

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук,
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 7 июня 2023 года №14

О присуждении **Вавиловой Юлии Дмитриевне**, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Изменение популяционного состава и характеристик системы шаперон-зависимого гомеостаза у циркулирующих клеток иммунной системы при развитии болезни Паркинсона» по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология принята к защите (протокол заседания № 9) 4 апреля 2023 г. диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, действует на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г., а также Приказа Минобрнауки России № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Вавилова Юлия Дмитриевна, 12 мая 1994 года рождения. В 2018 году соискатель окончила "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности 30.05.01 медицинская биохимия. В 2022 году соискатель окончила аспирантуру Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по специальности 1.5.3. молекулярная биология.

Научный руководитель - Сапожников Александр Михайлович, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории клеточных взаимодействий Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Гужова Ирина Владимировна, доктор биологических наук, руководитель отдела молекулярных и клеточных взаимодействий Института Цитологии Российской академии наук.; **Лебедева Ольга Сергеевна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства» дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России (ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России), Москва,

в своем положительном отзыве, подписанном Филатовым Александром Васильевичем, доктором биологических наук, профессором, зав. лабораторией иммунохимии ФГБУ "ГНЦ "Институт иммунологии" ФМБА России, и утвержденном директором ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России чл.-корр. РАН, д.мед.н., профессором Хаитовым Мусой Рахимовичем, указала, что диссертация Вавиловой Юлии Дмитриевны является завершенной научно-квалификационной работой, которая по своей новизне, актуальности и достоверности полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология."

Соискатель имеет 8 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 4 работ общим объемом 3 печ.л., в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных Web of Science и Scopus). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме в которые Вавилова Ю.Д. внесла основной либо существенный вклад, включают:

1. **Vavilova J.D.**, Boyko A.A., Ponomareva N.V., Fokin V.F., Fedotova E.Y., Streltsova M.A., Kust S.A., Grechikhina M.V., Bril E.V., Zimnyakova O.S., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. Reduced Immunosenescence of Peripheral Blood T Cells in Parkinson's Disease with CMV Infection Background. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(23):13119. <https://doi.org/10.3390/ijms222313119>
2. **Vavilova J.D.**, Boyko A.A., Troyanova N.I., Ponomareva N.V., Fokin V.F., Fedotova E.Y., Streltsova M.A., Kust S.A., Grechikhina M.V., Shustova O.A., Azhikina T.L., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. Alterations in Proteostasis System Components in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Parkinson Disease: Focusing on the HSP70 and p62 Levels. *Biomolecules*. 2022; 12(4):493. <https://doi.org/10.3390/biom12040493>
3. **Вавилова Ю.Д.**, Бойко А.А., Коваленко Е.И., Гречихина М.В., Шустова О.А., Ажикина Т.Л., Сапожников А.М. Анализ ассоциации полиморфизма генов CLIC1, MSH5, C6orf26, C6orf25 с уровнем экспрессии гена HSPA1B. *Медицинская иммунология*. 2020; 22(4):779-784. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-AOT-1629>
4. Boyko A.A., Troyanova N.I., **Teterina J.D.**, Azhikina T.L., Vetchinin S.S., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. // Features of Stress-Induced Changes of HSP70 Expression in Populations of Immunocompetent Cells // Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018, A. A. Asea, P. Kaur (eds.), *Heat Shock Proteins and Stress*, Heat Shock Proteins 15, 79-94. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90725-3_4

На диссертацию поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.б.н. **Гужовой Ирины Владимировны**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

Проверяли ли работоспособность антител С92F3А-5, к примеру, с помощью вестерн-блоттинга. В коллективе, где работает Юлия Дмитриевна, есть панель моноклональных антител, узнающих как Hsp70 (например, клон 2Е4, на него имеется патент), так и оба шаперона (клон 3С5).

Почему противоречивый результат, представленный на рис. 5 не был перепроверен с помощью собственных антител?

Какая конкретно, по мнению автора популяция клеток РВМС может вносить вклад в разницу в экспрессии белков HSP70?

2. Отзыв официального оппонента к.б.н. Лебедевой Ольги Сергеевны. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1). В литературе имеются свидетельства, указывающие на возможную ассоциацию БП с инфекционной нагрузкой таких распространенных патогенов как цитомегаловирус (CMV), вирус простого герпеса типа 1, *Chlamydomphila pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* и *Helicobacter pylori*. Проверили пациентов и здоровых доноров, принимавших участие в исследовании, на эти патогены? 2). В тексте работы присутствуют опечатки, пунктуационные и стилистические ошибки. Особенно бросилась в глаза фраза «антитела против человека» на стр. 37. Ошибок не много, и они не мешают восприятию текста. 3). В тексте диссертации отсутствует ссылка на рисунок 3. 4). Сбита нумерация в разделе «Материалы и методы», пропущен пункт 2.1. 5). Не расшифровано обозначение “HD” на рисунке 7 и в таблице 3. Судя по всему имеются в виду «здоровые доноры». 6). На рисунке 9 в описание есть расшифровка обозначения «ns» но на рисунке такого обозначения нет. 7). На стр. 49 видимо ошибочно приведена ссылка на рисунок 6, по тексту скорее должна быть ссылка на рисунок 3. 8). На рисунке 10 приведены интересные данные по сравнению базальной экспрессии стресс-индуцированных генов *HSPA1A*, *HSPA1B* и *HSPA6* в РВМС и PMN. Этот результат, как и другие результаты, полученные на PMN стоило подробнее обсудить в работе, и объяснить возможные причины и последствия такого явления. 9). Известны ли статистические данные по заражению CMV среди пациентов с болезнью Паркинсона в российской популяции? Безусловно набрать достаточно представительные выборки пациентов всегда не просто. Автор в достаточной степени учла отсутствие группы CMV-негативных пациентов с БП. Однако наличие такой группы украсило бы исследование.

3. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный. Принципиальных замечаний по диссертации нет. Остается непонятным, почему активность генов и внутриклеточное содержание HSP70 были проанализированы в периферических мононуклеарах, а не в популяции Т-лимфоцитов, субпопуляционные особенности которых были выявлены у пациентов с БП. Также можно отметить некоторые недочеты. В частности, отсутствует единое обозначение цитомегаловируса: CMV в тексте, но на рисунке 15 ЦМВ. Кроме этого, обозначения субпопуляций Т-лимфоцитов T_{CM} , T_{EM} и T_{EMRA} встречаются без учета регистра, а на рисунке 14 T_{CM} , T_{EM} обозначены как CM и EM. Однако, недочеты и стилистические неточности не умаляют ценности диссертационной работы.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области молекулярной биологии и иммунологии, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих российских и международных журналах. В ведущей организации - ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА – ведутся исследования в области иммунологии,

механизма клеточного иммунитета. Официальный оппонент Гужова Ирина Владимировна является ведущим специалистом в области молекулярной биологии, имеет многочисленные публикации о роли молекулярных шаперонов, в частности БТШ70, в функционировании клеточного протеостаза. Официальный оппонент Лебедева Ольга Сергеевна является специалистом в области исследования молекулярных механизмов наследственных нарушений центральной нервной системы человека, в том числе болезни Паркинсона, с помощью клеточных моделей. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований было показано увеличение транскрипционной активности стресс-индуцируемых генов *HSPA*, кодирующих белки-шапероны Hsp70 в мононуклеарных клетках крови на фоне БП. Впервые было обнаружено увеличение содержания основного белка аутофагии p62 в РВМС и выявлена положительная взаимосвязь между содержанием p62 в этих клетках и уровнем их спонтанного апоптоза. Выявлена диагностическая значимость комбинации уровня белка p62 и мРНК гена *HSPA6* для выявления БП. Установлено, что в периферической крови пациентов с БП снижено процентное содержание Т-клеток с признаками иммуностарения, а именно, терминально дифференцированных CD56–CD57+ Т-лимфоцитов и доли эффекторных Т-клеток памяти, повторно экспрессирующих CD45RA (TEMRA). Диссертантом впервые было показано, что болезнь Паркинсона ассоциирована с увеличением экспрессии гена *HSPA6* и внутриклеточного белка p62 в РВМС, а комбинация этих показателей может рассматриваться как потенциальный периферический биомаркер развития БП, использование которого в клинической практике может расширить существующие подходы в диагностике и анализе течения данного заболевания.

Теоретическая значимость исследования заключается в расширении существующих представлений об изменениях протеостаза в клетках периферической иммунной системы при БП. Изучен популяционный состав лейкоцитов периферической крови пациентов с БП и, на основании полученных данных сделан вывод о том, что предположительно, развитию БП может способствовать клеточный иммунный ответ, формирующийся при предшествующих или сопутствующих вирусных инфекциях.

Обнаруженное диссертантом снижение содержания Т-клеток с признаками иммуностарения в периферической крови пациентов с БП, может помочь определить направление дальнейших исследований аномалий периферической иммунной системы при нейродегенеративных заболеваниях.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что обнаруженные диссертантом различия по уровню экспрессии мРНК гена *HSPA6* и внутриклеточного содержания p62 могут рассматриваться как потенциальные периферические биомаркеры развития БП, использование которых в клинической практике может расширить существующие подходы к диагностике и к анализу течения данного заболевания. К тому же,

выявленные диссертантом изменения в периферических иммунных клетках у пациентов с БП, могут помочь определить направление дальнейших исследований аномалий иммунной системы при нейродегенеративных заболеваниях.

