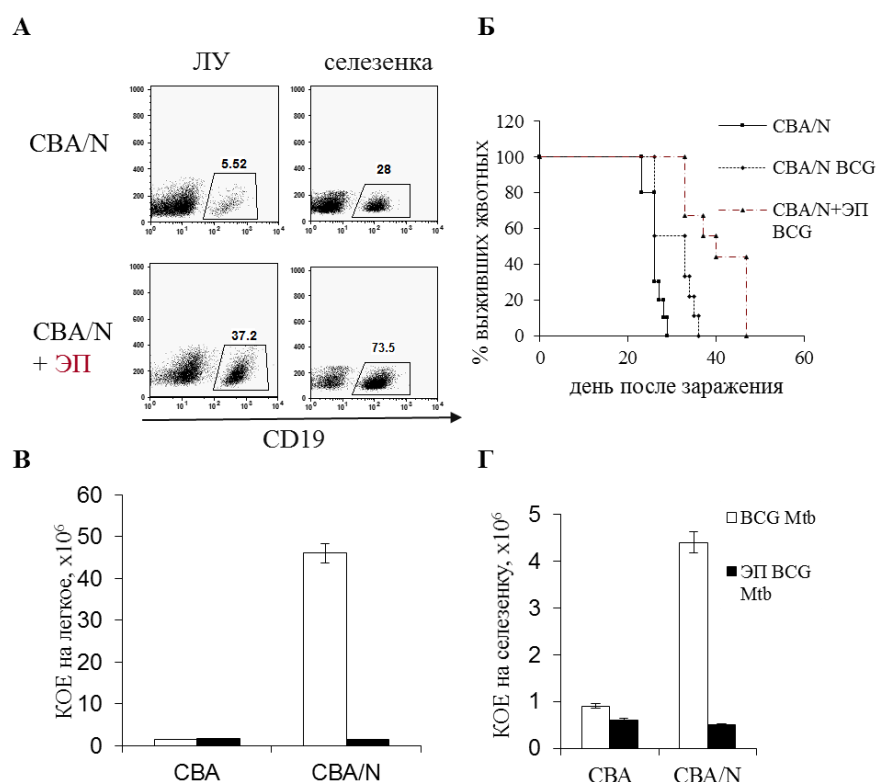


Рис. 30. Внутривенное введение клеток ЭП СВА мышам СВА/Н восстанавливает их способность отвечать на вакцинацию BCG.

3.18. Клетки перитонеального экссудата мышей СВА/Н не активируют специфические Т-лимфоциты

Поскольку ранее было показано, что очищенные В-лимфоциты мышей СВА и СВА/Н обладают одинаковой способностью презентировать АГ микобактерий специфическим Т-лимфоцитам [Nikopenko V., et al., 1996], мы предположили, что отсутствие иммунного ответа может быть следствием нарушения процессинга и/или презентации АГ профессиональными фагоцитами. Для проверки этой гипотезы мы оценили способность клеток перитонеального экссудата (КПЭ), нагруженных бактериями BCG *in vivo*, стимулировать к пролиферации специфические к МАГ линии Т-клеток. Для этого мы вводили бактерии BCG

(10^8 /мышь) в перитонеальную полость мышей линий СВА и СВА/Н на 2 часа. Затем выделенные клетки отмывали и помещали в совместную культуру со специфическими Т-линиями, полученными от мышей СВА и СВА/Н.

Как показано на Рис. 31, АГ-презентирующие клетки (АПК) мышей СВА индуцировали пролиферативную активность Т-линий мышей СВА и СВА/Н с одинаковой эффективностью. Напротив, в присутствии АПК мышей СВА/Н не наблюдалось пролиферации ни одной из Т-линий.

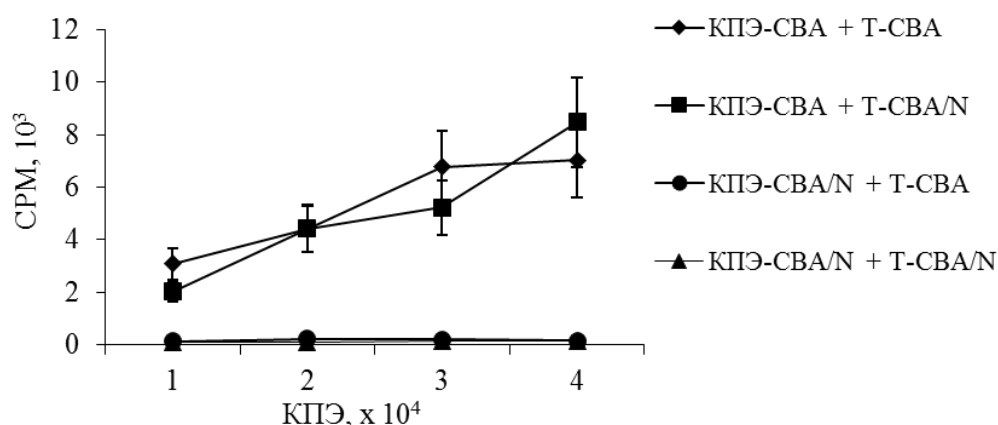


Рис. 31. Оценка пролиферации специфических Т-линий СВА и СВА/Н в ответ на презентацию МАГ КПЭ мышей СВА и СВА/Н по включению [3 H]-тимидина.

