

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу **Егорова Евгения Станиславовича** «Возрастные изменения в структуре репертуаров Т-клеточных рецепторов наивных Т-лимфоцитов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Актуальность темы исследования

Структура и разнообразие репертуара Т-лимфоцитов являются ключевыми характеристиками, определяющими эффективность адаптивного иммунитета. От них напрямую зависит как способность иммунитета к дискриминации "своего" и "чужого", так и его способность противостоять широкому и меняющемуся спектру патогенов, с которыми сталкивается иммунная система в ходе индивидуального развития организма. Эти важнейшие характеристики адаптивного иммунитета стали доступными для изучения лишь недавно, с широким вхождением в научную практику методов высокопроизводительного секвенирования ДНК. Весьма отраднo то, что признанным мировым лидером в разработке и применении методов NGS-секвенирования в приложении к анализу Т-клеточного репертуара является группа российских исследователей, возглавляемых Д.М.Чудаковым, а диссертант стоял у истоков рождения и развития этого научного направления. За прошедшие годы авторский коллектив применил разработанные ими методы для широкого ряда теоретических и практических задач - восстановления иммунной системы после трансплантации гемопоэтических клеток костного мозга при лейкозах и аутоиммунных заболеваниях, а также при иммунодефицитных состояниях и вакцинации. Диссертант приложил этот исследовательский аппарат к проблеме старения организма, в ходе которого происходит

инволюция тимуса и драматическое снижение интенсивности самообновления Т-клеточного репертуара, вследствие которого старики становятся группой риска при развитии эпидемий инфекционных заболеваний. Весьма вероятно, что с этим снижением связано и возникновение у них аутоиммунных заболеваний и ускользание трансформированных клеток от иммунологического надзора с последующим развитием онкологических заболеваний.

Таким образом, представленная работа весьма актуальна и имеет как фундаментальное, так и практическое значение.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В соответствии с поставленной целью автором было проведено обследование 83 здоровых доноров и 8 образцов пуповинной крови. Определенные Егоровым Е.С. цели и задачи диссертационного исследования полностью соответствуют использованным в работе методам и подходам. Достоверность результатов обеспечена достаточным количеством обследованных больных, использованием современных методов обследования и статистической обработки полученных данных. Полученные результаты достоверны и сомнений не вызывают.

Научная новизна и значимость исследования

Научная новизна работы абсолютна. Диссертант и коллектив, в котором он работает, являются безусловными мировыми лидерами в разрабатываемом научном направлении, которое осуществило настоящий прорыв в иммунологии. Автором впервые охарактеризованы репертуары Т-лимфоцитов и их субпопуляций у пациентов различного возраста с применением оригинального метода, позволяющего сделать это на молекулярном уровне.

Оценка структуры, содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа изложена на 115 страницах машинописного текста, включает разделы: введение, обзор литературы, цели и задачи, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, заключение, список сокращений и список используемой литературы (183 источника, в том числе 183 зарубежных). Работа содержит 12 таблиц и 21 рисунок.

Во введении Егоров Е.С. определил актуальность проведенного исследования, его новизну, теоретическую и практическую значимость, и привел данные о структуре диссертации.

Обзор литературы подразделен автором на две части, в первой из которых он приводит актуальную информацию о строении и организации Т-клеточных рецепторов, V-(D)-J рекомбинации их генов, биологии Т-лимфоцитов и связи их развития и дифференцировки с перестройками генов Т-клеточного рецептора. Во втором разделе обзора он приводит имеющиеся сведения о старении иммунной системы, инволюции тимуса, закономерностях поддержания Т-клеточного пула на периферии и репертуаре Т-клеток в старости. Обзор хорошо структурирован, а представленные в нем материалы изложены логично и четко. Обзор литературы достаточно полон и дает развернутое представление о современном состоянии проблемы. В нем систематизирован большой объем научной информации. В разделе "Цели и задачи" Автор четко сформулировал цель и задачи исследования,

В главе «Материалы и методы» описаны применяемые методики. В работе использован широкий спектр актуальных молекулярно-биологических и иммунологических методов выделения и характеристики субпопуляций Т-лимфоцитов из крови с использованием проточной цитофлуориметрии и сортировки клеток, а также дано подробное описание методов выделения РНК и синтез на ее основе библиотек кДНК.

Завершают главу описания подходов к секвенированию и анализу полученных данных.

