

Отзыв на диссертационную работу Комеч Екатерины Александровны на
тему: «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

Известно, что нарушения в работе иммунной системы могут приводить к развитию аутоиммунных болезней, рост заболеваемости которыми в развитых странах неуклонно растет. В частности, для многих аутоиммунных заболеваний было показано вовлечение в патологический процесс различных субпопуляций Т-лимфоцитов. Предположительно в основе аутоиммунитета лежит срыв толерантности к собственным антигенам организма. Для некоторых заболеваний (например, для диабета I-типа) такие антигены известны. Для других пока нет. Крайне любопытным объектом для изучения является анкилозирующий спондилит (болезнь Бехтерева), для которого не просто показано вовлечение CD8⁺ лимфоцитов в патологический процесс, а есть четкая ассоциация с HLA-генотипом: абсолютное большинство пациентов имеет аллельную группу HLA-B*27. При этом в той же аллельной группе есть и протективные аллели. Лидирующей гипотезой патогенеза анкилозирующего спондилита является то, что из-за кросс-реактивности между антигеном микробного происхождения и собственным антигеном развивается иммунная атака на ткани сустава. При этом оба антигена остаются неизвестными.

Современные технологии позволяют получать последовательности, кодирующие рецепторы не только единичных Т-лимфоцитов, но и секвенировать целые репертуары рецепторов, присутствующих в отдельных тканях или в кровотоке. Это позволяет получить количественную оценку

представленности определенного клонотипа в образце. Недавние работы продемонстрировали, что специфичные к определенному антигену рецепторы могут иметь существенный уровень аминокислотной гомологии. Зачастую у разных людей обнаруживаются идентичные по аминокислотной последовательности (публичные) клоны, специфичные к одному и тому же антигену, в том числе и в аутоиммунных заболеваниях.

В этой работе автором была поставлена задача проанализировать репертуары ТКР из образцов синовиальной жидкости и периферической крови больных анкилозирующим спондилитом.

В частности, поскольку не известен антиген, специфической терапии анкилозирующего спондилита не разработано. С некоторым успехом применяется аутологичная трансплантация стволовых клеток крови. Вторая задача автора состояла в динамическом анализе репертуаров больных анкилозирующим спондилитом после ауто трансплантации.

Все поставленные задачи были с успехом решены диссертантом. Была проанализирована общая структура репертуара 43 больных спондилоартропатиями (анкилозирующий спондилит и псориатический артрит) и 8 здоровых HLA-A*27+ доноров. На общем уровне различий между больными и здоровыми выявлено не было.

Затем был проведен поиск публичных клонотипов, характерных среди выборки доноров. С использованием информации о вероятности сборки рецептора были выявлены клоны, чья частота встречаемости не была обусловлена высокой вероятностью сборки. Были выявлены 8 клонотипов (семь CD8+ и один CD4+), обогащенные у больных.

Несмотря на то, что выявленные клоны были довольно небольшого размера, увеличение глубины секвенирования показало, что они прошли клональную экспансию у больных, но не здоровых доноров. Было также

показано, что наиболее публичный клонотип находится во фракции активированных лимфоцитов при обострении.

Далее были проанализированы репертуары ТКР образцов синовиальной жидкости (СЖ) от 20 больных спондилоартропатиями. Было показано, что репертуар СЖ значительно беднее репертуара периферической крови. А также были выявлены клоны, отсутствующие в кровотоке, что укладывается в представления о резидентных Т-лимфоцитах. Было показано, что в СЖ содержится большее количество общих клонотипов, чем в крови, что указывает на миграцию в очаг воспаления предположительно антиген-специфичных лимфоцитов.

Выделив все клонотипы, существенно обогащенные в СЖ по сравнению с ПК, автор показал, что часть из них обладает существенной гомологией, что указывает на предположительно одинаковый распознаваемый антиген. При этом методом были выделены те же клонотипы, что при анализе частоты встречаемости у больных. В то же время в образце синовиальной жидкости от HLA-B*27- пациента эти клоны отсутствовали. Все это указывает на патогенную роль этих клонотипов в спондилоартропатиях.

