

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКОВ М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.А.ОВЧИННИКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБХ РАН)

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН
8 октября 2014 года

Защита диссертации

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Путинцевой Екатериной Викторовной

«Разнообразии репертуаров Т-клеточных рецепторов человека и его
изменения в ходе старения»

по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Москва
2014 г.

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН

8 октября 2014 года

Заместитель председателя диссертационного совета
академик РАН

Е.В. Гришин

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов наук по профилю диссертации – 5. Кворум имеется.

1. академик РАН	Гришин Евгений Васильевич	(02.00.10)
2. член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
3. д.ф.-м.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4. д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
5. д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6. д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
7. Академик РАН	Богданов Алексей Алексеевич	(03.01.03)
8. д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
9. д. физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
10. член-корр. РАСХН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
11. д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
12. академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
13. академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
14. д.х.н.	Молотковский Юлиан Георгиевич	(02.00.10)
15. д.б.н.	Мурашев Аркадий Николаевич	(03.01.06)
16. д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
17. д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
18. д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
19. д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
20. д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
21. д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)

Е.В. Гришин:

Наверное, время объявить защиту открытой. Я предоставляю слово ученому секретарю.

В.А. Олейников:

(зачитывает документы из личного дела соискателя; отмечает, что объявление о защите диссертации размещено на сайте ВАК вовремя, все необходимые документы в деле есть).

Е.В. Гришин:

Есть ли вопросы? Вопросов нет, тогда разрешите предоставить слово диссертанту. Пожалуйста.

Е.В. Путинцева:

(излагает основные положения диссертационной работы).

Е.В. Гришин:

Спасибо. Теперь, пожалуйста, вопросы. Так, первый вопрос, пожалуйста.

Д.А. Долгих:

Скажите, а неродственные пары мама-ребенок - имеется в виду приемные дети?

Е.В. Путинцева:

Нет. Поскольку в нашем исследовании участвовали только пары мама-ребенок, среди которых дети могут быть свои или не свои, родственные пары – это мамы и их дети, а неродственные пары – это мамы и не их дети.

Д.А. Долгих:

И второй вопрос. Так, если посчитать, примерно получается, что репертуар уменьшается где-то на 1% за год, да?

Е.В. Путинцева:

Да.

Д.А. Долгих:

А вот если попробовать взять в прямое сравнение одних и тех же людей. Ведь, наверное, если 10% разницы 10 лет. В принципе, можно найти где-то

образцы крови того же самого человека 10 лет назад и сегодня. Или это тяжело, или вы это не пробовали просто?

Е.В. Путинцева:

Спасибо Вам большое за вопрос. Это, на самом деле, очень интересное предложение. И мы, действительно, это делаем. Просто мы сейчас в процессе этих как раз-таки десяти лет.

Д.А. Долгих:

Если вы это делаете, это как-то подтверждает те выводы, которые вы здесь делаете? Или пока это еще рано сказать?

Е.В. Путинцева:

Пока это еще рано сказать. Спасибо.

Е.В. Гришин:

Так, еще вопросы.

В.М. Липкин:

Скажите, пожалуйста, а если вот взять людей возраста примерно 60 лет и измерить у них репертуар Т-клеточных рецепторов, то можно предсказать, будет ли он долгожителем или не будет?

Е.В. Путинцева:

Спасибо за вопрос. По нашим предположениям, да, можно. То есть по нашим предположениям то изменение, которое мы наблюдаем у долгоживущих доноров, является не изменением, а является характеристикой этих доноров.

Р.Г. Ефремов:

Скажите, пожалуйста, вот вопрос о формировании выборки людей, на которых вы эти данные получили. У вас в каждой группе где-то по 15-20 человек, да? Десятки человек?

Е.В. Путинцева:

Порядка десяти человек в каждой группе, да.

Р.Г. Ефремов:

Проверяли ли вы вот эту выборку на вопрос вырожденности? Или какой-то, скажем, линейной зависимости там, допустим, в матрице, которую вы получали. Я имею в виду, что люди пожилые – могло случиться так, что у них вдруг какое-то общее заболевание. То есть что они каким-то общим признаком связаны – в отличие от молодых людей. Предположим, так. Просто не было ли вероятности получить какую-то смещенную оценку при обработке ваших данных?

