

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01
на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
26 февраля 2020 года

Защита диссертации
на соискание учёной степени кандидата биологических наук
Егорова Евгения Станиславовича
**Возрастные изменения в структуре репертуаров Т-клеточных рецепторов наивных
Т-лимфоцитов**
специальность: 03.01.03 — молекулярная биология

Москва — 2020

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 26 февраля 2020 года.

Председатель диссертационного совета д.х.н., академик РАН **Иванов В.Т.**

Учёный секретарь диссертационного совета д.физ.-мат.н. **Олейников В.А.**

Из 30 членов совета присутствует 20 человека, из них докторов по профилю диссертации – 5.

1.	Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
3.	Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
4.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
5.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6.	Академик РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
7.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
8.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
9.	Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
10.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
11.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
12.	Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
13.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(02.00.10)
14.	Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
15.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
16.	Академик РАН	Свердлов Евгений Давидович	(03.01.03)
17.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
18.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
19.	Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)
20.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(02.00.10)

Иванов Вадим Тихонович: Мне кажется, мы готовы к продолжению нашей работы. Речь идёт о защите диссертации Евгением Станиславовичем Егоровым. Владимир Александрович, материалы личного дела, как обычно. Прошу.

Олейников Владимир Александрович:

(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечает, что материалы личного дела и документы предварительной экспертизы соответствуют требованиям Положения ВАК)

Да, материалы личного дела. Егоров Евгений Станиславович, Российская Федерация. Окончил Московский государственный университет имени Ломоносова по специальности «биохимия» в 2014-м году. С 14-го по 18-й проходил обучение в очной аспирантуре ИБХ РАН, нашего института. С 14-го по 16-й год техник-лаборант, с 16-го по настоящее время – научный сотрудник в группе структурной организации Т-клеточного иммунитета отдела геномики адаптивного иммунитета ИБХ РАН. Кандидатский экзамен по специальности «молекулярная биология» сдан с оценкой «отлично». Работа выполнена в группе структурной организации Т-клеточного иммунитета отдела геномики адаптивного иммунитета ИБХ РАН. Научный руководитель диссертационной работы Британова Ольга Владимировна, это Институт биоорганической химии. Научный консультант диссертационной работы – Дмитрий Михайлович Чудаков. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите, автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 9 декабря 19-го года. И все необходимые документы в деле имеются.

Иванов Вадим Тихонович: Интересуюсь, есть ли вопросы, замечания по поводу того, что мы услышали? Всё понятно, всё ясно. И всё корректно. Тогда слово диссертанту. Евгений Станиславович, 20 минут. Постарайтесь уложиться.

Егоров Евгений Станиславович:

(Излагает основные положения диссертационной работы)

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо за доклад, точно 20 минут. Переходим к обсуждению. Вопросы. Прошу.

Долгих Дмитрий Александрович: Скажите, пожалуйста, не совсем понял одну деталь. На одном из Ваших слайдов было показано, что Вы свои результаты объединили с результатами других авторов, у которых несколько худшая статистика. Там у них 9 пациентов, у Вас 13. То есть Вы не стали сравнивать свои данные, а просто объединили и на основании этого проводили какой-то анализ? Это просто для увеличения статистики? Такой приём всё-таки используется не часто. Те же авторы тоже сделали какие-то выводы. Вот если из Ваших отдельно взятых данных сделать выводы? Сделать выводы и сравнить с выводами той работы, вот не могли бы Вы пояснить – почему делалось именно так?

Егоров Евгений Станиславович: Хорошо. Спасибо за дельный, очень правильный вопрос. Действительно мы пулировали эти данные. Объединили вместе с нашими для увеличения статистики нашей работы, но, естественно, мы также отдельно проанализировали эти два набора данных – наших и наших коллег. И тренды там были те же самые. Я ответил на Ваш вопрос?

Долгих Дмитрий Александрович: Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Если будет желание как-то поставить под сомнение, у нас будет общая дискуссия, поэтому будет такая возможность. Есть ещё вопросы? Прошу Вас, Александр Габибович.

Габибов Александр Габибович: Да, спасибо большое за очень интересное сообщение, к которому мы, в общем-то, привыкли морально. Скажите, пожалуйста, а вот в случае таких воспитаний, как суперантиген, когда попадается суперантиген, как Вы будете учитывать это? Потому что скажется или константной, или по какой-то функции на Ваши выводы. Вы же знаете, как суперантиген взаимодействует с Т-клетками?

Егоров Евгений Станиславович: Вот в таком случае, естественно, нужно будет проводить коррекцию, особенно это касается...

Габибов Александр Габибович: Вот с ходу мне было бы трудно предложить метод, но, наверное, он у Вас есть.

Егоров Евгений Станиславович: Здесь всё-таки у нас учитываются средневзвешенные все вот эти характеристики. То есть они у нас отдельно анализируются для каждого V-генного...

Габибов Александр Габибович: Но там же Вам придётся учитывать и взаимодействие с константной частью. А суперантигены, как в случае... Ну вот самые, один из самых известных на слуху – это gp120, в общем, влияющий существенно на общий репертуар ответа. Он, в общем, может сильно исказить картину.

Егоров Евгений Станиславович: Да, Вы, возможно, правы. Безусловно, правы. Но в таком случае, конечно, поскольку наш анализ касается исключительно CDR3 третьего региона, будет внесена некоторая погрешность в наши данные. Но здесь все данные были проанализированы средневзвешено, то есть с учётом общей доли тех или иных переменных генных сегментов относительно общего пула. То есть учитывалось не только разнообразие, но и их представленность внутри нашего репертуара.

