



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Карпов Вадим Львович

«11» октября 2019 г.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОТЗЫВ

Ведущей организации на диссертационную работу **Комеч Екатерины Александровны**
**«Сравнительный анализ индивидуальных репертуаров Т-клеточных рецепторов у
пациентов с аутоиммунными заболеваниями»**, представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности - 03.01.03 - молекулярная биология

Аутоиммунные заболевания являются одной из важнейших проблем современной иммунологии и медицины. Известно, что в патогенезе многих аутоиммунных заболеваний активное участие принимают клетки адаптивной иммунной системы – Т-лимфоциты. В норме основной задачей Т-клеток является распознавание чужеродных антигенов и элиминация зараженных клеток, однако при аутоиммунных патологиях происходит нарушение иммунологической толерантности: появляются аутореактивные клоны Т-лимфоцитов, которые начинают атаковать здоровые клетки и ткани организма. Исследование клональных репертуаров Т-лимфоцитов пациентов с аутоиммунными заболеваниями позволяет выявить аутореактивные

клоны Т-клеток, участвующие в патогенезе заболеваний, что делает их хорошими мишенями для направленной терапии. Спондилоартропатии (СпА) являются хроническими аутоиммунными заболеваниями суставов. Большинство СпА (и наиболее строго анкилозирующий спондилит) ассоциированы с HLA-B*27 и другими генами, участвующими в процессинге и презентации антигена. Генетические ассоциации и инфильтрация очагов воспаления Т-лимфоцитами привели исследователей к выдвиганию гипотезы «артритогенного» пептида об этиологии СпА, которая может быть сформулирована следующим образом: инициация воспалительного процесса при СпА происходит при распознавании CD8+ Т-лимфоцитом «артритогенного» пептида, который презентируется на HLA-B*27. Считается, что «артритогенный» пептид может быть как собственным пептидом организма, так и пептидом патогена. В последнем случае развитие аутоиммунного ответа происходит из-за сходства пептида патогена с пептидом организма и кросс-реактивности Т-клеточного рецептора.

Целью диссертационной работы Е.А. Комеч являлось выявление особенностей репертуара Т-лимфоцитов, включая идентификацию предположительно патогенных клонов, а также анализ динамики репертуара при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток крови у пациентов со спондилоартропатиями.

Диссертация Е.А. Комеч построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, целей и задач, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка использованной литературы, включающего 222 ссылки, и приложения. Работа содержит 24 рисунка и 8 таблиц.

В разделе «Обзор литературы» автор описывает процессы формирования клональных репертуаров Т-лимфоцитов у человека, а также современные методы их изучения. Подробно рассматриваются возможные причины нарушения иммунологической толерантности, приводящие к возникновению аутоиммунных патологий. Для спондилоартропатий приводится описание симптоматики и разбор существующих гипотез этиологии и патогенеза данной группы заболеваний с участием Т-лимфоцитов. Отдельный раздел посвящен обзору современных подходов к терапии пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

В разделе «Материалы и методы» приведены характеристики исследованных доноров и последовательно описаны основные методы, использованные в работе.

Раздел «Результаты и обсуждение» разделен на 4 части. Начинается раздел с подробного описания использованной технологии реконструкции клональных репертуаров Т-клеток. Автор описывает основные этапы пробоподготовки и биоинформатической обработки данных секвенирования, останавливаясь на важных моментах и объясняя целесообразность того или иного этапа.

Вторая часть «Результатов и обсуждения» посвящена изучению клональных репертуаров Т-клеток периферической крови пациентов с анкилозирующим спондилитом (АС). Автор наглядно показал отсутствие ярко выраженных отличий репертуаров пациентов от здоровых доноров, исследовав основные характеристики клональных репертуаров: клональное разнообразие, частоты использования V-сегментов TCR и количество общих высокопредставленных клонотипов между донорами.

