

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

30 октября 2019 г.

Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Комеч Екатерины Александровны

**Сравнительный анализ индивидуальных репертуаров Т-клеточных
рецепторов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями**

Специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

Москва - 2019

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 30 октября 2019 года.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Иванов В.Т.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 23 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. | Арсеньев Александр Сергеевич | (02.00.10) |
| 6. | Д.х.н. | Безуглов Владимир Виленович | (03.01.06) |
| 7. | Д.х.н. | Бовин Николай Владимирович | (03.01.06) |
| 8. | Академик РАН | Габибов Александр Габибович | (03.01.06) |
| 9. | Д.х.н. | Дзантиев Борис Борисович | (02.00.10) |
| 10. | Д.б.н. | Долгих Дмитрий Александрович | (03.01.03) |
| 11. | Член-корр. РАН | Завриев Сергей Кириакович | (03.01.06) |
| 12. | Д.х.н. | Зубов Виталий Павлович | (03.01.06) |
| 13. | Д.б.н. | Лебедев Юрий Борисович | (03.01.03) |
| 14. | Академик РАН | Лукьянов Сергей Анатольевич | (03.01.03) |
| 15. | Академик РАН | Мирошников Анатолий Иванович | (03.01.06) |
| 16. | Д.х.н. | Овчинникова Татьяна Владимировна | (02.00.10) |
| 17. | Д.б.н. | Патрушев Лев Иванович | (03.01.06) |
| 18. | Д.х.н. | Румш Лев Давыдович | (03.01.06) |
| 19. | Д.б.н. | Сапожников Александр Михайлович | (03.01.03) |
| 20. | Д.х.н. | Смирнов Иван Витальевич | (02.00.10) |
| 21. | Д.х.н. | Уткин Юрий Николаевич | (02.00.10) |
| 22. | Д.х.н. | Шахпаронов Михаил Иванович | (02.00.10) |
| 23. | Д.б.н. | Шпаковский Георгий Вячеславович | (03.01.03) |

Председатель: Полное впечатление, что тут все есть основания двигаться дальше. Речь идет о защите кандидатской диссертации Екатерины Александровны Комеч. Как правильно ставить ударение точно не знаю, надеюсь, я не ошибся. Как положено, материал личного дела должен быть у Владимира Александровича.

Ученый секретарь:

(Зачитывает материалы личного дела.)

Да. Значит, Екатерина Александровна Комеч, гражданка Российской Федерации, окончила биологический факультет Московского государственного университета по специальности "биохимия". С 2014 по 2017 год... это было в 2013 году. С 2014 по 2017й год - инженер-исследователь, а с 2017го года по настоящее время - младший научный сотрудник лаборатории сравнительной и функциональной геномики Института биоорганической химии, то есть нашего института. Далее, с 2013 по 2017 годы обучалась в аспирантуре нашего института, кандидатский экзамен по специальности молекулярная биология сдала с оценкой "отлично". В лаборатории выполнена в лаборатории сравнительной и функциональной геномики нашего института, научный руководитель диссертационной работы профессор Лебедев Юрий Борисович, руководитель этой лаборатории. По теме диссертации опубликовано пять статей, входящих в базы данных Web of Science и Scopus, объявление о защите, автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 17 июля 2019го года, все необходимые документы в деле имеются.

Председатель: Вопросы? Исправления? Какие-нибудь неточности?

Ученый секретарь: Нет? В этот раз все правильно.

Председатель: в этот раз все правильно. Спасибо. Ну что же, Екатерина Александровна, Вам 20 минут для доклада.

Соискатель: *(Излагает основные положения диссертационной работы)*

Председатель: Спасибо за доклад. Начинаем обсуждение. У кого есть вопросы? Николай Владимирович, начинайте.

Бовин Н.В.: Очень интересное исследование, и хочется видеть его продолжение. Вы знаете репертуар Т-лимфоцитов, которые узнают что-то, и дальше хотелось бы знать какая молекулярная природа этого "чего-то"? Есть ли у Вас предположения, есть ли у Вас планы, как изучать, как попытаться найти структуру? Если есть, то поделитесь, что Вы хотите делать далее.

Соискатель: Да, благодарю за вопрос. Конечно это то, что нас интересует сейчас просто очень сильно. В данный момент мы сотрудничаем с двумя лабораториями, и есть одна технология, называется дрожжевой дисплей. С ее помощью можно, если мы сделаем полную структуру рецептора в виде белка, то можно проскринировать какое-то большое число искусственных пептидов и понять, связываются ли они с этим TCR или нет. Такая работа ведется, я надеюсь, что вскоре мы сможем получить какие-то ответы. Пока у нас идей нет.

Бовин Н.В.: В продолжение, Вы абсолютно уверены, что мишенью являются именно белки? Может быть это гликаны или молекулярные паттерны?

Соискатель: Ну, это хорошие вопрос. Так как мы предполагаем, что это все-таки классическая молекула МНС I-го класса, HLA-B*27, то наверное, это скорее пептиды, но конечно никто не исключает что это может быть что-то иной природы.

Председатель: есть ли еще вопросы? Да, прошу.

Ефремов Р.Г.: Так же, как и в предыдущей работе, вопрос о статистической значимости, потому что насколько я понимаю на некоторых слайдах выводы делаются на основе анализа там допустим одного пациента. Вот какой-то у Вас там был, по какому-то признаку отрицательный пациент, у него не было обнаружено .. а сколько таких, выборка-то какая была?

Соискатель: Так, я поняла, о чем Вы говорите. Вы имеете в виду вот этот слайд. Действительно, здесь у нас есть выборка из 8 пациентов с анкилозирующим спондилитом, всего один В27 отрицательный, просто потому что 95% пациентов они всегда В27 положительные, набрать выборку с отрицательными очень сложно.

