

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу

Израельсона Марка Александровича

«Организация адаптивного иммунитета долгоживущего грызуна *Spalax galili*»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Актуальность темы исследования

Значительная часть наших знаний об иммунной системе млекопитающих получена благодаря изучению мышей. Использование в исследованиях таких модельных видов, как мыши, имеет ряд очевидных преимуществ, таких, например, как широчайшая номенклатура охарактеризованных антител, трансгенных линий животных и других ключевых инструментов. Однако исследование немодельных объектов также представляет большой интерес, поскольку часто оказывается, что многие виды обладают ранее неизвестными особенностями строения тех или иных систем, отражающими их уникальную эволюционную историю. В данной работе Марк Александрович Израельсон использовал современные молекулярно-биологические методы для детальной генетической характеристики адаптивного иммунитета долгоживущего грызуна слепыша. Особый интерес в изучении данного вида, помимо собственно факта необычно продолжительной жизни, заключается также в пониженной склонности к злокачественным новообразованиям.

По всей видимости, адаптивный иммунитет слепыша направлен в сторону поддержания более наивного состояния в ущерб развитой иммунологической памяти. Можно предположить, что такой эволюционный выбор частично обусловлен подземной средой обитания со сниженной вирусной нагрузкой. В связи с этим сложно представить себе непосредственную попытку перенести такую стратегию на человека с целью увеличения продолжительности жизни. Однако, с другой стороны, отсутствие накопления популяции регуляторных Т-клеток у слепыша с возрастом может свидетельствовать о том, что в отсутствие активной долговременной памяти, не происходит также и накопления патогенных клонов лимфоцитов, вызывающих воспалительную реакцию. Не исключено, что дальнейшее изучение систем регуляции и поддержания такого необычного состояния иммунной системы подскажет интересные фармацевтические и/или метаболические мишени, которые окажутся полезными в борьбе с ассоциированными со старением заболеваниями человека.

Таким образом, представленная работа весьма актуальна и имеет как очевидное фундаментальное значение, так и практический потенциал.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В соответствии с поставленной целью, Марком Александровичем был проведен масштабный сравнительный анализ репертуаров Т- и В-клеточных рецепторов

слепыша и мыши, а также проведен анализ экспрессии основных генов, которые на основании мышинных данных известны как маркеры и регуляторы дифференцировки популяций лимфоцитов. Определенные автором задачи диссертационного исследования полностью соответствуют использованным в работе методам и подходам. Достоверность результатов обеспечена достаточным количеством образцов, использованием современных методов молекулярной биологии в целом и передовых высокопроизводительных технологий вычислительной генетики в частности. Полученные результаты соответствуют общепринятым критериям статистической достоверности, внутренне непротиворечивы и не вызывают обоснованных сомнений.

Научная новизна и значимость исследования

Научная новизна работы заслуживает всяческих похвал. Несмотря на то, что коллектив, в составе которого Марк Александрович выполнял свою работу, входит в число мировых лидеров в области генетики адаптивного иммунитета млекопитающих, проект по изучению нового биологического вида все равно является рискованным. По итогам сделанной работы можно сказать, что риск полностью оправдался, были получены значимые научные результаты, которые если не совершили прорыв в иммунологии, то как минимум существенно обогатили данную область биологии. Установленная автором структура адаптивного иммунитета слепыша, а также обнаруженные ранее неизвестные уникальные особенности относительно более изученных других видов млекопитающих, открывают крайне интересные перспективы дальнейших фундаментальных и прикладных исследований.

Оценка структуры, содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа изложена на 135 страницах и имеет традиционную структуру. Список литературы включает 184 источника. Диссертация содержит 32 рисунка и 6 таблиц в основной части и 3 таблицы в приложении.

Во введении лаконично определены актуальность, новизна, теоретическая и практическая значимость проведенного исследования.

Обзор литературы также отличается лаконичностью. В нем автор приводит актуальную информацию о строении и организации Т-клеточного и В-клеточного иммунитета, подробно разбирая строение рецепторов, развитие и функциональные особенности различных популяций. Далее разбирается устройство иммунологической памяти, приводится актуальная информация о возрастных изменениях адаптивного иммунитета у людей и мышей. В завершение обзора литературы автор приводит сведения об изучении иммунной системы различных представителей позвоночных, то есть видов, обладающих адаптивной иммунной системой, родственной таковой у людей и мышей (автор называет летучих мышей, рыб и голого землекопа «немодельными объектами», отмечая важные особенности,

нехарактерные для модельных систем. Обзор хорошо структурирован, а представленные в нем материалы изложены логично и четко, в объеме, достаточном для получения развернутого представления о современном состоянии проблемы.