Габибов Александр Габибович: Наверное, с какими-то весами можно будет.

Егоров Евгений Станиславович: Да, если величина этого суперантигена будет представлять какие-то существенные доли, тогда да.

Иванов Вадим Тихонович: Продолжаем с вопросами. Или они иссякли? Не вижу больше желающих задать вопросы. Спасибо. Переходим к заслушиванию отзывов. Начинаем мы... Да, прошу прощения, перед тем, как заслушать отзыв, я должен дать слово научному руководителю для характеристики диссертанта. Прошу.

Британова Ольга Владимировна: Добрый день, уважаемые коллеги, члены учёного совета. В далёком 2014-м году Евгений Станиславович пришёл в нашу лабораторию для выполнения курсовой работы. И далее это перешло в успешную защиту дипломного проекта, методическая часть которого легла в основу предлагаемой диссертации. Надо сказать, что научный проект Евгения Станиславовича был поддержан индивидуальным грантом СКОЛТЕХа. И за всё время работы Евгения Станиславовича в нашей лаборатории, он показал себя как чрезвычайно аккуратный сотрудник, критически оценивающий полученные результаты. Более того, Евгений Станиславович активно обучает студентов и сотрудников, желающих научиться работе на клеточном сортере. Не могу не отметить потрясающие способности Евгения Станиславовича систематизировать данные и не только. Он способствовал во многом внедрению в нашей лаборатории рациональной системы хранения и учёта реактивов, что вообще в целом важно для работы всего научного коллектива. Спасибо за внимание.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. У нас ещё есть научный консультант. Но в порядке защиты отсутствует соответствующее возможное выступление специальное. У нас будет дискуссия. И если будет желание консультанта выступить, у Вас будет такая возможность. А сейчас давайте послушаем, что у нас с заключением организации, где работа выполнялась. И что сказала ведущая организация.

Олейников Владимир Александрович:

(излагает заключение организации)

Во-первых, заключение организации. Выполнялась работа в нашем институте. В Институте биоорганической химии. Опять же, значит, в заключении традиционно, заключение начинается с неких биографических данных Евгения Станиславовича, когда он пришёл в институт, как он работал и где. Это то, что было в личном деле оглашено в самом начале. Тема диссертации утверждена на заседании учёного совета нашего института 1 октября далёкого 14-го года. Как было сказано – далёкого. Да. Цель диссертационной работы: исследование изменений, наблюдаемых внутри репертуаров Т-клеточных рецепторов тотальных и сортированных наивных популяций Т-клеток доноров разного возраста.

Далее отмечается, что конкретно сделано. В основном то, что мы слышали. В данной работе автором на основе технологии 5'-RACE и молекулярного баркодирования был разработан метод качественного нормированного анализа репертуара TCR, подтвердивший свою эффективность, в том числе, в экспериментах с небольшим стартовым числом (несколько сотен клеток) в ситуации, когда классические методы анализа оказывались малоприменимы и сопряжены с большими потерями материала. С использованием были проанализированы тотальные Т-клеточные репертуары Т-лимфоцитов периферической крови доноров разного возраста. И, в общем, достаточно подробно изложено то, что было сделано.

Личный вклад Егорова. Он заключается в планировании проведения экспериментов, обработке анализа полученных данных, в подготовке результатов к публикации. Основные результаты экспериментальные были получены лично соискателем. Разработан и оптимизирован метод анализа репертуара Т-клеточных рецепторов. Для небольшого стартового числа клеток, приготовлены, секвенированы и проанализированы кДНК библиотеки Т-клеточных репертуаров доноров различного возраста и другое.

Диссертация написана согласно требованиям, установленным ВАКом. Результаты работы полностью изложены в 7 научных статьях, опубликованных в ведущих отечественных и международных журналах. И признаётся, что эта диссертация соответствует диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности «молекулярная биология». Заслушана на открытом заседании отдела геномики адаптивного иммунитета нашего института. Результаты голосования: единогласно «за». Присутствует там 21 человек. Подписано Мерзляк Екатериной Марковной – это кандидат биологических наук, научный сотрудник группы структурной организации Т-клеточного иммунитета. И замдиректора института Ямпольским. Утверждено заключение директором нашего института академиком Александром Габировичем Габировым. Это что касается заключения организации.

(Излагает отзыв ведущей организации. Отзыв положительный).

Теперь отзыв ведущей организации, коей является ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России». И актуальность темы диссертационной работы – тут уже в основном всё

прозвучало. Речь об иммунитете, который является важнейшей системой организма человека, поддерживающего физиологический и генетический гомеостаз. Опять же, речь идёт о возрасте. Во многом именно снижение эффективности приводит к повышению риска развития тяжёлых инфекционных и онкологических заболеваний у пожилых людей. И направленность вот эта, конечно же, актуальна, важна, и соответственно вот это здесь отмечается.

Соответствие темы научной специальности – соответствует. Основные результаты диссертационной работы, их достоверность. Здесь отмечается: предметом исследования в диссертационной работе Егорова стала структура популяции наивных Т-клеток у доноров различного возраста.

Цель работы заключалась в исследовании возрастных изменений в репертуарах бета-цепи Т-клеточных рецепторов методом высокопроизводительного таргетного секвенирования с применением технологии молекулярного баркодирования. В ходе исследования был разработан простой и надёжный подход, позволяющий анализировать репертуары иммунных клеток, в том числе, при небольших количествах стартового материала.

Научная новизна. Разработан автором новый метод анализа иммунных репертуаров на основе молекулярных баркодов. Особенностью разработанного метода является возможность работы с небольшим стартовым количеством целевых клеток.

Вот здесь отмечено: впервые с помощью разработанного метода проанализированы возрастные изменения тотальных репертуаров Т-клеток и репертуарах их функциональных субпопуляций.

Теоретическая значимость работы определяется комплексным анализом состояния Т-клеточного звена иммунитета у людей различных возрастных групп.

И далее научно-практическая значимость работы подчёркивается тем, что разработана технология подготовки фрагментов кДНК, несущих в своём составе молекулярный баркод, который в дальнейшем может служить уникальной меткой конкретного Т-лимфоцита. И создание такой технологии позволяет с высокой точностью характеризовать структуру популяции Т-лимфоцитов, представленность различных клонов, определять конкретную специфичность и вовлечённые в патогенез иммунозависимых заболеваний. Разработанный метод открывает принципиально новые возможности развития персонализированной медицины, и может быть использован при создании тест-систем, направленных на повышение эффективности иммунотерапии и вакцинопрофилактики.

Общая характеристика диссертационной работы. Она написана в традиционном стиле. Как обычно – введение, обзор литературы, описание целей и далее.

Библиографический список включает 183 источника. Объём диссертации 115 страниц машинописного текста. Далее конкретно по главам указывается – что, где было изложено. И автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

Ну и в заключении говорится, что диссертация Егорова Евгения Станиславовича «Возрастные изменения в структуре репертуаров Т-клеточных рецепторов наивных Т-лимфоцитов» является научно-квалификационной работой, в которой решены важные задачи. Диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Далее чётко изложены все положения, номера и даты этих положений. А её автор достоин присуждения искомой учёной степени кандидат биологических наук по специальности «03.01.03 – Молекулярная биология». Отзыв

соответствующий утверждён на заседании отдела иммуногенетики человека Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии»». Составил исполняющий обязанности заведующего лаборатории молекулярной иммуногенетики доктор биологических наук Кофиади. И, соответственно, утверждён директором ФГБУ этого института, членом-корреспондентом РАН, профессором Хаитовым. Без замечаний.

Иванов Вадим Тихонович: Да, я не слышал замечаний, поэтому незачем в отдельности отвечать на данный отзыв, что несколько экономит наше время. А есть отзывы на автореферат? Или какие-то другие?

Олейников Владимир Александрович: Нет. Отзывы на автореферат отсутствуют.

Иванов Вадим Тихонович: Тогда мы переходим к заслушиванию официальных оппонентов. Сначала Дмитрий Борисович Казанский, доктор биологических наук, Онкоцентр имени Блохина.

Казанский Дмитрий Борисович:

(излагает отзыв, отзыв положительный)

Уважаемые коллеги! Первое, о чём мне хочется сказать, глядя на эту работу. Главное, что вы видите, какое широкое распространение получила индустрия моноклональных антител. Т-клеточные рецепторы в отношении молекулярной биологии принципиально почти одно и то же. Но такого широкого распространения и практического применения это не получило. Почему? Первое – это, естественно, то препятствие, что Т-клетки антигены напрямую не распознают. Они взаимодействуют с молекулами главного комплекса гистосовместимости. Их разнообразие требует персонализации подхода.

Вторая сложность. Все Т-клетки разные. Вы берёте одну клетку, у неё одна структура Т-клеточного рецептора. Берёте другой Т-лимфоцит, у него другая. У третьего – третья. Для того, чтобы их идентифицировать как структуру конкретного рецептора, вам приходится вырастить из одной клеточки клон или получить гибридому, при этом там активируя соответствующие комбинации МНС-пептид. И только после того, как вы нарастили, у вас появляется возможность достоверно определить физико-химические свойства и последовательность Т-клеточного рецептора. Либо вам приходится вслепую из одной клетки полимеразно-цепной реакцией амплифицировать эти последовательности, и доставать их. Это очень сильно тормозит работу, делает её чрезвычайно дорогой, неэффективной, тяжёлой и сложной.

И вот, собственно говоря, работа, которую вы сегодня выслушали, это продолжение той замечательной серии работ, которая была положена в группе Дмитрия Михайловича Чудакова, которая эту проблему решает. И вы можете в один присест, сразу, анализируя сложную популяцию Т-лимфоцитов, получить среднюю информацию о структуре Т-клеточных рецепторов. После чего у вас становится возможным уже все молекулярно-биологические подходы для того, чтобы рецепторы заполучить в руки непосредственно.

Второй момент, который мне кажется важным. Именно то, что Т-клеточные рецепторы играют большую роль в физиологии Т-лимфоцитов, этот момент сейчас неосознаваемый, большей частью. И крайне недооценённый. Имея некоторую практику по работе с трансдукцией цепей в Т-клеточных рецепторов, мы постоянно видим, как серьёзно и существенно, если трансдукция влияет на физиологическое состояние Т-клеток, на их способность к делению, на активационный фенотип. Вот те фенотипы, о которых сегодня говорил диссертант. Ведь, по сути дела, они выстраиваются на основе спектра активационных молекул. Но, простите, господа, а Вы уверены, что телега и лошадь

находятся именно на своих местах и так, как мы их видим? И клетки памяти приобретают активационный фенотип после взаимодействия с антигеном. Когда мы получили трансгенную линию мышей с рецепторами в клетках памяти, мы поняли, что это может быть и не так, потому что мыши без всякого антигена, которые несли трансген такого рецептора, приобретали фенотип клеток, которые называются central memory cells. Работа проникает в самые основы иммунологии, в самые основы представлений, в закореневшие стереотипы восприятия действительности. Она задаёт вопросы, а, самое главное, даёт нам в руки инструмент для анализа, которого раньше мы не имели, ни у кого не было. Касательно самой работы, что хочется сказать?

Актуальность очевидна. Степень обоснованности научных положений. В общей сложности автором было проведено обследование 83 здоровых доноров и 8 образцов пуповинной крови. Здесь первое замечание, которое в общем небольшое, и не носит принципиального характера. В диссертации приведена практическая табличка. Доноры, возраст, их количество. Вообще, когда клинический материал обследуется, хорошим тоном считается, рассказать о критериях исключения и включения. И тогда там был бы учтён вопрос, который задал Александр Габирович. А если кто-то из этих доноров перенёс тяжёлое пищевое отравление перед тем, как у него взяли кровь? А если у него лимфоциты проактивированы стафилококковыми энтеротоксинами? Знают, просто переносил донор такие воздействия или нет, а мы могли бы исключить из анализа тех, у кого репертуар В-клеток, репертуар бета-цепей Т-клеток мог бы быть нарушен. Необходимо такую более подробную характеристику там этого давать. Но работа не носит такого прямо клинического характера. Я думаю, этот недостаток вполне можно диссертанту простить.

Научная новизна и значимость исследования. Научная новизна абсолютна в силу методического подхода диссертанта и коллектива, в котором он работает. Они являются, безусловно, мировыми лидерами в этом направлении. И направление это, я бы взял на себя смелость утверждать, осуществило настоящий прорыв в иммунологии. Автором впервые охарактеризован репертуар Т-лимфоцитов и их субпопуляции у пациентов различного возраста с применением оригинального метода, позволяющего сделать это на молекулярном уровне. Я не буду останавливаться подробно на оценке структуры, содержания и оформления диссертации, поскольку, по-моему, это сделали хорошо в отзыве ведущей организации. Поэтому, если позволите, я опущу описание.

Ремарка и то, на что мне хочется получить ответ на вопрос. Результаты интересные были получены автором в ходе исследования динамики Т-клеточных репертуаров у пациентов различного возраста. В пуповинной крови новорождённых он обнаружил высокий процент нефункциональных молекул TCR бета, то есть бета-цепей матричной РНК, которых содержит стоп-кодона или находится вне рамки считывания. Автор связывает это 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 может быть объяснено сниженным клиренсом апоптотических Т-лимфоцитов, не прошедших процессы бета-селекции в условиях относительной избыточности пролиферативных и селекционных процессов, идущих в тимусе в процессе раннего развития.

Дальше ещё один там был дискуссионный момент. Я полагаю, что диссертант несколько увлекается, утверждая, что использованная им технология баркодирования позволяет

идентифицировать пары альфа и бета цепей Т-клеточных рецепторов, принадлежащих одному клону. Для олигоклональных популяций, очевидно, что это, наверное, будет так. Но вряд ли жизнь будет настолько милосердна к исследователю, чтобы постоянно давать ему олигоклональные популяции. Вероятнее всего, вы будете иметь сложные смеси порядка тысяч и десятков тысяч различных клонов, число которых может существенно и не отличаться. И необходимо будет очень тщательно подбирать контроль для того, чтобы идентифицировать нужные из них. И там, я думаю, работа может сильно усложниться. Свою уверенность Вы основывали на исследовании клона Slec1, обнаруженного у больного анкилозирующим спондилитом, у которого, как Вы написали, экспрессируются две бета-цепи, одна из которых является нефункциональной. Строго говоря, из биологии клеток у генов бета-цепей есть жёсткое аллельное исключение. Поэтому в одном Т-лимфоците экспрессироваться может только одна бета-цепь. По альфа-цепям такого ограничения нет. И если прошла продуктивная реаранжировка генов в Т-клеточных рецепторах, то у вас возможно существование Т-клеток, у которых 2 Т-клеточных рецептора. Но оба они должны будут содержать одну бета-цепь. Мне кажется, что в Вашем случае, у вас всё-таки на руках был не клон, а достаточно сложная смесь, там по какой-то причине был источник, в котором были клетки всё-таки с разными бета-цепями. Вот об этом я хотел у Вас спросить и получить ответ на этот вопрос.

Дальше. Ну естественно эта работа очень активной творческой группы. Творческого коллектива. Очень часто в таких работах будут какие-то моменты, на которых спотыкаемся. Где-то что-то не так услышал, где-то какие-то опечатки, где-то неудачно сказанная фраза. Конечно, это присутствует в этой работе тоже. Но я бы не стал на этом останавливаться подробно. И хочу дать общее заключение, поскольку все эти моменты, недостатки принципиального значения не имеют. Диссертационная работа Егорова Евгения Станиславовича «возрастные изменения в структуре репертуара Т-клеточных рецепторов наивных Т-лимфоцитов», представленная на соискание учёной 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 пункта 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2015-го года №842 с изменениями в редакции Постановления Правительства Российской Федерации №335 от 21 апреля 16-го года, №748 от 2 августа 16-го года, №1024 от 28 августа 17-го года и №1168 от 1 октября 2018-го года, предъявляемым к диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности «03.01.03 – Молекулярная биология». Спасибо за внимание.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. В своём объёмном отзыве Дмитрий Борисович поднял несколько вопросов, я так понимаю, на которые ожидаются ответы диссертанта.

