

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01

4 октября 2023 года

Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Сычевой Анастасии Леонидовны

**По теме: «Клональная характеристика Т-клеточного ответа человека при
иммунизации инактивированными вакцинами»**

Специальность – 1.5.3. Молекулярная биология

Москва – 2023

СТЕНОГРАММА

заседания Диссертационного совета 24.1.037.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, от 4 октября 2023 года.

Председатель

Диссертационного совета д.х.н., академик РАН Мирошников Анатолий Иванович

Врио ученого секретаря

Диссертационного совета д.х.н. Уткин Юрий Николаевич

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 5.

1.	Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
3.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Липкин Валерий Михайлович	(1.5.6)
4.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
5.	Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
6.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
7.	Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
8.	Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
9.	Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
10.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
11.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
12.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
13.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
14.	Д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
15.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
16.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
17.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
18.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
19.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
20.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Мирошников А.И., председатель: Так, начинаем заседание ученого совета защитного, и у нас сегодня две защиты. Первая защита – кандидатские диссертации. Первая защита – это Сычевой Анастасии Леонидовны. Клональная характеристика клеточного ответа человека при иммунизации инактивированными вакцинами. Юрий Николаевич, давайте, докладывайте.

Уткин Ю.Н., врио ученого секретаря: *(зачитывает информацию о соискателе и документах, содержащихся в личном деле соискателя)*. Сычева Анастасия Леонидовна, гражданка Российской Федерации, в 2015 году окончила Биологический факультет Московского университета по специальности биохимия. С 2015 по 2019 годы проходила обучение в очной аспирантуре ИБХ РАН. С 2015 по 2018 год – инженер-исследователь, а с 2018 по настоящее время – младший научный сотрудник лаборатории сравнительной и функциональной геномики отдела геномики адаптивного иммунитета ИБХ РАН. Кандидатский экзамен по специальности молекулярной биологии сдан с отметкой «Отлично». Работа выполнена в лаборатории сравнительной и функциональной геномики отдела геномики адаптивного иммунитета ИБХ РАН. Научный руководитель диссертационной работы проф., д.б.н. Лебедев Юрий Борисович, заведующий лабораторией сравнительной и функциональной геномики отдела геномики адаптивного иммунитета ИБХ РАН. По теме диссертации опубликовано 6 статей. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК 5 июля 2023 года. Все необходимые документы в деле имеются.

Мирошников А.И., председатель: Вопросы к ученому секретарю? Нет? Спасибо. Так, пожалуйста, Анастасия Леонидовна. 20 минут. Успеете?

Сычева А.Л., соискатель: *(Излагает основные положения диссертационной работы)*.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Пожалуйста, вопросы. Пожалуйста.

Бовин Н.В.: В самом начале Вашего доклада Вы показали картинку, где после иммунизации наблюдается некоторое количество клонов, уровень которых увеличился, и также некоторое количество клонов, уровень которых уменьшился. Вот у меня вопрос по тем клонам, которых стало меньше. Есть у Вас обоснование, почему такие клоны появляются? И, может быть, Вы исследовали, а что это за клоны, какая специфичность этих клонов?

Сычева А.Л., соискатель: Это может быть связано с тем, что доноры у нас находятся не в стерильных условиях, а продолжают жить и контактировать с окружающим миром, и какие-то вирусы, какие-то патогены, бактерии, с которыми он регулярно встречается, могут стимулировать иммунитет, и происходят вот такие вот перестановки в репертуаре, когда

клетки снова пролиферируют, потом снова чуть-чуть уходят. Вот, к сожалению, мы не можем точно отследить, от каких именно.

Бовин Н.В.: Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Ещё вопросы? Пожалуйста.

Чугунов А.О.: Какие вакцины Вы брали для исследования? И могло ли быть так, что если взять другие, то результат сильно изменится?

Сычева А.Л., соискатель: Мы брали две вакцины. Это были инактивированная субъединичная вакцина против гриппа и инактивированная цельновирионная вакцина против клещевого энцефалита.

Чугунов А.О.: А названия какие?

Сычева А.Л., соискатель: Клещ-Э-Вак и Инфлювак. Я не думаю, что очень сильно зависит от производителя. Здесь важнее принцип производства вакцин. То есть является это цельновирионной или субъединичной, аттенуированной или инактивированной.

Мирошников А.И., председатель: Ещё вопросы? Пожалуйста.

Ефремов Р.Г.: Ну, у меня больше технический вопрос, может быть, немного наивный. В основе Вашей классификации и кластерного анализа, если я правильно понял, лежит анализ динамики появления этих клонов, да? То есть у Вас там 44-й день, 37-й день и так далее. Но там очень мало точек, то есть 2-3 точки. Вот, в чём была проблема, сложности? В эксперименте просто технически? Потому что говорить, что там бимодальное распределение или одномодальное распределение, и на основании этого относить вот этот график к одной категории или к другой категории, которую потом Вы используете для таких базовых вещей, для классификации, кластеризации и так далее. Вот здесь насколько надежны эти данные, как Вы считаете?