3.19. У мышей СВА/Н большую часть ВСГ поглощают нейтрофилы

Поскольку мы не обнаружили пролиферации Т-клеток в ответ на презентацию АГ ВСГ клетками мышей СВА/Н, мы еще раз оценили жизнеспособность выделяемых клеток и субпопуляционный состав. Известно, что одними из наиболее короткоживущих клеток в организме являются нейтрофилы. Они крайне чувствительны к различным манипуляциям и не являются профессиональными АПК. Мы предположили, что большая часть выделяемых АПК мышей СВА/Н могут быть нейтрофилами. Мы оценили соотношение популяций выделяемых клеток у мышей СВА и СВА/Н после введения ВСГ в динамике. Оказалось, что через 1,5-2 часа после введения бактерий, т.е. в срок выделения АПК для опытов по презентации, нейтрофилы составляют 70% от всех КПЭ у мышей СВА/Н, тогда как у мышей СВА — менее 20% (Рис. 32А).

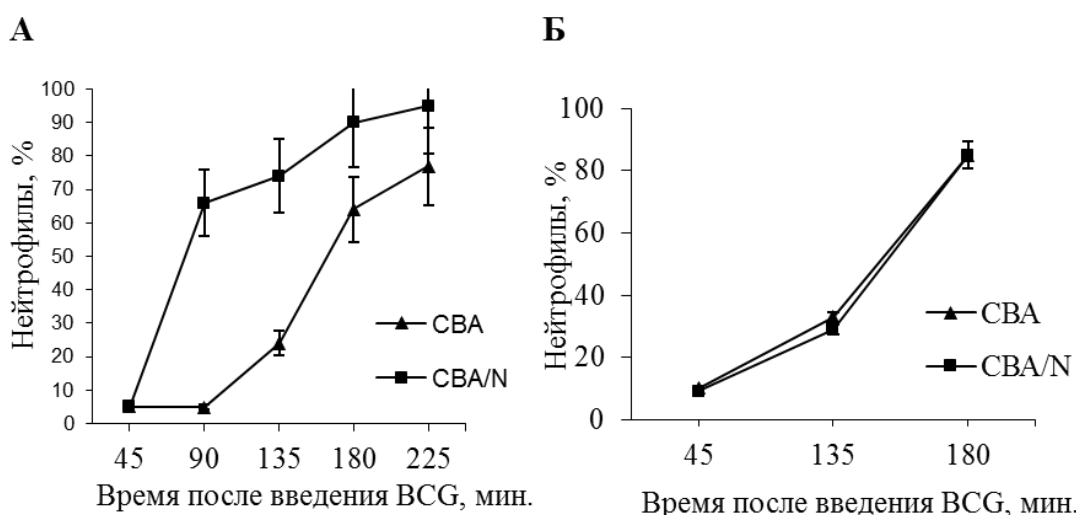


Рис. 32. А – Оценка числа нейтрофилов в перитонеальной полости мышей СВА и СВА/Н в различные сроки после введения BCG, 10^8 КОЕ/мышь. Б – Оценка числа нейтрофилов в перитонеальной полости мышей СВА и СВА/Н в ответ на введение бактерий BCG после переноса КПЭ СВА, обогащённого В-клетками.

Чтобы понять, влияют ли КПЭ на миграцию нейтрофилов, мы перенесли эти клетки от наивных мышей СВА в перитонеальную полость мышей СВА/Н за 15 часов до введения BCG. Поскольку в перитонеальной полости животных в норме большую часть клеток составляют В-клетки (~60%), макрофаги (~18%) и Т-клетки (~17%), мы взяли фракцию клеток, не прилипающих к пластику, обогатив их таким образом В-клетками (~75% CD19⁺, <4% F4/80⁺, ~21% CD3⁺). Затем реципиентам и контрольным мышам СВА/Н ввели BCG и сравнили динамику миграции нейтрофилов. Перенос обогащенной В-клетками фракции КПЭ мышей СВА снизил миграцию нейтрофилов в перитонеальную полость мышей СВА/Н в ответ на BCG (Рис. 32Б). Поскольку прилипание к пластику элиминировало ~80% макрофагов, а функции Т-клеток мышей СВА/Н не изменены по сравнению с СВА, мы полагаем, что именно В-лимфоциты играют ключевую роль в снижении подвижности нейтрофилов в ответ на внешние стимулы.