Цели и задачи в соответствующем разделе сформулированы четко и понятно, за исключением задачи 1, в которой термин «метрика разнообразия TCR» встречается впервые в тексте работы.

В главе «Материалы и методы» описаны объекты исследования и применяемые методики. В работе использован широкий спектр актуальных молекулярно-биологических методов выделения РНК и синтез на ее основе библиотек кДНК. Для исследования тимуса был использован метод магнитно-резонансной томографии. Завершают главу описания подходов к секвенированию и биоинформатическому анализу полученных данных.

Изложение результатов занимает около 30 страниц (30% основного текста) и сопровождается таблицами, схемами и рисунками, что облегчает восприятие и анализ материала. На основании полученных результатов сформулировано шесть выводов, которые корректно и в полной мере отражают основное содержание работы, соответствуют задачам диссертационного исследования и положениям, выносимым на защиту.

Ключевой публикацией по проекту является статья в престижном журнале Nature Aging, в которой Марк Александрович является первым автором. В 2021 году, когда была опубликована статья, вышел первый том журнала, поэтому импакт-фактор пока неизвестен, но, учитывая репутацию данной группы журналов, можно не сомневаться, что к моменту первого подсчета он будет высоким. Интересно, что ключевые результаты работы были доложены на престижном 5-м Европейском конгрессе по иммунологии в сентябре 2018 года, то есть доведение данных до публикации заняло более двух лет. Подобная трудоемкость характерна для журналов группы Nature, и успешное преодоление данного барьера лишний раз подтверждает высокий уровень работы. В трех других статьях из списка публикаций затронуты различные методические аспекты применяемых подходов, все эти статьи опубликованы в международных журналах высокого уровня, и в одной из них Марк Александрович является первым автором, как и в основной статье в Nature Aging. Таким образом, уровень публикаций по теме работы можно охарактеризовать как выдающийся, намного превышающий рекомендации ВАК..

Как уже сказано выше, несомненным достоинством работы Израельсона М.А. является ее фундаментальная значимость, поскольку впервые охарактеризована структура адаптивного иммунитета долгоживущего вида грызунов с уникальными свойствами. Дальнейшие исследования в этой области представляют большой интерес и имеют практический потенциал. Кроме того, работа имеет методическую значимость, поскольку разработанные в ней молекулярно-биологические и биоинформатические методы для получения данных репертуаров T- и B-

лимфоцитов и анализа свойств полученных репертуаров могут использоваться при дальнейшем изучении как данного объекта, так и других систем.

Содержание диссертации полностью соответствует паспорту специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология» и теме исследования, в полной мере достигнута цель исследования и решены все задачи. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

По работе Израельсона М.А. можно сделать следующие замечания:

1. Работа страдает от чрезмерной лаконичности, особенно в части обсуждения полученных результатов. Собственно, раздел «Обсуждение» как таковой в диссертации отсутствует, есть лишь краткие (1-2 фразами) резюме в конце каждого подраздела результатов, «Заключение» объемом чуть больше 1 стр., и выводы. К издержкам краткости можно отнести и упомянутое выше выражение «метрика разнообразия TCR» в формулировке задачи 1 на стр. 48. Внятное объяснение, что это такое, приведено лишь на стр. 62 в разделе «Результаты», и больше нигде не повторяется (а это было бы полезно для облегчения понимания).

2. В качестве одного из примеров чрезмерной лаконичности можно привести наблюдение, что у слепыша имеется две копии изотипа IGHM (кодирующего IgM) и отсутствует IGHD (кодирующий IgD). Это наблюдение упоминается однажды на стр. 69 и больше не затрагивается. Между тем возникает множество очевидных вопросов, в частности, можно ли различить между собой две копии IGHM и если да, то что можно сказать о частотах их использования? Какие последствия для физиологии В-лимфоцитов несет отсутствие IgD, который является важным регуляторным иммуноглобулином, по-видимому, важным для реакций в герминативных центрах? Моно ли здесь предположить связь с тем, что у слепыша такие реакции, по-видимому, снижены?