Сычева А.Л., соискатель: Я считаю, что эти данные достаточно надежны для того, чтобы оценить тренды и того, как реагировали клоны, то есть насколько быстро, например, они пролиферировали, их Т-клетки пролиферировали, когда они достигли своей наивысшей концентрации. И также они достаточно надежны для того, чтобы оценить, что, например, группа “d30” практически не ответила. Даже если там были небольшие колебания, всё равно на предполагаемом пике ответа, когда остальные клоны уже активно пролиферировали, там ответа никакого не было. Это тоже по этим двум точкам можно было бы отследить, если бы он был.

Мирошников А.И., председатель: Ещё вопросы?

Сычева А.Л., соискатель: Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Не вижу. Спасибо. Так, Юрий Борисович, идите, хвалите.

Сычева А.Л., соискатель: Спасибо за вопросы.

Лебедев Ю.Б., научный руководитель: Я нетрадиционно позволю себе дополнить ответ Анастасии Леонидовны на последний вопрос. Здесь суммарные представлены графики. Каждая из немногих временных точек — это сотни, а иногда и тысячи отдельных клонов.

Мирошников А.И., председатель: То есть добавили точек, да?

Лебедев Ю.Б., научный руководитель: Попробовал. Про диссертанта. Составляя официальный отзыв, я как-то с некоторым удивлением обнаружил, что в эти дни можно праздновать десятилетнюю годовщину работы Насти в нашей лаборатории. Один из хороших примеров, ну, если можно так сказать, полного цикла не то чтобы воспитания, а становления квалифицированного и продуктивного научного сотрудника. Настя появилась как последняя по очередности из цепочки очень талантливых студентов кафедры вирусологии Биофака. И вот эти десять лет, они не всегда были легкими, но всегда были очень приятными и вдохновляющими. А Настя, как я сказал, они друг друга рекомендовали, студенты кафедры вирусологии Биофака, и Настя была последней из них. Поначалу она как-то побаивалась такой уже авторитетной с ее точки зрения компании, которая не просто работала с китами, а создавала новые и довольно сложные технологии. Но такая боязливость быстро прошла. Студентка Сычева была включена в состав работающих грантов, посвященных похожей очень тематике. И сама начала, используя независимую собственную тему исследований, собственный объект, разрабатывать, улучшать технологии реконструкции репертуаров Т-клеточных рецепторов и периферических Т-лимфоцитов. И в этом становлении Настя очень успешно не только освоила многие трудоемкие, сложные даже не методики, а подходы современной молекулярной иммунологии, но и оптимизировала наши собственные разработки. И что еще я хотел отметить, что диссертант — тот необычный тип человека и очень востребованный в современных условиях, который хорошо, удачно, уверенно сочетает качество хорошего экспериментатора, способного дизайнировать эксперимент и четко его провести, со способностями вполне современного биоинформатика. Все статистические биоинформатические процедуры, которые сегодня были доложены, выполнены, собственно, Настей, а на самом деле такой работы было гораздо-гораздо больше и при выполнении диссертационного проекта, и при ее участии в других грантах. В самом начале я сказал, что не всегда 10 лет были легкими, и теперь скажу о трудностях. Настя настолько щепетильно относится к собственным результатам, что убедить ее опубликовать статью или защитить диссертацию некоторого труда стоило. Ей постоянно хотелось улучшить эксперимент, добавить доноров, улучшить систему обсчета и вообще написание статьи или диссертации доводить до абсолютного совершенства. Я надеюсь, что такое перфекционистское отношение к научной работе в дальнейшей,

безусловно, успешной карьере Насти будет ей только помогать. А членам Диссертационного совета прошу поддержать мое мнение о полном соответствии Анастасией Сычевой.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Так, Юрий Николаевич, пожалуйста.

Уткин Ю.Н., врио ученого секретаря: (*зачитывает положительное заключение организации,*

где выполнялась работа). У нас имеется заключение Федерального государственного бюджетного учреждения науки ИБХ РАН о диссертации «Клональная характеристика Т-клеточного ответа человека при иммунизации инактивированными вакцинами». Я прошу разрешения пропустить вот те данные, которые были изложены в персональном представлении кандидата и перейти непосредственно к заключению.

Диссертация Сычевой посвящена изучению влияния инактивированных вакцин против гриппа и клещевого энцефалита на Т-клеточный иммунитет человека. Данная тема продолжает оставаться актуальной, поскольку часто при изучении иммуногенности вакцин ограничиваются анализом ответа вирусов специфических антител, в то время как Т-клетки играют не менее важную роль в формировании противовирусной защиты. Более детальное изучение особенностей Т-клеточного ответа и формирования Т-клеточной памяти помогут лучше понять механизмы, лежащие в основе действия выбранных вакцин.