Е.В. Путинцева:

Спасибо большое за вопрос. Мы, к сожалению, не анализировали никакие заболевания у данной выборки людей. Но поскольку это были люди не из одной когорты, не из одной семьи, мы все-таки склоняемся к тому, что у нас не было никаких перекосов. Но, кроме анализа этих 39 людей, которыми мы занимались в данном исследовании, мы продолжаем набирать статистику. И сейчас у нас порядка ста образцов в исследовании. И ту динамику развития, которую мы наблюдаем на этих ста образцах, повторяет то, что мы сейчас наблюдаем. Поэтому я склонна все-таки считать, что никаких перекосов в заболеваниях пожилых людей у нас не было. Но это хороший вопрос. Наверное, стоит это учитывать и анализировать. Спасибо.

Е.В. Гришин:

А можно мне вопрос? Значит, вот вы делаете библиотеку кДНК перед тем, как переходить к дальнейшим этапам окончательного секвенирования, да? Вот, как вы считаете, ту популяцию РНК, которую вы выделяете, она полностью представлена в библиотеке кДНК или какие-то там могут быть отдельные молекулы РНК, которые выпадают?

Е.В. Путинцева:

Вы имеете в виду, соответствует ли количество молекул РНК полностью тому образцу крови, который мы получаем? Поскольку вот, например, в старении мы проводили нормализацию на количество исходных молекул кДНК Т-лимфоцитов. То есть, естественно, мы теряли: какие-то образцы у нас были несколько более подробно отсеквенированы, какие-то менее подробно отсеквенированы. И мы все анализировали на исходный миллион молекул кДНК Т-лимфоцитов. Конечно же, мы теряли информацию в некоторых образцах по сравнению с другими образцами.

Е.В. Гришин:

Вот когда вы говорите, что у вас 5 миллионов, то какой-то там еще предел есть.

Е.В. Путинцева:

Да, да.

Е.В. Гришин:

А насколько он примерно может быть. То есть какая у вас там цена потери?

Е.В. Путинцева:

Ну, на самом деле, сколько нам дадут крови, столько мы можем и обработать. Вопрос в том, сколько человек может крови дать. Из десяти миллилитров, например, крови, как правило, получается десять миллионов Т-лимфоцитов. Соответственно, как-то так. Ну, можно пятьдесят миллионов проанализировать.

Е.В. Гришин:

Понятно, спасибо. И второй вопрос, такой технический. Вот цикл от взятия крови до получения результатов – сколько времени проходит?

Е.В. Путинцева:

Вы имеете в виду до результатов массированного секвенирования? Все зависит от того, как быстро мы набираем достаточное количество образцов, чтобы запустить дорожку секвенирования.

Е.В. Гришин:

Но в среднем?

Е.В. Путинцева:

В среднем – порядка, может быть, месяца это занимает. Если все интенсивно происходит.

Е.В. Гришин:

Понятно, спасибо. Так, еще вопросы есть? Пожалуйста, Алексей Алексеевич.

А.А. Богданов:

Вот, может быть, об этом рецензенты скажут, но я как-то не очень уловил. Вообще этим делом кто-нибудь еще занимается на свете?

Е.В. Путинцева:

Да, занимается. Да, использование массированного секвенирования для того, чтобы анализировать репертуары Т-клеточных рецепторов и В-клеточных рецепторов, является очень на данный момент популярным направлением – в связи с развитием методов массированного секвенирования и удешевлением этого процесса. И, да, много лабораторий в мире этим занимается, кроме нас.

Е.В. Гришин:

Я так понимаю, что вопросы исчерпаны? Тогда спасибо, присаживайтесь, отдохните. И время пришло предоставить слово ученому секретарю для оглашения поступивших в совет отзывов.

В.А. Олейников:

В совет поступил отзыв ведущей организации, в качестве которой выступал Институт общей генетики имени Вавилова. Отзыв полностью положительный. (Зачитывает отзыв, отзыв прилагается).

«Несмотря на многочисленные достоинства работы, она не лишена недочетов:

Первое: работе не приводится сравнительного анализа репертуаров β -цепей Т-клеточных рецепторов внутри группы мам и группы неродных детей. Полученные таким образом данные могли бы служить хорошим внутренним контролем.

