

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Государственный научный центр Российской Федерации  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук  
(ГНЦ ИБХ РАН)**

**СТЕНОГРАММА**

заседания Диссертационного совета 24.1.037.01 от 22 января 2025 года

Защита диссертации  
на соискание учёной степени кандидата биологических наук

**Овчинниковой Лейлы Александровны**

*Структурно-функциональный анализ В-клеточного репертуара при рассеянном  
склерозе*

Специальность: 1.5.3. – Молекулярная биология

Москва, 2025 г.

## СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 22 января 2025 года.

Председатель

диссертационного совета

акад., д.х.н. Анатолий Иванович Мирошников

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.ф.-м.н. Владимир Александрович Олейников

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 7.

1.	Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
3.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
4.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
5.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
6.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
7.	Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
8.	Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
9.	Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
10.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
11.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
12.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
13.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
14.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
15.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
16.	Д.б.н.	Рубцов Юрий Петрович	(1.5.3)
17.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
18.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
19.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
20.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
21.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)

**Мирошников А.И., председатель:**

Уважаемые коллеги, мы начинаем очередное заседание диссертационного совета. У нас сегодня одна защита, и я надеюсь, что она пройдет у нас достаточно быстро. Так, и у нас Овчинникова Лейла Александровна, с кандидатской диссертацией “Структурно-функциональный анализ В-клеточного репертуара при рассеянном склерозе”. На соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. Научный руководитель – Ломакин Яков Анатольевич. Работа выполнена в лаборатории биокатализа ИБХ РАН. Официальные оппоненты – Тикунова Нина Викторовна, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, и Филатов Александр Васильевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимии ГНЦ Института иммунологии Федерального медико-биологического агентства России. Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук. Пожалуйста.

**Олейников В.А., учёный секретарь:** Материалы личного дела: Овчинникова Лейла Александровна, Российская Федерация, окончила Медицинский университет имени Пирогова, по специальности “врач-биофизик” 2018 году. С 2017 по 2018 гг. инженер, потом инженер-исследователь, в настоящее время младший научный сотрудник лаборатории биокатализа нашего института – ГНЦ ИБХ РАН. С 2018 по 2022 аспирант ГНЦ ИБХ РАН. Кандидатский экзамен по специальности молекулярная биология сдан с оценкой “отлично”, работа выполнена в нашем институте в лаборатории биокатализа, как уже сказано, Яков Анатольевич Ломакин, старший научный сотрудник лаборатории биокатализа, являлся научным руководителем. Семь статей опубликованы по теме диссертации в рецензируемых научных журналах. Объявления о защите и автореферат размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 20 ноября 2024 года, и все необходимые документы в деле имеются.

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо. Лейла Александровна, вперед.

**Овчинникова Л.А., соискатель:** *(Излагает основные положения диссертационной работы).*

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо! Вопросы? Пожалуйста.

**Бовин Н.В.:** Вы фиксировали ряд аутоантител и нашли, с какими именно белками связываются аутоантитела. Но я не услышал вашей попытки связать структуру и функцию этих белков с течением заболевания. Или это вообще бессмысленно в данном случае?

**Овчинникова Л.А., соискатель:** Спасибо большое за вопрос. В ходе данной работы нами идентифицирована панель аутоантигенов. Исследованные аутоантигены ранее не были ассоциированы с воспалением при рассеянном склерозе. Однако данные аутоантигены были показаны при других аутоиммунных заболеваниях. Мы на данном этапе не связывали функцию данных белков с иммунным ответом на данные белки у пациентов с рассеянным склерозом. Однако, например, известно, что белок периоксин, на который повышен титр сывороточных антител, это белок, встречается в периферической нервной системе, и, возможно, данный белок вместе со спекрином просто повышается вследствие воспаления, когда разрушаются компоненты нервной системы и данные белки становятся доступны для иммунной системы.

**Бовин Н.В. :** То есть получается, наверное, что появление этих аутоантител связано не напрямую с рассеянным склерозом, а с какими-то косвенными факторами, что-то меняется при рассеянном склерозе и образуются эти аутоантитела.

**Овчинникова Л.А., соискатель:** Да, так как данные аутоантитела к данным аутоантигенам, они были идентифицированы в основном у пациентов с активной формой рассеянного склероза. И у этих пациентов уже какое-то время назад было диагностировано данное заболевание, и, соответственно, воспалительный ответ тоже был развит довольно давно. То появление аутоантител к данным аутоантигенам — это, возможно, последствия воспалительного процесса в центральной нервной системе.

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо. Еще вопрос.

**Габибов А.Г.:** Все-таки Вы нашли новые парочку антигенов. Когда я работал, это были MBP, MOG и другие. И что, как Вы думаете, все-таки в общее знание дает появление новых антигенов? Они сейчас действительно находятся. Довольно революционный поток их возникает, и вы в него вписались. Скажите нам, что открытие новых антигенов дает в понимание развития и, может быть, даже лечения этого заболевания? Спасибо.

