



ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ»
(ФГБУ «ГНЦ ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ» ФМБА РОССИИ)

Каширское шоссе, д. 24,
Москва, 115522

от 10.02.2020 г. № 10-09/12

на № _____ от _____ 20 ____ г.

тел.: 8 499-311-67-78

8 499-617-10-27

факс: 8 499-612-81-51


E-mail: info@nrcii.ru

www.nrcii.ru

УТВЕРЖДАЮ



Директор ФГБУ «ГНЦ Институт
Иммунологии» ФМБА России,
доктор медицинских наук,
профессор, член-корреспондент
РАН


М.Р. Хаитов

«10» февраля 2020 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости
диссертационной работы Егорова Евгения Станиславовича «Возрастные измене-
ния 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 диссертационной работы

Иммунитет является важнейшей системой организма человека, поддержи-
вающей его физиологический и генетический гомеостаз. Иммунная система обес-
печивает защиту организма от внешних и внутренних антигенов. Своевременное и
точное распознавание чужеродных и видоизмененных собственных молекул зави-
сит от эффективности врожденных и приобретенных иммунных реакций. Однако

многими исследованиями подтверждено постепенное снижение эффективности иммунного ответа с возрастом. Во многом, именно это приводит к повышению риска развития тяжелых инфекционных и онкологических заболеваний у пожилых людей.

Ключевую роль в механизмах противоопухолевой и противoinфекционной защиты играет адаптивный иммунитет. Эффективность адаптивного иммунного ответа напрямую связана с разнообразием антигенраспознающих рецепторов лимфоцитов. За поддержание разнообразия Т-клеточных рецепторов (ТКР) отвечает популяция наивных Т-клеток. Таким образом, именно наивный репертуар определяет диапазон распознаваемых антигенов и эффективность иммунного ответа, опосредованного Т-клетками.

Исследование репертуара ТКР до последнего времени было осложнено их чрезвычайной вариабельностью, а также особенностями формирования их разнообразия. Точное установление последовательности вариабельных фрагментов генов ТКР стало возможно лишь с внедрением технологии высокопроизводительного секвенирования. Эта технология нашла широкое применение в исследованиях иммунитета и используется в настоящее время при анализе сложных генетических мишеней, характеризующихся высоким полиморфизмом (Т- и В-клеточные рецепторы, система генов HLA, KIR-рецепторы).

Адаптация технологии высокопроизводительного секвенирования к решению задач качественного и количественного анализа репертуаров ТКР позволит определить закономерности реализации адаптивного иммунного ответа в норме и при патологии. С практической точки зрения данные о функциональной организации адаптивного иммунитета могут быть полезны при разработке диагностических тестов, предназначенных для определения конкретных функциональных или тканеспецифичных групп лимфоцитов. Мониторинг динамических изменений популяций лимфоцитов, а также сравнительная характеристика их состава позволят повысить эффективность терапии иммунозависимых заболеваний и выявить группы клеток, обладающих потенциальным терапевтическим эффектом. В свою очередь, исследование возрастных отличий репертуаров может стать ключом к пони-

манию механизмов постепенного снижения функции иммунитета и составить основу методов поддержания адаптивного иммунного ответа в пожилом возрасте.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Диссертационная работа Е.С. Егорова выполнена на базе ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН и посвящена исследованию возрастных изменений в структуре репертуаров Т-клеточных рецепторов в тотальных и сортированных наивных популяциях Т-клеток у доноров разного возраста. Тематика диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «03.01.03 – Молекулярная биология».

Основные результаты диссертационной работы и их достоверность

Исследование спланировано адекватно сформулированным задачам и выполнено методологически правильно. Сформулированные автором цель и задачи исследования достигнуты полностью.

Предметом исследования в диссертационной работе Е.С. Егорова стала структура популяций наивных Т-клеток у доноров различного возраста. Цель работы заключалась в исследовании возрастных изменений в репертуарах β -цепей Т-клеточных рецепторов методом высокопроизводительного таргетного секвенирования с применением технологии молекулярного баркодирования.

В ходе исследования был разработан простой и надежный подход, позволяющий анализировать репертуары иммунных клеток, в том числе при небольших количествах стартового материала. На основании анализа различий в тотальном Т-клеточном репертуаре подтверждено сохранение значительной части клональных экспансий Т-лимфоцитов на протяжении нескольких лет. В ходе исследования определены признаки, характерные для Т-клеточного иммунитета в разные периоды жизни. Исследованы физико-химические свойства региона CDR3 ТКР, и получены данные, указывающие на наличие периферической селекции наивного Т-клеточного репертуара при старении иммунной системы. Установлено уменьшение с возрастом относительного содержания сильно взаимодействующих аминок-

кислотных остатков и средней длины CDR3, что указывает на более быстрое истощение клонов наивных Т-клеток к собственным рМНС.