3.20. Разница в миграции нейтрофилов совпадает с динамикой экспрессии генов хемокинов в КПЭ

Показано, что регуляция миграции нейтрофилов осуществляется как паракринно за счет продукции хемокинов различными стромальными клетками,

так и аутокринно [Furze R.C., Rankin S.M., 2008]. В связи с этим мы оценили экспрессию генов хемоаттрактантов нейтрофилов клетками перитонеальной полости мышей обеих линий до и после введения BCG в динамике. До введения BCG уровень экспрессии генов *Gcsf* и *Cxcl1* в КПЭ мышей СВА был выше, чем у СВА/N (Рис. 33), в отсутствие разницы по экспрессии гена *Cxcl2* (Рис. 33). После введения BCG в клетках перитонеальной полости наблюдалось быстрое изменение экспрессии исследуемых генов, что соответствовало динамике притока нейтрофилов у мышей СВА и СВА/N. Экспрессия генов *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Gcsf*, а также гена рецептора к СХС хемокинам *Cxcr1*, одновременно возрастала через 45 минут после введения BCG у мышей СВА/N. При этом у мышей СВА увеличение экспрессии наблюдалось только для гена *Cxcl2*, а уровень экспрессии *Gcsf* и *Cxcr1* резко падал в ответ на введение BCG. Через 3 ч уровень экспрессии всех исследуемых генов выравнивался (Рис. 33), что полностью соотносится с динамикой миграции нейтрофилов (Рис. 32А). Таким образом, одновременное повышение экспрессии генов трех хемокинов и рецептора к ним, как у мышей СВА/N, приводит к быстрой мобилизации и притоку нейтрофилов в место введения инфекции. Эти факторы взаимосвязаны и, видимо, прямо или опосредованно регулируются В-лимфоцитами [Wengner A.M., et al., 2008].

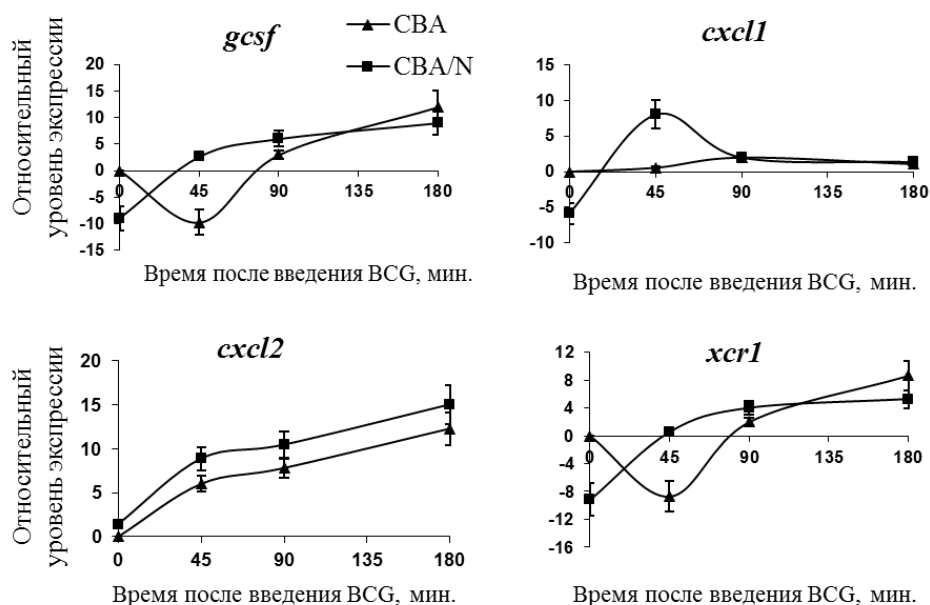


Рис. 33. Экспрессия генов факторов, участвующих в привлечении нейтрофилов, клетками перитонеального экссудата (КПЭ) мышей линий СВА и СВА/N.

3.21. Удаление нейтрофилов *in vivo* восстанавливает эффективность вакцинации BCG у мышей CBA/N-xid

В связи с обнаруженной разницей в динамике притока нейтрофилов в ответ на введение BCG, мы оценили, какие именно клетки перитонеальной полости преимущественно фагоцитируют бактерии BCG через 2 часа после инъекции. Действительно, большая часть бактерий была ассоциирована с моноцитами у мышей дикого типа CBA (Рис. 34А), но с нейтрофилами у мышей CBA/N (Рис. 34Б). Таким образом, бактерии экранированы от профессиональных АПК, макрофагов, у мутантных животных CBA/N.