Сычева принимала активное участие во всех этапах выполнения диссертационной работы. В исследовании, посвященном противогриппозной вакцинации, участвовала в приготовлении библиотек кДНК β -цепей TCR и анализе полученных данных. Секвенирование совместно с Погорелым (лаборатория сравнительной и функциональной геномики ИБХ РАН). Для исследования, посвященного вакцинации против клещевого энцефалита, разработала дизайн исследования, занималась сбором образцов, выделением клеток, *in vitro* стимуляцией и подготовкой стимулированных клеток к выделению методом клеточного сортирования. Клеточный сортирование был выполнен Комеч (лаборатория сравнительной и функциональной геномики ИБХ РАН). Подготовка библиотек кДНК β -цепей TCR и библиотек для секвенирования транскриптома *in vitro*.

Достоверность полученных результатов обеспечена применением тщательно проработанного протокола пробоподготовки с использованием сертифицированных наборов реагентов. Для подтверждения специфичности клонов, ассоциированных с ответом на вакцину против клещевого энцефалита, была выполнена *in vitro* стимуляция клеток с очищенными и инактивированными частицами вируса клещевого энцефалита. Препарат предоставлен Воровичем (лаборатория клещевого энцефалита и других вирусных энцефалитов Института им. М.П. Чумакова РАН). Основной сравнительный анализ был

выполнен с использованием биологических реплик, результаты которого затем были подтверждены независимым статистическим подходом.

Далее, я прошу разрешения пропустить изложение содержания работы, то, что мы слышали. И далее, при написании диссертации соблюдены требования, установленные пунктом 14, об отсутствии заимствований без ссылок на источник авторов «Положения о присуждении ученых степеней». Содержание диссертации полностью соответствует выбранной отрасли науки, биологической науки и специальности «1.5.3 – Молекулярная биология». Основные результаты диссертации изложены в шести статьях, опубликованных в рецензируемых научных международных журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science. Таким образом, публикации по теме диссертации полностью удовлетворяют требованиям в пунктах 11-13 «Положения о присуждении ученых степеней». Диссертация «Клональная характеристика Т-клеточного ответа человека при иммунизации инактивированными вакцинами» Сычевой Анастасии Леонидовны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3 – Молекулярная биология». Заключение принято на открытом заседании отдела геномики адаптивного иммунитета. На заседании присутствовало 18 человек. Результаты голосования за – 18, против – 0, воздержалось – 0. Протокол №1 от 2 июня 2023 года. Подписано старшим научным сотрудником лаборатории сравнительной и функциональной геномики отдела геномики адаптивного иммунитета Звягиным и зам.директора ИБХ РАН Ямпольским. Утверждено директором ИБХ РАН академиком Габибовым. Это заключение нашего института.

И теперь отзыв ведущей организации *(зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный)*.

Актуальность темы диссертационной работы. Сегодня вакцинация является одной из наиболее эффективных стратегий борьбы с распространением инфекционных заболеваний. Поэтому создание новых и совершенствование уже существующих вакцин представляет собой первостепенную задачу в обеспечении общественного здравоохранения. Однако с точки зрения фундаментальных принципов функционирования иммунной системы достаточно давно было очевидно, что формирование полноценной иммунной защиты вряд ли возможно без участия Т-клеток. Т-клеточный ответ на антиген зависит от активации конкретных клонов Т-клеток. Все клетки обладают одинаковыми антиген-распознающими Т-клеточными рецепторами (TCR). Поэтому любые процессы, связанные с Т-клеточным иммунным ответом, будут отражены в репертуаре TCR. В данной работе для изучения особенностей Т-клеточного ответа на инактивированные вакцины методом высокопроизводительного секвенирования были выбраны две широко используемые вакцины – против гриппа и против клещевого энцефалита. Обе вакцины имеют

подтвержденную эффективность, но в обоих случаях для поддержания иммунитета требуется регулярная ревакцинация, а также возможны так называемые прорывные инфекции, представляющие серьезную угрозу для жизни больного. Поэтому получение новых данных о влиянии выбранных вакцин на иммунную систему имеет важное значение для повышения эффективности борьбы с инфекционными заболеваниями.

Соответствие темы диссертации научной специальности. Диссертационная работа Сычевой выполнена на базе ИБХ РАН и посвящена изучению динамики фенотипических свойств и клонального состава Т-клеточного ответа на вакцины против гриппа и клещевого энцефалита. Тематика диссертационной работы полностью соответствует паспорту научной специальности «1.5.3 – Молекулярной биологии». Далее излагаются основные результаты диссертационной работы. Я прошу разрешения пропустить этот пункт, поскольку мы это уже слышали.

Научная новизна работы. В рассматриваемой работе впервые проведен детальный анализ иммунного ответа на вакцины против гриппа и против клещевого энцефалита на уровне отдельных клонов Т-лимфоцитов, что в том числе позволило выявить и описать несколько волн клональной экспансии и проследить формирование новых клонов Т-клеток памяти. Фенотипический анализ показал преобладание CD4⁺ хелперов в Т-клеточном компоненте иммунного ответа на обе вакцины, но при этом впервые было продемонстрировано активация CD8⁺ Т-клеток в ответ на вакцинацию против клещевого энцефалита. Таким образом, был сделан важный шаг на пути к изучению особенностей антиген-специфичного ответа на вакцину против клещевого энцефалита.

