

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения «Государственный
научный центр «Институт
иммунологии» Федерального медико-
биологического агентства,

член-корреспондент РАН,
профессор, М.Р. Хаитов

« 9 » февраля 2023 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертационной работы Израельсона Марка Александровича «Организация адаптивного иммунитета долгоживущего грызуна *Spalax galili*» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3 – «Молекулярная биология»».

Актуальность темы диссертационной работы

Старение считается естественным и неизбежным «побочным эффектом» жизни, при этом продолжительность жизни может существенно различаться у разных видов и индивидуумов. Исследователи предлагают множество теорий о причинах старения, но ни одна из них в настоящий момент не возобладала. Тем не менее поиск путей замедления процесса старения и предотвращения развития заболеваний, связанных с функциональным угасанием организма, не теряет своей актуальности.

Иммунологическая теория, рассматривающая старение, как результат сочетанного действия факторов, связанных со снижением эффективности иммунной функции, формированием условий для прогрессирующего воспаления и активацией аутоиммунных механизмов, рассматривается многими специалистами

в качестве одной из наиболее перспективных. В последнее время произошли значительные изменения в понимании клеточных и молекулярных основ, генетических и эпигенетических изменений во врожденной и адаптивной иммунной системе во время старения позвоночных.

В качестве объекта таких исследований часто выступают долгоживущие организмы. Так подземный грызун *Spalax Galili* (слепыш), обитающий в восточной части Средиземноморья, подобно другому известному долгожителю, голей кротовой крысе, живет в 10 раз дольше, чем у близкородственные мыши и крысы. Кроме того, эти грызуны демонстрируют удивительную устойчивость к раку.

Таким образом исследования в области изменения иммунных функций по мере старения у человека и животных позволяют выявить основные механизмы старения и предложить новые идеи для терапии заболеваний. Прогресс в области изучения долголетия приведет к существенному социальному и экономическому эффекту, связанному с увеличением продолжительности жизни и снижением бремени возрастных заболеваний.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Диссертационная работа Израельсона М.А. Выполнена на базе ФГБУН «Институт Биоорганической Химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН и посвящена изучению возрастных изменений и структуре адаптивного иммунитета у не модельного объекта *Spalax galili*. 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. Выводы базируются на изучении достаточного объема экспериментального материала для получения достоверных результатов.

Предметом исследования в диссертационной работе Израельсона М.А. стало изучение возрастных изменений структуры адаптивного иммунного ответа у грызуна *Spalax galili*. Для решения поставленных задач был разработан метод получения кДНК библиотек иммунных рецепторов, основанный на гомологии константных сегментов генов α - и β -цепей Т-клеточных рецепторов, и тяжелой цепи иммуноглобулинов. Полученные библиотеки были использованы для создания референса Т- и В-клеточных генных сегментов. С использованием разработанного метода и референса, был проведен сравнительный анализ иммунных репертуаров *Spalax galili*, человека и мыши в четырех возрастных группах. Также автором были получены кДНК библиотеки транскриптомов слепыша и мыши в 4 возрастных группах. На основе полученных данных был создан референс для работы с транскриптомом *Spalax galili*, включающий 16736 генов. Был проведен сравнительный анализ уровней транскрипции генов, вовлеченных в развитие и функционирование иммунной системы у слепыша и мышей, для 4 возрастных групп.

Применение современных иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования обосновывает достоверность результатов. Анализ исследуемых иммунологических параметров проведен корректно, с привлечением большого объема исходных данных. Статистическая обработка полученных данных выполнена на высоком методическом уровне с учетом требований к анализу данных медико-биологических исследований.

Объем и структура работы соответствуют требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Значительный вклад соискателя в разработке рассматриваемой проблемы не вызывает сомнений. Широкая апробация вновь выявленных фактов в форме научных публикаций и дискуссий на научных конференциях определяют обоснованность и достоверность выносимых на защиту результатов и выводов.