Достоверность результатов исследования сомнений не вызывает: исследования проводились с использованием современных научных методов, экспериментальные данные были получены с использованием сертифицированного оборудования, воспроизводимость результатов неоднократно продемонстрирована, при анализе данных были использованы современные методы сбора и обработки информации

Личный вклад Вавиловой Юлии Дмитриевны заключается в непосредственном участии в выборе направления научной работы, разработке цели и задач исследования по теме диссертационной работы. Соискателем проведены эксперименты по оценке распределения популяций Т-лимфоцитов и NK-клеток с помощью метода проточной цитометрии в РВМС пациентов с БП здоровых добровольцев, а также оценка CMV статуса всех участников исследования. Вавиловой Ю.Д. были получены данные о внутриклеточном содержании белка p62 в РВМС в сотрудничестве с главным научным сотрудником лаборатории регуляторной транскриптомики, д.б.н., Ажикиной Т.Л., был проведен анализ базовой транскрипционной активности генов *HSPA* методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Сбор образцов РВМС проводился в сотрудничестве с научным сотрудником научного центра неврологии, д.м.н. Пономаревой Н.В. и сотрудником федерального клинического центра им. А.И. Бурназяна, к.м.н. Бриль Е.В. Кроме того, Вавилова Ю.Д. занималась обработкой и интерпретацией полученных экспериментальных данных и подготовкой материалов научных публикаций по теме диссертационной работы.

Диссертационный совет 24.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Вавиловой Юлии Дмитриевны является законченной научно-квалификационной работой, посвященной важным аспектам молекулярной биологии и иммунологии – изучению популяционного состава иммунокомпетентных клеток периферической крови и характеристик системы шаперон-зависимого гомеостаза и аутофагии в этих клетках у пациентов с болезнью Паркинсона.

Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3. – Молекулярная биология. Таким образом диссертационная работа Вавиловой Юлии Дмитриевны «Изменение популяционного состава и характеристик системы шаперон-зависимого гомеостаза у циркулирующих клеток иммунной системы при развитии болезни Паркинсона» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; № 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539).

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания:

1. Не могли бы вы сделать один общий вывод, что вы считаете сделали самое главное, самое мощное, самое перспективное в вашей работе?
2. Есть ли шансы лечить болезнь Паркинсона?
3. Известно, что триггером болезни Паркинсона являются различные вирусные инфекции, анализировали ли вы каким-то образом что было в анамнезе тех пациентов, у которых вы анализировали те или иные показатели, что послужило причиной? Были ли у вас данные о том, что предшествовало развитию этого заболевания?
4. Поскольку одна из целей – поиск биомаркеров для ранней диагностики, но ведь пациент обратится тогда, когда у него появится симптоматика, то есть гипокинезия, тремор и так далее, до этого он не придет. Какова практическая значимость поисков этих биомаркеров для ранней дифференциальной диагностики, как вам кажется?
5. Транскрипционная активность возрастает, а изменения внутриклеточного содержания белков нет, как вы можете это объяснить?
6. С кем вы работали, с какой больницей?

Соискатель Вавилова Ю.Д. ответила на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию.

1. Выявление таких показателей как экспрессия мРНК HSPA6 и внутриклеточное содержание белка p62 вместе может использоваться в дальнейшем как потенциальный биомаркер. Это важно, и я считаю, что нужно в дальнейшем изучать на более расширенных выборках. И что иммунный профиль пациентов с болезнью Паркинсона явно отличается от нормального и это тоже стоит в дальнейшем изучать, тоже интересный перспективный момент.
2. Конечно, есть.
3. Не известно, что является первоначальным, нейровоспаление в головном мозге, повреждение нейронов, либо что-то происходит на периферии, какое-то воспаление. Случаи болезни Паркинсона в нашей выборке были спорадическими, идиопатическими. Это значит, что они случайны, без анамнеза в семье, то есть не генетически опосредованы и идиопатические, то есть этиология болезни Паркинсона в нашей выборке была не известна.
4. Диагноз ставится, действительно, на основании клинических симптомов и это, как правило до 80% нейронов уже может погибнуть к этому времени. В настоящее время в литературе ведется огромный поиск биомаркеров, это и альфа-синуклеин в плазме, это различные биохимические маркеры. Я считаю, что нужно найти и верифицировать на огромной выборке пациентов, сначала, конечно же у тех, у которых был поставлен диагноз болезни Паркинсона и в дальнейшем использовать как скрининг здорового населения.
5. Дело в том, что при измерении внутриклеточного уровня белков HSP70 были использованы коммерческий клон антител bgm-22, который распознает весь пул белков теплового шока, то есть как конститутивные, так и стресс-индуцированные, а на уровне мРНК мы задетектировали только повышение мРНК стресс-индуцированных генов. Так как конститутивный белок теплового шока в клетке превалирует, то за счет антител bgm-22, мы обнаружили в основном этот белок, потому что стресс-индуцируемый находится в следовых количествах и его задетектировать сложно методом проточной цитометрии. Измерение транскрипционной активности является более чувствительным методом, поэтому здесь нам удалось их задетектировать.
6. Научный центр неврологии и центр Бурназяна.

На заседании 7 июня 2023 года диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по изучению изменений популяционного состава и характеристик системы шаперон-зависимого гомеостаза у циркулирующих клеток иммунной системы при развитии болезни Паркинсона присудить Вавиловой Юлии Дмитриевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 8 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 - Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета



академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

7 июня 2023 г.