Второе: использование молекулярных баркодов в диссертационной работе по какой-то причине не сопровождается созданным в лаборатории и опубликованным новым эффективным алгоритмом коррекции ошибок MiGEC.

Впрочем, названные недочеты не умаляют основных достоинств данной работы и не снижают общего положительного впечатления.

Все части работы хорошо и полно изложены. Аналитическая часть работы занимательна, аккуратна и точна. Приведенные иллюстрации достаточно просты в понимании и хорошо иллюстрируют содержащуюся в тексте информацию. Вся работа проведена на высоком методическом уровне и является целостным и законченным фундаментальным исследованием.

Данные результаты были опубликованы в семи рецензируемых зарубежных научных журналах, доложены на международной конференции. Автореферат полностью отражает основные результаты исследования.

Диссертационная работа Путинцевой Екатерины Викторовны «Разнообразие репертуаров T-клеточных рецепторов человека и его изменения в ходе старения» соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям. Диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842) для ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»».

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре центра коллективного пользования «Генетический полиморфизм» отделения биологических наук Российской академии наук. 26 августа 2014 года, протокол номер 1. И подписан руководителем ЦКП «Генетический полиморфизм» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, доктором биологических наук Ребриковым. И отзыв утвержден директором Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН член-корр. РАН доктором биологических наук, профессором Янковским.

Е.В. Гришин:

Спасибо. Екатерина Викторовна, надо бы что-то отвечать, да? Пожалуйста.

Е.В. Путинцева:

Спасибо большое за прочтение. По поводу сравнительного анализа внутри групп неродных детей и мам я бы хотела сказать, что все образцы детей и мам, которые мы анализировали, мы секвенировали на двух разных дорожках Illumina HiSeq. И известно, что при секвенировании на твердой фазе между соседними кластерами могут возникать кросс-контаминации. В связи с этим мы анализировали группу мам отдельно и группу детей – отдельно. Однако если сравнивать эти выборки внутри себя, учета таких контаминаций избежать не удастся. Поэтому мы не могли себе позволить такой контроль, хотя это, наверное, было бы полезно.

По поводу использования алгоритма ошибок MiGEC. Для того, чтобы использовать этот алгоритм, необходимо довольно существенное оверсеквенирование. Необходимо, по крайней мере, 5 прочтений

секвенирования на молекулу кДНК. А в данной работе нам была очень важна глубина секвенирования. И 5 ридов на молекулу мы просто не могли себе позволить. Однако я надеюсь, что цена массированного секвенирования в будущем будет продолжать падать. И в дальнейшем и мы, и многие другие лаборатории, которые этим занимаются, смогут использовать алгоритм исправления ошибок MiGEC, потому что это, на самом деле, очень эффективный алгоритм. Спасибо.

Е.В. Гришин:

Спасибо. Ну, теперь слово научному руководителю. Пожалуйста, Дмитрий Михайлович.

Д.М. Чудаков:

(даёт характеристику диссертанту, отзыв положительный)

Е.В. Гришин:

Спасибо. Есть ли отзывы на автореферат?

В.А. Олейников:

Нет, в совет не поступило ни одного отзыва.

Е.В. Гришин:

Ну, нет, так нет. Тогда разрешите предоставить слово официальному оппоненту. Это доктор медицинских наук Атауллаханов Равшан Инноятович, руководитель Отдела иммунной биотехнологии, а также заведующий Лабораторией активации иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения Института иммунологии ФМБА России. Пожалуйста.

Р.И. Атауллаханов:

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный).

У меня есть некоторые замечания по работе. В работе исследуется репертуар рецепторов Т-клеток периферической крови. Принимая во внимание рециркуляцию Т-лимфоцитов между кровью и лимфоидными органами, автор подразумевает, что циркулирующий пул клеток в точности отражает свойства лимфоидных клеток во всем организме. Диссертант это не выдумала – так устроена вся человеческая иммунология. Доступный материал, как правило, - это кровь. И все, что могут ученые и врачи знать об иммунной системе человека – это то, что можно увидеть в крови, это те