Научная новизна работы

Изучение структуры иммунитета у долгоживущих организмов представляет значительный интерес. Особенности строения или обитания таких организмов

позволяют им задействовать ранее не описанные механизмы борьбы с заболеваниями. Открытие таких механизмов может помочь при разработке новых способов лечения заболеваний, связанных со старением. В результате исследования автором впервые установлено, что разнообразие репертуара Т-клеточных рецепторов *Spalax galili* не снижается с возрастом в отличие от мыши и человека. По всей видимости это происходит из-за того, что в ходе эволюции слепыши выработали новый механизм, который позволяет им избежать накопления крупных клонов Т-клеток с возрастом. В том числе автором проведен анатомический анализ структуры тимуса слепышей и было показано, что он инволюционирует с возрастом и, таким образом, не может обеспечивать поддержание разнообразия Т-лимфоцитов.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования определяется комплексным иммунологическим анализом адаптивного иммунитета у животных в разных возрастных группах. Анализ транскриптома мышей и слепышей, принадлежащих к различным возрастным группам, показал, что для слепышей характерен пониженный и не меняющийся с возрастом уровень экспрессии генов, участвующих в дифференцировке Т-клеток (*Il2, Il2ra, Prf1, Ifng, Gzma, Fasl* и *Il12a*). В то же время гены противовоспалительных цитокинов, ингибирующих дифференцировку (*Il10*), и цитокинов, участвующих в поддержании гомеостаза наивных Т-клеток (*Il7, Il7r*) высоко экспрессируются у слепыша в течение всей жизни. Автором показано, что уровень экспрессии генов наивных Т-клеток (*Ccr7* и *Lef1*) с возрастом у слепыша повышен по сравнению с мышью. Также в исследовании показано, что для слепыша характерна пониженная экспрессия транскрипционных факторов специализированных Т-клеточных популяций *Eomes, Gata3, Tbx21* и *Foxp3*, что указывает на незначительную аккумуляцию функциональных Т-клеточных популяций у старых особей. У слепыша с возрастом не наблюдается повышения экспрессия *Foxp3* и *Ctla4*, что свидетельствует об отсутствии экспансии регуляторных клеток. Эти наблюдения предполагают

гомеостаз наивных Т-клеток с возрастом и свидетельствуют об отсутствии у слепыша долговременной Т-клеточной памяти и активной дифференцировки в специализированные Т-клеточные популяции.

В свою очередь анализ гуморального иммунитета слепыша показал отсутствие увеличения частоты гипермутаций в генах иммуноглобулинов с возрастом. Показано, что IgG достигает пика уже в раннем возрасте, и этот изотип доминирует на протяжении всей жизни. В то же время, разнообразие IgM остается стабильным в течении всей жизни у слепыша, что может указывать на устойчивое присутствие популяции наиболее ранних фетальных В1-клеток, способных активироваться независимо от Т-лимфоцитов.

Научно-практическая значимость

Поиск подходящих животных моделей имеет решающее значение в биомедицине, но редко один вид (например, мыши) обладает всеми необходимыми характеристиками, а также отражает все физиологические аспекты целевого вида (например, человека). В связи с этим удачный выбор объекта исследования важен с практической точки зрения, поскольку позволяет взглянуть на изучаемую проблему с нового ракурса.

Определение полного разнообразия иммунных репертуаров является нетривиальной задачей, ограниченной характеристиками образца и недостатками методов экстраполяции. Также сравнение основных параметров иммунных репертуаров сильно зависит от глубины анализа, которая часто варьирует от образца к образцу даже в стандартизованных экспериментах. Для нивелирования различной глубины секвенирования при сравнении образцов автор использовал новый метод нормировки на количество исходных молекул с использованием молекулярного баркодирования. Использование молекулярных баркодов позволяет корректировать мутации, возникающие во время амплификации. Для того, чтобы подобрать метрику разнообразия и проверить эффект нормализации на молекулярные баркоды, был проведен сравнительный анализ разнообразия CDR3 регионов бета цепей TCR молодых и старых мышей. Для каждого образца также

был определен процент наивных Т-лимфоцитов. Была оценена корреляция между различными метриками разнообразия и возрастом, а также между метриками и процентом наивных Т-клеток. Для проведения статистического анализа и визуализации характеристик иммунных репертуаров, полученных с использованием ранее разработанных программных пакетов MiXCR и MiGEC было разработано программное обеспечение VDJviz. Исходя из результатов эксперимента были выбраны метрики разнообразия и алгоритм обработки данных для их использования, которые лучше всего коррелируют с возрастом и процентом наивных клеток.