Теоретическая значимость работы. В ходе исследования было получено детальное представление о клональной динамике Т-клеточного ответа на две инактивированные вакцины, включающие разные типы антигенов и отличающиеся по протоколу иммунизации, что значительно расширило представление о Т-клеточном ответе на данные типы вакцин. Анализ сходства антигенной специфичности вакцин-ассоциированных клонов дает представление о возможном разнообразии эпитопов вируса клещевого энцефалита, к которым был сформирован иммунный ответ, что на данный момент является недостаточно изученной темой.

Научно-практическая значимость. Главным практическим выводом данной работы является демонстрация формирования новых Т-клеток памяти в ответ на иммунизацию, поскольку это подтверждает эффективность выбранных вакцин с точки зрения Т-клеточного иммунитета. Значительную ценность представляют впервые полученные мотивы TCR для клонов, ассоциированных с ответом на вакцину против клещевого энцефалита. В соответствии с известными для каждого донора аллелями HLA, это может продвинуть

поиск иммунодоминантных эпитопов вируса клещевого энцефалита и разработку реагентов на основе мультимеров комплекса HLA-пептид для более детального изучения иммунного ответа на инфекцию и вакцинацию.

Далее проявляется общая характеристика диссертационной работы, где описывается объем работы и ее содержание. Я прошу разрешения не зачитывать этот пункт.

Заключение. Диссертационная работа производит очень хорошие впечатления и серьезных замечаний не вызывает. В рамках научной дискуссии хотелось бы задать два связанных друг с другом вопроса:

1. Следует ли ожидать, что существование в организме Т-клеток памяти вследствие введенной ранее вакцины или перенесенной инфекции приведет к каким-то особенностям в характере протекания ответа на новую вакцинацию? Можно ли интерпретировать двухпиковый характер ответа на вакцину против клещевого энцефалита у донора №9 как такую особенность? Можно ли предположить, что сходность с донором №9, двухпиковый характер ответа у донора №7 появляется вследствие того, что донор №7 когда-то получил вакцину или перенес инфекцию, но не сохранил об этом ни воспоминаний, ни медицинских записей?

2. Есть ли основания для рассуждения о возможности создания метода лабораторной диагностики для определения напряженности Т-клеточного иммунитета против клещевого энцефалита? Если да, то насколько практичным может оказаться такой метод с точки зрения сложности реализации? Если нет, то в каком направлении следует развивать исследование, чтобы создать основания для данных рассуждений?

И далее заключение. Диссертационная работа Сычевой Анастасии Леонидовны «Клональная характеристика Т-клеточного ответа человека при иммунизации инактивированными вакцинами», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Молекулярная биология», представляет собой завершенную научно-квалификационную работу высокого уровня, в которой впервые подробно изучен иммунный ответ на вакцины против гриппа и клещевого энцефалита на уровне отдельных клонов Т-лимфоцитов. Диссертационная работа Сычевой Анастасии Леонидовны соответствует критериям, в том числе пункту 9, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», а сам диссертант, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности «Молекулярная биология».

Отзыв обсужден и одобрен на объединенном семинаре лабораторий молекулярных механизмов иммунитета, пролиферации клеток, биохимии вирусных инфекций и передачи внутриклеточных сигналов в норме и при патологии. Протокол №1 от 26 июня 2023 года.

Отзыв подготовлен Ивановым Александром Владимировичем, д.б.н., заместителем директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии Российской академии наук. Отзыв утвержден заместителем директора Института молекулярной биологии, д.б.н., член-корр. Миткевич 15-го сентября 2023 года. Были замечания.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Анастасия Леонидовна, давайте отвечайте на вопросы.

Сычева А.Л., соискатель: В отзыве было два вопроса. Первый вопрос касался влияния предыдущих иммунизаций или предыдущих, может быть, инфекций на ответ при последующей иммунизации. Да, у нас есть основания ожидать, что это влияние будет, как, например, здесь это видно по динамике антител. Это как раз концентрация антител у донора, который за 10 лет уже был вакцинирован. Но относительно Т-клеточного ответа мы не можем делать такой же вывод, поскольку все группы присутствовали у всех доноров, даже которые в первый раз встречались. Но у них разное количество клонов, разная представленность этих клонов, и это может быть связано с индивидуальной вариабельностью ответа. Это касается как донора №9, так и донора №7.

И второй вопрос был про использование наших методов и подходов в лабораторной диагностике. К сожалению, метод, основанный на анализе репертуаров, довольно трудоемкий и его тяжело использовать для медико-лабораторных тестов, но мы возлагаем надежды на разработку мультимеров с антигенами вируса, которые помогут с минимальными затратами определять антиген-специфичный иммунный ответ.

Мирошников А.И., председатель: Все?

Сычева А.Л., соискатель: Да.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Так, значит, официальный оппонент.

Уткин Ю.Н., врио ученого секретаря: Анатолий Иванович, два отзыва ещё. На автореферат два отзыва.

Мирошников А.И., председатель: А, да, отзывы на автореферат давайте.