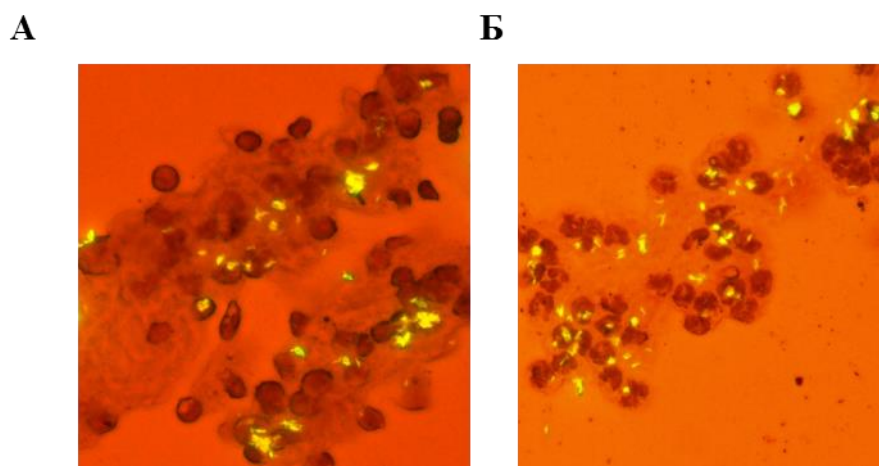


Рис. 34. Оценка колокализации микобактерий BCG и КПЭ мышей CBA (А) и CBA/N (Б). В перитонеальную полость мышей CBA и CBA/N вводили бактерии BCG (10^8 КОЕ/мышь), затем через 2 ч получали КПЭ. Окрашивание микобактерий проводили аурамином (желтый) с последующей окраской КПЭ гематоксилином.

Мы предположили, что похожий эффект может наступать и при вакцинации исследуемых животных. Для проверки этой гипотезы мы удалили нейтрофилы введением мАТ α -Ly6G/Ly6C (RB6-8C5) в перитонеальную полость мышей CBA/N перед вакцинацией. Через 15 часов после введения мАТ содержание нейтрофилов в крови упало на 99% (Рис. 35А). В этот момент мышей вакцинировали BCG подкожно в дозе 10^7 КОЕ/мышь. Затем через 5 недель животных заражали внутривенно вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

Мы показали, что однократного введения элиминирующих нейтрофилы мАТ достаточно для восстановления эффекта вакцинации у мышей CBA/N-xid. Как

показано на Рис. 35 (В, Г), у вакцинированных мышей СВА/Н без нейтрофилов на порядок снижалось количество бактерий в легких и селезенке по сравнению с контрольными животными. Кроме того, количество IFN- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов CD4⁺ в легких оказалось почти в 3 раза выше у мышей СВА/Н с удаленными нейтрофилами, по сравнению с контрольными животными (данные не приведены). Эти данные являются прямым свидетельством того, что у мышей с дефицитом В-лимфоцитов, измененная миграция нейтрофилов является причиной нарушения эффекта вакцинации BCG для последующего заражения ТБ.