клетки, которые оказались в крови, циркулируют. И диссертант тоже читает репертуар клеток, которые в крови. И вот, мне кажется, здесь надо очень корректно, подчеркнуто говорить о том, что это репертуар циркулирующего пула. Почему я так думаю? Потому что не очевидно, что идентичное распределение между всеми остальными лимфоидными клетками организма и циркулирующим пулом. Известно, что активированные в лимфоидной системе, в лимфоидных тканях Т-клетки выходят ненадолго – на несколько дней – в кровь, а потом уходят в очаги воспаления. Они, собственно, становятся эффекторными и выполняют свои защитные функции. Известно, что клетки памяти в течение десятилетий гнездятся в каких-то малоизученных нишах костного мозга и там и сохраняются. Это означает, что может быть неравномерным распределение между кровью и любыми тканями – и лимфоидными, и кроветворными, и обычными тканями тела. И поэтому, говоря о репертуаре, корректно было бы всегда подчеркивать, что это репертуар циркулирующего пула.

При сравнении репертуаров двух людей наряду с относительным содержанием низкочастотных и высокочастотных клонотипов было бы полезным сравнивать абсолютное количество клеток. Временами это у вас есть, но не всегда и поэтому я обращаю внимание на это. В общем, абсолютное количество вариантов – именно оно ценно для организма, а не какие-то отношения между собой.

Важно в будущем оценить вклад антигенных нагрузок на формирование разнообразия и однообразия. Почему я так думаю? Репертуар CDR3 организма может зависеть от того, с чем встречалась иммунная система, на что она отвечала, размножалась и так далее. Когда вы сталкиваетесь с однообразием сиквенсов, а вы с ним столкнулись, и это очень интересно, возникает множество мыслей. В том числе и те, что мы все имеем некие общие антигены, с которыми мы встречаемся. У нас очень похожая микрофлора, которая с нами живет вместе и является источником антигенов – все бифидобактерии, лактобактерии и так далее – очень похожие антигенные нагрузки. Мы болеем одними и теми же инфекциями – это тоже антигенные нагрузки. В детстве мы заболеваем детскими инфекциями, которые практически одни и те же. Гриппом мы все болеем, ЦМВ, вирусом Эпштейна-Барра. То есть есть у нас нечто общее – в смысле инфекций и антигенных нагрузок. И не только инфекции – мы едим примерно одинаковую пищу, это еще сотни килограммов антигенных нагрузок в течение жизни очень похожих. Значит, это может генерировать какое-то единообразие в нашем популяционном разнообразии. И предложение такое, что стоило бы, наверное, придумать (для человека трудно придумать

модель), но придумать ситуацию, когда вы можете посмотреть репертуар еще до того, как антигенные нагрузки произошли. Например, в пуповинной крови. Может, это окажется полезным.

Ну, и, конечно, крайне интересным был бы поиск механизмов генерации однообразия или вот этих public сиквенсов, как вы их называете.

В связи с обнаруженными различиями пулов CD4 и CD8 и их динамики в возрастном аспекте, конечно, было бы интересно понять, почему CD8 субпопуляция сокращается с возрастом, а CD4 – нет. И даже более того, она оказывается высокой у особых каких-то людей.

И в заключение: диссертационная работа Путинцевой Е.В. актуальна по теме и является логически завершенным исследованием, выполненным на современном экспериментальном уровне. Основные научные результаты диссертационной работы получены впервые и опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ. Достоверность и обоснованность полученных результатов, научных положений и выводов не вызывает сомнений.

Диссертация Екатерины Викторовны Путинцевой соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Молекулярная биология». Спасибо.

Е.В. Гришин:

Спасибо большое. Ну, наверное, что-то нужно сказать. Там дискуссионные вещи, но тем не менее.

Е.В. Путинцева:

Я хочу поблагодарить Равшана Инноятовича за такой подробный отзыв. По поводу вопросов. По поводу того, что мы анализировали разнообразие периферической крови, а не общее разнообразие – я абсолютно согласна с этим замечанием. Было бы, конечно, намного более правильно анализировать общее разнообразие репертуаров. Но, как вы правильно заметили, получение 10 миллилитров образца периферической крови и получение образца костного мозга – это задачи разной сложности. Но если кто-то хочет сдать нам костный мозг, мы с удовольствием примем этот образец. А в наших публикациях и моей диссертации мы стараемся указывать, что мы говорим о разнообразии исключительно периферической крови. Спасибо.