Ефремов Р.Г.: Тогда может как-то осторожнее делать выводы. Это может быть случайный результат.

Соискатель: Да, я согласна, но тем не менее у нас есть выборка из пациентов с псориатическим артритом. Здесь уже есть несколько пациентов. Здесь, по-моему, 7 В27 отрицательных. И опять же мы видим, что такие клонотипы у них отсутствуют. То есть, таким образом, это не один пациент, а уже какая-то весомая группа.

Председатель: Еще желающие задать вопрос имеются? Вопросов больше нет, тогда немножко отдохните, переходим к отзыву ведущей организации. Владимир Александрович нам доложит.

Ученый секретарь: *(Зачитывает отзыв ведущей организации. Отзыв положительный. Отзыв прилагается.)*

Так, ведущая организация - это Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта. Отзыв полностью положительный. Ну и здесь пишется, опять же некие общие вещи, о том, что аутоиммунные заболевания являются одной из важнейших проблем современной иммунологии и медицины. Происходит нарушение.. суть иммунологической толерантности, появляются аутореактивные клоны Т-лимфоцитов, которые начинают атаковать здоровые клетки и ткани организмов, организма. Исследование клональных репертуаров Т-лимфоцитов пациентов с аутоиммунными заболеваниями позволяет вывить аутореактивные клоны Т-клеток.., участвуют в патогенезе заболевания, что делает их хорошими мишенями для направленной терапии. Ну собственно, это некое обоснование актуальности, а цель диссертационной работы - это выявление особенностей репертуара Т-лимфоцитов, включая идентификацию предположительно патогенных клонов, а также анализ репертуара при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток крови у пациентов с спондилоартропатиями. Сама диссертация построена по классической схеме: введение, обзор литературы и так далее, 222 ссылки, содержит 24 рисунка. В разделе Обзор литературы автор описывает процесс формирования клональных репертуаров. Материалы и методы - приведены характеристики исследованных доноров и последовательно описаны основные методы, использованные в работе. Результаты и обсуждение разделены на 4 части. Ну и далее. Первое - это подробное описание использованной технологии реконструкции клональных репертуаров Т-клеток. Далее, вторая часть посвящена изучению

клональных репертуаров Т-лимфоцитов периферической крови пациентов с анкилозирующим спондилитом - АС, они это обозначают. Далее идет идентификация АС-ассоциированных клонотипов, ну и так далее, то, что мы сегодня слышали. В последней части исследуется динамика Т-клеточного репертуара в ходе аутологической трансплантации гемопоэтических стволовых клеток крови у двух пациентов с АС. Замечания.

Первое. В разделе «Обзор литературы» было бы уместно более подробно осветить функциональную характеристику различных субпопуляций Т-клеток, описать последствия передачи сигналов от них в клетки-мишени (а сейчас это указано лишь для Т-регуляторных клеток). Кроме этого, раздел выиграл бы от большего количества иллюстраций. Так, например, работу украсило бы наличие рисунка со строением TCR (в т.ч. с указанием CDR участков), схема взаимодействия TCR с комплексом МНС-антиген, а также строение иммунного синапса.

Второе. Раздел «Материалы и методы» местами написан излишне лаконично — отдельные эксперименты будет трудно воспроизвести без использования вспомогательной литературы. Так, в главе 4.3.2 следовало бы на отдельном рисунке привести стратегию постановки гейтов для сортировки клеточных популяций, в главе 4.3.3 уточнить, проводилась ли обработка полученных образцов суммарной РНК с помощью ДНКазы I. Кроме того, в главе 4.3.2 указано, что препарат CD4 или CD8+ Т-клеток, выделенный из 4-8 мл венозной крови или 16-24 мл синовиальной жидкости, лизировали в 0,5 мл реагента TRIzol, тогда как в главе 4.3.3 отмечается, что для препаратов, полученных из 8 мл периферической крови или синовиальной жидкости, использовали 1 мл TRIzol. Данный момент требует уточнения, так как количество реагента TRIzol имеет важное методологическое значение и может повлиять на качества получаемого препарата мРНК. Также встречаются некоторые нестыковки в описании использованных реактивов в разных частях раздела: в главе 4.1.1 упомянут набор реагентов для ОТ-ПЦР SmartScribe, а в разделе 4.3 — реактивы компании «Евроген». Также хотелось бы, чтобы автор привел более подробную характеристику индексов Chao1 и Gini.

Третье. Несмотря на то, что в работе указана ссылка на статью, в которой описан программный пакет для анализа репертуаров Т-лимфоцитов "tcR", было бы уместно прямо в тексте диссертации дать ссылки на онлайн-ресурсы, на которых размещены сам пакет и его исходный код, тем более, что данный программный пакет был разработан при участии автора.

Четвертое. Исходя из подписи к рисунку 6, на предмет клонального разнообразия репертуаров Т-клеток периферической крови было проанализировано 25 пациентов с АС, однако на графике отображено только 19 таких пациентов. Аналогичная ситуация со здоровыми донорами: в подписи указан 101 человек, в то время как на графике отображено около 65 соответствующих точек. Это несовпадение требует пояснения.

Пятое. На рисунок 11 в качестве контроля следовало бы добавить данные для здоровых доноров.

Шестое. Правая часть рисунка 14 выглядит перегруженной и тяжело воспринимается.

Седьмое. Для рисунка 17 нагляднее было бы привести расшифровку цветового кода обозначения полярности аминокислот по Ленинджеру.

Восьмое. Остается не до конца понятным, насколько репрезентативной является выборка из двух пациентов с АС, перенесших аутологичную ТГСК.