3. Крайне скупо обсуждены и данные по гипермутагенезу. Между тем, рассматривая рисунок 30, можно заметить, что частота гипермутаций у слепыша не только мало меняется с возрастом, но и совершенно иначе распределена между изотипами: максимальная частота гипермутаций наблюдается у IGHM изотипа, она не только выше частоты гипермутаций IGHG у слепыша, но и не слишком уступает частоте гипермутаций IGHG у мыши! Такое положение дел резко контрастирует со статусом гипермутагенеза IgM у мышей (который у молодых животных фактически не происходит) и, вероятно, указывает на существенно иную, по сравнению с мышами, физиологию В-клеточного отдела иммунной системы.

4. Озадачивает раздел о тестировании антител к поверхностным маркерам. Как объяснить, что антитела к CD3, CD4 и CD44 вначале дали некий положительный сигнал, а затем не дали никакой внятной картины? Возможно, положительный сигнал был некачественным или был неправильно проинтерпретирован? Это можно было бы понять по первичным данным цитофлуориметрии, которые в работе не приведены. Также непонятно, что дальше? Если вообще никакие кросс-

реагирующие антитела не подходят, то как следует решать задачу получения иммунологических реагентов для данного объекта?

5. На рис. 24 показаны данные по экспрессии генов *Cd3d*, *Cd3e* и *Trbc1*, которые в дальнейшем используются для нормализации. *CD3δ* и *CD3ε* - сигнальные компоненты комплекса TCR (рецептора T-клеток), а *Trbc1* кодирует константную часть TCRβ. В состав комплекса TCR эти белки входят в практически стехиометрическом соотношении, поэтому их экспрессия хорошо скоординирована, что мы и наблюдаем у мышей. Однако у слепыша скоординированы только *Cd3d* и *Cd3e*, а экспрессия *Trbc1* практически отсутствует. Как это возможно, ведь T-клеток без TCRβ не бывает? В образце были какие-то другие лимфоциты? Что-то технически пошло не так? Можно ли использовать эти данные для нормализации?

6. Насколько корректно говорить о закономерностях экспрессии генов в различных группах животных на основании всего 3 особей на группу (рис. 25, 26)? Особенно бросается в глаза первое животное в группе старых слепышей. В этом образце резко повышен IL-10 и целый ряд иммунных рецепторов. В организме явно что-то происходило в момент взятия образцов, корректно ли усреднять эти данные с двумя другими образцами из этой группы?

7. В работе встречается некоторое количество опечаток, а также неудачных или неточных выражений, указывающих на то, что автору работы ближе именно молекулярная биология, а не иммунология или эволюционная биология. Например, на стр. 24 написано «Изначально наивная B-клетка может экспрессировать два изотипа IgM и IgG» - опечатка, которая обязательно привлекла бы внимание иммунолога (на стр. 30 имеется верное утверждение об IgM и IgD). Фраза «Мыши содержались в стерильных условиях» применительно к SPF статусу является весьма неточной, как и утверждение «Мыши являются линейными животными» без уточнения, что речь идет об инбредных лабораторных линиях.

Следует отметить, что высказанные замечания не имеют принципиального характера, не влияют на достоверность сделанных выводов и не снижают в целом очень положительного впечатления от работы. Количество опечаток не является критическим и не мешает восприятию материала.

Заключение

Диссертационная работа 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, выполненной под руководством кандидата биологических наук Британовой Ольги Владимировны. Научным консультантом работы является доктор биологических наук Чудаков Дмитрий Михайлович. По актуальности, новизне полученных данных, фундаментальной и практической значимости, диссертационная работа

Израельсона Марка Александровича полностью соответствует всем требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного 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».

Официальный оппонент
Главный научный сотрудник
лаборатории передачи внутриклеточных
сигналов в норме и патологии,
ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
доктор биол. наук, профессор, член-корреспондент РАН


_____ Купраш Дмитрий Владимирович

« 1 » февраля 2023 г.


Контактные данные:

Адрес (рабочий): ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Телефон: +7 916 6550098

E-mail: kuprash@eimb.ru, kuprash@gmail.com

Личную подпись Купраша Д.В. заверяю


Бочаров Александр Анатольевич
кандидат ветеринарных наук, ученый секретарь ФГБУН
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук



« 1 » февраля 2023 г.