По поводу сравнения абсолютных количеств клеток, а не долей – я хочу сказать спасибо за это замечание, я с ним абсолютно согласна и в дальнейшем мы постараемся измерять абсолютные количества клеток во всех

случаях. Хотя я хочу добавить, что у нас есть данные по некоторым донорам, которых мы анализировали, - людям разных возрастов – и по нашим данным количество клеток с возрастом уменьшается, но не сильно. Но, тем не менее, в дальнейшем мы постараемся всегда анализировать абсолютные количества.

По поводу пуповинной крови – спасибо вам за предложение. Это, действительно, очень интересно, и мы, действительно, считаем это очень интересным. Именно поэтому как раз это один из наших текущих проектов – анализ разнообразия Т-клеточных рецепторов пуповинной крови.

Изучение механизмов генерации идентичных последовательностей у разных людей – я хочу с вами снова согласиться – это и вправду очень интересно. Только я хочу добавить, что это очень сложная задача, потому что мне кажется, что сделать это биохимически очень трудно. Но мы в этом направлении движемся. Мы набираем статистику по разным донорам с разными заболеваниями – и так мы стремимся к тому, чтобы обнаружить специфичность, в частности среди часто встречающихся клонотипов в популяции.

И по поводу различий изменения CD4 и CD8 субпопуляций Т-клеток с возрастом – я тоже с этим абсолютно согласна. Это было бы невероятно интересно. Например, можно было бы поделить CD4 субпопуляцию на более мелкие и посмотреть, какие на самом деле изменения стоят за изменением в пуле CD4+ Т-лимфоцитов. Нас эти вопросы интригуют, и мы продолжаем их изучать. Спасибо большое.

Е.В. Гришин:

Спасибо. Удовлетворены?

Р.И. Атауллаханов:

Да, полностью. Спасибо.

Е.В. Гришин:

Спасибо. Тогда разрешите предоставить слово второму оппоненту. Это Мария Дмитриевна Логачева, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории эволюционной геномики Факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени Ломоносова.

М.Д. Логачева:

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный).

Несмотря на полностью благоприятную оценку данной работы, у меня есть ряд замечаний, о которых я сейчас скажу.

Первое - это то, что метод молекулярного баркодирования был использован только в третьей части работы, посвященной анализу разнообразия репертуаров бета-цепей T-клеточных рецепторов у доноров разного возраста. А в первой части работы, которая была посвящена анализу разнообразия репертуаров у матерей и их детей и сравнению разнообразия репертуаров у родственников и неродственных доноров, этот метод почему-то не применялся, хотя не представляет сомнений то, что его применение могло бы дать более точные и более надежные результаты. Но, возможно, здесь просто вопрос времени: сначала был поставлен эксперимент, потом был разработан метод. И не представлялось возможным получить заново все результаты с применением уже нового метода.

Дальше обращает на себя внимание то, что все стадии, связанные с амплификацией, с ПЦР, проведены с помощью смеси полимераз Encyclo, которая, хотя и обладает корректирующей активностью, но тем не менее не относится к высокоточным. В принципе, обычно для исследований, требующих высокой точности, используются другие полимеразы. Безусловно, диссертант убедительно показал, что разработанный ею метод дает возможность коррекции ошибок и обеспечивает высокую точность, тем не менее, не очень понятно, зачем было сначала добавлять источник ошибок в виде неточной полимеразы и затем с ними бороться. Возможно, имело бы смысл использовать высокоточную полимеразу. Или, может быть, чтобы усилить методический аспект этой работы, провести какой-то модельный эксперимент с применением Encyclo и другой полимеразы – более точной. Потому что, безусловно у использования Encyclo тоже есть свои аргументы. Во-первых, это реагент российского производства, поэтому более доступный, более дешевый, чем зарубежные аналоги. Во-вторых, она очень высокоэффективная и позволяет получить продукцию самого минимального количества материала и стартовать с каких-то сложных матриц, с РНК не очень высокого качества. Но, возможно, стоило бы этот момент с точностью проконтролировать.

И также о точности ферментов: практически никак не упомянута роль обратной транскриптазы как источника ошибок. Безусловно, она тоже таким источником ошибок может являться, причем эти ошибки не могут быть скорректированы с помощью разработанного диссертантом метода.

Еще один момент, который меня несколько смущает в выводах, - автор говорит, что метод молекулярных баркодов позволяет сравнивать образцы, которые отсекутены с разной глубиной, сделаны с разного количества стартового материала, а также с разным качеством РНК. Если с первыми двумя пунктами я полностью согласна, они не вызывают сомнений, то как

можно нормализовать образцы с разным качеством РНК, это не очень понятно. И, возможно, автору самому это тоже не очень понятно, потому что я посмотрела текст статьи с изложением данного метода и я не увидела упоминания про качество РНК. Поэтому, возможно, из выводов стоило бы это убрать или, может быть, как-то переформулировать – если это все-таки возможно, то тогда пояснить, каким образом.

Это, пожалуй, основные содержательные замечания. Еще есть ряд замечаний чисто технических. Были замечены орфографические ошибки, опечатки, еще какие-то странные моменты. Например, в какой-то момент в конце абзаца посреди текста стояла буквы «ы» – непонятно, к чему относящаяся. Еще было неправильно указано название прибора, видимо, в результате автозамены, которая считает, что лучше знает, как он должен называться. Это, естественно, несущественно, поскольку не является смыслоразличающим. Еще, тоже техническое, но более существенное, на рисунке 5.10 в подписи к рисунку два раза в подписи повторено правый столбец, хотя очевидно, что одна из подписей должна была относиться к левому столбцу. Но, в принципе, это не нарушает понимания, потому что на самой диаграмме эти столбцы подписаны. И в автореферате тоже написано правильно.

Последнее, что я хотела бы сказать – это публикации. Список публикаций очень впечатляющий. Это семь статей, две из которых опубликованы в таком высоко уровневом журнале, как Nature Methods. И при этом, несмотря на то, что все эти статьи опубликованы в 2013-2014 годах, они уже получили более двадцати цитирований, что говорит о высокой востребованности и научной актуальности работы диссертанта.

И в заключение, как уже, наверное, понятно из всего, сказанного выше, я хочу сказать, что диссертация Путинцевой Екатерины Викторовны удовлетворяет требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности “Молекулярная биология”. Спасибо.

Е.В. Гришин:

Спасибо. Пожалуйста, Екатерина Викторовна, вам есть, на что ответить.

Е.В. Путинцева:

Спасибо большое, Мария Дмитриевна. Я начну сначала. По поводу отсутствия использования метода молекулярного баркодирования в первой части работы – в анализе репертуаров матерей и детей. Дело в том, что там,

по нашему мнению, молекулярное баркодирование не прибавило бы информации. Потому что мы были заинтересованы в максимально возможной глубине секвенирования. А при нормировке на количество молекулярных событий на старте мы бы потеряли некоторое количество – большое количество – событий. А этого мы не могли себе позволить в данном эксперименте.

По поводу использованной полимеразы. На самом деле, мы проводили несколько сравнений полимераз. Первое мы делали до начала эксперимента и по его результатам получилось так, что Encuslo устраивала нас больше всего. Во-первых, Encuslo находится прямо здесь в ИБХ и не является очень дорогой. Кроме того, нам понравилась ее эффективность и нам просто было удобно ее использовать. Однако потом мы проводили еще сравнение – и как раз такое, как вы предложили. Сравнение одного и того же образца РНК с использованием разных полимераз. И вы совершенно правильно заметили: Encuslo оказалась не самой прекрасной полимеразой. В данный момент для приготовления наших библиотек мы используем полимеразу Q5.

По поводу качества РНК: когда мы говорим, какие возможности дает использование молекулярного баркодирования, мы, действительно, имеем в виду качество исходного образца РНК. Потому что в зависимости от качества обратная транскрипция этого образца и дальнейшая амплификация будет проходить с разной эффективностью. То есть если у вас есть один образец с плохим качеством РНК и другой образец с хорошим качеством РНК, если вы не знаете об этом и не знаете, какое количество молекул кДНК у вас было на старте, вы ложным образом решите, что в том образце, где было плохое качество, разнообразие ниже. Однако это не так. Молекулярные баркоды позволили бы избежать этой ошибки.

За опечатки и прочие недочеты я прошу прощения. А вообще спасибо большое.