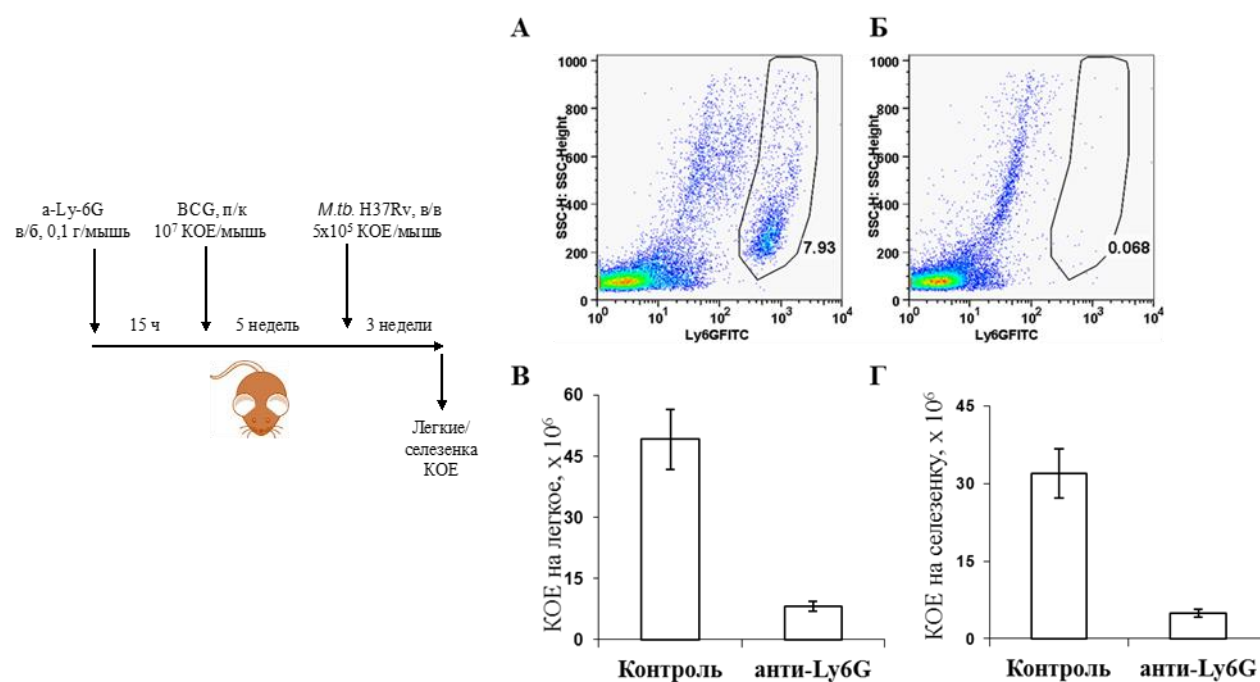


Рис. 35. А, Б – контроль удаления нейтрофилов после введения МАТ. Цитометрический анализ клеток периферической крови. В, Г – количество микобактерий в легких и селезенке мышей СВА/Н через 3 после заражения *M. tuberculosis*.

В заключение отметим, что традиционно считающиеся второстепенными факторами иммунитета при противотуберкулезном ответе В-лимфоциты и нейтрофилы, на самом деле вносят большой вклад в иммунный ответ на микобактерии. В модели вакцинации BCG и заражения ТБ нами получены свидетельства патогенной роли нейтрофилов. Очень вероятно, что быстрая миграция к первичным очагам инфекции и фагоцитоз микобактерий приводит к тому, что нейтрофилы, плохо убивающие микобактерии, экранируют их от

макрофагов, способных эффективно элиминировать патоген, а затем активировать адаптивный иммунный ответ. Помимо этого, в хронической стадии развития инфекции нейтрофилы сами провоцируют излишнее воспаление и способствуют деструкции окружающей ткани легкого. Таким образом, нейтрофилы играют роль «Троянского коня» в иммунном ответе на микобактерии. В связи с этим применяемую для лечения других заболеваний направленную на нейтрофилы препараты вероятно стоит рассматривать для перепрофилирования и разработки новых типов вспомогательной терапии для ТБ.

Одними из клеток, участвующих в торможении миграции нейтрофилов, являются В-лимфоциты. Длительное сохранение в легочной ткани резистентных животных В-фолликулов, включающих специфические к антигенам микобактерий В-лимфоциты, секретирующие преимущественно иммуноглобулины IgA, сопровождается меньшим уровнем диффузного воспаления (туберкулезной пневмонии) и образования некротических очагов. Помимо того, секретируемый В-клетками провоспалительный цитокин IL-6 также необходим для своевременной активации Т-клеточного звена противомикобактериальной защиты. Таким образом, при ТБ сохранение В-фолликулов в легком можно рассматривать как индикатор более эффективного иммунного ответа, а удаление умирающих и зараженных нейтрофилов должно способствовать защите окружающих тканей и снижению воспаления.

4. Выводы

1. Установлено, что удаление нейтрофилов в первые дни после заражения вирулентными микобактериями *M. tuberculosis* приводит к увеличению числа IFN- γ -продуцирующих клеток в селезенке, уменьшению нейтрофильного воспаления и степени поражения легочной ткани, снижению бактериальной нагрузки и увеличению продолжительности жизни чувствительных к ТБ мышей I/St, но не устойчивых мышей В6. Это свидетельствует о патогенной роли нейтрофилов при ТБ у чувствительных животных.

2. Линия мышей B100, несущая β -цепь класса II комплекса H2 от родительской линии I/St, проявляет большую резистентность к инфекции, вызванной *M. avium*, чем конгенная линия B139, что является зеркальным фенотипом по отношению к заражению ТБ. Показано, что усиленный приток нейтрофилов у мышей B100 ассоциирован с экспрессией генов хемоаттрактантов *Cxcl1*, *Cxcl2* и *Il17*, но не ассоциирован с чувствительностью. Эти данные свидетельствуют о менее выраженном патогенном эффекте ранней миграции нейтрофилов при заражении менее вирулентными микобактериями.

3. При специфическом и неспецифическом воспалении нейтрофилы секретируют в больших количествах свободный тимидин, что может негативно сказываться на репликации ДНК соседствующих клеток. Полученные данные также должны учитываться при постановке пролиферативных тестов *in vitro* с участием нейтрофилов и исключить метод оценки пролиферации клеток по включению радиоактивно-меченного [^3H]-тимидина.

4. При заражении *M. tuberculosis* В-лимфоциты мигрируют в легкие и размножаются *in situ*, поддерживая образующиеся В-фолликулы. По мере прогрессирования инфекции В-фолликулы рассасываются у чувствительных к ТБ мышей, но сохраняются длительное время у резистентных мышей. Стабильность фолликулов сопровождается сниженной экспрессией в легких генов для воспалительных цитокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-11, IL-17 и TNF- α . При заражении мышей менее вирулентными микобактериями *M. avium* большее количество В-фолликулов ассоциировано с чувствительным фенотипом, за проявление которого отвечает аллель s гена *slc11a1*.