Девятое. В работе имеется незначительное количество опечаток и стилистических неточностей. В «Список сокращений» следовало бы внести аббревиатуру НПВП или расшифровать ее на стр. 43. Кроме того, в последние годы устоялось название цитокина «TNF» вместо «TNFальфа».

Указанные недостатки не являются существенными и не снижают общего положительного впечатления от диссертационной работы, выполненной на высоком

научном уровне. По теме работы опубликовано пять статей. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

Диссертационная работа Комеч Екатерины Александровны соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология.

И подписано: составитель отзыва - Купраш. Это чл.-корр. РАН, д.б.н., заведующий лабораторией передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Института молекулярной биологии имени Энгельгардта, и утверждено Карповым Вадимом Львовичем - заместителем директора этого Института. Вот, было много недостатков указано.

Председатель: Спасибо. Екатерина Александровна, 9 замечаний, прошу ответить.

Соискатель: Да, действительно, Дмитрий Владимирович очень тщательно проанализировал мою работу.

Значит, что касается литературного обзора, действительно, я согласна, что можно было бы описать функциональные особенности передачи сигналов и добавить больше картинок. Ну вот сегодня в презентации я показала картинку с синапсом, учту.

Далее, касаемо методов: ну, так как все методы являются оригинальными, и технология постоянно меняется, мы какие-то делаем модификации, то я постаралась описать общий принцип, и какие-то могли, действительно, неточности с количествами быть. Но в статьях все методы опубликованы, можно посмотреть как что сделано в различные годы и посмотреть какие модификации мы вносили.

Касаемо публикации онлайн-ресурсов, я согласна, можно было бы действительно привести ссылку на исходный код.

Про подписи к рисункам. Про количество пациентов и точек отображенных на рисунках. Ну понятно, что у нас была какая-то общая выборка, но для различных анализов мы старались все время подбирать сравнимые выборки, репрезентативные, и поэтому не на всех рисунках отображены все пациенты. Но тем не менее это никак не влияет на результаты.

Далее, "правая часть рисунка выглядит перегруженной и тяжело воспринимается". Ну, к сожалению нам приходилось компоновать иногда несколько рисунков для упрощения.

"Нагляднее было бы привести расшифровку цветового кода аминокислот" - согласна с этим замечанием.

Касаемо трансплантации, которую мы исследовали на двух пациентах, действительно, здесь надо сказать, что конечно выборка маленькая, и это не клиническое исследование. Это пилотная работа. Это всего вторая работа по трансплантации для таких пациентов, и мы надеемся, что результаты, полученные в ходе этой работы, помогут при разработке новых протоколов и, возможно, помогут для проведения клинических исследований.

Так, касаемо "опечатки и стилистические неточности" - да, я согласна, надо было привести полную расшифровку всех аббревиатур. С последним замечанием согласна.

Председатель: Спасибо. Значит, Юрий Борисович, есть желание охарактеризовать вашего подопечного?

Лебедев Ю.Б., научный руководитель: Да, спасибо. Вся лаборатория, весь отдел долго ждали этого дня. Катя очень светлый человек, и мы ждали, чтобы иметь возможность ее поздравить, и всячески за нее болели. Не только она светлый человек, а очень, я даже не могу подобрать эпитета, умиротворяющий - плохое слово, позитивный - еще более худшее. Я сегодня первый раз Екатерину Александровну видел, как неуверенность, некоторая взволнованность отразилась в начале ее выступления. Но вот уже при ответе на вопросы

Катя вернулась в свое естественное состояние, и эти широко распахнутые глаза и желание и подискутировать, и убедить в собственной правоте окружающих, они вызывают естественную ответную реакцию. Катю очень-очень любят и уважают в лаборатории, и она - одна из таких цементирующих членов лаборатории. А уважают ее еще и за то, что она и собственные результаты, и результаты своих коллег не только критикует, а очень хочет найти рациональное быстрое продолжение тем небольшим вопросикам, на которые удастся ответить в каждом эксперименте. И то что Катя сейчас, можно сказать, сама инициировала достаточно широкие исследования не только анкилозирующего спондилита, но и псориатического артрита - это полностью ее достижение. Она непосредственно участвует и в подборе когорты пациентов, и в договоренности с клиницистами, и в обсуждении даже промежуточных результатов, опять таки в таком ключе - как быстрее и полноценнее продвинуть работу дальше. Все что я сказал, я постарался не очень растекаться, надеюсь, убедило вас в том, что Екатерина Александровна Комеч очень перспективный молодой научный сотрудник, полностью самостоятельный, инициативный, мотивированный, и мне остается только призвать членов совета проголосовать за эту диссертацию, а Кате пожелать и дальше продолжать расти. Спасибо.

Председатель: Мы учтем ваше мнение. Тем не менее мы выслушаем мнение оппонентов официальных. Вначале, Григорий Александрович Ефимов. Это у нас национальный центр гематологии Минздрава.

Ефимов Г.А., официальный оппонент: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается.)*

Добрый день, уважаемые коллеги, уважаемые члены ученого совета. Разрешите мне представить свой отзыв на диссертационную работу Екатерины Александровны Комеч.