Далее, Комеч Е.А. идентифицирует АС-ассоциированные клонотипы, оценив вероятность генерации клонотипов и их встречаемость в донорах. В итоге было идентифицировано 8 клонотипов, которые согласно своей низкой вероятности генерации должны встречаться всего у нескольких доноров, но тем не менее присутствуют в большом числе доноров, все из которых являются больными АС. Автор показывает, что выявленные клонотипы обладают схожей аминокислотной последовательностью антиген-распознающего участка, и выдвигает предположение о возможности распознавания ими одного и того же антигена. Затем автор анализирует присутствие и численность выявленных клонотипов в репертуарах периферической крови и демонстрирует, что все выявленные клонотипы обладают относительно низкой численностью в репертуарах пациентов с АС и практически отсутствуют у здоровых доноров. При этом численность АС-ассоциированных клонотипов у здоровых HLA-B*27+ доноров на несколько порядков ниже, чем у пациентов с АС, из чего автор делает вывод о прошедшей клональной экспансии данных клонотипов в организме пациентов.

В следующей части автор исследует клональные репертуары очагов воспаления – синовиальной жидкости из воспаленного коленного сустава пациентов с АС и псориатическим артритом. Комеч Е.А. выявляет отличия клонального репертуара Т-лимфоцитов сайта воспаления от репертуара периферической крови: репертуар очага воспаления обладает низким клональным разнообразием и высоким уровнем олигоклональности. Исследовав частоты использования V-сегментов, автор заключает, что несмотря на присутствие потенциально одинаковых антигенов в сайте воспаления, репертуары Т-клеток очага воспаления менее похожи между пациентами, чем репертуары Т-лимфоцитов периферической крови. Затем Комеч Е.А. анализирует присутствие в очаге воспаления клонотипов с известной специфичностью и заключает, что они не обогащены в синовиальной жидкости по сравнению с периферической кровью, а значит, скорее всего, не участвуют в распознавании антигенов в сайте воспаления.

Далее, для идентификации предположительно патогенных клонотипов, способных распознавать антигены в комплексе с HLA-B*27, автор исследует репертуары CD8+ Т-лимфоцитов HLA-B*27+ пациентов с АС. На основе сходства аминокислотных последовательностей антиген-распознающего участка TCR был выявлен большой «кластер»,

составленный из высокомолекулярных клонотипов. Частично эти клонотипы совпали с ранее выявленными АС-ассоциированными клонотипами, что служит независимым подтверждением их связи с патогенезом заболевания. Показано обогащение всех АС-ассоциированных клонотипов в очаге воспаления относительно крови. Также продемонстрировано их присутствие в очаге воспаления у HLA-B*27+, но не у HLA-B*27- пациентов с псориатическим артритом, что говорит о строгой HLA-B*27 рестрикции идентифицированных клонотипов. Так как Т-клеточный рецептор является своеобразной меткой клона Т-клетки, появляется возможность использовать идентифицированные клонотипы в качестве маркеров для диагностики и/или мишеней для направленной терапии HLA-B*27-ассоциированных спондилоартропатий. Для самого распространенного АС-ассоциированного клонотипа восстановлена парная альфа-цепь Т-клеточного рецептора, что в дальнейшем может позволить идентифицировать распознаваемый данными клонотипами антиген.

В последней части диссертации Комеч Е.А. исследует динамику Т-клеточного репертуара в ходе аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток крови (ТГСК) у двух пациентов с АС. Автор показал, что большинство высокочисленных клонов Т-клеток исходного репертуара переживают трансплантацию и остаются высокочисленными, таким образом не происходит обновления «верхушки» репертуара. Автор выдвигает предположение, что это может быть связано с отсутствием Т-клеточной деплеции трансплантата в использованном протоколе ТГСК.

К диссертационной работе имеется ряд замечаний и пожеланий:

1. В разделе «Обзор литературы» было бы уместно более подробно осветить функциональную характеристику различных субпопуляций Т-клеток и описать последствия передачи сигналов от них в клетки-мишени (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.

2. 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, а 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.

3. 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.

4. 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.

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

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

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

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

9. 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 «TNF α ».

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 в рецензируемых журналах, в трех из которых Е.А. Комеч является первым автором. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

Диссертационная работа Комеч Екатерины Александровны соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ИМБ РАН (протокол №1 от 04 июня 2019 г.).

Составитель отзыва:

д.б.н., член-корр. РАН,
зав. лаб. передачи внутриклеточных
сигналов в норме и патологии
ФГБУН Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32,
kuprash@eimb.ru
+7 (499) 135-97-70
<http://www.eimb.ru>

Купраш Д.В.

Подпись Д.В. Купраша удостоверяю
Ученый секретарь ФГБУН Института
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, к.в.н.



Бочаров А.А.