Уткин Ю.Н., врио ученого секретаря: Поступило два отзыва на автореферат. Отзывы полностью положительные и заключают, что диссертация Сычевой полностью соответствует требованиям, установленным в «Положении о присуждении ученых степеней», а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Молекулярная биология». Отзывы подготовлены к.б.н., старшим преподавателем кафедры иммунологии Биологического факультета МГУ Шиловым Евгением Сергеевичем и научным сотрудником лаборатории клеточных взаимодействий отдела иммунологии ИБХ РАН, к.б.н. Стрельцовой Марией Алексеевной.

Мирошников А.И., председатель: Вопросов нет?

Уткин Ю.Н., врио ученого секретаря: Вопросов нет.

Мирошников А.И., председатель: Да, спасибо. Александр Соломонович Апт, пожалуйста. Официальный оппонент д.б.н., зав. лаборатории иммуногенетики отдела иммунологии из Института туберкулеза. Вы первый раз у нас сегодня?

Апт. А.С., официальный оппонент: В качестве оппонента, да. У нас это семейное – жена оппонировала.

Мирошников А.И., председатель: Пожалуйста.

Апт. А.С., официальный оппонент: *(излагает отзыв, отзыв положительный).*

Уважаемый президиум, уважаемые члены Ученого совета, прежде всего я хочу сказать, что мне диссертация Сычевой Анастасии Леонидовны очень понравилась. Я ее с большим удовольствием прочел. И первое, что меня подкупило, это то, что сразу речь пошла об ответе Т-клеток. И это замечательно, потому что все-таки без Т-клеток никакая адаптивная иммунология не происходит. И как говорил еще очень давно замечательный иммунолог Борис Давидович Брондз, «В-клетка – дура. Чему ее Т-клетки научат, то она и будет делать. Так что вы эти антитела потом, а вот давайте поговорим о Т-клетках». И это я совершенно разделяю, что, в общем, на Т-клетку завязано чрезвычайно много, и понимать точно, как она работает, когда происходит такое, в общем, простое практическое воздействие: человека вакцинируют. Потом, конечно, есть эффекторные антитела, которые от вируса защищают. А что же делается, в общем, чтобы эти антитела получить, и как это все поддерживается, это все-таки в основном Т-клетки, и это замечательно. Мне, в общем, общая оценка диссертации очень высокая. Я не буду говорить все статистические данные о том, сколько там в ней страниц, сколько там чего, каких ссылок – это совершенно необязательно. А вот хочу сказать, что я в своем вот таком устном выступлении хотел бы ограничиться только тремя пунктами. И особенно потому, что я такой иммунолог физиологического профиля и я не смогу вполне компетентно выступить по вопросам биоинформатики – это, прямо скажем, не мое. Но вот есть три вещи, на которые я хотел бы обратить внимание, как на очень важные, которые вошли в выводы, и я счел для себя эти выводы центральными.

Значит, во-первых, я сначала решил, что как-то не очень правильно выглядит раздел работы по вакцинации против гриппа, потому что там один человек, один донор. Ну, один донор, мало ли что, как-то это все-таки в биологии не совсем принято. Но потом, когда я вчитался во весь этот раздел и понял, что вывод, самый главный-то вывод из этого одного-единственного донора такой: взрослый человек, даже уже вполне такой зрелый человек, 58 лет, несколько раз вакцинируется против гриппа, и у него каждый раз не только происходит буст того, что в нем уже есть, и какие клоны в нем есть после первой вакцинации, после

второй вакцинации, у него после третьей вакцинации появляются новые клоны, которые вакцинация вовлекла в ответ. Это важный, на мой взгляд, вывод. Во-первых, это прямое оправдание того, что все-таки вакцину надо вводить неоднократно и очень часто. А во-вторых, это любопытно как иммунная система в силу абсолютно непонятных нам причин находит среди чего-то вновь появившегося на периферии, что произошло заново из костного мозга, что будет опять отвечать на вакцину. Это будет не такой клон, как были предыдущие. Такую биологию следует поддерживать. В любом случае, мне это очень понравилось.

Очень мне понравилась также из многочисленных выводов сделанных ситуация с клонами Т-клеток, которые имеют неидентичную структуру TCR с теми клонами, которые, так сказать, автор считает прямо специфичными на антигены, на то, что содержится в вакцине, а которые похожи по своим TCR на полностью специфичные клоны, тоже вовлекаются в ответ, по-видимому, с другими центрами связывания, потому что самые лучшие клоны, так сказать, самые сильные – это то, что прямо на вакцину, а похожие – это рядом. Но это очень хорошая вещь, потому что, во-первых, это количественная иммунология такая настоящая, когда понятно, что любой иммунный ответ – это некий континуум клонов, который, скорее всего, это какая-то из формы гауссовой кривой, когда туда вовлекаются и те, кто и слишком сильно реагирует, и слишком слабо реагирует. Их потом, по-видимому, селекция убирает на периферии, лучше и поддерживает. Но всегда есть некое количество клонов, которые работают рядом с основными. И это важно, как мне показалось, и я отмечаю этот в отзыве, даже несколько в вакцинологии. По-моему, это вещь, которую обнаружил автор, которая важна для понимания того, что происходит при совсем других состояниях, таких как аутоиммунные ответы, таких как трансплантология, когда идет отторжение из-за того, что ответ идет на аллогенное, не на модифицированное свое, а на чужое. Но это чужое – оно слабо чужое. Для одних клонов это достаточно, чтобы их стимулировать, для других недостаточно. Одни видят это, как совсем чужое, и кидаются. Другие видят – ага, это что-то как-то похоже на модифицированное свое, и, наверное, надо тоже, так сказать, это распознать. И вот такие вещи важны и в трансплантологии, и в аутоиммунитете. Ну, и потом есть целый ряд совершенно забытых, но и уже никто их не поминает, таких феноменов, которые никто никогда не объяснил. Если в зале есть иммунологи, то многие из них могут помнить, что такое аллогенная ингибция, что такое гибридная резистентность. Это когда гибриды не хотят маму с папой, трансплантат не приживается. Это все существует в природе, и мы совершенно не понимаем, как это существует. Скорее всего, из сделанной работы можно сделать вывод – там есть некое количество клонов, которые то ли ошибкой вовлечены в этот ответ, то ли их ответ не слишком аффинный, но все-таки есть, и