В главе, посвященной результатам собственных исследований, последовательно изложены наиболее значимые результаты. Первой задачей, на которую направил усилия диссертант, стала разработка метода, позволяющего проводить качественный анализ репертуаров Т-клеточных рецепторов, в том числе для небольшого стартового числа (порядка нескольких сотен) Т-клеток. Автор приводит подробное описание пробоподготовки образцов кДНК и использованных им технических решений, направленных на минимизацию количественных искажений, вызванных разной эффективностью амплификации переменных генных сегментов TCR, а также исправление ошибок PCR и секвенирования. Ими стали технологии 5'-RACE со сменой матрицы и баркодирование с использованием маркирования каждой молекулы кДНК специальной последовательностью – уникальным молекулярным идентификатором (англ. *unique molecular identifier, UMI*) или баркодом, состоящим из 12 встроенных в SMART-адаптер случайных нуклеотидов. Автор подобрал условия пробоподготовки, позволяющие с успехом работать с малыми количествами клеток. Приведенный им анализ эффективности метода с использованием UMI, его чувствительности и воспроизводимости достаточно логичен, подробен и убедителен. Вместе с тем, диссертант, на мой взгляд, чрезмерно увлекается, утверждая, что используемая им технология баркодирования позволяет идентифицировать пары α и β -цепей TCR, принадлежащие одному клону, "на основании их встречаемости с сопоставимой частотой в одних и тех же небольших репликах". Автор основывает свою уверенность на данных, полученных при исследовании клона *Slec1*, обнаруженного у больного анкилозирующим спондилитом, в котором, по утверждению Автора, экспрессируются две β -цепи, одна из которых является

нефункциональной. И здесь непонятно, что именно имел Автор в виду. Экспрессия β -цепей подчинена правилу аллельного исключения, что делает существование Т-клеточного клона с экспрессией двух β -цепей невозможным. Появление в результате рекомбинации функциональной β -цепи, способной объединиться с суррогатной α -цепью влечет за собой прекращение экспрессии рекомбиназ и дальнейших перестроек β - и γ -генов на других хромосомах с уходом этих областей в гетерохроматин. Скорее всего, клон Slec1 представлял собой смесь двух разных клонов с различными β -цепями. В этом свете данные представленные Автором на рисунке 9 и странице 65 могут быть интерпретированы иначе и в данном случае стандартный анализ дает более точные значения частот. Если под "нефункциональностью" он имел в виду экспрессию транскрибированных продуктов, то это обычное явление, часто встречающееся при характеристике β -цепей клонированных Т-клеток, предполагающее неспособность к синтезу функционального белкового продукта. Если реаранжировки генов на одной из хромосом закончились неудачно, Т-лимфоцит продолжает экспрессию рекомбиназ и перестройку генов на другой хромосоме и эти процессы завершаются с образованием функционального продукта, тогда как экспрессия транскрибированного продукта на другой хромосоме продолжается. Но тогда становится непонятной апелляция Автора к данным проточной цитофлуориметрии, с которыми, по его мнению, совпадают результаты проведенного им анализа. Объяснения этому было бы желательно получить.

В ходе исследования возрастных изменений репертуаров здоровых доноров, представляющего вторую задачу исследования, диссертант пришел к убеждению, что они содержат значительную долю клонов, стабильно сохраняющихся в течение ряда лет и что эта доля хорошо коррелирует с долей Т-клеток памяти, измеренной с помощью проточной

цитофлуориметрии. Для клонов Т-клеток CD8 была характерна обширная экспансия, тогда как клоны Т-клеток CD4 характеризовались меньшими размерами и в 5 раз большим разнообразием. Доля репертуара, занимаемая стабильными клонами, с возрастом увеличилась у старшего донора, но уменьшилась у младшего, что диссертант объясняет более быстрым истощением клонов Т-клеток в молодом возрасте и продолжающейся экспансией клеток памяти у пожилых людей.

Интересные результаты были получены Автором в ходе исследований динамики Т-клеточных репертуаров у пациентов различного возраста. В пуповинной крови новорожденных им обнаружен высокий процент нефункциональных молекул TCR β , мРНК которых содержит стоп-кодоны или находится вне рамки считывания. Автор связывает это явление с подавлением нонсенс-опосредованного распада РНК в условиях гипоксии, в которых находился плод. На мой взгляд, это объяснение не совсем удачно, учитывая незрелость моноцитарно-макрофагальной системы в раннем постнатальном онтогенезе. Увеличение непродуктивных вариантов TCR β может быть объяснено сниженным клиренсом апоптотических Т-лимфоцитов, не прошедших процессы β -селекции в условиях относительной избыточности пролиферативных и селекционных процессов, идущих в тимусе в этот период развития. Автор обнаружил, что для Т-лимфоцитов новорожденных характерно также снижение числа n-нуклеотидов, добавляемых терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (TdT) в ходе перестройки генов Т-клеточного рецептора. Наибольшее индивидуальное разнообразие последовательностей CDR3 β -цепей Т-клеточных рецепторов, наблюдаемое в образцах пуповинной крови, коррелировало с самым высоким процентом наивных Т-клеток, и оба параметра равномерно снижались с возрастом. Наивные CD4 Т-клетки представляли более половины всех Т-клеток в образцах пуповинной крови, в то время как

наивные CD8 – около 20%. В молодом возрасте соотношение наивных популяций CD4 и CD8 понемногу выравнивалось. Процент наивных Т-клеток уменьшался с возрастом, причем наибольшее снижение наблюдалось среди Т-клеток CD8. Высокая доля общих клонов в образцах пуповинной крови и у детей, скорее всего, обусловлена множеством общих клонотипов из пренатального репертуара с высокой вероятностью сборки при отсутствии активности TdT в эмбриональном развитии.