5. Легочные В-лимфоциты при ТБ презентируют мАГ Т-клеткам; секретируют про-воспалительные цитокины IL-6 и IL-11, TNF- α , но не IFN- γ ; продуцируют антитела классов IgA, IgG и IgM, но не IgE, при этом большая часть легочных В-клеток чувствительных к ТБ мышей производят антитела, не обладающие специфичностью к микобактериям. По анализу репертуаров BCR, легочные В-лимфоциты резистентных мышей B6 образуют крупные, специфичные к мАГ кластеры клонотипа IgA, тогда как В-клетки

чувствительной линии мышей I/St – меньшие по размерам и количеству кластеры клонотипов IgM и IgG. Это свидетельствует об отставании иммунного ответа у чувствительных к инфекции животных.

6. Дефицит продукции TNF- α В-клетками приводит к уменьшению образования В-фолликулов в легких, но не влияет на чувствительность мышей к *M. tuberculosis* и *M. avium*. В то же время отсутствие продукции В-клетками IL-6 приводит к повышению чувствительности к туберкулезной инфекции, снижению общего уровня IL-6 в легких в первые недели после инфицирования и нарушению Т-клеточного ответа – уменьшения числа специфических Т-лимфоцитов CD4⁺IFN- γ ⁺ и CD4⁺IL-17⁺, а также фолликулярных Т-лимфоцитов TfhCD4⁺CXCR5⁺.

7. Удаление В-лимфоцитов в хронической стадии ТБ у мышей резистентной линии В6 приводит к увеличению числа микобактерий в органах, развитию нейтрофил-ассоциированного воспаления, более выраженной кахексии и сокращению срока жизни. Это свидетельствует о протективной роли В-клеток и легочных В-фолликулов при ТБ.

8. Дефицит В-лимфоцитов у мышей CBA/N-xid, не отвечающих на вакцинацию BCG против ТБ, приводит к более быстрой миграции нейтрофилов в место введения вакцины BCG, показывая способность В-клеток тормозить миграцию нейтрофилов. Восстановление популяции В-клеток или удаление нейтрофилов за сутки до введения BCG мышам CBA/N-xid приводит к достоверному повышению эффективности вакцинации.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Научные статьи:

1. Logunova N., Kapina M., Dyatlov A., Kondratieva T., Rubakova E., Majorov K., Kondratieva E., **Linge I.**, Apt A. Polygenic TB control and the sequence of innate/adaptive immune responses to infection: MHC-II alleles determine the size of the S100A8/9-producing neutrophil population. *Immunology*, 2024, 173(2): 381-393. doi: 10.1111/imm.13836

2. Tsareva A., Shelyakin P.V., Shagina I.A., Myshkin M.Y., Merzlyak E.M., Kriukova V.V., Apt A.S., **Linge I.A.**, Chudakov D.M., Britanova O.V. Aberrant adaptive immune response underlies genetic susceptibility to tuberculosis. *Front. Immunol.* 2024, 15:1380971. doi: 10.3389/fimmu.2024.1380971
3. **Линге И.А.**, Капина М.А., Царева А.К., Кондратьева Е.В., Апт А.С., Логунова Н.Н. Дефицит ИЛ-6 увеличивает восприимчивость к туберкулезной инфекции конгенных по МНС-II линий мышей. *Иммунология*, 2024, 45 (2): 171–182. doi: <https://doi.org/10.33029/1816-2134-2024-45-2-171-182>
4. **Linge I.**, Kondratieva T., Apt A. B-cell follicles in tuberculous lung: Active defenders or modest bystanders? *Immunology*. 2023, 169(4): 515-518.
5. **Linge I.**, Kondratieva E., Apt A. Prolonged B-lymphocyte-mediated immune and inflammatory responses to tuberculosis infection in the lungs of TB-resistant mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24 (2): 1140.
6. Kondratieva E., Majorov K., Grigorov A., Skvortsova Y., Kondratieva T., Rubakova E., **Linge I.**, Azhikina T., Apt A. An in vivo model of separate M. Tuberculosis phagocytosis by neutrophils and macrophages: gene expression profiles in the parasite and disease development in the mouse host. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(6): 2961.
7. **Linge I.**, Tsareva A., Kondratieva E., Dyatlov A., Hidalgo J., Zvartsev R. and Apt A. Pleiotropic effect of IL-6 produced by B-lymphocytes during early phases of adaptive immune responses against TB infection. *Front. Immunol.* 2022, 13: 750068.
8. **Линге И.А.**, Апт А.С. Нейтрофилы: неоднозначная роль в патогенезе туберкулеза. *Инфекция и иммунитет*. 2021, 11 (5): 809-819.
9. Никоненко Б.В., Ажикина Т.Л., Григоров А.С., **Линге И.А.**, Логунова Н.Н., Каюкова С.И. Новый аттенуированный штамм *Mycobacterium tuberculosis* BN. Характеристика, вакцинные свойства. *Туберкулез и болезни легких*. 2021, 99 (10): 60-65.
10. Kondratieva T., Shleeveva M., Kapina M., Rubakova E., **Linge I.**, Dyatlov A., Kondratieva E., Kaprelyants A., Apt A. Prolonged infection triggered by dormant

