

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента Гривенникова Игоря Анатольевича  
на диссертацию  
Горшковой Екатерины Александровны  
«Особенности иммунной системы голого землекопа (*Heterocephalus  
glaber*)», представленную на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук по специальности 3.2.7. «Иммунология»**

**Актуальность избранной темы.** Голый землекоп (*Heterocephalus glaber*) — небольшой грызун размерами до 12-15 см и весом 30-50 г из семейства Bathyergidae, обитающий в настоящее время в Восточной Африке. Эти зверьки живут под землей семьями по 50-200 особей с чёткой социальной иерархией. Хотя эти грызуны были описаны еще в середине 19-го века, до последнего времени они не привлекали внимания ученых. В результате адаптации к изолированному подземному образу жизни у этих животных возник ряд уникальных физиологических особенностей, благодаря которым этот вид в настоящее время завоевал популярность у исследователей механизмов старения и биологии опухолей. С точки зрения молекулярной эволюции иммунная система является наиболее быстро адаптирующейся системой организма. Рассматривая хорошо известные в настоящее время особенности физиологии голых землекопов — высокую продолжительность жизни (в 5-10 раз превышающую таковую у других грызунов), низкие температуру тела и скорость метаболизма, пониженную болевую чувствительность, устойчивость к образованию опухолей — можно предположить, что в каждый из этих признаков привносит свой вклад иммунная система. Несмотря на это, иммунная система голого землекопа до сих пор недостаточно изучена. Следует отметить, что на момент начала работы диссертанта знания о специфических свойствах иммунной системы голых землекопов были либо отрывочны, либо вообще отсутствовали. К примеру, не было даже проведено анатомическое описание лимфоидных органов голых землекопов.

Методические подходы, используемые в работах с иммунными клетками голых землекопов, были неоднородны и недостаточно детально описаны. Так, только в конце 2019 года появилось несколько работ, демонстрирующих количественное преобладание миелоидных клеток в иммунной системе голого землекопа. При этом оказалось, что в организме *H.glaber* отсутствует одна из субпопуляций лимфоцитов (NK), отвечающая за элиминацию инфицированных вирусами или злокачественных клеток. Это обстоятельство, вступающее в кажущееся противоречие с устойчивостью данного вида к развитию злокачественных опухолей, только повысило интерес к продолжению исследования иммунной системы этих животных. Очевидно, что любая новая информация относительно молекулярных и клеточных механизмов устойчивости к опухолеобразованию представляет колоссальный интерес в свете борьбы со злокачественными новообразованиями у человека. Исходя из вышеизложенного, диссертационная работа Горшковой Е.А., посвященная описанию, характеристике морфологии и клеточного состава лимфоидных органов голого землекопа, а также разработке моделей для углубленного исследования адаптации иммунной системы голого землекопа на клеточном и молекулярном уровнях **является безусловно актуальной и востребованной в настоящее время, а степень обоснованности положений, выносимых на защиту, не вызывает сомнений.**

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 125 источников. Работа изложена на 112 страницах, содержит 31 рисунок и 8 таблиц. Кроме того диссертация включает в себя приложение и благодарности.

**Глава «Введение»** посвящена описанию состояния проблемы, обоснованию актуальности диссертационного исследования, постановке цели и задач работы. В этой главе также описаны научная новизна, теоретическая и

практическая значимость работы и сформулированы положения, выносимые на защиту, приведен список опубликованных по теме диссертации работ.