У клонов с предполагаемой специфичностью к вирусам EBV и CMV диссертант обнаружил снижение их разнообразия с возрастом и увеличение их размеров, тогда как в глубокой старости им отмечено уменьшение и их размеров тоже, что он связывает общим истощением антиген-специфического репертуара Т-клеток в старости.

Данные, полученные диссертантом на сортированных клетках CD4 и CD8 указывают на присутствие определенной периферической селекции наивного Т-клеточного репертуара при старении иммунной системы. Уменьшение с возрастом относительного содержания сильно взаимодействующих аминокислотных остатков и средней длины CDR3 в TCR β репертуаре наивных Т-клеток может свидетельствовать о значительно более быстром истощении клонов наивных Т-клеток с высокой аффинностью к собственным рМНС.

Изложение результатов сопровождается таблицами, схемами, и рисунками, что облегчает восприятие и анализ материала.

На основании полученных результатов было сформулировано шесть корректных выводов, которые в полной мере отражают основное содержание работы, соответствуют задачам диссертационного исследования и положениям, выносимым на защиту. Данные, полученные в ходе исследования опубликованы в шести статьях в международных научных журналах, в том числе, топового уровня, одной статье в

"Вестнике РГМУ" - все журналы относятся к рекомендованным ВАК. Результаты доложены на двух конференциях в России.

Фундаментальная значимость работы неоспорима - ею впервые открыт путь к описанию и характеристике репертуаров Т-лимфоцитов на молекулярном уровне, что в значительной мере определит пути развития иммунологической науки и ее приложений на десятилетия вперед.

Несомненным достоинством работы Егорова Е.С. является ее практическая значимость и возможность использования разработанного метода в широком ряду направлений современной иммунологии, открывая возможность быстрой и эффективной идентификации Т-клеточных рецепторов для персонализированной адоптивной иммунотерапии онкологических и инфекционных заболеваний.

Содержание диссертации полностью соответствует специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология» и теме исследования, в полной мере достигнута цель исследования и решены все задачи. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Однако, следует также отметить наличие орфографических ошибок в тексте диссертационной работы. Встречаются профессионализмы и не вполне понятные блоки текста:

"Клетки виртуальной памяти взрослых мышей непосредственно демонстрируют превосходную эффекторную функцию и пролиферацию по сравнению с их истинно наивными (англ. *true naive*, *TNa*) аналогами [34]. Скорее всего, они возникают из-за неонатальной лимфоцитопении и вынуждены делиться и превращаться в VM в ответ на избыток IL-7 в практически "пустом" неонатальном периферическом компартменте у мышей"

или

"был обнаружен CD4 Т-клеточный фенотип памяти, специфичный для различных вирусных антигенов, некоторые из которых (например,

столбняк и оспа) вряд ли имели отношение к рассматриваемым субъектам."

или

"мобилизация кожного CD4 T-клеточного иммунитета"

Встречаются неточности - например суррогатную α -цепь Автор называет предшественником α -цепи.

Данные замечания не имеют критического характера и не снижают ценность работы в целом.

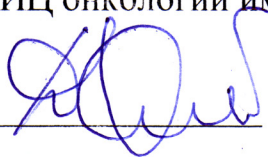
Заключение

Диссертационная работа Егорова Евгения Станиславовича «Возрастные изменения в структуре репертуаров T-клеточных рецепторов наивных T-лимфоцитов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология» является научно-квалификационной работой, выполненной под руководством кандидата биологических наук Британовой Ольги Владимировны. Научным консультантом работы является доктор биологических наук Чудаков Дмитрий Михайлович.

По актуальности, новизне полученных данных, фундаментальной и практической значимости, диссертационная работа Егорова Евгения Станиславовича полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №1024 от 28.08.2017 г. и №1168 от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор

заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент
доктор биол. наук, профессор,
Зав. лабораторией
механизмов регуляции иммунитета
НИИ канцерогенеза
ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина" Минздрава России



Казанский Дмитрий Борисович

«Подпись Казанского Дмитрия Борисовича заверяю»:

учёный секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, к.м.н.



Кубасова Ирина Юрьевна

Сведения об официальном оппоненте: Казанский Дмитрий Борисович, профессор, доктор биол. наук, заведующий лабораторией механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза, ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина" Минздрава России.

Адрес: Каширское шоссе, д. 24, стр. 15

Телефон: +7(499)-324-55-13; +7(916)-485-73-88 (моб.)

Электронный адрес: kazansky1@yandex.ru