- Mycobacterium tuberculosis: Immune and inflammatory responses in lungs of genetically susceptible and resistant mice. PLoS One. 2020, 15 (9): e0239668.
11. **Linge I.**, Petrova E, Dyatlov A, Kondratieva T, Logunova N, Majorov K, Kondratieva E, Apt A. Reciprocal control of Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis infections by the alleles of the classic Class II H2-A β gene in mice. Infect Genet Evol. 2019, 74: 103933.
 12. Dyatlov A.V., Apt A.S., **Linge I.A.** B lymphocytes in anti-mycobacterial immune responses: Pathogenesis or protection? Tuberculosis (Edinb). 2019, 114: 1-8.
 13. Kondratieva T.K., Kapina M.A., Rubakova E.I., Kondratieva E.V., Nikonenko B.V., Majorov K.B., Dyatlov A.V., **Linge I.A.**, Apt A.S. A new model for chronic and reactivation tuberculosis: Infection with genetically attenuated Mycobacterium tuberculosis in mice with polar susceptibility. Tuberculosis (Edinb). 2018, 113: 130 - 138.
 14. **Linge I.**, Dyatlov A., Kondratieva E., Avdienko V., Apt A., Kondratieva T. B-lymphocytes forming follicle-like structures in the lung tissue of tuberculosis-infected mice: Dynamics, phenotypes and functional activity. Tuberculosis (Edinb). 2017, 102: 16-23.
 15. **Линге И. А.**, А. В. Дятлов, Е. В. Кондратьева, А. С. Апт, Т. К. Кондратьева. «При экспериментальной инфекции, вызванной Mycobacterium avium, образование скоплений В-лимфоцитов в легочной ткани является фактором патогенеза». Туберк. Бол. Лег. 2016, 94: 51-56.
 16. **Линге И.А.**, Е.В. Кондратьева, Т.К. Кондратьева, В.А. Макаров, В.И. Польшаков, О.Ю. Савельев, А.С. Апт. Тимидин – «супрессорный фактор нейтрофилов»: краткая история долгого заблуждения. Биохимия. 2016, 81 (11): 1530 – 1539.
 17. Yermeev V., **Linge I.**, Kondratieva T., Apt A. Neutrophils exacerbate tuberculosis infection in genetically susceptible mice. Tuberculosis (Edinb). 2015, 95 (4): 447-451.
 18. Кондратьева Т.К., **Линге И. А.**, Кондратьева Е. В., Дятлов А. В., Друцкая М. С., Зварцев Р. В, Недоспасов С. А., Апт А. С. Образование компактных скоплений

В-лимфоцитов в легочной ткани при микобактериальных инфекциях у мышей зависит от продукции этими клетками TNF и не является фактором иммунологической защиты хозяина. Биохимия. 2014, 79 (12): 1657 – 1663.

19. Kondratieva T.K., Rubakova E.I., **Linge I.A.**, Evstifeev V.V., Majorov K., Apt A.S. B cell delay neutrophil migration toward the site of stimulus: tardiness critical for effective Bacillus Calmette-Guerin vaccination against tuberculosis infection in mice. The Journal of immunology. 2010, 184 (3): 1227-1234.

20. **Линге И.А.**, Рубакова Э.И., Апт А.С., Кондратьева Т.К. Исследование роли В-клеток в формировании противотуберкулезного иммунитета. Проблемы туберкулеза и болезни легких (Москва). 2009, 4: 39-41.

Работы, опубликованные в сборниках материалов конференций:

21. **Линге И. А.**, Коротеева В.Ю., Кондратьева Е. В., Апт А. С. Исследование легочных В-фолликулов при туберкулезе у мышей с генетически разной чувствительностью к инфекции // Материалы XVII Всероссийского научного форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», 2023, с. 84.

22. **Linge I.**, Kondratieva E., Apt A. Effect of in vivo B-cell depletion during chronic stage of TB-infection in genetically resistant C57BL/6 mice // Сборник тезисов EMBO Workshop on Tuberculosis 2022: From innovation to intervention, 2022, с. 184.

23. Логунова Н.Н., **Линге И.А.**, Капина М.А., Рубакова Э.И., Кондратьева Т.К., Коротецкая М.В., Кондратьева Е.В., Апт А.С. Полиморфизм МНС и регуляция микобактериальных инфекций // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. 2020. № S2. С. 55-56.