**Овчинникова Л.А., соискатель:** Спасибо! Как я сказала во введении, классическими антигенами при рассеянном склерозе являются компоненты миелиновой оболочки. И в течение достаточно долгого времени считалось, что основные аутоантитела при рассеянном склерозе — это антитела к MBP, PLP и MOG. Однако со временем появились более чувствительные методы детекции аутоантител и расширены также выборки пациентов, которые были исследованы, и стали опровергать наличие таких аутоантител у пациентов с рассеянным склерозом. И сейчас также наблюдается тенденция к тому, что в сыворотке крови пациентов с рассеянным склерозом находят уже новые аутоантитела. Например, как я сказала, аутоантитела к нейрофасцинам, нейрофиламентам, калиевым каналам и так далее. Таким образом, на мой взгляд, идентификация панели новых аутоантигенов при рассеянном склерозе способна прояснить этиологию данного заболевания, так как этиология данного заболевания до конца неизвестна, как и его патогенез. Изучая иммунный ответ при данном заболевании, мы можем приблизиться к пониманию этиологии данного заболевания, какие компоненты страдают при воспалении при рассеянном склерозе.

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо. Еще вопросы? Пожалуйста.

**Долгих Д.А.:** Скажите, пожалуйста, вот частота мутаций получается у пациентов с рассеянным склерозом, Вы сказали, она выше, чем у контрольных групп людей, да? А какие-нибудь количественные характеристики могут быть? Два раза или сколько? Насколько вот велика эта разница?

**Овчинникова Л.А., соискатель:** Да, спасибо за вопрос. В нашем исследовании получилось, что частота соматических гипермутаций в генах, кодирующих в переменные фрагменты тяжелых цепей иммуноглобулинов, ниже у пациентов с рассеянным склерозом. Получается, тяжелые цепи транзигентных В-регуляторных клеток у пациентов с рассеянным склерозом менее зрелые, так как содержат меньшее количество соматических гипермутаций. Это выражается в процентном содержании данных мутаций по сравнению с исходным гермлайном. То есть мы сравниваем полученные нами последовательности антител с последовательностями антител, которые содержатся в базах данных антител. И таким образом показываем, сколько соматических гипермутаций произошло в гипервариабельных областях данного иммуноглобулина, и как далеко он отошел от своего гермлайна.

**Долгих Д.А.:** А количественные оценки? Или это на качественном уровне только?

**Овчинникова Л.А., соискатель:** Мы оценивали процент таких мутаций, их частоту.

**Долгих Д.А.:** Спасибо.

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо. Еще вопросы? Ну отдохните. Яков Анатольевич, руководитель диссертации.

**Ломакин Я.А., научный руководитель:** Здравствуйте. Я могу охарактеризовать только с положительной стороны Лейлу Александровну. Она пришла к нам достаточно давно, уже больше семи лет, и ещё будучи студенткой сразу проявила себя достаточно работоспособным, инициативным сотрудником. Участвовала, на самом деле, она в очень многих проектах, и те результаты, которые вошли в ее диссертацию, это, на самом деле, где-то всего половина результатов полученных. И что особо хочется подчеркнуть в Лейле Александровне, это ее инициативность, то есть умение как-то корректировать вектор исследований и даже в чем-то создавать, закладывать новые направления для исследований. Желание разбираться в проблемах и предложение способов, как эти проблемы решать. Поэтому, в принципе, на мой взгляд, Лейла Александровна полностью заслуживает звания кандидата биологических наук. Если она останется с нами, будем очень рады продолжать с ней сотрудничество.

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо. Так, пожалуйста, Владимир Александрович.

**Олейников В.А., учёный секретарь:** Так, ну такая вот фактически необходимая часть – это различные заключения.

*(Зачитывает заключение организации, где выполнялась диссертация).* Во-первых, работа выполнялась в нашем институте, как было сказано. У меня в руках заключение, соответственно, в заключении отражается, что лаборатория биокатализа это то место, где выполнялась эта диссертация. Некие биографические данные: диплом о высшем образовании, об окончании аспирантуры. Научный руководитель только что выступил – Ломакин Яков Анатольевич, старший научный сотрудник нашего института. Диссертация была обсуждена на открытом семинаре отдела пептидно-белковых технологий ГНЦ ИБХ РАН 25 сентября 2023 года. И, соответственно, актуальность исследования подчеркивается. Ну, мы уже слышали про рассеянный склероз. Это очень страшное заболевание. В настоящий момент этиология и молекулярные механизмы данного заболевания до конца не ясны, но и решение вот этих проблем, конечно, очень актуально. Личное участие. Все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии под руководством Я.А. Ломакина и руководителя лаборатории А.Г. Габибова. Результаты. Здесь перечислятся 5 пунктов важных результатов, но это фактически то, что мы только что слышали и отражено в выводах настоящей работы. Достоверность сомнений не вызывает. Исследование проведено с помощью самых современных подходов, методов проточной цитометрии, иммуноферментного анализа, широкомасштабного секвенирования, результаты обработаны математической статистикой. Новизна тоже сомнений не вызывает, поскольку полученные данные в работе имеют большое значение для выяснения молекулярных механизмов развития и прогрессирования рассеянного склероза и в будущем могут помочь скорректировать терапию данного заболевания с учетом особенностей его протекания у пациентов. Семь статей в хороших журналах, соответственно, в том числе, естественно, и Q1 есть. Результаты доложены на российских и международных конференциях. Ну и в целом

