

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Зорниковой Ксении Викторовны на тему: «Динамика гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2» по специальности 3.2.7 – Иммунология

Актуальность темы диссертационной работы

В настоящее время мир переживает небывалую пандемию нового вирусного заболевания COVID-19, вызываемого коронавирусом SARS-CoV2. Первый случай заболевания был официально зарегистрирован в г.Ухань провинции Хубей Китая 23 декабря, а уже 11 марта ВОЗ официально классифицировала эпидемическую ситуацию как пандемия. Прокатившись по миру пятью отчётливыми волнами и унеся 6.9 миллионов человеческих жизней, SARS-CoV-2 эволюционировал и приспосабливался к новому хозяину, в том числе — путём совершенствования механизмов избегания гуморального иммунного ответа. Господствующие на сегодняшний день в мире субварианты Омикрон характеризуются меньшей вирулентностью, чем ранние варианты SARS-CoV-2, однако, существенно более высокой способностью к избеганию вируснейтрализующих антител. В этой связи, исследования Т-клеточного иммунного ответа не только не потеряли свою актуальность, в связи с затуханием пандемии, но, на мой взгляд, становятся приоритетными – как для понимания фундаментальных законов иммунного ответа на новый возбудитель, так и для разработки эффективных механизмов профилактики заболевания и его осложнений, связанных с аутосенсбилизацией Т-клеток собственными антигенами.

Хорошо известно, что для противовирусной защиты критически важным звеном являются именно Т-клетки, и не только потому, что Т-хелперы помогают В-клеткам формировать антитела, а потому что именно цитотоксические CD8+ Т-клетки обнаруживают и уничтожают зараженные вирусом клетки и сам вирус. Именно Т-клеточной иммунный ответ обеспечивают клиренс вирусов в организме. Изучение Т-клеточных ответов

по косвенным параметрам, таким как продукция интерферона в ответ на стимуляцию вирусными антигенами имеет ряд ограничений. Прежде всего, продукция интерферона свидетельствует лишь о факте распознавания антигена, но не дает представления о таких важных параметрах Т-клеточного ответа, как репертуар Т-клеточных рецепторов, а также оставляет открытыми очень много вопросов о том, как формируется и что влияет на поддержание Т-клеточного звена иммунологической памяти. Изучение формирования и поддержания иммунологической памяти CD8⁺ Т-лимфоцитов на антигенные эпитопы вируса SARS-CoV-2 позволяет понять не только особенности клеточного иммунитета против конкретного вируса, но и дает фундаментальные знания о том, как формируется и работает Т-клеточный иммунитет в целом.

Работа Ксении Викторовны Зорниковой посвящена исследованию репертуара Т-клеточных рецепторов, взаимодействующих с антигенными эпитопами SARS-CoV-2 у пациентов, перенесших COVID-19 в аспекте изучения стойкости гуморального и клеточного противовирусного иммунитета. С учётом непрекращающегося появления новых, вызывающих опасения, вариантов SARS-CoV-2, возникающих, например, в результате генетической рекомбинации разных штаммов, подобное исследование является крайне актуальным.

Научная новизна полученных результатов

Известно, что клеточный иммунитет к антигенам вируса SARS-CoV-2 может формироваться у переболевших COVID-19 даже в отсутствие антител. В рассматриваемой диссертационной работе было показано, что CD8⁺ Т-клеточный иммунитет сохраняется у переболевших COVID-19 дольше, чем соответствующие антитела. Было доказано, что из трех изученных структурных белков вируса SARS-CoV-2 (S-, M- и N-белков) ответ на N-блок был наименее стабильным. При исследовании нескольких иммуногенных эпитопов вируса SARS-CoV-2 было описано 715 уникальных клонотипов. В работе продемонстрировано, что эпитоп-специфичный ответ имел различную

динамику и различался по характеристикам репертуара Т-клеточных рецепторов, а наиболее стойкий ответ формировался за счет наиболее разнообразного эпитоп-специфичного репертуара.

В работе впервые получены последовательности β цепей Т-клеточных рецепторов и определены характеристики Т-клеточного репертуара, специфичного к основным иммуногенным эпитопам вируса SARS-CoV-2. Описаны 9 иммунодоминантных эпитопов (ALSKGVHVFV, ALWEIQQVV, KCYGVSPTK, KTFPPTEPK, LLLDRLNQL, LLYDANYFL, MEVTPSGTWL, RLQSLQTYV, YLQPRTFLL), обеспечивающих наиболее продолжительный и наиболее поликлональный Т-клеточный иммунный ответ.

