

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 001.001.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ» ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 19 декабря 2019 № 259

О присуждении Барковской Маргарите Шамилевне, гражданке РФ,
ученой степени кандидата медицинских наук.

Диссертация «Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и субпопуляционный состав Т-клеток памяти при бронхиальной астме» по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» принята к защите 15 октября 2019 года, протокол № 257 диссертационным советом Д001.001.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ), почтовый индекс 630099, адрес организации: г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, дом 14, действующего на основании приказа Минобрнауки России № 714 от 02.11.2012 года.

Соискатель, Барковская Маргарита Шамилевна, 1983 года рождения, окончила в 2006 году с отличием Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирская государственная медицинская академия» с присвоением квалификации «Врач» по специальности «Педиатрия».

В 2008 году окончила клиническую ординатуру на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ) по специальности «Аллергология и иммунология».

В 2014 году закончила обучение в очной аспирантуре НИИФКИ по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология».

Работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ.

Диссертация выполнена в лаборатории клинической иммунопатологии отдела клинической иммунологии НИИФКИ.

Научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Козлов Владимир Александрович, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии».

Официальные оппоненты:

1. **Литвинова Лариса Сергеевна**, доктор медицинских наук, директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.
2. **Минина Юлия Михайловна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России (ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России) в своем положительном заключении, подписанном Шиловским Игорем Петровичем, доктором биологических наук, заведующим лабораторией противовирусного иммунитета ФГБУ «ГНЦ «Институт

иммунологии» ФМБА России, указывает, что в диссертационной работе на основании полученных автором данных осуществлено решение актуальных задач для клинической иммунологии и аллергологии: оптимизирована методика флуоресцентного окрашивания теломер, создано и валидировано новое программное обеспечение, позволяющее получать надежные данные об изменении их размера, а также изучен характер укорочения теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и содержание различных субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов с бронхиальной астмой, что отражает иммунопатогенетические различия между различными формами бронхиальной астмы. Сформулированные выводы логичны и целиком вытекают из результатов исследования. Диссертационная работа Барковской М.Ш. полностью соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, согласно п.9. «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор заслуживает искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология».

Соискатель имеет 12 опубликованных работ по теме диссертации, в том числе 3 статьи в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, в том числе 2 статьи в научных журналах, входящих в международную базу цитирования Web of Science, а также 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Богомолов А.Г., **Барковская М.Ш.**, Рубцов Н.Б. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Оценка длины теломерных районов хромосом (MeTeLen) / Measurement of telomere length on chromosomes (MeTeLen)» № 2016614696 // опубл. 20.05.2016. – Бюллетень №5 (115) – С. 2016614696.

2. **Barkovskaya M.Sh.**, Bogomolov A.G., Knauer N.Yu., Rubtsov N.B., Kozlov V.A. Development of software and modification of Q-FISH protocol for estimation of individual telomere length in immunopathology // Journal of Bioinformatics and Computational Biology.– 2017. – V. 15. - № 2. - P. 1650041.
3. **Барковская М.Ш.**, Блинова Е.А., Коняхина Ю.В., Леонова М.И., Непомнящих В.М., Демина Д.В., **Кожевников В.С.**, Козлов В.А. Распределение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при бронхиальной астме // Бюллетень Сибирской Медицины. – 2019. – Т. 18. – № 1. – С. 164-174.
4. **Барковская М.Ш.**, Блинова Е.А., Гришина Л.В., Леонова М.И., Непомнящих В.М., Демина Д.В., Козлов В.А. Содержание CD4⁺ и CD8⁺ эффекторных клеток памяти и пролиферативная активность Т-лимфоцитов при бронхиальной астме // Медицинская Иммунология. – 2019. – Т. 31. – № 3. – С. 503-516.

Все основные результаты, представленные на защиту, опубликованы в оригинальных статьях в рецензируемых изданиях и тезисах докладов в сборниках научных конференций. Основные экспериментальные и клинические результаты, их статистическая обработка и представление в виде публикаций выполнены соискателем лично.