Егоров Евгений Станиславович: Спасибо, Дмитрий Борисович, за замечательный отзыв. И что касается вопросов. Давайте начнём с первого. Конечно, справедливо замечание, и действительно это стоит исследовать, в дальнейшем проверить. Мы, как

нам показалось, предположили, сделали изящное такое заключение на основании того, вернее, выдвинули предположение, о чём я говорил про высокое количество нефункциональной мРНК, что известно, что данная система чувствительна к уровню кислорода в крови. И также мы нашли работы, где было показано, что плод во время перинатального периода развития, там концентрация кислорода чуть ниже, поэтому мы выдвинули предположение, что действительно это могло быть связано с гипоксией, во-первых, а второе, конечно, как правильно заметил Дмитрий Борисович, могло быть связано просто с незрелой системой во время пренатального периода развития.

Что же касается второго вопроса про идентификацию нативных пар альфа и бета цепей, наш метод, разумеется, предполагает использование олигоклональных образцов в первую очередь. Потому что в сложной смеси, содержащей десятки, сотни, тысячи, сотни тысяч клонотипов, такая идентификация, безусловно, многократно усложняется. А наш метод предполагает предсказание пар, которые, естественно, в дальнейшем нужно на основе транскриптомики с единичных клеток, либо какую-то цитометрию за специфичные тетрамеры нужно отдельно выцеплять и сортировать, анализировать эти данные. Наш метод основывается на стохастическом спаривании вот этих цепей во многих репликах. То есть если у нас один и тот же клон, вернее, альфа и бета цепь встречаются во многих репликах или не встречаются, вот у нас было 8 реплик, но их может быть там 5, 10, больше. Там, где встречается альфа и встречается бета на одинаковом уровне, или если она не встречается, скорее всего, это один и тот же клон. Если у нас часто мы видим, когда у нас встречается лишь альфа, а бета нет, то, наверное, несмотря на то, что это частоты у данных фрагментов совпадают, скорее всего, это представители разных клонотипов.

Что же касается клона Slec1, то да, возможно, в результатах было не совсем понятно описано, здесь вот отдельный слайд, здесь, естественно, под клоном Slec1, содержащим две последовательности мРНК, мы под нефункциональной последовательностью, она здесь бледно-красным цветом выделена, подразумевали, естественно, экспрессию транскрибированного фрагмента, который содержал стоп-кодон в своей последовательности. Вот.

Иванов Вадим Тихонович: Всё у Вас, да?

Егоров Евгений Станиславович: Да.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Мы двигаемся дальше. К сожалению, второй официальный оппонент не смог прибыть к нам на защиту, но он оставил нам свой отзыв, с которым ознакомит Владимир Александрович.

Олейников Владимир Александрович:

(излагает отзыв, отзыв положительный)

Я представляю отзыв официального оппонента, это Касьянов, кандидат физико-математических наук, он отсутствует по каким-то своим рабочим моментам. Отзыв полностью положительный. Опять же, по поводу актуальности он пишет: «Иммунная система является одной из ключевых компонентов живого организма. Благодаря своей возможности с высоким уровнем специфичности распознавать инфекционные и опухолевые агенты, она является ключевым фактором защиты живого организма от факторов среды. К сожалению, она также подвержена процессам старения. Ключом к пониманию процессов старения может стать изучение популяции наивных Т-клеток, характеризующихся крайне разнообразным репертуаром Т-клеточных рецепторов. Данной проблеме как раз посвящена работа Евгения Станиславовича». И далее он

пишет, что кроме достаточно интересной биологической проблемы, решаемой в ходе выполнения диссертационной работы, автором был предложен достаточно эффективный метод изучения репертуаров Т-клеточных рецепторов, основанный на УМІ (уникальных молекулярных идентификаторов). Как известно, основной проблемой современных методов высокопроизводительного секвенирования при изучении количественных характеристик изучаемого набора ДНК последовательностей, является необходимость ПЦР амплификаций исходного материала. Данная процедура вносит сильные искажения, не позволяет точно судить о частоте встречаемости той или иной нуклеотидной последовательности в организме. А вот этот метод уникальных молекулярных идентификаторов как раз и призван исправить данную ситуацию.

Диссертационная работа построена по классической схеме. Это уже неоднократно мы здесь сегодня слышали. Обзор литературы, необходимый обзор информации даёт обзор литературы. И позволяет достаточно полно, этот обзор отражает спектр данных, которые представлены в работе.