диссертация Овчинниковой Лейлы Александровны рекомендуется к защите по специальности 1.5.3 “молекулярная биология”. Это заключение принято на открытом семинаре. Присутствовали 23 человека. Единогласное голосование, подписано председателем семинара Александром Григорьевичем Тоневицким, секретарем семинара Алексеем Анатольевичем Белогуровым и, соответственно, зам. директора ИБХ РАН Ямпольский Илья Викторович. Утверждено директором нашего института Александром Габитовичем Габитовым.

*(Зачитывает отзыв ведущей организации).* Далее у меня в руках официальный отзыв ведущей организации – Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта. Ну и тоже, отражается актуальность исследования, подчеркивается, научная новизна, поскольку в работе представлены новые данные об особенностях аутоиммунного ответа при рассеянном склерозе. Соответственно, автором впервые выявлены новые потенциальные аутоантигены. Ну и так далее. Новизна сомнений не вызывает. Структура и содержание работы: 154 страницы, 41 рисунок, 12 таблиц и 221 литературный источник. Раздел «Обзор литературы», соответственно, отражает сегодняшнее состояние. Раздел «Материалы и методы», последовательно описаны основные методы, используемые в данной работе. Результаты обсуждения, там два подраздела, но это то, что мы с вами только что слышали, фактически, вот здесь отражается. Достоверность сомнений не вызывает, опубликовано хороших журналах, пожелания и замечания: принципиальные замечания к работе отсутствуют. В тексте встречаются неизбежные при таком объеме текста опечатки. В работе описывают состояние платформы для поиска антиген-специфичных антител. Верификация данной платформы проводилась на вирусных антигенах. Использование данной платформы для поиска аутоантител при рассеянном склерозе существенно улучшило бы данную работу. Но указанные недостатки не являются существенными, не снижают общего положительного впечатления. И заключение. Диссертационная работа Овчинниковой Лейлы Александровны соответствует критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней. Перечисляются подробно номера положений, постановления и так далее. И сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоение искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 “молекулярная биология”. Составитель отзыва – профессор, доктор биологических наук, Рубцов Петр Михайлович, институт молекулярной биологии имени Энгельгардта и, соответственно, утверждено это заключение ведущей организации директором института имени Энгельгардта, доктором биологических наук, академиком РАН Георгиевой Софьей Георгиевной. Спасибо.

**Мирошников А.И., председатель:** Ну, поскольку замечаний нет, давайте по отзывам на автореферат.

**Олейников В.А., учёный секретарь:** Поступило в совет два отзыва на автореферат. Оба отзыва положительные, но здесь тоже есть некие, так сказать, с критикой замечания.

*(Зачитывает первый отзыв на автореферат).* Результаты, представленные в данной работе, расширяют понимание молекулярных механизмов, приводящих к развитию рассеянного склероза, углубляют существующие знания об антительном ответе при развитии данного заболевания. Семь статей опубликованы. В качестве замечания, не снижающего общего впечатления от работы, отмечу, что рассеянный склероз характеризуется воспалением в центральной нервной системе и для его диагностики в том числе исследует спинномозговую жидкость. Исследование антительного ответа в спинномозговой жидкости пациентов с рассеянным склерозом могло бы дополнить данную работу. Ну, вот это единственное замечание, а далее все говорится о том, что соответствует и заслуживает. Подписано Марковым Д. Д. Это лаборатория молекулярной нейрогенетики и врожденного иммунитета Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”. Да, Марков Дмитрий Дмитриевич. Это первый отзыв.

*(Зачитывает второй отзыв на автореферат).* И второй отзыв тоже полностью положительный, но тоже здесь есть некое уточняющее замечание, которое ни в коей мере не снижает значимость и полноту проведенного исследования. Первое. В работе используется не совсем корректная формулировка. Разработан и оптимизирован метод амплификации сложных ДНК-матриц в каплях эмульсии. С использованием данного метода создана пептидная фаг-дисплейная библиотека, однако с помощью метода амплификации ДНК не могут быть получены пептиды. Второе. В разделе с описанием подбора условий для эМПЦР не приведены количественные показатели для каждой комбинации условий. Например, можно было провести показатели распределения и покрытия, что облегчило бы понимание выбора именно этих условий для читателя. В приведенном ROC-анализе используется несколько комбинаций впервые предлагаемых маркеров. Однако интересно посмотреть их в сравнении с уже существующими маркерами и сравнить показатели чувствительности и специфичности полученных классификаторов. Но в целом можно заключить, что работа соответствует критериям, установленным в положении о присуждении ученых степеней, а сама Овчинникова заслуживает присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. Соответственно, кандидат биологических наук подписал в лаборатории системной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени Ореховича, Вавилов Никита Эдуардович. Ну, все замечания были. Спасибо.