мы его видим как неприятность для того, кому сделали трансплантацию. И это очень, по моему, важно и хорошо, и в этом направлении можно работать и дальше сколько угодно.

Ну и потом последний вывод, это который номер четыре, о том, каков процент клеток, которые вовлекаются в ответ на вакцинацию. Значит, у автора получается, что на хорошем пике вакцинации до 3% всего репертуара Т-клеток, которые в данный момент есть у человека, он на пике ответа на 3% состоит из того, что отвечает на вакцину. Представим себе ситуацию, когда человек вот так живет-живет, ему надо прививаться от одного, другого, третьего, четвертого. Вот он сделал себе десяток прививок против разных вакцин, против разных возбудителей, он сделал бусты, поэтому он догнал клоны, отвечающие на разные вакцины до известных пределов, а останется ли у него в иммунной системе что-нибудь, если появится что-нибудь неожиданное. Это такое, на мой взгляд, довольно серьезное соображение, которое надо иметь в виду, и поэтому становится не праздным вопрос: сколько раз и сколько разных вакцин применять для того, чтобы вакцинировать одного человека. Это тоже косвенный, но очень важный вывод, который есть в работе.

Ну и, наконец, я должен сказать, что, в общем, диссертация очень сильная, очень хорошая, там и публикации есть очень приличного уровня, совсем хорошего. Там и технически текст сделан очень хорошо, он иллюстрирован замечательно. Там, скажем, открыл литобзор молекулярный биолог, но который работает не в иммунологической области. И он сразу увидит, как Т-рецептор распознает МНС с пептидом, там картинка будет, там простые объяснения такие. И все это укладывается в довольно компактный, сжатый текст. Диссертация не слишком большая по объему, это очень хорошо, и это приятно видеть.

Ну и мои замечания, они касаются исключительно... Правка, которую я бы сделал, она исключительно редакторская, другой я бы даже и не предложил. И с этими замечаниями диссертант ознакомлен, она знает, что я думаю по поводу качества текста, и чтобы я просил бы учесть на будущее при написании. Выражается это очень простыми словами: текст автор должен вычитать от 20 до 40 раз, тогда у него будет текст. Во все остальное мой отзыв содержит, включая и упоминание, естественно, пункта 9, и всех Постановлений, которым должна соответствовать диссертация. Так что я считаю, что это очень хорошая работа, которой, безусловно, достойно быть кандидатской диссертацией, и даже с превышением, а автор достоин степени кандидата биологических наук. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо, Александр Соломонович. Но Юрий Борисович уже рассказал, что Настя очень ответственно относится к своей работе, особенно к написанию диссертации. Настя, будете отвечать? Ну, нечего, в общем-то.

Сычева А.Л., соискатель: Я хотела бы сказать, что я полностью согласна со всеми правками. Многие из них стилистические или такого характера более технического в плане

использования корректного термина. И некоторые из них я постаралась учесть при подготовке этого выступления. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: То есть больше не будете? Хорошо, спасибо. Так, второе заключение у нас – отсутствует оппонент. Юрий Николаевич, пожалуйста.

Уткин Ю.Н., врио ученого секретаря: (*излагает отзыв, отзыв положительный*). Отзыв официального оппонента к.б.н. Храмеевой Екатерины Евгеньевны на диссертацию Сычевой Анастасии Леонидовны, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Диссертационная работа Сычевой посвящена актуальной теме изучения Т-клеточного ответа человека при иммунизации инактивированными вакцинами. Т-клеточный иммунитет уже достаточно хорошо изучен, однако исследования Т-клеточного ответа на вакцины против гриппа и клещевого энцефалита на уровне отдельных клонов ранее не проводилось. Таким образом, в диссертационной работе впервые изучается динамика, фенотипический свойства и клональный состав Т-клеточного ответа на вакцины против гриппа и клещевого энцефалита методами высокопроизводительного секвенирования. Далее кратко излагается общая характеристика и содержание работы. Я прошу разрешения этот пункт не зачитывать.