Раздел результатов. Их обсуждение состоит из трёх частей. В первой части автор даёт описание разработанного им метода анализа иммунных репертуаров на основе уникальных молекулярных идентификаторов. Во второй части автором было проведено изучение возрастных изменений в тотальных Т-клеточных репертуарах. Была показана высокая стабильность периферического Т-клеточного репертуара человека, значительная часть крупных клонотипов, занимающих не менее половины репертуара взрослого здорового донора сохраняет свои частоты на протяжении как минимум трёх лет. И, наконец, третий раздел. Приводятся результаты анализа CDR3 и TCR бета репертуаров наивных CD4 и CD8 клеток периферической крови для доноров в двух возрастных группах. Опять же, мы всё это видели, и слышали результаты в форме выводов. И поэтому я сейчас остановлюсь на том, что оппонент пишет по недостаткам.

Диссертационная работа не лишена ряда недостатков.

Первое. В тексте диссертации полностью отсутствует информация о том, каким образом происходила первичная обработка данных секвенирования. А именно – проводился ли какой-нибудь тримминг, удаление адаптерных последовательностей и так далее, и тому подобное.

Второе. В тексте диссертации проводится сравнение с программой MiTCR, которая проводит первичный биоинформатический анализ без учёта вот этого метода УМІ. Очевидно, что читатель может ознакомиться в посвящённой ей статье с её устройством, но для облегчения текста хотелось бы, чтобы автор дал небольшую характеристику применяемых там методов.

В литературном обзоре не уделяется должного внимания существующим методам биоинформатического анализа репертуаров Т-клеточных рецепторов. И в связи с тем, что существенная часть работы посвящена новой методике, как на молекулярно-биологическом уровне, так и на биоинформатическом. Читателя следовало бы ввести в курс дела.

Четвёртое. В работе показана зависимость разнообразия репертуара Т-клеточных рецепторов от возраста индивида. Интересно было бы понять, возможно решить обратную задачу? А именно на основе данных о разнообразии репертуаров Т-клеточных рецепторов установить возраст. Эти замечания, однако, не снижают хорошего впечатления от работы, носят характер пожеланий и технических замечаний.

И, наконец, диссертационная работа Егорова Евгения Станиславовича соответствует требованиям, предъявляемым ВАК Российской Федерации к кандидатским диссертациям. Диссертация полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присвоении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 13-го года №842 с соответствующими изменениями, которые были в более поздние годы. И требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а её автор заслуживает присвоения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности «03.01.03 – Молекулярная биология».

Официальный оппонент старший научный сотрудник лаборатории №19 Института проблем передачи информации имени Харкевича Российской академии наук, кандидат физико-математических наук Касьянов.

Ну были замечания.

Иванов Вадим Тихонович: Понятно. Евгений Станиславович, хотелось бы услышать Ваши ответы на замечания.

Егоров Евгений Станиславович: На самом деле, первые три замечания, по сути, представляют собой одну и ту же проблему, касающуюся того, что касательно описания методов предварительной обработки данных секвенирования. Если в должной степени, конечно, описывать все эти данные, а не указывать просто ссылки на какие-то предыдущие наши работы, то объём диссертации увеличился бы, наверное, двукратно, если не больше. Но если говорить про какую-то предварительную обработку данных, естественно, она проводилась. То есть, разумеется, у нас учитывались, в анализе мы оценивали качество полученных нами ридов секвенирования. То есть, мы отфильтровывали риды плохого качества, где были точно не уверены, правильно ли там были указаны нуклеотиды. Конечно же, мы удаляли адаптерные последовательности как вот наши молекулярные баркоды, так и адаптерные последовательности Illumina. Данные риды мы выравнивали на известные базы данных, данных переменных J-генных сегментов, VDJ, если мы для бета-цепей говорим. Потом мы их мёрджили, соединяли. И там смотрели изменения, наблюдаемые в CDR3 репертуарах. Естественно, у нас была проведена предварительная оценка наших данных.

Что касается последнего вопроса, который затрагивает идентификацию, можно ли с помощью данных репертуаров определить статус пациента относительно молодость или старость – да, ранее в работах было показано, что это как раз-таки касается работы наших коллег, что они анализировали репертуары. Вот эта работа, данные из которой мы тоже использовали в своём анализе. Они в первую очередь оценивали разнообразие наивных репертуаров и показали, что разнообразие репертуаров не только тотальных, которые делали мы, и делали другие коллеги, оно для тотальных репертуаров – также снижается с возрастом общее разнообразие. При этом увеличивается, происходит экспансия оставшихся полнотипов. И данное наблюдение может быть использовано как некий маркер статуса эффективной защиты адаптивного иммунитета организма. Пожалуй, всё.

Иванов Вадим Тихонович: Отлично.

Егоров Евгений Станиславович: Да, но стоит заметить, единственное замечание хотел бы сделать. Для этого нужна очень хорошая глубина определённого секвенирования, что немаловажно при дальнейшем анализе. Та или иная анализируемая молекула кДНК

должна получить должное количество прочтений на одну и ту же молекулу. Всё, на этом все.

Иванов Вадим Тихонович: Хорошо. Принято. Итак, мы заслушали все официальные отзывы. И открываем общую дискуссию, в ней могут принять участие все присутствующие в этом зале. Кто хотел бы участие принять? Я думаю, Дмитрий Михайлович уже планировал такое выступление?

Чудаков Дмитрий Михайлович: Большого выступления не планировал, но что-нибудь обязательно скажу. Коллеги, спасибо большое за Ваше внимание к таким сложным, не всегда понятным материям. Так как я научный консультант, то, наверное, я могу говорить немножко и про диссертанта, и про науку тоже могу. Правильно?

Иванов Вадим Тихонович: Можно, можно.