Для того, чтобы получить полную последовательность ТКР авторы отсортировали цитотоксические клетки из СЖ шести пациентов, имеющие определенный V-ген бета-цепи. И приготовили парные библиотеки альфа- и бета-цепей. Существенной гомологии альфа-цепей выявлено не было, что указывает на то, что основную роль в распознавании этого антигена играет бета-цепь. Однако было показано, что в отсортированной популяции существенно обогащены клетки с TRAV21 геном. Методом сравнения частот для одной бета-цепи была выявлена парная цепь.

Анализ динамики клональных репертуаров Т-лимфоцитов у пациентов с АС после терапевтической аутологичной трансплантации показал, что большинство высокопредставленных клонотипов первоначального репертуара переживает трансплантацию.

Таким образом диссертантом было показано, что у больных спондилоартропатиями выявляется группа высокогомологичных клонов, существенно обогащенных в синовиальной жидкости. Предположительно эти клоны участвуют в патологическом процессе, а возможно и являются причиной заболевания.

Диссертационная работа написана по классическому плану, изложена на 110 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка использованной литературы, включающего 222 ссылки. Работа содержит 24 рисунка и 8 таблиц.

Обзор литературы написан лаконично, очень четко и хорошим научным языком и охватывает такие аспекты, как перестройка генетических фрагментов, кодирующих Т-клеточный рецептор, тимусная селекция, анализ репертуаров ТКР, в том числе получение парных альфа-бета последовательностей, кросс-реактивность лимфоцитов и срыв иммунологической толерантности. Отдельно рассмотрены аспекты патогенеза спондилоартропатии и методы их лечения.

Раздел материалы и методы. В разделе Материалы и методы подробно изложены использованные в работе методы. В разделе Результаты и обсуждение четко и убедительно описаны полученные экспериментальные данные и дана их четкая интерпретация.

К незначительным замечаниям можно отнести:

- В разделе 5.1 «результатов» дано подробное изложение метода получения кДНК библиотек и биоинформатической обработки данных секвенирования. Эту информацию было бы более уместно приводить в разделе Материалы и методы.

- Немного путает, что в списке задач для образцов, полученных из разных биологических компартментов: периферической крови и синовиальной жидкости употребляются термины «анализ» и «характеристика» клональных репертуаров, соответственно, хотя, исходя из проделанной работы имелось в виду одно и то же.

- Одинаковая специфичность клонотипов, ассоциированных с анкилозирующим спондилитом, является очень вероятной, но пока, в отсутствии экспериментальных доказательств, остается лишь предположением. Следовало бы использовать более мягкие формулировки.

- Большая часть замечаний рецензента были учтены после апробации, исправления были внесены в финальную версию диссертационной работы.

Подводя итог, хочется сказать, что представленная работа выполнена на очень высоком уровне и представляет собой удачно спланированное, выполненное и описанное исследование. Результаты, полученные в данной работе крайне важны в понимание патогенеза спондилоартропатий и хочется верить, что в ближайшее время будет установлен антиген, распознаваемый обнаруженными клонотипами. Возможно на основе этого открытия будет разработан метод патогенетического лечения этой группы аутоиммунных заболеваний.

Исходя из вышесказанного, можно сказать, что диссертационная работа Комеч Екатерины Александровны полностью соответствует требованиям,

предъявляемым к кандидатским диссертационным работам, 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), и ее автор заслуживает присуждения степени кандидата наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент, заведующий лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, кандидат биологических наук Ефимов Григорий Александрович

федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Лаборатория трансплантационной иммунологии

125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4

Тел. +7 (495) 612-44-43

e-mail: efimov.g@blood.ru

Подпись к.б.н. Ефимова Г.А. заверяю _____ секретарь ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, к.м.н. Жуклякя



09.10.2019 г.