В ходе работы также был создан метод получения кДНК библиотек репертуаров Т-клеточных и В-клеточных рецепторов слепыша, подобраны специфические праймеры к генным сегментам, кодирующим константные области Т-клеточных рецепторов и изотипов иммуноглобулинов. С применением данного протокола получены и проанализированы библиотеки, на основе которых созданы референсные данные генных сегментов иммунных рецепторов Т- и В-лимфоцитов. Анализ последовательностей позволил определить координаты генных сегментов и идентифицировать наборы функциональных генов.

Используя разработанные методы, автор показал, что слепыши обладают ранее не описанными для других млекопитающих особенностями адаптивного иммунитета, в том числе показал, что с возрастом у этих животных не наблюдается падения разнообразия репертуаров Т-клеточных рецепторов в периферических органах.

Эти результаты создают основу для дальнейшего изучения структуры адаптивного иммунного ответа в контексте долголетия и здорового старения. Кроме того полученные результаты могут быть использованы в составе учебных программ для подготовки специалистов медико-биологического профиля.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, раздела, посвященного

полученным результатам, заключения и выводов. Обращает внимание глубокий и всесторонний анализ литературных данных по изменениям адаптивного иммунитета, связанным со старением и изучению иммунитета на немодельных объектах. Библиографический список включает 184 литературных источника. Диссертационная работа иллюстрирована 32 рисунками, 6 таблицами в основной части и 3 таблицами в приложении. Общий объем диссертации составляет 135 страниц машинописного текста.

Во введении диссертации обоснована актуальность исследований, отражены научная новизна, практическая значимость.

В обзоре литературы автор компетентно проводит анализ современного понимания особенностей развития адаптивного иммунного ответа и его изменений с возрастом.

В главе «Материалы и методы» приведено описание использованных современных методов исследования, использованных автором. Подробно изложены иммунологические и молекулярно-генетические методы изучения иммунных репертуаров.

Результаты работы изложены в 12 главах, посвященных подбору метода оценки иммунных репертуаров, разработке метода получения библиотек кДНК, созданию референса ТКР и иммуноглобулинов слепыша, филогенетическому анализу генов ТКР и иммуноглобулинов слепыша и возрастным особенностям структуры адаптивного иммунного ответа.

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

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на конференции 5th European Congress of Immunology в Амстердаме. Основные положения диссертационного исследования изложены в 4 печатных работах, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации.

Заключение

Диссертация Израельсона Марка Александровича «Организация адаптивного иммунитета долгоживущего грызуна *Spalax galili*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология», является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований, решены задачи, важные для молекулярной биологии, а именно: впервые охарактеризована структура адаптивного иммунитета не модельного объекта долгоживущего грызуна *Spalax galili*, а так же показаны особенности устройства нехарактерные для ранее изученных систем.

Диссертационная работа Израельсона Марка Александровича полностью соответствует критериям (в том числе п.9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. №748; 29.05.2017 г. №650; 20.03.2021 г. №426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 № 1690), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

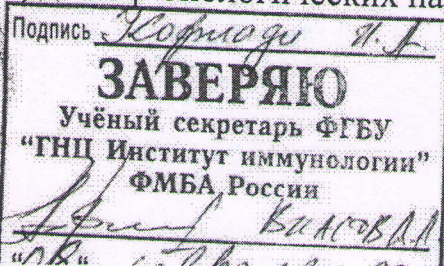
Отзыв обсужден и утвержден на открытом заседании отдела иммуногенетики человека ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, протокол заседания № 23-1 от 2 февраля 2023 г.

Отзыв подготовил

И.о. Заведующего лабораторией молекулярной иммуногенетики

ФГБУ «ГНЦ Институт Иммунологии»

ФМБА России, доктор биологических наук,



Кофиади И.А.