Чудаков Дмитрий Михайлович: Мне разрешается. Сначала всё-таки про диссертанта. Большая сложность и препятствие в работе Евгения Станиславовича существовала, связанная с высоким качеством его деятельности. И это не совсем шутка. Наши любимые репертуары Т-клеточных рецепторов можно приготовить очень по-разному. Можно их приготовить с РНК, с ДНК, с молекулярными баркодами и без. А можно приготовить их качественно и не очень. Эту работу можно сделать хорошо, средне, плохо, а можно сделать очень хорошо. Вот то, что делает Женя, он делает очень хорошо, когда мокрая работа в его руки попадает, он по-другому не умеет. Он может только хорошо. И это касается и приготовления библиотек, и сортировки клеток. А сортировка клеток – это отдельное искусство. И как мы сегодня поняли, с далёкого уже 2014-го года Женя овладел этим искусством в совершенстве. Очень качественная суперработа – правильно сортировать эти популяции и многие другие. Ну, в целом, основные данные, которые сегодня были изложены, Женя освоил весь, вот то, что называется пайплайн работы с клетками, получение материала, приготовление библиотек очень качественное и анализ данных, ну тут ещё другие люди помогали, потому что тут сложные вещи. Вот то, что вы сегодня видели, эти много точек – это целая игра ума за этим стоит. Но из-за того, что Женя делал всё так хорошо, как вы понимаете, соблазн попросить его поучаствовать в разных проектах, был чрезвычайно велик у самых разных людей, которые были вокруг и немножко поодаль, и которые вообще занимались флуоресцентными белками. Там тоже очень много всякой сортировки. И есть перечень работ, которые Евгений включил в свою диссертацию, а есть более широкий перечень работ, если вы посмотрите в PubMed, которые не имеют отношения к сегодняшней теме предмета, но в которых его роль тоже была очень значительная. Самые разные, связанные с разными проектами в иммунологии и рядышком. И с флуоресцентными белками, есть большая сложная красивая биоинформатическая работа Кондрашова, и там красивая биоинформатика сделана Кареном Саркисяном, тоже из наших стен вышедшего Димы Болотина, который там сидит. Но мокрое ядро этой работы – это опять сортировка клеток. Качественная сортировка клеток, там флуоресцентные белки разные уровни. И это тоже сделал Женя. Там довольно большой спектр работ, который вы сегодня не видите. Это, в общем и мягко говоря, отвлекло его от движения по собственной диссертации. И сегодня тоже Женя во многие разные проекты вовлечён. Но тем не менее, слава Богу, мы прорвались через это и смогли оторвать Женю после его многочисленных просьб от бесконечного разрыва на всё одновременно, сфокусировать на собственные задачи, которые вы видите в сегодняшней диссертации.

Если про науку, то тут можно очень долго рассказывать, и я вас мучить не хочу. Но, наверное, ключевой момент, который хочется попробовать описать, а что мы, собственно, увидели. Мы, строго говоря, не очень понимаем, что мы увидели. Мы увидели, что внутри наивного репертуара, с возрастом, тимус у нас работает до 20 лет, а потом работать перестаёт. Наивные клетки, тем не менее, никуда не исчезают, они гомеостатически поддерживаются, где-то раз в год или раз в два они делятся. Но на разбеге в 10, 20, 30, 40 лет это вытекает в то, что какие-то наивные Т-лимфоциты поделились лучше, а какие-то хуже. И это зависит от многих каких-то разных причин. С одной стороны, есть то, что называется, некий тонинг-сигналинг, которые их поддерживают, они всё время немножко «щупают» МНС наша собственность, нашими собственными пептидами. Это для них позитив, они лучше делятся такие. С другой стороны, если этот тонинг-сигналинг слишком существенный, слишком выраженный, то тогда они чаще делятся. И исчерпывают свой потенциал деления, который у них тоже может быть. И, может быть, уходят поэтому из репертуара. И поэтому мы наблюдаем снижение, если вы поняли примерно, что Женя показывал, снижение представленности наивных Т-лимфоцитов, у которых много сильно взаимодействующих аминокислот, которые, грубо говоря, липкие такие, которые хотят со всеми взаимодействовать.

С третьей стороны, у нас есть разные входящие челленджи разной инфекции, вакцинации, аутоиммунные процессы, в ходе которых происходит праймирование наивных Т-клеток, и они собственно выбывают из этого пула, они уходят в эффекторные, и мы не видим их в этом анализе, который сфокусирован на наивных Т-лимфоцитах. Может быть, поэтому такие варианты. А как меняются в целом свойства репертуаров? Если общими словами описать то, что Евгений Станиславович наблюдал. Уменьшаются сильно взаимодействующие аминокислоты, и сокращается длина CDR3, то есть он становится такой менее гибкий, менее болтающийся, и менее на всё липнувший. В целом, по разным проектам, которые мы ведём, мы сегодня знаем, что это в целом ассоциируется такое движение – коротенький CDR3 и мало сильно взаимодействующих аминокислот, это движение в сторону низко кроссреактивного репертуара, в сторону нелипких Т-клеточных рецепторов. И то же самое с антителами. Они пока отбираются, они становятся менее липкими и более специфичными к своей мишени. Получается, что с возрастом в силу разных причин, которых мы в совокупности не понимаем, но кросс-реактивность, липкость наивного репертуара, его способность отвечать на более широкий спектр челленджей, она снижается, но становится более аккуратной и более специфичной. Нарочно это сделано, или это так случайно получается само, мы не понимаем. Но интересно это видеть и щупать достоверно современной вот этой всей биоинформатикой, правильном приготовлении библиотек, и у Жени получилось всё это сделать через разные сложности и сомнения, что там правда, что неправда, много раз спотыкаясь. Но сегодня мы, в общем, уверены, что Женя показал, это действительно так. Мы наблюдаем такие штуки внутри репертуара. Собственно, всё, что я хотел сказать. Спасибо вам за внимание.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо Вам. Кто ещё хотел бы добавить к тому, что мы услышали в обсуждениях? Александр Габибович, прошу.