Е.В. Гришин:

Спасибо. Вы удовлетворены?

М.Д. Логачева:

Да.

Е.В. Гришин:

Все, спасибо. Присаживайтесь, пожалуйста. Так, разрешите, коллеги, открыть общую дискуссию по поводу прослушанной защиты. У кого есть желание, кому угодно высказаться? Так, Алексей Алексеевич, пожалуйста.

А.А. Богданов:

Ну, я должен сказать, что работа мне очень понравилась. Я узнал очень много нового для себя. Это очень ценно – не просто просидеть на совете, а что-то еще новое узнать. Меня особенно убедило выступление первого рецензента и также меня Сергей Анатольевич уверил, что все, что здесь было сделано в этой работе – это не просто соответствует мировому уровню, а выше мирового уровня. Но вот я хотел бы все-таки по поводу терминологии выступить. Ну, то, что касается родных пар – это вопрос беллетристики, художественной литературы. А вот чего я категорически против, так это использования термина “сиквенс”, подразумевая под этим последовательность нуклеотидов или последовательность аминокислот. Дело не в том, что этот термин придумали проклятые американцы. А дело в том, что он не может просто вот так использоваться для обозначения. Понятно, за ним что-то следует – даже если вы посмотрите на ваш список литературы, как этот термин используется в названиях статей – там все нормально. Это, опять же, чисто лабораторный жаргон. Между прочим, я знал одну лабораторию – замечательную – когда-то в Гатчине под Ленинградом. Она состояла из одних охотников и рыболовов. Там и не такие термины еще использовались, как нормальный лабораторный жаргон. Я представляю, как бы они назвали вообще нуклеотидные последовательности. Так что мне кажется, что когда вы выходите на эту высокоуважаемую трибуну и показываете что-то на этом высокоуважаемом экране, то это должно соответствовать нормальной научной терминологии. А так, конечно, я буду голосовать за, положительно по поводу этой работы. Работа очень хорошая, я вас поздравляю.

Е.В. Гришин:

Спасибо, Алексей Алексеевич. Кому угодно еще высказаться? Никому. Тогда, значит, наверное, разрешите предоставить заключительное слово диссертанту.

Е.В. Путинцева:

Спасибо. Я бы хотела выразить огромную благодарность своим оппонентам за прочтение моей работы, внимательное ознакомление. Равшану Инноятовичу в особенности – за то, что он так прекрасно объяснил ее в своем выступлении. Я бы хотела поблагодарить Татьяну Игоревну Яковлеву за огромную помощь в подготовке к защите. Самую свою большую благодарность я бы хотела выразить своему научному руководителю –

просто за все. А также всем коллегам и сотрудникам лаборатории геномики адаптивного иммунитета, лаборатории биофотоники и лаборатории активных форм кислорода за поддержание высокого уровня интереса того, что происходит, за поддержку и за прекрасное чувство юмора. Спасибо.

Е.В. Гришин:

Для того, чтобы нам сделать процедуру голосования, необходимо избрать счетную комиссию. И тут есть предложение: без имен-отчеств это Мурашев, Шахпаронов и наш уважаемый ученый секретарь. Нет возражений? Давайте проголосуем. Кто за - прошу поднять руки. (Все «за»).

Теперь, уважаемые коллеги, прежде, чем перейти к голосованию, я все-таки предлагаю немножко изменить программу заседания и рассмотреть вариант заключения диссертационного совета. Значит, у вас эти варианты есть. Значит, какие есть замечания по форме и по сути? Всех все устраивает? Никто ничего там не обнаружил, да? Ну, судя по всему, так. Тогда мы принимаем и объявляется перерыв на голосование, пожалуйста.

(проходит голосование и подсчёт голосов)

В.А. Олейников:

(оглашает результаты голосования)

Путинцева Екатерина Викторовна. Присутствовало на заседании - 21 член совета, роздано бюллетеней – 21, оказалось в урне бюллетеней – 21, «за» - 21, «против» - нет, недействительных – нет.

Е.В. Гришин:

Спасибо. Я прошу утвердить итоги голосования. Кто «за»? (Все «за»).

(Проходит голосование по проекту заключения совета. Заключение совета принято единогласно.)

Заместитель председателя диссертационного совета
академик РАН

Е.В. Гришин

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