Качество диссертационной работы в целом является высоким с научной и методической точки зрения, и у меня есть лишь несколько небольших замечаний в отношении выполненного статистического анализа данных:

1. В разделе 4.2.3 «Транскрипционные профили *in vitro* стимулированных Т-клеток» выполняется усреднение технических реплик. Этот шаг анализа является корректным. Однако сначала следовало бы показать сходимость технических реплик между собой. Перед усреднением следовало бы посчитать коэффициенты корреляции между техническими репликами, указать их в тексте работы и показать, что они являются высокими, выше для одного и того же биологического образца, чем между разными. И в таком случае усреднение не вызывало бы вопросов.
2. На Рисунке 18 показано среднее значение по двум репликам. Однако, хотелось бы оценить вариабельность. Можно было бы добавить на этот рисунок значение по отдельным репликам в виде точек в дополнении к линиям. Это помогло бы оценить статистическую значимость наблюдаемых отличий.
3. Возможно ли оценить статистическую значимость отличий на Рисунке 20?
4. В разделе 4.4.7 «Сравнение транскрипционных профилей субпопуляции *in vitro* стимулированных Т-клеток» автору удалось найти крайне мало DEG, из чего делается вывод о высокой степени функционального сходства всех субпопуляций *in vitro* стимулированных Т-клеток. Этот вывод является не совсем верным. С точки зрения

формальной статистики, если не удастся найти статистически значимые отличия, то это не значит, что их на самом деле нет. Корректным будет лишь вывод о том, что согласно анализируемым данным статистически значимых отличий найти не удастся. В случае этой конкретной работы отсутствие статистически значимых отличий может быть следствием большой технической вариабельности или биологической вариабельности вследствие каких-то неизвестных «confounding factors» (курения, не диагностированные сопутствующие заболевания доноров и т.п.). В случае большой технической вариабельности количество доноров, выбранное по дизайну исследования, может оказаться недостаточным, чтобы достигнуть нужной статистической мощности для наблюдения статистически значимых отличий. Общее правило такое: чем больше технической вариабельности, тем больше нужно проанализировать образцов, чтобы получить статистически значимые отличия. В данной работе оценка минимально необходимого количества образцов с учетом этих соображений не проводилась, к сожалению.

Тем не менее, эти замечания не снижают качество работы и не уменьшают научную значимость полученных результатов. В целом диссертация Сычевой Анастасии Леонидовны представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, выполненную на высоком научном уровне. Все результаты, полученные автором, подтверждены экспериментально и являются достоверными. Выводы обоснованы и соответствуют содержанию работы. Автореферат и статьи автора полностью отражают содержание диссертации. Полученные автором данные являются новыми и актуальными. Они расширяют представление о Т-клеточном иммунном ответе. Диссертационная работа Сычевой Анастасии Леонидовны выполнена на высоком научном и методическом уровне, а также соответствует требованиям по актуальности, степени обоснованности научных положений и выводов их достоверности и новизне. Диссертационная работа Сычевой Анастасии Леонидовны соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности «Молекулярная биология». Официальный оппонент к.б.н. Храмева Екатерина Евгеньевна, старший преподаватель Центра молекулярной клеточной биологии Сколковского института науки и технологий.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Ну, Настя, давайте отвечайте.

Сычева А.Л., соискатель: Я хотела бы начать со второго пункта. Под Рисунком 18 имеется в виду график общей динамики клонов, и здесь черным я отметила значения, полученные по репликам. Видно, что разброс минимальный, что связано с тем, что у нас очень хорошая воспроизводимость реплик, о чем я до этого рассказывала в докладе. Затем Екатерина

Евгеньевна спрашивает, можно ли оценить здесь статистику различий. И действительно, если мы оценим преобладание CD4 субпопуляции над CD8 во всей когорте доноров, то парный t-тест покажет значимость этой разницы. И для ответа на остальные замечания мне сначала нужно пояснить, о каких технических репликах идет речь. Это касается последнего раздела в результатах работы, который не вошел ни в выводы, ни в автореферат. Дело в том, что вот из этих стимулированных клеток мы собирали субпопуляции клеток, которые экспрессируют CD137 или продуцируют IFN γ в ответ на стимуляцию, методом сортирования. И из полученных образцов, помимо репертуаров TCR, мы также получали полные транскриптомы, которые затем и анализировали. Здесь представлены коэффициенты корреляции по Спирмену, посчитанные для всех полных транскриптомов. Они достаточно высокие для того, чтобы объединять технические реплики, и для большинства реплик они выше, чем для биологических образцов. И последнее замечание касается сформулированной нами гипотезы, о том, что полученные нами субпопуляции являются частью единой функционально похожей субпопуляции Т-клеток. У нас есть два основания для того, чтобы считать эту гипотезу правомерной. Первый – это сравнительный анализ транскриптомов клеток из этих субпопуляций, который показал, что у нас нет большого количества различий между ними. Второй – это анализ репертуаров этих клеток. По нему видно, что значительная часть репертуаров состоит из клеток, которые принадлежат клонам, найденных в обеих субпопуляциях, которые здесь отмечены темно-синим цветом. Надеюсь, я удовлетворила ответом.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Так, коллеги, ну а теперь следующие вопросы. Мы должны дискуссию открыть. Пожалуйста.