24. Дятлов А.В., Царева А.К., **Линге И.А.** Исследование роли интерлейкина-6, производимого В-лимфоцитами, в иммунном ответе при экспериментальной туберкулезной инфекции // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. 2019. № S1. С. 16-17.

25. **Linge I.A.**, Petrova E.S., Kondratieva E.V., Apt A.S. The influence of the H2 complex on Mycobacterium avium infection in mice // Сборник тезисов докладов конференции «Proceedings of International conference, dedicated to the 110th

- anniversary of St. Petersburg Pasteur Institute and to the 95th anniversary of naming the Institute after Pasteur Molecular bases of epidemiology, diagnostics, prevention and treatment of infectious diseases», Infect Immun (Russian), спецвыпуск, 2018, Т. 8, N4, с. 573.
26. **Linge I.A.**, Petrova E.S., Majorov K.B., Kondratieva E.V., Kondratieva T.K., Apt A.S. Mycobacterium avium-triggered disease: host genetics and immunity in mouse models // Сборник тезисов докладов конференции «Proceedings of International conference, dedicated to the 110th anniversary of St. Petersburg Pasteur Institute and to the 95th anniversary of naming the Institute after Pasteur Molecular bases of epidemiology, diagnostics, prevention and treatment of infectious diseases», Infect Immun (Russian), спецвыпуск, 2018, Т. 8, N4, с. 573.
27. **Linge I.**, Kondratieva E., Avdienko V., Dyatloff A., Apt A., Kondratieva T. B-lymphocytes forming follicle-like structures in the lung tissue of TB-infected mice: phenotypic and functional features // Сборник тезисов EMBO conference: Tuberculosis 2016: Interdisciplinary research on tuberculosis and pathogenic mycobacteria, 2016, с. 290.
28. Dyatlov A.V., **Linge I.A.**, Apt A.S. Influence of B cells on tuberculosis pathology // Сборник тезисов “12th Spring school on Immunology”, 2016, с.82.
29. Дятлов А.В., Кондратьева Е.В., Кондратьева Т.К., **Линге И.А.** Исследование роли В-лимфоцитов в поляризации лёгочных макрофагов при экспериментальной туберкулёзной инфекции // Сборник тезисов конференции «Новые технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулёза взрослых и детей», 2014, с.63-66.
30. **Линге И.А.**, Дятлов А.В., Апт А.С. Образование В-фолликулов в легких мышей, зараженных Mycobacterium avium, ассоциировано с экспрессией чувствительного аллеля гена slc11a1 // Сборник тезисов докладов VI международной школы молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и системная биология», 2014, с. 29.
31. Kondratieva T., Rubakova E., **Linge I.**, Majorov K., Apt A. Xid-mutation in CBA/N mice leads to alterations in neutrophil/macrophage migration and abrogates protectivity of BCG vaccination // Сборник тезисов докладов международного

симпозиума «Emerging trends in tuberculosis research: biomarkers, drugs & vaccines», 2008, с. 133.

32. **Линге И.А.**, Петровская С. Н., Рубакова Э. И., Апт А.С., Кондратьева Т. К., 2007. Оценка влияния мутации *h1d* мышей СВА/N на фагоцитирующую способность макрофагов». «Новейшие технологии в эпидемиологии, диагностике, профилактике и лечении больных туберкулезом и других заболеваний легких // Сборник материалов научно-практической конференции молодых ученых, посвященный Всемирному дню борьбы с туберкулезом, 2007, с. 64-66.
33. **Батурина И.А.**, Рубакова Э. И., Апт А.С., Кондратьева Т. К., 2007. Почему мутация В-клеточной тирозинкиназы *Btk* отменяет Т-зависимый эффект вакцины BCG: исследование механизмов // Тезисы доклада на конференции «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2007», Медицинская иммунология, спецвыпуск, Т. 9, N2-3, с. 118-119.
34. **Батурина И.А.**, Рубакова Э.И., Апт А.С., Кондратьева Т.К. 2006. «Восстановление способности к вакцинации BCG у мышей СВА/N *h1d*» // Сборник тезисов докладов конференции «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, 2006, с. 272-273.
35. **Батурина И.А.**, Рубакова Э.И., Петровская С.Н., Апт А.С., Кондратьева Т.К. Роль лимфоцитов В-1 при вакцинации BCG мышей СВА/N-XID // Тезисы доклада на конференции «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2006», Медицинская иммунология, спецвыпуск, Т. 8, № 2-3, с. 119-120.

Глава в монографии:

36. **Линге И.А.**, Дятлов А.В., Кондратьева Е.В., Кондратьева Т.К., Апт А.С. "В-лимфоциты в иммунном ответе на микобактерии", глава в монографии "Фундаментальные исследования во фтизиатрии", под редакцией Эргешева А.Э. - М.: Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза. ISBN 978-5-9907563-9-7.