**Глава «Обзор литературы»** состоит из трех основных подразделов. Это положение на филогенетическом дереве и экология вида *Heterocephalus glaber* в сравнении с другими грызунами; физиологическая адаптация голых землекопов к подземному образу жизни, включая его адаптацию к кислородному голоданию, терморегуляцию, длительной продолжительности жизни и замедленному старению, устойчивость к новообразованиям. В третьем подразделе автор достаточно подробно описывает известные факты об особенностях иммунной системы этого грызуна. Рассмотрено строение и функционирование кроветворных и лимфоидных органов. Отмечена крайняя чувствительность голого землекопа к вирусным инфекциям. В то же время отмечена эффективность работы антибактериальных механизмов врожденного иммунитета, что косвенно подтверждается способностью голого землекопа — контролировать микрофлору и производством высокоактивных противомикробных пептидов. Другим важным наблюдением оказалось отсутствие популяции МК-клеток или клеток, обладающих похожим на МК-клетки мыши транскрипционным профилем. Известно, что в норме МК-клетки отвечают за элиминацию инфицированных вирусами или трансформированных клеток, поэтому отсутствие данной популяции не согласуется с устойчивостью *H. glaber* к развитию новообразований, но может объяснять чувствительность к вирусным инфекциям. В целом обзор написан достаточно подробно, с привлечением источников литературы последних лет и, на мой взгляд, хорошо иллюстрирован. Чувствуется, что автор хорошо знаком с проблематикой, которой посвящена диссертационная работа.

**В главе «Материалы и методы»** автор подробно описывает схемы и протоколы проведенных экспериментов. Для решения поставленных задач был выбран адекватный набор современных методов иммунологии, молекулярной и клеточной биологии: получение и культивирование клеток иммунной системы мыши и голого землекопа, проточная цитофлуориметрия,

приготовление препаратов клеток и тканей и иммунофлуоресцентная детекция антигенов, ПЦР в реальном времени, транскриптомный анализ, сопряженный с биоинформатическим анализом полученных данных, мультиплексный анализ продукции цитокинов и хемокинов. Кроме того, автором описаны методические подходы к анализу клеточного метаболизма (дыхания, состояния митохондрий, продукции окиси азота). В целом материал, изложенный в этой главе, свидетельствует о методической подготовленности автора к решению задач настоящей работы.

**В главе «Результаты»** автор последовательно излагает полученные результаты. К безусловной заслуге автора следует отнести выбор в качестве «контрольного» сравнительного объекта мышей, как наиболее изученных в настоящее время грызунов. Кроме того, для оценки морфологии и клеточного состава гемопоэтических и иммунных органов были использованы тимус, костный мозг, селезенку, а также клетки собственной пластинки кишечника голого землекопа и мыши. На первом этапе работы Е.А. Горшковой был проведен трудоемкий, но необходимый подбор антител, способных узнавать гемопоэтические и иммунные клетки голого землекопа. В результате такого скрининга из 70 препаратов были выбраны шесть антител, работающих в проточной цитометрии, и три - в иммуногистохимии, на основе которых и была составлена панель для анализа структуры и клеточного состава иммунных органов голого землекопа в настоящей работе. С помощью выбранных антител, автором проведена характеристика первичных и вторичных лимфоидных органов, а также кишечника и лимфоидной ткани, ассоциированной с ним. Было установлено, что голый землекоп обладает, в целом, характерным для грызунов планом расположения и строения лимфоидных органов. С другой стороны, были отмечены некоторые особенности по сравнению с мышью, представляющие интерес в контексте эволюционных приспособлений голого землекопа, связанные с норным образом жизни. Существенное внимание автором было уделено миелоидным клеткам голого землекопа в моделях *in vitro*. Было продемонстрировано, что

различные по происхождению популяции иммунных клеток голого землекопа могут иметь неодинаковую чувствительность к температуре. Так как макрофаги являются важнейшим элементом поддержания защиты и гомеостаза тканей, существенное внимание автором было уделено свойствам этих клеток по сравнению с мышью. При воспалении макрофаги непосредственно захватывают и уничтожают патогены, а также активно выделяют цитокины, помогая регулировать иммунный ответ. Поэтому Е.А. Горшкова провела ряд изящных экспериментов с макрофагами голого землекопа в про- и противовоспалительных условиях. Опираясь на полученные результаты, было предположено, что при выбранных условиях поляризация макрофагов голого землекопа как в сторону воспалительного, так и противовоспалительного фенотипов, проходит отличным от мыши образом. Были также обнаружены особенности клеточного метаболизма классически- и альтернативно активированных макрофагов голого землекопа. В целом этот раздел производит приятное впечатление последовательным изложением материала и хорошо иллюстрирован.