**Мирошников А.И., председатель:** Лейла Александровна, будете отвечать?

**Овчинникова Л.А., соискатель:** Большое спасибо за заданные вопросы. Касательно вопроса по приведению количественных показателей для комбинации условий при постановке эмульсионного ПЦР. Да, действительно, в рамках данной работы мы сравнивали 4 различных условия получения эмульсий. Мы сравнивали 2 состава для эмульгирования на основе минерального масла: масло А с добавлением эмульсификатора Абил и масло Т с добавлением смеси Span/Tween/Triton. Также мы сравнивали 2 метода эмульгирования: при помощи вортиксирования и при помощи магнитной мешалки. Исследованные условия обозначили как Av/Am и Tv/Tm. При проведении эМПЦР в эмульсии полученной при помощи магнитной мешалки и с маслом Т (как видно из электрофореграммы) наблюдается крайне низкий выход целевого продукта. Поэтому библиотеки, полученные в данных условиях мы дальше не анализировали. Покрытие и распределение для библиотек, полученных в оставшихся 3х различных условиях представлены внизу слайда и в диссертации, однако не вошли в автореферат. Из данного рисунка видно, что Несмотря на хорошее качество продукта ПЦР, наблюдаемое после эмульгирования с помощью магнитной мешалки, фактическое распределение прочтений, оцененное с помощью NGS, было менее равномерным по сравнению с эмульгированием, полученным при вихревом перемешивании. Образец эМПЦР, полученный с использованием масла Т и демонстрирующий интенсивную полосу высокомолекулярного побочного продукта, продемонстрировал более узкое распределение прочтений по сравнению с образцом Am. Однако для библиотеки Tv было показано меньшее покрытие последовательностей исходной библиотеки по сравнению с образцом Av. На основании этого, мы и остановились на условиях Av.

Касательно второго вопроса по ROC-анализу. ROC-кривая — график, позволяющий оценить качество бинарной классификации. Количественная интерпретация ROC даёт показатель AUC (площадь под кривой) — площадь, ограниченная ROC-кривой и осью доли ложных положительных классификаций. Чем выше показатель AUC, тем качественнее классификатор, при этом значение 0,5 демонстрирует непригодность выбранного метода классификации. Значения выше 0.8 – хорошая характеристика классификатора. Значения выше 0.9 – превосходная характеристика классификатора. В нашей работе при комбинировании нескольких маркеров мы добились значения 0.818. На сегодняшний день наиболее верифицированный маркер рассеянного склероза – легкая цепь нейрофиламента.

Для данного маркера при исследовании цереброспинальной жидкости ранее были получены значения площади под ROC-кривой порядка 0.9. Однако NfL не является абсолютно специфичным маркером рассеянного склероза, так как его уровень повышается при любых аксональных повреждениях. В более современном исследовании пациентов с рассеянным склерозом сравнивали с группой контролей у которых имеются неврологические симптомы неустановленного генеза, что является более строгим контролем. В данном случае показатель AUC для цереброспинальной жидкости снижается до 0.8 и еще немного снижается при исследовании сыворотки крови. При этом, NfL уже используют в клинике зарубежом. Мы планируем объединить наши маркеры и NfL в одну панель и таким образом добиться существенного улучшения диагностики рассеянного склероза.

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо. А спинно-мозговая жидкость?

**Овчинникова Л.А., соискатель:** По поводу спинно-мозговой жидкости, это в предыдущем было задано отзыве. Мы действительно в ходе данной работы исследовали уровень аутоантител в спинномозговой жидкости пациентов. При этом мы сравнивали уровень аутоантител в спинномозговой жидкости пациентов с рассеянным склерозом с уровнем антител в спинномозговой жидкости пациентов с боковым амиотрофическим склерозом. Мы измерили уровень связывания к ограниченной панели аутоантигенов, в том числе к кератину, спектрину, периоксину, и к LMP1. Антитела, на указанные маркеры, были обнаружены в цереброспинальной жидкости, что подтверждает значимость предложенной нами панели биомаркера.

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо. Нина Викторовна, спасибо, что приехали.