В работе впервые было показано, что сохранение иммунного ответа на SARS-CoV-2 в течение длительного времени зависит от клонального разнообразия первоначального ответа, а не от представленности определенного клонотипа в периферической крови пациента.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы определяется раскрытием некоторых механизмов формирования и поддержания Т-клеточной памяти, возникающей после иммунного ответа на вирусные антигены. Так выявлено, что из 15-ти эпитопов, считавшихся иммуногенными по данным литературы, 11 оказались иммунодоминантными, дающими ответ более чем у 50% доноров. Ответ на эти иммунодоминантные эпитопы сохранялся как минимум 8 месяцев после заболевания, однако показано, что со временем уменьшалось количество и частота эпитоп-специфичных клонов.

Самым интересным и новым, с моей точки зрения, в работе К.В. Зорниковой является выявленная закономерность, связывающая клональное разнообразие TCR по отношению к конкретным эпитопам и интенсивность Т-клеточного ответа на эти же эпитопы. Проведя биоинформатический анализ результатов NGS-секвенирования TCR, автор обнаружила, что некоторые из изученных эпитопов характеризовались высоким клональным разнообразием, тогда как ответ на другие был

олигоклональным. Исследования следующей временной точки показало, что наиболее длительный Т-клеточный ответ наблюдается как раз на те эпитопы, которые характеризовались максимальным клоном разнообразия CD8+Т-клеток. Таким образом, автором было убедительно доказано, что на длительное поддержание Т-клеточной памяти влияет не размер конкретного клона, а именно поликлональность ответа. Выявленные закономерности могут иметь важное научно-практическое значение при разработке и оценке эффектов новых противовирусных вакцин и при оценке иммунной защиты у людей с нарушениями Т-клеточного звена иммунитета.

Степень обоснованности научных положений и выводов и достоверность полученных результатов

Достоверность результатов, обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений. Это обеспечено использованием адекватных методов, проверкой одной гипотезы разными методами, достаточным количеством обследованных доноров и полученных экспериментальных данных и их тщательным анализом. Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне с использованием цитологических, иммунохимических, молекулярных и иммунологических методов. Методы статистической обработки, упоминаемые в процессе описания результатов, позволяют оценить достоверность выявленных различий.

Основные положения и выводы, сформулированные автором, являются логически обоснованными, полученные данные сопоставлены с результатами других исследователей. Выводы диссертационной работы полностью основаны на полученных результатах, сформулированы корректно и обладают научной новизной.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертация изложена на 113 страницах и содержит «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы» и «Список литературы».

Работа иллюстрирована 21 рисунком и содержит 3 таблицы. Список литературы включает 170 источников.

В разделе «Введение» автор обосновывает актуальность исследования, излагает цель и задачи. Этот раздел также содержит подразделы «Научная новизна работы», «Теоретическая и практическая значимость работы», «Методология и методы исследования», «Основные положения, выносимые на защиту», «Личный вклад автора» и «Апробация результатов и публикации».

Раздел «Обзор литературы» основывается на анализе 170 зарубежных и русскоязычных источников полноценно раскрывает исследуемую в диссертации проблему. В обзоре присутствуют главы, посвященные как особенностям вируса SARS-CoV-2 и иммунного ответа на этот вирус, так и непосредственно исследованиям репертуара Т-клеточного рецептора, что являлось основным предметом изучения в данной работе.

В главе «Материалы и методы» представлена методическая часть работы, содержащая описание обследованных пациентов, культуральных, иммунохимических, молекулярных и статистических методов. Все методы, использованные в работе, достаточно современны и подробно описаны.

В соответствии с логикой работы в разделе «Результаты» сначала приводится анализ гуморального и Т-клеточного ответов в двух временных точках у 50 человек, перенесших COVID-19 в бессимптомной, легкой и среднетяжелой форме. Показано, что клеточный иммунный ответ на антигены S-, M- и N- белков вируса SARS-CoV-2 развивается чаще и сохраняется дольше, чем гуморальный. Далее автор производит анализ эпитоп-специфичного ответа Т-клеток. Для этого по результатам HLA-типирования были отобраны 26 человек с гаплотипами, подходящими для исследования эпитоп-специфичного ответа CD8⁺ лимфоцитов. Обнаружено, что эпитоп-специфичный ответ CD8⁺ Т-клеток снижается, но остается детектируемым в течение 8 месяцев после инфекции. Далее автор переходит к исследованию клонального репертуара цитотоксических клеток, распознающих антигенные

пептиды вируса SARS-CoV-2. Доказано, что высокое клональное разнообразие обеспечивает превалирующий эпитоп-специфичный ответ CD8+ Т-клеток.

В разделе «Обсуждение результатов» проводится тщательный анализ и сопоставление полученных данных с данными мировой научной литературы. Обсуждение диссертационной работы содержит краткое резюме, охватывающее основные моменты проведенных исследований. На основе полученных результатов автор формулирует заключение и основные выводы работы, представленные в разделе «Выводы».

Можно заключить, что работа изложена грамотным языком, логична и последовательна. Полученные результаты хорошо структурированы и дополнены рисунками и таблицами. Автореферат отражает все основные результаты работы, что позволяет ознакомиться с сутью работы, основными результатами и сформулированными на их основе выводами.

Замечания, комментарии и вопросы к представленной работе

Диссертация К.В. Зорниковой является законченным научно-квалификационным трудом и в целом производит очень благоприятное впечатление. Вместе с тем, как к любому экспериментальному исследованию, выполненному не тобой, а другим исследователем, к диссертации имеется ряд замечаний и вопросов.

1. Основные замечания к работе с моей стороны касаются характеристики и формирования выборки пациентов. С учётом сложности и динамического характера проведенных исследований выборка из 50 переболевших пациентов, наверное, не является недопустимо малой, но, возможно, и не является достаточной. Первичный скрининг гуморального ответа бóльшего количества пациентов с различной тяжестью ковида мог бы, вероятно, позволить сформировать более репрезентативные подгруппы пациентов (например – с продолжительным и слабым гуморальным ответом, с неэффективным/избыточным иммунным ответом и т.д.) для последующего

HLA-типирования и анализа репертуара TCR. Здесь и далее после замечания будут идти вопросы к диссертанту.

- 1.1. На основании каких критериев подбирали доноров по тяжести заболевания? Почему в исследовании было 33 участника с лёгкой формой заболевания и 17 – со средней тяжестью? Почему в исследовании не было пациентов, с тяжелой степенью заболевания?
- 1.2. Не вполне понятно, почему на основании результатов HLA типирования из 50 обследованных реконвалесцентов отобрали группу из 26 доноров? Какие именно гаплотипы и почему были отобраны? Насколько репрезентативна эта выборка, с учетом частоты различных аллелей HLA?
- 1.3. Могут ли результаты, полученные на данной выборке (с учетом распределения по степени тяжести заболевания и частоте HLA-I) быть экстраполированы на человеческую популяцию в целом?
2. В диссертации отсутствует информация о том, в какой период пандемии были набраны участники исследования и каким именно вариантом SARS-CoV-2 переболели рекрутированные реконвалесценты.
 - 2.1. В какую из волн пандемии рекрутировались пациенты?
 - 2.2. Насколько корректно объединять в исследовании Т-клеточного ответа пациентов из разных волн пандемии? (Разные штаммы возбудителя, отличающиеся по вирулентности и трансмиссивности, совершенно разные схемы лечения – от плаквенила до тоцилизумаба и т.д.).
 - 2.3. Есть ли информация о том, каким штаммом переболели участники исследования?
 - 2.4. Существуют ли какие-либо специфические особенности Т-клеточного ответа на различные варианты SARS-CoV-2?
3. . В первом положении, вынесенном на защиту читаем: «Т-клеточный иммунный ответ сохраняется дольше, чем гуморальный». При такой

формулировке это – общеизвестный факт, описанный еще после первой эпидемии SARS в 2003 году.

4. У диссертации 3 положения, выносимых на защиту и 4 вывода. По сути, первое положение почти дословно воспроизводит первый вывод, второе положение – полностью соответствует по смыслу второму и третьему выводу, а третье положение и четвёртый вывод разными словами описывают одно и то же. На мой взгляд, в данной диссертации должно было быть единственное положение, выносимое на защиту, касающееся самого интересного из полученных результатов: Длительность Т-клеточного ответа определяется клональным разнообразием Т-клеток памяти.

5. Опечаток в работе, на мой взгляд больше, чем могло бы быть (я насчитал не менее 5 в автореферате, в диссертации не считал, но видел довольно много). Опечатки, в основном – «съеденные» окончания слов, т.е. легко устранимые при банальной проверке орфографии в MS Word.

Предваряя заключение, хочу отметить, что указанные замечания носят методический и оформительский характер и ни в коей мере не влияют на научную ценность данного квалификационного исследования.

Заключение

Диссертация Ксении Викторовны Зорниковой отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 3.2.7 – Иммунология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям №5, 6 Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Соискатель Ксения Викторовна Зорникова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7 – Иммунология.

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук, доцент,
Заместитель генерального директора
по научной работе и медицинским технологиям
ФГБУ ФНКЦ ФМБА России
Баклаушев Владимир Павлович

04.05.2023

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.04 – биохимия.

Адрес места работы: 115682, г. Москва, Ореховый бульвар 28,

ФГБУ ФНКЦ ФМБА России

Тел.: +7499-725-44-40; e-mail: info@fnkc-fmba.ru.

Подпись сотрудника ФГБУ ФНКЦ ФМБА России

Баклаушева Владимира Павловича удостоверяю:

Заместитель исполнительного директора

по персоналу

Т.М. Ильина

Дата 04.05.2023