Аутоиммунные болезни, то есть те болезни, при которых происходит атака на собственные ткани организма, представляют не только большой фундаментальный интерес для молекулярной иммунологии, но также являются крайне важными с клинической точки зрения, потому что их число неуклонно растет с увеличением качества жизни населения. Считается, что в основе патогенеза аутоиммунных заболеваний является срыв толерантности на собственные антигены организма за счет феномена кросс-реактивности. Поскольку системное распознавание Т-лимфоцитами своих антигенов имеет некую вырожденность, то некоторые рецепторы способны, распознав однажды антиген, происходящий из какого-то патогена, вируса или бактерии, они также могут обладать способностью иногда распознавать собственные антигены организма, что вызывает аутоиммунные заболевания. Аутоиммунные заболевания - достаточно большая группа, но надо сказать, за редким исключением, вот аутоиммунный диабет является таким исключением, для которого известен антиген, а для большинства аутоиммунных заболеваний антигены неизвестны. В то же время есть данные о том, что многие аутоиммунные заболевания так или иначе ассоциированы с конкретными аллелями генов главного комплекса гистосовместимости - МНС, - что указывает на то, что есть какие-то конкретные антигены. Поскольку мы знаем, что каждый аллель МНС представляет свой почти уникальный набор антигенных эпитопов, то это указывает на то, что есть конкретные антигены, лежащие в основе патогенеза различных аутоиммунных заболеваний. Вот АС, на который делался основной фокус в данной работе, является уникальным практически заболеванием с почти 100% ассоциацией с конкретной аллельной группой HLA-B*27. Более того, в этой аллельной группе есть как патогенные, так и протективные аллели. Протективные - те которые не связаны, не ассоциированы с наличием заболевания, что очень, как бы, кричит о том, что тут есть конкретный антиген, представляемый в этой аллели МНС. Существуют и другие гипотезы о том, как именно, что это может быть не только артритогенный пептид, презентуемый этой аллелью, но может быть сама

конформация этой аллели. Но вот, забегаю немножко вперед, данные, полученные в этой работе очень весомо ложатся на чашу весов в пользу гипотезы артритагенного пептида, и если не забивают гвоздь в крышку гроба альтернативных гипотез, то как минимум небольшой гвоздь туда вколачивают.

Работа основана на методе анализа репертуаров Т-клеточного рецептора. Мы с вами знаем, что Т-клеточный рецептор в геноме не кодируется, что он получается в результате полуслучайной рекомбинации отдельных генетических сегментов, и в крови взрослого человека единомоментно существует около 10 миллионов различных Т-клеток с различными рецепторами. Из них несколько десятков тысяч являются теми Т-лимфоцитами, которые встретили свой антиген, прошли клональную экспансию, обеспечивают иммунную память и являются как бы "слепком" иммунной истории организма. Современные методы позволяют не только анализировать последовательность одного конкретного рецептора, но и с помощью секвенирования нового поколения делать "срез" всей иммунной системы, анализировать весь репертуар. Лаборатория, в которой диссертант выполняла работу, не просто в совершенстве владеет этими методами, это очень современный и высокотехнологичный метод, но она являлась одной из немногих лабораторий в мире, где этот метод разрабатывался.

Кроме того, в последнее время, в течение последних нескольких лет, даже двух лет, появляется много данных о том, что рецепторы, специфичные к одному и тому же антигену, имеют очень высокую степень похожести. Кроме того встречается такой эффект, так называемые публичные рецепторы. Это рецепторы, которые независимо в разных людях были собраны в процессе генетической рекомбинации и специфичные к одному и тому же антигену.

Конкретно задача данной работы была в том, что анализировали репертуары больных с анкилозирующим спондилитом, псориатическим артритом и сравнивали их Т-клеточными репертуарами от здоровых доноров, и были использованы как репертуары, полученные с периферической крови, так и репертуары, полученные с синовиальной жидкости. Было показано, что на уровне общей структуры репертуары больных АС не отличаются от репертуаров здоровых. Однако при оценке... при сравнении репертуаров больных и здоровых были выявлены клоны, которые чаще встречаются, или уникально встречаются у больных и не встречаются у здоровых людей. И что мне очень понравилось, что автор использовал такой параметр как расчет частоты рекомбинации, что позволяло исключить те клоны, которые встречаются у нескольких людей просто потому, что у них большая вероятность рекомбинации. Также было показано, что эти рецепторы, специфичные для больных, встречаются не просто в Т-клеточном репертуаре, а в репертуаре CD8 цитотоксических лимфоцитов. А мы знаем, что аллель В27 - это как раз МНС-I класса, который распознается цитотоксическими лимфоцитами. И дополнительно было показано, что эти клонотипы находятся в активированной фракции, то есть это очень существенный аргумент, который указывает на то, что действительно эти клоны каким-то образом ассоциированы с болезнью.

Затем были просеквенированы репертуары, полученные из очага воспаления, непосредственно из патологического очага, из синовиальной жидкости. Там была выявлена группа клонов, которые имели высокую степень взаимной похожести. Как я сказал раньше, по современным данным, если клоны похожи друг на друга, существует существенное указание, что они распознают один и тот же антиген. И более того, эти клоны пересекались с теми клонами, которые были выявлены у больных и не у здоровых людей. Как сказал диссертант, есть немногочисленная группа больных с АС, у которых нет данной аллели В27, вот у них у одного пациента такого таких клонов не было.

Как мы знаем, для того, чтобы получить полный функциональный рецептор, распознающий антиген, нам нужна не только бета-цепь, но и альфа-цепь. И такая задача тоже была поставлена - получить полную структуру, полную последовательность

рецептора. Автором с помощью проточной цитометрии были изолированы специфические клетки и просеквенированы и альфа, и бета цепи, и статистическими методами был получен один спаренный полный рецептор. Это прямо как бы важный инструмент для того, чтобы двигаться дальше и распознавать.. понимать, что же он распознает.

Про саму работу я хочу сказать, что она... я получил огромное удовольствие, по-моему, это замечательная работа. Очень приятно, что есть четкая задача, у которой есть фундаментальная составляющая, ну а релевантность ее вообще не вызывает никаких сомнений, поскольку у анкилозирующего спондилита на сегодняшний день не существует патогенетического метода лечения, лечение симптоматическое. Оно направлено на то, чтобы просто подавлять общую.. иммунную систему в целом. Если будет в конечном итоге в результате этой работы выяснен антиген для этого заболевания, то это позволит, возможно позволит, создать патогенетическое лечение, с помощью получения антиген-специфических Т-регуляторных клеток, или с помощью удаления конкретного патогенного клона.

Также я хочу сказать, что я как человек, который сам работает с образцами от пациентов, хочу вам сказать, что работа с пациентскими образцами требует очень большой организационной работы, а тут было проанализировано больше 40 больных! И это довольно редкое заболевание, и само просто получение этих образцов требовало, очевидно, очень больших усилий. Работа написана приятным, хорошим, легко читаемым научным языком. Обзор - лаконично и четко. В нем изложены.. обобщаются механизмы формирования Т-клеточного рецептора, генетическая перестройка, тимусная селекция, методы секвенирования репертуаров Т-клеточного рецептора, а также описывается механизмы срыва толерантности, кросс-реактивности и отдельно рассматриваются аспекты патогенеза и современные методы лечения анкилозирующего спондилита.

Результаты.. да, Материалы и Методы, как я сказал, метод суперсовременный и высокотехнологичный, описан достаточно подробно. Также использовано.. кроме секвенирования репертуаров, была использована проточная цитометрия в работе.

Результаты изложены четко и ясно, их интерпретация не вызывает никаких сомнений.

Меня.. Я должен сказать, что мои все.. почти все мои замечания были учтены еще на стадии апробации работы, поэтому у меня их практически не осталось. У меня есть 3 небольших замечания, которые несколько не умаляют достоинств этой работы. Во-первых, мне кажется, что может быть было бы уместнее подробное описание метода секвенирования, которое дается в этой работе, перенести.. привести не в разделе Результаты, как он сейчас, а в раздел Материалы и Методы.

Во-вторых, есть небольшая терминологическая нечеткость: в задачах называется один и тот же по сути подход - анализ клональных репертуаров Т-клеточных рецепторов, - называется то анализом, то характеристикой, что может в принципе сбить, наверное, читателя.

Я, лично меня автор убедил, что эти.. Я верю искренне в то, что эти Т-клеточные рецепторы распознают действительно один и тот же антиген, что есть много независимых свидетельств этому. Но формально как бы это еще не доказано. Можно было бы чуть-чуть, чуть-чуть поаккуратнее формулировать, но, как я говорю, я верю, и я знаю, что ведутся работы в направлении того, чтобы действительно с помощью полученного рецептора выявить антиген, и надеюсь, что они будут успешны, и что все это не только обогатит наши знания, но и, в какой-то момент, дойдет до клинического применения.

И я считаю, что работа безусловно соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертационным работам. Диссертант заслуживает присуждения степени кандидата наук по специальности молекулярная биология.

Председатель: Спасибо. В отзыве было немного, но тем не менее замечания были. Екатерина Александровна, у вас есть возможность среагировать.

Соискатель: Да, значит первое замечание касается того, что я описываю использованную технологию пробоподготовки в разделе Результаты, а не в разделе Методов. Это связано частично с тем, что, во-первых, это действительно результат. То есть я участвовала непосредственно в модификации этой технологии и в разработке последовательности биоинформатических алгоритмов, и в принципе, ну, мы сочли, что это более уместно в разделе Результаты поместить.

Касаемо цели и задач, действительно, я использую разные, условно, слова "характеристика" и "анализ". Ну, могу только сказать, что мы.. как-бы слово "анализ", оно подразумевает некое сравнение, да, еще с чем-то другим, и вот анализ репертуаров крови мы проводили с репертуарами... проводили между репертуарами здоровых и больных. А так как очаги воспаления есть только у пациентов, то как бы их не с чем особо сравнить, поэтому мы характеризовали, характеризовали клональные репертуары очагов воспаления. Вот.

И, по поводу формулировок, я согласна, что местами я, уже полностью погрузившись и убедившись морально, внутренне, что эти клоны действительно распознают одно и то же, я могла написать действительно, что.. слишком уверенную формулировку, стоило быть немножко мягче. Благодарю.

Председатель: Понятно. Спасибо. Кхм. К сожалению, официальный оппонент Атауллаханов Равшан Иноятович не смог приехать, но у нас есть его письменный отзыв, с которым мы сейчас ознакомимся.

Ученый секретарь: *(Зачитывает отзыв официального оппонента. Отзыв положительный. Отзыв прилагается.)*

Да, ну здесь отзыв официального оппонента, как уже сказано, Атауллаханов Равшан Иноятович. Отзыв полностью положительный. Написан на 6.. 7. На 7 страницах десятым шрифтом, то есть он очень объемный. Ну и поэтому, так сказать, я как-то, некую вытяжку дам, с вашего позволения. Ну, во-первых, естественно, оговаривается актуальность исследования - то, что мы сегодня уже неоднократно слышали об аутоиммунных заболеваниях.

Содержание работы изложено на количественно 110 страницах, 222 ссылки. В обзоре литературы очень хорошо описываются предшествующие уровни знаний в области в этой и отмечается, что Комеч отлично владеет современными знаниями в своей области молекулярной иммунологии.

Методы исследования соответствуют самому передовому мировому уровню изучения репертуаров. Методический уровень работы высокий, позволяющий получить лучшие по качеству и надежности данные на современном уровне развития этой науки. Биоинформатический и статистический анализ полученных результатов не вызывает сомнения и гарантирует достоверность полученных данных. Отмечается обстоятельность, аккуратность работы. Отмечается, что описанный протокол анализа Т-клеточных рецепторов был применен для исследования образцов ПК и СЖ 31 больного, 12 больных "псориазтрическим" артритом, В общем большое количество проб было сделано.