**Тикунова Н.В., официальный оппонент:** *(излагает отзыв, отзыв положительный).*

Глубоко уважаемый председатель, члены диссовета, коллеги. Мне было очень приятно оппонировать эту работу. Как всегда, приятно и интересно читать публикации из лаборатории Александра Габибовича. Поскольку меня вызвали первым оппонентом немножко формальности все-таки скажу. Первое, об актуальности. Большинство взрослых образованных людей хоть раз в жизни испытывает опасения, не развивается ли у него нейродегенеративное заболевание, и как раз в отношении рассеянного склероза хоть что-то немножко знакомо и это несколько облегчает дальнейшее исследование, хотя понятно что не все, не полностью и надо, надо исследовать. Поэтому об актуальности тут даже вопросов не может быть. Работа чрезвычайно актуальна. Вторая важная формальная вещь – это научная новизна исследований, практическая значимость. Они тут тесно переплетены поскольку буквально все что сделано – это все новое. Как правило база, на которой все это сделано, она обладает практической значимостью. Например, создана и оптимизирована методическая платформа для создания специфических библиотек. Будет в дальнейшем использоваться? Будет. На основе этой платформы сконструирована библиотека пептидов. На мой взгляд, даже не полностью ее возможности исчерпаны. Она скорее всего будет в дальнейшем использоваться другими студентами, возможно, аспирантами. Я не говорю о том, что с помощью этих подходов получены новые знания, выявлены новые потенциальные маркеры. Новизна – да, практическая значимость – почти наверняка. Главное потом это как бы доразвивать, до внедрения. Впервые показано содержание повышенных, вернее, повышенное содержание транзистентных регуляторных В-клеток – тоже может использоваться в дальнейшем. С другой стороны – новизна. Поэтому все очень важно. Интересно читать было, очень интересно. Дальше, использованные методы вызывают уважение. Очень много разнообразных, не так много классических методов – в основном все абсолютно новые методы. В целом, я не буду пересказывать работу, но обращает внимание что сама работа – часть “результаты и обсуждения” написано очень-очень плотно. То есть они не так, что мы поставили ИФА и получили такой результат, а потом снова поставили



ИФА и получили другой результат, а потом снова поставили и так бесконечно. Нет. Каждый раз это новый метод, результаты, следующий новый метод, результаты, следующий новый метод, результаты. То есть просто читаешь почти как научный детектив очень плотный, хорошо насыщенный результатами работы и, вместе с тем, очень хорошо написано. Спасибо. Было приятно читать не надо было прорубаться через текст. На мой взгляд работа Лейлы Александровны явно выходит за понимание квалификационной работы. Это полноценное научное исследование. Причем, там сконцентрировано не одно исследование. Собственно, только подразделов в результатах два, а реально там есть еще один, третий раздел, спрятанный внутри. С большим трудом я нашла замечания. Первое – это просто придирка. Все-таки термин “фаг-дисплейная библиотека” – это скорее лабораторный сленг. Все говорят комбинаторная библиотека в русскоязычной научной лексике. Но это сами понимаете, придирка. И второе, это скорее вопрос, может быть вы сможете ответить. Если при идентификации кандидатных маркеров рассеянного склероза на основе данных PhIP-Seq наибольшее количество различных эпитопов обнаружено для нинеина, то почему в дальнейших экспериментах, а именно исследовании реактивности сывороток, этот пептид не рассматривался, эти пептиды не рассматривались? Очевидно, что придирку отмечаем. На вопрос как-то наверное соискатель ответит. Эти замечания несколько не умаляют значимость представленной работы. Это полноценное комплексное научное исследование. Выводы полностью соответствуют задачам, они достоверны и соответствуют заявленной специальности 1.5.3 “молекулярная биология”.

Таким образом, говорят, что это обязаны оппоненты зачитывать, диссертационная работа Овчинниковой Лейлы Александровны “Структурно-функциональный анализ В-клеточного репертуара при рассеянном склерозе” по актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований и практической значимости соответствует критериям, в том числе пункта 9, установленным положением о присуждений ученых степеней, а сам диссертант несомненно, заслуживает присвоение искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 “молекулярная биология”.

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо. Лейла Александровна, на придирку, наверное, можно не отвечать.

**Овчинникова Л.А., соискатель:** Спасибо большое, Нина Викторовна, что согласились прооппонировать мою работу, а также что приехали на мою защиту. Я полностью согласна с вашим замечанием по “фаг-дисплейным библиотекам” – постараюсь не использовать в своих докладах данный термин.

Что касается вопроса с нинеином. Данный рисунок не вошел в основные слайды. На нем изображены белки, для которых методом фаговой иммунопреципитации с дальнейшим секвенированием было идентифицировано наибольшее количество пептидов, с которыми наблюдается повышенный титр антител у пациентов с рассеянным склерозом. Наибольшее число пептидов, входящих в состав одного белка, с которыми связывались антитела пациентов с рассеянным склерозом, были идентифицированы для нинеина. Сывороточные антитела некоторых доноров связывались более чем с 3 фрагментами данного белка. Однако единого пептида, на который наблюдается антителый ответ хотя бы у части пациентов с рассеянным склерозом для нинеина обнаружить не удалось. Возможно, то, что нами было обнаружено связывание аутоантител со многими фрагментами данного белка объясняется большой молекулярной массой нинеина – 209 kDa и присутствием в библиотеке множества пептидных последовательностей для данного белка. В работе мы анализировали антителый ответ на конкретные пептиды, для которых связывание было обнаружено у большинства пациентов с рассеянным склерозом, для нинеина общие пептиды у разных пациентов обнаружены не были. Для дальнейших отборов аутоантител мы планируем использовать рекомбинантный нинеин. Так как нам интересно посмотреть антителый ответ на данный белок. Спасибо.