Деев С.М.: Дорогие коллеги, выступаю не потому, что у нас должна быть дискуссия для стенограммы, которая пойдет в ВАК, а потому, что действительно очень приятно удивлен данной работой. Я, когда знакомился с рефератом, удивился, насколько большая работа, и даже непонятно было, как можно такую большую работу сделать. Ну вот Юрий Борисович ответил на мой вопрос тем, что работали 10 лет.

Мирошников А.И., председатель: 10 лет прошло.

Деев С.М.: Да, огромный срок. И я думаю, что мы все должны поблагодарить Анастасию Леонидовну и Юрия Борисовича, а также Александра Соломоновича, который очень дополнил интереснейший доклад. Касается каждого, мы все иммунизируемся, нам всем понятно, для чего это нужно, но и очень высокая наука. Вы посмотрите, 6 публикаций такого уровня, там и PNAS, и NAR, и Вакцины, и значит 6 публикаций очень высокого уровня. Мы нечасто в докторских диссертациях видим такое большое количество высокорейтинговых публикаций. Прекрасный доклад. Я когда читал, мне была интересная

тема, смотрел реферат, было очень профессионально, очень с большим уважением к ремеслу к собственному сделаны иллюстрации, пояснительные объяснения. Доклад прекрасный, даже цветовая гамма на рисунках была подобрана. Настолько все удачно сделано. В общем, снимаю шляпу перед профессионализмом данной работы. Ну конечно, все голосуем за. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Еще кто хочет сказать? Не вижу. Настя, Вам слово.

Сычева А.Л., соискатель: Я хотела бы поблагодарить во-первых всех членов Диссертационного совета, от которых я сегодня услышала очень теплые слова, и которые отдельно даже подходили и поздравляли. И, конечно же, в первую очередь поблагодарить коллектив нашей лаборатории и всех сотрудников, которые помогли мне в реализации этого проекта. И помогли какими-то методическими советами, участвовали в обсуждении результатов работы, обучали различным методикам в самом начале, когда я только пришла в лабораторию. И, конечно же, моего научного руководителя, Лебедева Юрия Борисовича, который человек с огромным терпением, он уже рассказывал, насколько я перфекционист, вот, он со всем этим имел дело. И еще он уникальный научный руководитель в том смысле, что у него получается как-то вовремя направлять, но при этом сохранять индивидуальность подхода и мышления у подопечного. Я не представляю, как ему это удается. Также я хотела поблагодарить Воровича Михаила Фридриховича, который помогал с стимуляцией клеток *in vitro* и предоставил нам препараты инактивированного вируса. И моих оппонентов Александра Соломоновича, который написал очень интересный отзыв, его было увлекательно читать, и я взглянула на свою работу с другой стороны, и Екатерину Евгеньевну, которая дала очень конкретные методические замечания, которые в дальнейшем я обязательно учту в своей будущей работе. Также хотела бы поблагодарить коллег из ведущей организации. Это был увлекательный семинар, на котором мы очень долго обсуждали мою работу. Они задавали много интересных вопросов и давали советы, которые помогли улучшить сегодняшний доклад. И, конечно же, я хотела бы поблагодарить мою семью и моих друзей, без которых вся эта работа тоже была бы невозможной, и я бы не справилась с ней морально. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Так, коллеги, я предлагаю избрать счетную комиссию перед тем, как голосовать. И счетная комиссия в составе Татьяны Леонидовны Ажикиной, Аллы Николаевны Генераловой и Юрий Николаевич Уткин. Не возражаете? Возражения не вижу. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Ну что, господа, давайте проголосуем.

(Идет тайное голосование)

Уткин Ю.Н., врио ученого секретаря: Так, протокол заседания счетной комиссии по голосованию. Диссертации Сычевой Анастасии Леонидовны. Присутствовало на заседании 20 членов совета, роздано бюллетеней – 20, осталось неиспользованных – 10, оказалось в урне – 20, за – 20, против – нет, недействительных – нет.

Мирошников А.И., председатель: Так, кто за то, чтобы утвердить результаты счетной комиссии, прошу поднять руки. Так, кто против? Нет. Воздержавшихся? Нет тоже. Пожалуйста. Так, и у нас последний вопрос – это проект Заключения Совета, и мы должны принять это заключение. Пожалуйста, Юрий Николаевич.

Уткин Ю.Н., врио ученого секретаря: А есть ли возражения против?

Мирошников А.И., председатель: Возражения есть по поводу проекта Заключения? У Николая Владимировича что-то есть? Пожалуйста.

(Бовин Н.В. сообщает о незначительных редакторских правках тексте Заключения. С учетом этого Диссертационный совет единогласно принимает Заключение).

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Сегодня заседание закрыто. Мы поздравляем защитившихся. Да, спасибо.

Председатель
Диссертационного совета

акад. РАН, д.х.н. Мирошников А.И.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