**Основные полученные результаты и их оригинальность.** Автором впервые было показано, что лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником, является самым крупным вторичным лимфоидным органом голого землекопа за счёт более высокого абсолютного количества лимфоцитов собственной пластинки кишечника по сравнению с мышами. Обнаружено, что в костном мозге и селезёнке голого землекопа наблюдается меньшее абсолютное количество клеток, однако увеличено процентное содержание CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> субпопуляций по сравнению с мышью, что согласуется с преобладанием миелопоэза у этого животного. Миелоидные клетки-предшественники голого землекопа образуют колонии и приобретают зрелый фенотип в культуре макрофагов костного мозга уже при температуре 32 °С, но не 37 °С, что может отражать адаптацию его иммунной системы к гетеротермии. Впервые показано, что макрофаги костного мозга голого землекопа, активированные липополисахаридом и интерфероном-гамма,

увеличивают экспрессию провоспалительных генов, продукцию цитокинов и аэробный гликолиз, но в то же время способны лучше поддерживать функциональную активность митохондрий по сравнению с макрофагами мышцы. Автором было продемонстрировано, что M1 макрофаги голого землекопа практически не продуцируют оксид азота, что может отражать адаптацию иммунной системы к гипоксии в тканях этого грызуна.

**В главе «Заключение»** автор подводит итоги проведенной работы и отмечает перспективность разработанных подходов для дальнейших исследований. Основной перспективой дальнейших исследований иммунной системы голого землекопа станет расшифровка механизмов, участвующих в поддержании высокой продолжительности жизни и устойчивости к опухолеобразованию, которые в будущем смогут предложить новые стратегии для биомедицины.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Теоретическая и фундаментальная значимость настоящей работы заключается в получении новых и приоритетных данных относительно строения и функционирования иммунной системы *H. glaber*. Следует признать, что голый землекоп — новая и перспективная модель в иммунологии. Практическая значимость диссертационной работы заключается в получении новых данных относительно устройства и свойств иммунной системы этого грызуна в свете его устойчивости к образованию злокачественных опухолей, что может в перспективе помочь ученым бороться с канцерогенезом у человека. Полученные автором результаты могут быть использованы при чтении лекций по иммунологии на Биологическом факультете МГУ им. М. В. Ломоносова и ряде медицинских университетов.

**Достоверность результатов работы** не вызывает сомнений, поскольку они базируются на достаточном объеме экспериментального материала. Достоверность результатов подтверждается также их воспроизводимостью и использованием современных методов исследования и статистической

обработки: на всех этапах применялись современные способы получения репрезентативных данных.

**Выводы диссертации обоснованы и логично вытекают из полученных результатов и их обсуждения. Принципиальных замечаний по диссертационной работе не имеется.** Автору следовало бы более внимательно оформить список литературы: в ряде ссылок отсутствуют страницы статей, а даются только номера, в ряде случаев страницы статей даются в неполном варианте. **Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.**

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus или РИНЦ. Результаты работы были представлены на 8 симпозиумах, конференциях и школах, как российских, так и международных.

**Заключение.** Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 3.2.7. «Иммунология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Горшкова Екатерина Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. «Иммунология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник Лаборатории молекулярной  
нейрогенетики и врожденного иммунитета

Национального исследовательского центра

«Курчатовский институт»

Гривенников Игорь Анатольевич

123182, г. Москва, пл. ак. Курчатова, д. 2, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт») тел.:8499-1960014, e-mail: [iag.img@yandex.ru](mailto:iag.img@yandex.ru)

Шифр и наименование специальности, по которой защищена диссертация: 1.5.3 – молекулярная биология; 3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология.

Подпись Гривенникова И.А. заверяю,  
Главный Ученый секретарь  
Национального исследовательского центра  
«Курчатовский институт»

К.Е. Борисов

«\_\_\_» мая 2023 г.