**Мирошников А.И., председатель:** Второй официальный оппонент — Александр Васильевич Филатов, доктор биологических наук, институт иммунологии. Пожалуйста.

**Филатов А. В., официальный оппонент:** *(излагает отзыв, отзыв положительный).*

Уважаемые коллеги, на ваше рассмотрение представлена диссертация Лейлы Александровны, и прежде всего я хотел бы сказать о достоинствах этой диссертации. Отчасти я повторюсь о том, что диссертация является вполне актуальной, потому что она направлена на изучение рассеянного склероза. И тут я отчасти повторюсь, сказав, что рассеянный склероз — это одно из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний, которые поражают иммунную систему. На современном уровне медицины это заболевание пока что лечению не поддается, патогенез его изучен очень плохо, поэтому эта работа очень актуальна. Но когда я открыл диссертацию, я вдруг неожиданно для себя обнаружил, что значительная часть этой диссертации посвящена изучению коронавирусной инфекции. И тут я невольно подумал о том, что мы все пережили пандемию коронавируса, и в это время многие иммунологи, вирусологи, молекулярные биологи отложили на время решения своих задач и переключились на решение вот этих гораздо более актуальных вопросов. Я тешу себя надеждой на то, что наша работа и работа Лейлы Александровны все-таки внесла малую толику в то, что были быстро разработаны методы диагностики коронавирусной инфекции, вакцины были разработаны, и мы очень продвинулись к вниманию самого иммунного ответа на коронавирусную инфекцию. Но, как известно, большие задачи решают большие проблемы и создают... простите, я это пропущу. Дело в том, что коронавирусная инфекция дала нам очень богатый клинический материал, на котором можно было оттачивать те методики, которые до этого было осуществить очень трудно. И вот Лейла Александровна, использовала коронавирусную инфекцию для разработки своих методик. И на этом пути она достигла довольно больших результатов. Здесь уже отмечалось то, что ею были разработаны такие методики, как усовершенствование амплификации сложных ДНК-матриц в каплях эмульсии, была создана платформа для высокопроизводительного скрининга антиген-специфических иммуноглобулинов, были созданы дисплейные библиотеки, которые включают в себя большое количество потенциальных аутоиммунных мишеней человека. И вот тот доклад, который мы слышали, там вот тематика по коронавирусу, она была очень так приглушена. Может быть, это, Лейла Александровна, сделала специально, чтобы не было расфокусировки, но мне кажется, что все-таки эта часть исследования, она тоже заслуживает отдельного внимания и заслуживает высокой оценки. Если говорить об основных результатах работы, то, конечно, основным объектом были регуляторные В-клетки, так называемые Breg. Трудность изучения Breg связана с тем, что это очень маленькая клеточная популяция. Мало того, что она маленькая, она еще очень гетерогенная по своему происхождению. Но, тем не менее, Лейла Александровна очень успешно с этим справилась. Ею были получены не просто результаты о количественных или фенотипических изменениях Breg, но даже были просеквенированы гены иммуноглобулинов, гены рецепторов, и здесь были получены результаты очень интересные. И, конечно, тоже очень важный результат — были идентифицированы биомаркеры, которые могут нам показывать наличие или отсутствие рассеянного склероза. И вот здесь Николай Владимирович задавал вопрос по поводу, как эти мишени могут участвовать в патогенезе. Я не могу ответить на этот вопрос, но для диагностики, несомненно, эти мишени представляют интерес. Ну, я все-таки свои обязанности как оппонента вижу так, что кроме того, что хвалить работу нужно еще и высказать некоторые замечания. И в качестве замечаний я могу сказать, что была разработана комбинаторная фаговая библиотека аутоантигенов, которая содержала перекрывающиеся пептиды длиной 44 аминокислотных остатков. То есть такая библиотека нам моделирует линейные только эпитопы. Я хотел бы пожелать Лейле Александровне, и ее руководителям, чтобы была создана фаговая библиотека, которая могла анализировать антитела и конформационным эпитопам. Еще одно замечание — это то, что были получены антитела против коронавируса, но нужно было сделать уточнение, против каких вариантов