Габибов Александр Габибович: Да, спасибо большое. После такого глубокого анализа, поскольку, я имею в виду со стороны Чудакова, но не Чумакова, трудно, наверное, что-то добавить. Но всё-таки этот анализ был связан, что Дмитрий, как минимум, соавтор и лицо заинтересованное. Поэтому он всё-таки говорил о диссертанте. Я должен сказать,

что, конечно, эта работа как часть сериала статей и работ, которые родились в этом институте благодаря в основном, я помню время, когда это было зарождение, в основном Дмитрия. Вот как часть этого сериала, эта работа исключительная и занимает достойное место в этом ряду диссертаций этого плана. Действительно метод эксплуатирует гипервариабельность, объяснённую Сузуму Тонегаву, получившего за это Нобелевскую премию. И очень уместно и хорошо с помощью биоинформатических методов это делает. Конечно, метод ещё не лишён определённых недостатков, некоторые из которых здесь прозвучали, но, тем не менее, я не раз слушал фрагменты этой работы в исполнении как раз Евгения Станиславовича Егорова на аттестационных всяких мероприятиях. И я вот здесь должен сказать, что, мне кажется, что этот молодой человек производит впечатление весьма умного и достойного научного сотрудника. Я не знаю, как он планирует свою судьбу, но было бы приятно, чтобы он её планировал бы в стенах нашего института. И мы должны создать для этого условия все. Я призываю проголосовать «за». И считаю, что это очень интересная точка роста в развитии, которая будет ещё иметь достаточно много интересных ответвлений и в В-клетках, и, может быть, Вы в МНС что-то найдёте. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо, Александр Габибович. Может, ещё есть желающие добавить? Хотя, на мой взгляд, уже ситуация ясная. И, тем не менее, по-видимому, на этом мы завершаем общую дискуссию. Я даю слово диссертанту для заключения данного обсуждения.

Егоров Евгений Станиславович: Большое спасибо за очень лестный отзыв Александр, Габибович, Дмитрий Михайлович. Хотел бы поблагодарить диссертационный совет, который собрался здесь, друзей, родственников, знакомых. Всех, кто поддерживал меня, помогали мне, не давали опустить руки, были рядом, советовали. В общем, большое всем спасибо. Я буду краток, мне очень приятно, что вы помогали, были рядом. Без вас вряд ли эта работа была бы такой, как она вылилась сейчас. Спасибо всем.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо Вам за краткость. Мы приближаемся к решающему этапу – голосованию. Последний мой вопрос перед тем, как перерыв объявить. У нас будет проект заключения, за него тоже будем голосовать. Может быть, есть какие-то предварительные замечания, чтобы его подправить можно было? У Вас есть?

Завриев Сергей Кириакович: Да. Мне кажется, знаете, вот 5 страница, начало предпоследнего абзаца. Здесь такая фраза есть: «оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные результаты были получены на сертифицированном оборудовании». Мне кажется, эту фразу надо как-то подкорректировать, потому что она немножко какая-то туманная. Наверное, «оценка достоверности результатов, оценка оборудования, на котором получены результаты, выявила, что оно было сертифицировано, поэтому результаты достоверны».

Иванов Вадим Тихонович: Предлагаю следующим образом. Мы доверим авторам под присмотром...

Завриев Сергей Кириакович: Дмитрия.

Иванов Вадим Тихонович: ... Вашим внести поправки. И будем голосовать за уже скорректированный какой-то вариант.

Завриев Сергей Кириакович: Я думаю, без меня справятся. Просто я как-то несколько раз прочёл, не знаю.

Иванов Вадим Тихонович: Это минимальная коррекция, я думаю, она не влияет на итоги нашего решения.

Завриев Сергей Кириакович: Да, минимальная. Не, совершенно не влияет.

Иванов Вадим Тихонович: Мы понимаем, что у нас ещё повестка дня голосованием не исчерпывается. У нас ещё 2 вопроса есть. Поэтому я объявляю перерыв на голосование. Но прошу не расходиться членам совета как минимум для того, чтобы продолжить нашу работу. Голосуем и снова собираемся и обсуждаем.

(проводится тайное голосование)

Олейников Владимир Александрович: Вот результаты заседания счётной комиссии по диссертации. Егоров Евгений Станиславович. Роздано бюллетеней 20, оказалось в урне 20, «за» - 20, «против» и недействительных бюллетеней нет.

Иванов Вадим Тихонович: Утверждаем. Кто «за»? Кто «против»? Поздравим с успешной защитой сотрудников нашего коллектива. Поздравляем вас! И так держать и дальше. Вперёд!

Председатель диссертационного совета
д.х.н., академик РАН



Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь диссертационного совета
д.физ.-мат.н.

Олейников Владимир Александрович