Научные результаты работы и их новизна. Опять же, так сказать, то, что мы слышали, но вот здесь отмечается: в диссертационной работе Комеч получено множество приоритетных научных данных, впервые проведено глубокое исследование репертуаров Т-клеток больных, указаны болезни. И далее слово "впервые" встречается здесь неоднократно. Исследовано распределение использования V-сегментов как доли клонотипов с определенным V-сегментов от всех клонотипов, и она экстраполировала эти данные на относительное содержание Т-клеточной популяции клеток, рецепторы которых используют определенные V-сегменты. Впервые при сравнении ну и так далее.. Еще раз "впервые", 25

больных упоминается.. И вот это слово "впервые", "впервые" встречается достаточно постоянно. Я не буду, так сказать, зачитывать подробно и повторять, поскольку, в общем-то, это было уже сказано сегодня в основном. Особенно интересные результаты были получены Комеч при изучении материала из суставов, пораженных воспалением. Диссертант показал, что обнаруженные ею в крови клонотипы, ассоциированные с анкилозирующим спондилоартритом, присутствуют в "синовиальной" жидкости воспаленных суставов у больных анкилозирующим спондилитом и "псориатрическим" артритом. Опять же слово "впервые", так сказать, и еще раз "впервые", в диссертации, поиск клонотипов и так далее. То есть очень, так сказать, хвalebный, очень такой яркий отзыв.

Научно-практическое значение результатов работы. В диссертационной работе получено значительное количество новых научных данных о репертуарах Т-клеток в крови и синовиальной жидкости больных вот этих болезней. Эти принципиально новые сведения представляют большое значение для фундаментальной науки. В частности, опять же оговаривается. Чрезвычайно интересное и полезное знание добыто диссертантом о клонотипах, ассоциированных вот с этими болезнями. Несмотря на то, что антигенную-специфичность обнаруженных клонотипов TCR еще предстоит изучить, открытие их структуры.. высокий уровень гомологии 16ти ассоциированных с указанными болезнями клонотипов позволяют уже сейчас ре-синтезировать их и использовать для диагностики, а также создания принципиально новых вариантов лечения вот этих болезней.

Вопросы и замечания:

По обзору литературы:

- Аргументы в пользу идеи «артритогенного пептида» неубедительны.

Второе. Не ясно, каким образом экспрессируются гомодимеры HLA-B27 у нокаутов по бета2-микроглобулину, поскольку известно, что белки HLA класса I в отсутствие B2M не выводятся на клеточную поверхность.

- Не ясно, каким образом гомодимеры HLA-B27 могут активировать CD4 Т-клетки, поскольку CD4 взаимодействуют с белками HLA класса II, но не класса I.

- Не вполне понятно, почему пернициозная анемия отнесена к аутоиммунным заболеваниям.

По методической части:

- Следовало бы указать, каким было содержание CD34-положительных клеток в аутотрансплантанте и сколько пришлось ввести белых клеток крови, чтобы достичь дозы 2,4... миллиона стволовых клеток.

По результатам:

- В стадии обострения анкилозирующего спондилоартрита исследован клональный состав CD38+HLA-DR+ Т-клеток периферической крови. Было бы полезно представить данные об относительном содержании таких активированных Т-клеток до и вовремя обострения болезни, то есть на момент изучения клонального репертуара этих клеток.

- Рис. 10А, стр. 63. Надпись «Полный репертуар Т лимфоцитов» не вполне соответствует тому, что здесь представлено наличие и частота 8 обнаруженных автором клонотипов TCR, ассоциированных с анкилозирующим спондилоартритом.

- Стр. 67 — сравнение Т-клеточных репертуаров в периферической крови и "синовиальной" жидкости следовало делать с учетом того, naive Т-клетки не выходят из циркуляции в ткани. Это означает, что более корректным было бы сравнить фракцию naive Т-клеток крови и Т-клеток синовиальной жидкости.

- Страница 66. Переводить частоты клонотипов TCR, определенные по РНК, в частоты Т-клеток, экспрессирующих такие клонотипы, нужно с осторожностью, поскольку уровни экспрессии мРНК TCR в разных Т-клетках могут существенно различаться.

- на рисунке 15 представлены аминокислотные последовательности обнаруженных диссертантом клонотипов CDR3, ассоциированных с анкилозирующим спондилоартритом.

Я уже научился это слово выговаривать. Полезно было бы представить и нуклеотидные последовательности тем более, что дальше автор сообщает о различных нуклеотидных реализациях, кодирующих эти фрагменты TCR.

Перечисленные замечания и вопросы ни в коей мере не умаляют достоинств и достижений работы. Они имеют характер пожеланий. Диссертационная работа Комеч — сильная, современная, содержательная, очень интересная, которая представляет собой новое решение актуальной научной задачи. Ну, далее название диссертации: «Сравнительный анализ индивидуальных репертуаров T-клеточных рецепторов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями». И наконец, диссертационная работа Екатерины Александровны Комеч соответствует критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней, а диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 молекулярная биология.

Подписано - Атауллаханов Равшан Иноятович, доктор медицинских наук, профессор, руководитель Лаборатории активации иммунитета бюджетного учреждения федерального государственного.. Государственный научный центр Институт иммунологии ФМБА. Ну, соответственно, все подписано.

Председатель: Понятно. Екатерина Александровна, Вам слово для очередного ответа на замечания.

Соискатель: Благодарю. Так. Начнем с начала. Про аргументы.. неубедительность аргументов в пользу идеи "артритогенного пептида". Ну, надо сказать, что гипотез о развитии и инициации спондилоартропатий несколько, и когда я писала обзор, они были разделены на 4, и артритогенный пептид - это только одна из них. Но вот в недавнем обзоре все 4 гипотезы были одним из ведущих специалистов в этой области, они были объединены в одну гипотезу. И наверное, моя работа внесла какой-то тоже вклад, я надеюсь, и все эти гипотезы можно будет объединить. И гипотеза "артритогенного пептида" будет звучать более убедительно, после моей работы.

Неясно как экспрессируются гомодимеры HLA-B*27 у нокаутов по b2-микроглобулину, так как известно, что белки HLA без микроглобулина не экспрессируются на поверхности. Но, на самом деле, все-таки гомодимеры образуются, и именно HLA-B*27. Известно, что такие белки обнаружены *in vivo*, и есть даже коммерческое антитело, которым можно покрасить такие гомодимеры. Так что здесь я возражаю Равшану Иноятовичу.

Неясно, каким образом гомодимеры активируют CD4 T-клетки, так как они связываются с белками II класса МНС. Здесь я поясню, что активация CD4 T-клеток происходит не за счет молекул HLA, а при контакте B27-гомомеров с рецепторами KIR3DL или KIR3DS - это рецепторы, другого... не TCR, но так же участвуют в активации или ингибировании иммунного ответа.

Не понятно, почему перциниозная анемия отнесена к аутоиммунным заболеваниям. Ну, на самом деле, я ее не относил к аутоиммунным заболеваниям, я просто показывала ее в качестве примера заместительной терапии. Известно, что при сахарном диабете - заместительная терапия инсулином, а при перциниозной анемии - витамин B12. Так что, здесь я не относил ее ни в коем случае к аутоиммунным.

Следовало бы указать, каким было содержание CD34 T-клеток в аутооттрансплантате. В принципе, это зависит очень сильно от донора, и протоколы очень сильно меняются. В статье у меня это описано, ну к сожалению в диссертации я этого не привела, действительно, стоило бы указать число.

Дальше по результатам. Я проводила, действительно, исследование фракции активированных T-клеток. Но, к сожалению, не было сравнения активированных T-клеток в стадии обострения заболевания, и Равшан Иноятович предлагает сравнить ее с такой же фракцией, но в состоянии ремиссии этого заболевания. Но так как мы не хотели делать

каких-то дополнительных инвазивных процедур с пациентами, то мы старались минимизировать взятие образцов крови. Но конечно, такой анализ был бы интересен и уместен.

Замечание по названию рисунка - я согласна, не в полной мере, может быть, соответствует тому, что представлено на рисунке.

Хороший, хороший аргумент про то, что при сравнении репертуаров крови и синовиальной жидкости стоило бы использовать ненаивные Т-клетки. Но тем не менее мы знаем, что большая часть, то есть большая доля Т-клеток приходится именно на Т-клетки памяти. И поэтому то, что я показала олигоклональность репертуара очагов воспаления, этот результат не изменился бы, если бы мы сравнили ненаивные Т-клетки.

Перевод частот клонотипов, которые мы оцениваем по матричной РНК TCR - да, это наша.. все время нам говорят, что это с осторожностью это надо делать. И чтобы подтвердить или понять, соответствует ли наша технология реальности, мы провели параллельную подготовку образцов Т-клеточных рецепторов и с мРНК, и с геномной ДНК. Это было сделано не мной, в другой работе. Но мы, в принципе, удостоверились, что один УМІ примерно соответствует одной Т-клетке, и технология определения частот по мРНК - она вполне работает.

И последнее, то, что на рисунке 15 у меня представлены аминокислотные последовательности, и можно было бы привести нуклеотидные. Я согласна, можно было бы привести, но мы знаем, что, и нам интересно изучать именно аминокислотные последовательности, потому что функционально то, что экспрессируется на клетке, то, что в ходит в контакт с антигеном. И кроме того, так как мы знаем что рецепторы, они очень низковероятные, у них у всех... у всех разные нуклеотидные последовательности, и, ну, логично ожидать они не будут совпадать. Все.

Председатель: Все, так, все отлично. У нас нет отзывов на автореферат. Но тем не менее наша дискуссия может быть продолжена, если есть желающие выступить в общей дискуссии. Сергей Анатольевич, прошу.

Лукиянов С.А.: Уважаемые Вадим Тихонович, уважаемые коллеги. Я считаю, что сегодня мы заслушали два великолепных доклада. Высококласных доклада. Вообще очень всегда приятно участвовать в заседаниях нашего диссертационного совета. Класс, который мы держим, он непрерывно растет. Но я хотел бы сосредоточить свои слова на второй защите, поскольку мы сейчас ее заслушали, и отметить, что эта.. С фундаментальной точки зрения Екатерина очень хорошо все представила, и были вопросы по перспективе, но некоторая часть, она как бы осталась в тени. Она практическая. И на основе данных, полученных Екатериной в лаборатории Юрия Борисовича Лебедева, этим коллективом уже с подключением медиков, университета, который я возглавляю, ученых, компании Биокад было создано новое терапевтическое антитело, которое имеет пока только внутренний код, этот самый, VCD180. На следующий год запланированы клинические испытания. Это антитело уникально. Я несколько слов об этом, наверное, говорил в своем докладе на конференции, которая недавно здесь прошла, но все слушали, поэтому я повторюсь. Что доказательства того, что *это* является артритагенным пептидом, что именно то, что найдено, связано с возникновением болезни, оно может быть единственным: если уничтожить такие клетки, то у человека должна наступить ремиссия. Вот, несмотря на то, что клинические испытания намечены на следующий год, конечно, несомненно скажем так, законно и официально, были проведены испытания в рамках таких научных исследований на пациентах. И наступила полная, фантастическая ремиссия. То есть, человек, который был, там, в течение 15 лет не мог жить без антиФНО или НПВС, уже полгода не пользуется никакими противовоспалительными средствами, и у него наблюдается восстановление как бы структуры мышечной, функционала ряда суставов.

И поэтому.. эта работа далеко за рамками анкилозирующего спондилита. Это новая стратегия лечения аутоиммунных заболеваний в виде такой секторальной супрессии части адаптивного иммунитета. При этом это длительные ремиссии, и, поскольку убираются причины заболеваний, отсутствие прогресса заболеваний. Отсутствие серьезных побочных эффектов, потому что это не тотальная иммуносупрессия, как при антиФНО или там Мабтере, антиCD20 и других препаратах. И соответственно, вот эти преимущества, думаю, делают такой класс лекарственных препаратов... в будущем данной области терапевтического воздействия на аутоиммунные заболевания, я прогнозирую, что в ближайшие 10 лет масса лабораторий и компаний примутся для разных заболеваний искать такие последовательности Т-рецепторов, к которым можно сделать антитело и терминировать заболевание. Вот в лаборатории, в отделе у Чудакова Дмитрия Михайловича такие работы параллельно уже ведутся для разных заболеваний. И у Юрия Борисовича расширяются спектры применимости уже создаваемого препарата, поэтому я не постесняюсь, все-таки скажу, что это революционная работа. В очередной раз с этой трибуны, мне очень приятно приходить в институт и уверять, что мы являемся свидетелями представленных данных, которые несут огромные последствия для мировой науки и медицины. Спасибо. Ну и, я считаю, что мы должны поддержать эту работу.

Председатель: Ну понятно. Кто-нибудь еще хотел бы добавить? Татьяна Владимировна, прошу.

Овчинникова Т.В.: Глубокоуважаемый Вадим Тихонович, глубокоуважаемые коллеги. Я нарочно попросила слово после второй защиты, чтобы не выходить дважды на эту трибуну, но хотела бы сказать об обеих работах. И о представленной ранее работе Марии Алексеевны, и о работе Екатерины Александровны, и вот почему: обе соискательницы пришли в наш институт совсем юными после второго курса. Они студентки нашей базовой кафедры - кафедры биоорганической химии Московского государственного университета. Затем прошли полный курс обучения в нашей аспирантуре. И тот достигнутый ими, очевидный для всех присутствующих, высочайший уровень квалификации говорит о том, что для института это очень важно, чтобы такие молодые сотрудники, такие активные, такие грамотные, приходили. В этом источник развития и прогресса нашего института. Поэтому я хотела бы пожелать, чтобы обе соискательницы остались работать здесь, продолжали свою работу. Поздравить научных руководителей, Елену Ивановку Коваленко и Юрия Борисовича Лебедева, с такими замечательными воспитанниками. И предложить всем членам диссертационного совета проголосовать за обе работы. Спасибо.

Председатель: Спасибо. Кто-то еще хочет добавить? На мой взгляд все ясно. Ну вдруг. Не вижу. Если все так, тогда пусть завершит нашу дискуссию Екатерина Александровна. Екатерина Александровна, завершаем дискуссию.

Соискатель: Так. Волнительный момент. Действительно, я очень рада, что когда-то я попала в лабораторию Юрия Борисовича Лебедева. И мне посчастливилось работать с замечательными людьми. Я благодарна моему научному руководителю, Юрию Борисовичу. Благодарна моим оппонентам, которые очень тщательно проанализировали мою работу и действительно очень ценные комментарии мне сказали по ней. Я благодарна всем сотрудникам, которые работают в нашей лаборатории, без их помощи у меня бы вообще ничего не получилось. Благодарю моих родителей, мою семью, моего супруга за их поддержку, и также всех моих друзей, которые меня поддерживали и тоже задавали высокую планку, говорили идти защищаться. Всем спасибо.

Председатель: Ну что же, мы приближаемся к решающему моменту. Счетная комиссия

уже избрана. Давайте я по традиции спрошу, присутствующих: есть ли какие-то предварительные замечания по поводу проекта заключения? Если все будет нормально с голосованием, мы будем голосовать и за проекты заключения. Я посмотрел под углом зрения Николая Владимировича, и там все лучше.

Бовин Н.В.: Мне очень стыдно, но я ничего не нашел.

Председатель: Вот. Ну, тут мы солидарны. Значит мы готовы принять, если все будет нормально, и данный проект заключения как целое, целиком. Тогда я объявляю перерыв на голосование. Прошу голосовать, но не расходиться, потому что у нас есть еще один не очень сложный, но тем не менее пункт нашей повестки дня.

(Перерыв. Проводится тайное голосование и подсчет голосов.)

Председатель: Слушаем итоги голосования.

Ученый секретарь: Мне очень приятно объявлять. Отработала счетная комиссия. ... Комеч Екатерина Александровна. Присутствовало - 23, роздано - 23, оказалось в урне - 23. За - 23. Против, недействительных - нет.

Председатель: Кто за то, чтобы утвердить то, что мы слышали? Кто против? Такой рискованный момент, вдруг один оказался против, а мы его не учли.

(Проводится голосование. Результаты работы счетной комиссии утверждены единогласно.)

Председатель: Все, все отлично. Поздравим диссертантов с блестящей защитой! Спасибо!

И последнее, я предлагаю проголосовать за утверждение проекта заключения, которое мы уже обсудили. Кто за? Кто против?

(Проводится голосование по проекту Заключения диссертационного совета. Проект заключения принимается единогласно.)

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

Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь диссертационного совета,
д.ф.-м.н.

Олейников Владимир Александрович

11.11.2019