коронавируса были получены эти тела. Мне кажется, что в выводе номер 5 слово «репертуар» как-то немножко стоит не на месте, то есть стилистически здесь нужно было бы как-то сделать по-другому. На странице 129 сказано, что в генах зародышевых линий тяжелых и легких каппа цепей содержится меньше мутаций по сравнению со здоровыми донорами. Наверное речь идет не о мутациях в зародышевых линиях, а речь идет о соматических гипермутациях. Лейла Александрова в своем докладе именно озвучила такой правильный вариант. Я думаю, что это просто такая опечатка. Ну и вот такая студенческая ошибка на странице 120. Написано, что у пациентов с рассеянным склерозом повышен сывороточный титр В-регуляторных клеток. Но высказанные замечания не затрагивают полученных результатов и в сущности сделанных выводов, не влияют на общую положительную оценку рассматриваемой диссертации, поэтому я с легким сердцем могу перейти к заключительной части отзыва и зачитать, что диссертационная работа Лейлы Александровны соответствует критериям положения о присуждении ученых степеней, дальше идет длинный перечень этих положений, а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3, “Молекулярная биология”. Спасибо за внимание.

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо, Александр Васильевич. Лейла Александровна, отвечаете.

**Овчинникова Л.А., соискатель:** Большое спасибо, Александр Васильевич. Я полностью согласна с высказанными замечаниями, в частности, про то, что не все речевые обороты были удачные. Что касается первого вопроса про линейные эпитопы. Использование библиотеки перекрывающихся пептидов длиной 44 аминокислоты связано с ограничениями, накладываемыми на длину синтезированной библиотеки олигонуклеотидов. В представленной библиотеке мы заказали синтез олигонуклеотидов длиной 168 нуклеотида. На момент создания библиотеки синтез олигонуклеотидов длиннее 170 оснований приводил к существенному увеличению числа ошибок. На данный момент имеется возможность заказа синтеза библиотек длиной уже до 220 нуклеотидов. Более того недавно была опубликована методика синтеза библиотек олигонуклеотидов длиной до 350 пар оснований.

На этапе оптимизации нами использовалась модельная фаговая библиотека антигенов вируса SARS-CoV-2, где на поверхности фагов экспонировались антигены длиной до 165 и 199 аминокислот. При такой длине антигена уже теоретически возможно образование конформационного эпитопа. Более того, часть отобранных антител обладала вирус-нейтрализующей активностью. По литературным данным большинство SARS-CoV-2-нейтрализующих антител, взаимодействуют именно с конформационным эпитопом, поэтому мы предполагаем, что использование библиотеки аутоантигенов, где на поверхности экспонированы фрагменты более 100-200 аминокислот, позволяет идентифицировать антитела, узнающие в том числе и конформационные эпитопы. В дальнейшем мы планируем работать с библиотеками более протяженных эпитопов.

Далее было сделано замечание, касающееся того, какой вариант SARS-CoV-2 был использован в работе. Мы использовали доноров, вакцинированных начальным вариантом Sputnik и переболевших COVID-19, Уханьский штамм. Для отборов использовали антигены, соответствующие Уханьскому штамму. Для проверки полученных антител использовали RBD других штаммов SARS-CoV-2. Так, по нашим данным, Vac-3.1, отобранный на Уханьский штамм, нейтрализует не только исходный вариант, но и штамм Омикрон, а связывает RBD штаммов Ухань, Альфа, Гамма, Омикрон. Второе антитело – Vir 1.7, нейтрализует только исходный уханьский вариант, а связывает штаммы Ухань и Альфа, в меньшей степени – Гамма и Дельта и еще слабее – Омикрон.

Далее был вопрос, касающийся соматических гипермутаций. Действительно, в данном случае использование термина “мутация” по отношению к генам зародышевых линий некорректно. В данной работе мы изучали уровень соматических гипермутаций в

вариабельных фрагментах тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Для анализа мы выделяли тотальную РНК В-клеток или транзистентных В-регуляторных клеток, с выделенной РНК ставили обратную транскрипцию и с полученной кДНК апмплифицировали последовательности, кодирующие вариабельные фрагменты тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. В данном случае частота мутаций обозначает процент последовательности клонотипа, отличающейся от соответствующих последовательностей V- и J-сегментов зародышевой линии, за исключением области CDR3.

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо. Так, коллеги, ну и что, открываем дискуссию. Кто хотел бы выступить? Так, хорошо.