Анализ исследуемых иммунологических и генетических параметров проведен корректно, с привлечением достаточного объема исходных данных, что обеспечило высокую степень качества последующего статистического анализа. Статистическая обработка полученных данных выполнена адекватными методами математической статистики с учетом требований к анализу данных медико-биологических исследований, что позволило Е.С. Егорову обосновать полученные результаты и сделать выводы. Широкая апробация вновь выявленных фактов в форме научных публикаций и дискуссий на научных конференциях и семинарах определяют обоснованность и достоверность выносимых на защиту выводов.

Выводы диссертации базируются на изучении достаточного объема экспериментального материала, четко сформулированы, логично вытекают из полученных результатов исследования.

Структура работы соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Значительный вклад соискателя в разработку рассматриваемой проблемы не вызывает сомнений.

Научная новизна работы

Автором разработан новый метод анализа иммунных репертуаров на основе молекулярных баркодов. Особенностью разработанного метода является возможность работы с небольшим стартовым количеством целевых клеток. Введение молекулярных баркодов в структуру кДНК позволяет оценить количество молекул, успешно прошедших стадии пробоподготовки и устранить количественные искажения, возникающие из-за неравномерной амплификации генных сегментов ТКР, а также из-за неоднородной эффективности секвенирования. Дальнейшая математическая обработка данных секвенирования с учетом молекулярных баркодов позволяет отличить ошибки полимеразной цепной реакции и секвенирования от истинного разнообразия фрагментов генов ТКР.

Впервые с помощью разработанного метода проанализированы возрастные изменения тотальных репертуаров Т-клеток и репертуаров их функциональных субпопуляций. При оценке Т-клеточного репертуара на протяжении трех лет установлены минимальные отличия в тотальном Т-клеточном репертуаре, сопоставимые с разницей между биологическими репликами, полученными в одно и то же время. Таким образом, продемонстрирована стабильность периферического Т-клеточного репертуара человека.

Анализ Т-клеточных репертуаров доноров различных возрастных групп выявил наличие большего количества нефункциональных Т-клеточных рецепторов, а также значительно меньшего количества добавленных случайных нуклеотидов в регион CDR3 в образцах пуповинной крови, по сравнению с образцами других возрастных групп. Показано, что с возрастом процент наивных клеток и разнообразие репертуара Т-лимфоцитов падает. При анализе известных CMV и EBV специфичных Т-клеточных рецепторов установлено снижение их числа у пожилых доноров. В то же время средний размер таких клонотипов с возрастом увеличивался.

При анализе изменения характеристик наивных репертуаров в популяции наивных CD4⁺-клеток установлено уменьшение средней длины региона CDR3, размера вставки NDN и количества добавленных нуклеотидов с возрастом. При анализе показателей силы взаимодействия, гидрофобности и полярности аминокислотных остатков установлено значительное уменьшение силы взаимодействия (аффинности к рМНС-комплексу) и полярности у наивных CD4⁺- и гидрофобности у CD8⁺-Т-лимфоцитов с возрастом, что может быть следствием периферической селекции наивного Т-клеточного репертуара с возрастом. В исследовании показаны значительные изменения характеристик репертуаров недавних эмигрантов из тимуса и зрелых наивных CD4⁺-клеток с возрастом.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования определяется комплексным анализом состояния Т-клеточного звена иммунитета у людей различных возрастных

групп. Проведенный анализ иммунных репертуаров имеет важное значение для понимания механизмов старения иммунной системы и может быть использован при дальнейшем изучении адаптивного иммунитета, в том числе с учетом факторов, ассоциированных с его ускоренным старением. Результаты, полученные при оценке стабильности Т-клеточного репертуара, позволяют предположить, что значительная часть клональных экспансий Т-лимфоцитов сохраняется в организме на протяжении многих лет. На основании наблюдений за динамикой CMV и EBV специфичных клонов можно сделать вывод о наличии постепенного отбора и пролиферации определенных CMV и EBV специфичных клонов, которые в ходе дальнейшей экспансии вытесняют первоначальное разнообразие антиген-специфичного репертуара. Анализ физико-химических свойств CDR3 региона указывает на возможность периферической селекции наивного Т-клеточного репертуара при старении иммунной системы. Уменьшение сильно взаимодействующих аминокислотных остатков и средней длины CDR3 может свидетельствовать о быстром истощении клонов наивных Т-клеток с высокой аффинностью к собственным рМНС.

Научно-практическая значимость

Практическая значимость исследования определяется анализом структуры ТКР в тотальных и изолированных популяциях лимфоцитов, проведенном на принципиально новом уровне. ТКР - уникальный поверхностный маркер Т-лимфоцита, определяющий антигенную специфичность Т-клетки и ее судьбу после активации. После стимуляции соответствующим антигеном Т-лимфоцит активно пролиферирует, дифференцируясь при этом в зрелую эффекторную клетку. Потомки одного или нескольких лимфоцитов способны формировать ТКР уникальной специфичности. Определение специфических клонов, ассоциированных с развитием патологий является важной практической задачей. Помимо возможности разработки модифицирующей терапии, направленной на удаление патогенных клонов, возможно установление специфичностей, обладающих повышенной эффективностью в отношении инфекционных и опухолевых антигенов. Такие клоны

могут составить основу для разработки таргетной терапии нового поколения, направленной на борьбу с заболеваниями, до сих пор считавшихся неизлечимыми.

Существует несколько фенотипически различных популяций Т-лимфоцитов, выполняющих разные функции. Однако особенности формирования функциональной гетерогенности Т-клеток до сих пор не описаны. Для решения данной задачи не подходят рутинные молекулярно-биологические методы. Здесь необходим анализ, подразумевающий новый уровень в исследовании функциональной и генетической гетерогенности отдельных клеточных субпопуляций.

Разработка такого метода составляет вторую важную практическую задачу, решенную в диссертационной работе. В ходе исследования разработана технология подготовки фрагментов кДНК, несущих в своем составе молекулярный баркод, который в дальнейшем может служить уникальной меткой конкретного Т-лимфоцита. Создание такой технологии позволяет с высокой точностью характеризовать структуру популяций Т-лимфоцитов, представленность различных клонов и определять конкретные специфичности, вовлеченные в патогенез иммунозависимых заболеваний. Разработанный метод открывает принципиально новые возможности для развития персонализированной медицины и может быть использован при создании тест-систем, направленных на повышение эффективности иммунотерапии и вакцинопрофилактики.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания цели и поставленных задач, главы «Материалы и методы», главы «Результаты и обсуждение», выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы. Библиографический список включает 183 литературных источника. Диссертационная работа иллюстрирована 21 рисунком и 12 таблицами. Общий объем диссертации составляет 115 страниц машинописного текста.

В обзоре литературы автор компетентно проводит анализ современного понимания функциональных особенностей Т-клеточного иммунного ответа. Автором проведен всесторонний анализ литературных данных по строению и

организации Т-клеточных рецепторов, структуре кодирующих их генов, физиологическим особенностям гомеостаза Т-клеток и факторам, влияющим на структуру Т-клеточных репертуаров и функциональные изменения Т-клеток с возрастом.

В главе «Материалы и методы» приведено описание современных методов исследования, использованных автором. Подробно изложены молекулярно-биологические методы изучения качественного и количественного состава тотальных и изолированных по функциональному признаку популяций Т-лимфоцитов.

Результаты работы изложены в 3 разделах, посвященных разработке качественного метода анализа иммунных репертуаров, возрастным изменениям в тотальных Т-клеточных репертуарах, изменению характеристик наивных репертуаров с возрастом. В главе приводится анализ собственных данных и их сопоставление с аналогичными работами авторов других научных коллективов.

Выводы диссертации обоснованы, вытекают непосредственно из экспериментальных данных, полученных диссертантом.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на одной всероссийской научной конференции и одном научном семинаре.

Основные положения диссертационного исследования изложены в 7 печатных работах, опубликованных в изданиях, включенных в перечень российских периодических рецензируемых научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов диссертации.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

Заключение

Диссертация Егорова Евгения Станиславовича «Возрастные изменения в структуре репертуаров Т-клеточных рецепторов наивных Т-лимфоцитов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.01.03 – Молекулярная биология», является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором иссле-

дований, решены задачи, важные для молекулярной биологии, а именно: разработан метод анализа репертуаров ТКР, применимый, в том числе для небольших стартовых количеств клеток; установлена функциональная структура популяций наивных Т-клеток у доноров различного возраста; определены факторы, ассоциированные со старением иммунной системы и влияющие на адаптивный иммунный ответ; охарактеризованы физико-химические свойства переменных фрагментов ТКР, указывающие на возможные механизмы подавления иммунной функции с возрастом. Диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335), а ее автор достоин присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.01.03 – Молекулярная биология».

Отзыв обсужден и утвержден на заседании отдела иммуногенетики человека Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, протокол заседания № 01-1 от «28» января 2020 г.

Отзыв составил:

и.о. заведующего лабораторией молекулярной иммуногенетики
ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»
ФМБА России, доктор биологических наук,
Кофиади И.А.



10.02.2020