На автореферат поступило 3 отзыва от:

- 1) научного руководителя Федерального государственного унитарного предприятия «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых препаратов» ФМБА России, доктора медицинских наук, профессора, член-корреспондента РАН, **Симбирцева Андрея Семёновича**;
- 2) заведующей кафедрой клинической иммунологии и аллергологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный

медицинский университет» Минздрава РФ, доктора медицинских наук, профессора, **Сизякиной Людмилы Петровны;**

- 3) ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии Научно-исследовательского института научных проблем Севера – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, кандидата биологических наук, **Смольниковой Марины Викторовны.**

Во всех отзывах отмечается высокая актуальность темы диссертационного исследования, высокий методологический уровень исследования, перспективность и практическая значимость работы. Среди полученных результатов выделяется экспериментальное определение субпопуляционного состава Т-клеток памяти и исследование длины теломера на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с экзогенной и эндогенной формами бронхиальной астмы, которые демонстрируют различия в иммунопатогенезе клинических вариантов заболевания. Все отзывы положительные, критических замечаний не содержат.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России является одним из ведущих научно-медицинских центров России, осуществляющих научные исследования по фундаментальным и прикладным проблемам современной иммунологии и аллергологии. В подразделениях ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России проводятся работы по изучению молекулярно-генетических и клеточных основ иммунитета, моделированию патологических процессов *in vivo* и *in vitro*, выявлению эндогенных и экзогенных факторов развития аллергопатологии с целью создания инновационных диагностических и терапевтических технологий для лечения аллергических заболеваний. При этом бронхиальная астма является одной из нозологий, активно исследуемых в подразделениях ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России. В частности, лаборатория противовирусного иммунитета отдела молекулярной иммунологии ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

занимается изучением молекулярных механизмов патогенеза вирус-индуцированных обострений бронхиальной астмы, разработкой подходов к антицитокиновой терапии аллергической формы бронхиальной астмы и профилактике обострений бронхиальной астмы.

Выбор официального оппонента, **Литвиновой Л.С.**, доктора медицинских наук, обосновывается её достижениями в области научных исследований клеточного звена иммунитета при иммунопатологии, в области изучения молекулярно-генетических механизмов дифференцировки Т-клеток-памяти, а также профессиональным владением методами многоцветного анализа в проточной цитометрии для определения субпопуляций клеток иммунной системы.

Выбор официального оппонента, **Мининой Ю.М.**, кандидата биологических наук, обосновывается её достижениями в исследованиях структуры терминальных районов хромосом и механизмов регуляции длины теломер в клетках млекопитающих, а также владением различными методическими подходами к определению длины теломер, включая метод количественной флуоресцентной гибридизации *in situ* (Q-FISH).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Разработана новая научная идея о значимости укорочения длины теломер на индивидуальных хромосомах при различных формах бронхиальной астмы, что вместе с характеристикой субпопуляционного состава Т-клеток памяти углубляет понимание функционирования иммунной системы при аллергопатологии.

Доказано, что модифицированный протокол методики Q-FISH в сочетании с разработанным программным обеспечением представляют собой корректный подход для определения количества теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом, который позволяет оценивать различия теломерных профилей пациентов с бронхиальной астмой и здоровых доноров.

Доказано, что у пациентов с экзогенной формой бронхиальной астмы, в отличие от больных с эндогенной формой, укорочена длина теломер на плечах следующих хромосом: 1p, 4q, 5q, 6p, 9p, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 20q.

Доказано, что у пациентов с экзогенной формой бронхиальной астмы, находящихся в дебюте заболевания, укорочены теломеры на p- и q-плечах девятой хромосомы, тогда как у пациентов с длительным течением заболевания длина теломер сокращена на девятнадцати плечах пятнадцати хромосом, включая 4q, 5p, 5q, 6p, 7q, 9p, 9q, 10q, 11q, 12q, 13p, 13q, 14q, 15p, 15q, 17p, 18p, 20q, 22q.