**Габибов А.Г.:** Мне кажется, я легитимен в плане выступающего, хотя я соавтор большинства статей, но руководитель Яша. Я должен сказать, что аспирантом, аспиранткой скорее всего я руководил официально. Да, Лейла, вами? Да. Потому что я считаю, но не все согласны в институте с этим, что аспирантами должны руководить доктора наук. Я еще из советского прошлого. Значит я должен сказать, что уже Яков характеризовал большую работоспособность и такие человеческие усилия, выше может быть где-то пределов возможного, Лейлы на выполнение этой работы. Она действительно на взгляд может быть несколько эклектична, но как уже Александр Васильевич подчеркнул и Нина, значит она все-таки подчинена была одной цели. И, конечно, тот объем материала, который удалось собрать и осмыслить, и доложить Лейле Александровне, он, конечно, в общем-то впечатляет. И как не хочу давить на членов ученого совета, мне кажется, что диссертация, наверное, даже чуть выше, может быть, среднего. Вот Лейле я бы хотел пожелать успешной работы, может быть, и сменить тему. Бывает в жизни всякое, их нужно менять. Но действительно Лейла очень грамотный специалист. Сочетание грамотного и хорошего молекулярного биолога, биохимика и в общем-то даже иммунолога. Хотя я всегда подчеркиваю моему другу Недоспасову, что мы не иммунологи. Ну, а Лейла предоставила мне большую, очень приятную возможность вновь увидеть Нину Тикунову, нашего соавтора старого. Женщина молодая, но соавтор старый. Я должен сказать, что у нас нет довольно давно уже пересекающихся работ, но Нина Викторовна была со-инициатором моих первых исследований в области комбинаторики по рассеянному склерозу. Наши первые статьи... Я обычно никогда не проверяю цитирование, но я помню вас, вашу аспирантку Викторию, когда вы приехали и сделали первую библиотеку с неправильным еще спариванием. Я был удивлен, это был, наверное, 11-й год, что никто до этого не сделал библиотеку иммуноглобулинов больных рассеянным склерозом. Так что эта работа мне приятна и в человеческом плане, и она инициировала очень много исследований. Мы рассеянный склероз начали, собственно, с Алексеем Белогуриным в таком плане, иммунохимическом, когда нашли каталитические антитела против миелина. Но большое спасибо. Так что я свое мнение высказал и мне защита эта была очень приятна. Спасибо.

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо. Так коллеги, значит в счетную комиссию предлагается Виктор Ионович Цетлин, Николай Владимирович Бовин и Владимир Александрович Олейников. А сейчас заключительное слово Соискателю. Пожалуйста.

**Овчинникова Л.А., соискатель:** В первую очередь я бы хотела искренне поблагодарить своих оппонентов Александра Васильевича Филатова и Тикунову Нину Викторовну за то, что нашли время проанализировать мою работу и приехать на мою защиту. Я также выражаю благодарность и признательность своему научному руководителю Ломакину Якову Анатольевичу за внимательное руководство, непрерывное обучение и формирование высоких стандартов работы в лаборатории. Особую благодарность я бы хотела выразить Габибову Александру Габибовичу за научное руководство в аспирантуре и после, и возможность заниматься интересными исследованиями в лаборатории биокатализа. За



помощь в подготовке исследований для данной диссертации я бы хотела отдельно поблагодарить Белогузова Алексея Анатольевича и Рубцова Юрия Петровича. Отдельную признательность я бы хотела выразить своим коллегам и соавторам Терехову Станиславу Сергеевичу, Елисееву Игорю Евгеньевичу. Также я благодарю коллектив лаборатории биокатализа за неоценимую помощь и поддержку. Отдельно хотелось бы выразить признательность нашим коллабораторам из центра неврологии, МГУ и медицины Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук. Спасибо моим друзьям, которые пришли на эту защиту, и тем, у кого не получилось присутствовать, Вы все мне очень сильно помогли. Спасибо.

**Мирошников А.И., председатель:** Лейла, у Вас соавторов, по-моему, не входит даже на экран. Потому что я посмотрел статьи, и соавторов у Вас очень много. Спасибо.

**Овчинникова Л.А., соискатель:** Спасибо.

**Мирошников А.И., председатель:** Так, коллеги. Проведем, давайте, тайное голосование. Пожалуйста.

*(Идет тайное голосование)*

**Мирошников А.И., председатель:** Нормально? Пожалуйста, Владимир Александрович!

**Олейников В.А., учёный секретарь:** Результат тайного голосования. Хочу огласить. Тайное голосование по диссертации Овчинниковой Лейлы Александровны. Присутствовало на заседании – 21 член Совета. Роздано бюллетеней – 21. Оказалось в уровне – 21. “За” – 21, “Против” и недействительных – нет.

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо. Утверждаем? Да. Спасибо. И поздравляем, у нас новый кандидат появился. Так что пожалуйста, у кого есть замечание по заключению?

*(Происходит обсуждение проекта заключения совета. Овчинникова Т.В. предлагает заменить термин “фаг-дисплейная библиотека”. Бовин Н.В. предлагает внести небольшие редакторские корректировки в раздел о теоретическом и практическом значении работы.)*

**Мирошников А.И., председатель:** Принимается.

*(Проходит голосование. Заключение совета принято единогласно.)*

**Мирошников А.И., председатель:** Спасибо. Все, коллеги, заседание совета закончено. Спасибо.

Председатель  
Диссертационного совета

Ученый секретарь  
Диссертационного совета



академик, д.х.н. Мирошников А.И.

д.ф.-м.н. Олейников В.А.