Доказано, что в отличие от здоровых доноров в периферической крови больных с экзогенной формой бронхиальной астмы значительно повышено содержание $CD4^+$ Т-клеток памяти и субпопуляций $CD4^+62L^+$ и $CD8^+62L^+$ эффекторных Т-клеток памяти.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что в данной работе расширены современные представления об иммунопатогенезе бронхиальной астмы. Полученные результаты о характере укорочения теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и выявленные изменения содержания $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти и субпопуляционного состава Т-клеток памяти в зависимости от формы и длительности течения бронхиальной астмы являются принципиально новыми данными и свидетельствуют об иммунопатогенетической разнородности заболевания.

Применительно к проблематике диссертации:

Результативно использован комплекс существующих современных экспериментальных методик, включающий многоцветную проточную цитофлуориметрию, метод количественной флуоресцентной гибридизации *in situ*, цитогенетический анализ, методы выделения и культивирования клеток.

Изложены доказательства неравномерного укорочения теломер на плечах хромосом Т-лимфоцитов периферической крови при экзогенной форме бронхиальной астмы и **показаны** отличия в укорочении длины

теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов, находящихся в дебюте и при длительном течении экзогенной бронхиальной астмы.

Изучены особенности субпопуляционного состава циркулирующих Т-клеток памяти при экзогенной и эндогенной формах бронхиальной астмы и **показана** сохранность пролиферативного потенциала Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов периферической крови больных бронхиальной астмой в ответ на поликлональную стимуляцию *in vitro*.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики:

Разработано новое программное обеспечение «MeTeLen» и модифицирован протокол методики Q-FISH для измерения количества теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с иммунопатологией. По разработанному программному обеспечению получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2016614696 «Оценка длины теломерных районов хромосом (MeTeLen) / Measurement of telomere length on chromosomes (MeTeLen)».

Представлены новые научные данные об укорочении теломер индивидуальных хромосом и изменении субпопуляционного состава Т-клеток памяти в зависимости от формы бронхиальной астмы, которые могут стать основой для дальнейшего поиска маркеров клинических фенотипов бронхиальной астмы, предикторов эффективности терапии или неблагоприятного исхода заболевания, что важно для разработки персонализированного подхода к лечению и диагностике аллергических заболеваний.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что исследование проведено на сертифицированном оборудовании, с использованием сертифицированных реагентов. Работа выполнена на высоком методическом уровне и достаточном по объему материале.

Достоверность полученных результатов подтверждается методически правильно построенным дизайном исследования, использованием современных методов сбора и статистической обработки первичной информации. Выводы соответствуют поставленным задачам, логически вытекают из полученных данных и отражают содержание работы.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в получении исходных данных и написании диссертационной работы. Вся экспериментальная работа выполнена лично автором. Включение больных в исследование, и клинический анализ проводились совместно с сотрудниками отделения аллергологии клиники иммунопатологии НИИФКИ г. Новосибирска.

Разработка модифицированной методики Q-FISH и программы «MeTeLen», их тестирование и валидизация проводились совместно с профессором, д.б.н. Рубцовым Н. Б. и к.б.н. Богомоловым А. Г. (лаборатория морфологии и функции клеточных структур ФИЦ ИЦиГ СО РАН). Статистическая обработка и интерпретация экспериментальных данных проведена лично автором. Подготовка основных публикаций по выполненной работе проведена при непосредственном участии автора.

Диссертационная работа Барковской М.Ш. «Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и субпопуляционный состав Т-клеток памяти при бронхиальной астме» является научно-квалификационной работой, в которой решена важная с практической и теоретической точки зрения задача – изучен характер укорочения теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и содержание различных субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в периферической крови больных бронхиальной астмой. По актуальности, методическому уровню, новизне, теоретической и практической значимости представленная работа полностью отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской

