

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 04.10.2023 г. № 22

О присуждении **Сычевой Анастасии Леонидовне** (Российская Федерация) ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Клональная характеристика Т-клеточного ответа человека при иммунизации инактивированными вакцинами» по специальности «1.5.3 - Молекулярная биология» принята к защите 27 июня 2023 г. (протокол заседания №19) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, и действующим на основании Приказов Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Сычева Анастасия Леонидовна, 26 февраля 1992 года рождения, в 2015 г. окончила биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по специальности «Биохимия». С 1 ноября 2015 г. по 31 октября 2019 г. проходила обучение в очной аспирантуре в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории сравнительной и функциональной геномики отдела геномики адаптивного иммунитета ИБХ РАН.

Диссертация выполнена в лаборатории сравнительной и функциональной геномики отдела геномики адаптивного иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель - доктор биологических наук, **Лебедев Юрий Борисович**, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, главный научный сотрудник и заведующий лабораторией сравнительной и функциональной геномики отдела геномики адаптивного иммунитета.

Официальные оппоненты Апт Александр Соломонович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», заведующий лабораторией иммуногенетики отдела иммунологии и **Храмеева Екатерина Евгеньевна**, кандидат биологических наук, Сколковский институт науки и технологий, старший преподаватель Центра молекулярной и клеточной биологии дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, г. Москва, в своем *положительном* отзыве, подписанном заместителем директора по научной работе доктором биологических наук Ивановым Александром Владимировичем и утвержденном заместителем директора доктором биологических наук член-корреспондентом РАН Митькевичем Владимиром Александровичем, указала, что диссертационная работа Сычевой Анастасии Леонидовны представляет собой завершенную научно-квалификационную работу высокого уровня, в которой впервые подробно изучен иммунный ответ на вакцины против гриппа и КЭ на уровне отдельных клонов Т-лимфоцитов, и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями Постановлений Правительства Российской Федерации от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426, 26.09.2022 г. № 1690), а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3 – Молекулярная биология».

Соискатель имеет 6 опубликованных работ по теме диссертации. Все работы были опубликованы в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных Web of Science и Scopus) и составляют общий объем 3,8 печатных листов. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах. Научные работы по теме, в которые Сычева А.Л. внесла основной либо существенный вклад, включают:

1. **Sycheva A.L.**, Komech E.A., Pogorelyy M.V., Minervina A.A., Urazbakhtin S.Z., Salnikova M.A., Vorovitch M.F., Kopantzev E.P., Zvyagin I.V., Komkov A.Y., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B. Inactivated tick-borne encephalitis vaccine elicits several overlapping waves of T cell response // *Front. Immunol.* 2022. Т. 13. С. 970285.
2. **Sycheva A.L.**, Pogorelyy M.V., Komech E.A., Minervina A.A., Zvyagin I.V., Staroverov D.B., Chudakov D.M., Lebedev Y.B., Mamedov I.Z. Quantitative profiling reveals minor changes of T cell receptor repertoire in response to subunit inactivated influenza vaccine // *Vaccine.* 2018. Т. 36, № 12. С. 1599–1605.
3. Pogorelyy M.V., Minervina A.A., Touzel M.P., **Sycheva A.L.**, Komech E.A., Kovalenko E.I., Karganova G.G., Egorov E.S., Komkov A.Y., Chudakov D.M., Mamedov I.Z., Mora T., Walczak A.M., Lebedev Y.B. Precise tracking of vaccine-responding T cell clones reveals convergent and personalized response in identical twins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018. Т. 115, № 50. С. 12704–12709.
4. Shugay M., Bagaev D.V., Zvyagin I.V., Vroomans R.M., Crawford J.C., Dolton G., Komech E.A., **Sycheva A.L.**, Koneva A.E., Egorov E.S., Eliseev A.V., Van Dyk E., Dash P., Attaf M., Rius C., Ladell K., McLaren J.E., Matthews K.K., Clemens E.B., Douek D.C., Luciani F., Van Baarle D., Kedzierska K., Kesmir C., Thomas P.G., Price D.A., Sewell A.K., Chudakov D.M. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity // *Nucleic Acids Res.* 2018. Т. 46, № D1. С. D419–D427.

5. Pogorelyy M.V., Elhanati Y., Marcou Q., **Sycheva A.L.**, Komech E.A., Nazarov V.I., Britanova O.V., Chudakov D.M., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B., Mora T., Walczak A.M. Persisting fetal clonotypes influence the structure and overlap of adult human T cell receptor repertoires // PLoS Comput. Biol. 2017. T. 13, № 7. С. e1005572.
6. Zvyagin I.V., Mamedov I.Z., Tatarinova O.V., Komech E.A., Kurnikova E.E., Boyakova E.V., Brilliantova V., Shelikhova L.N., Balashov D.N., Shugay M., **Sycheva A.L.**, Kasatskaya S.A., Lebedev Y.B., Maschan A.A., Maschan M.A., Chudakov D.M. Tracking T-cell immune reconstitution after TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children // Leukemia. 2017. T. 31, № 5. С. 1145–1153.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. проф. **Апта Александра Соломоновича**. Отзыв **положительный**, содержит замечания технического и стилистического характера относительно использованных терминов и понятий. Также в отзыве отмечена необходимость уточнить во многих разделах литературного обзора, что изложенный материал касается именно противовирусного иммунитета

Отзыв официального оппонента к.б.н. **Храмеевой Екатерины Евгеньевны**. Отзыв **положительный**, содержит несколько замечаний и вопросов в отношении выполненного статистического анализа данных:

- 1) В разделе 4.2.3. *Транскрипционные профили in vitro стимулированных T-клеток* не показана сходимость технических реплик перед их усреднением.
- 2) На рисунке 18 было бы полезным добавить значения по отдельным репликам для оценки вариабельности.
- 3) Возможно ли оценить статистическую значимость отличий на рисунке 20?
- 4) В разделе 4.4.7. *Сравнение транскрипционных профилей субпопуляций in vitro стимулированных T-клеток* сделан не совсем верный вывод о «высокой степени функционального сходства всех субпопуляций in vitro стимулированных T-клеток». Более корректным будет лишь вывод о том, что, согласно анализируемым данным, статистически значимых отличий найти не удастся. Для более точной оценки следует определить минимально необходимое количество образцов с учетом уровня технической вариабельности в данной работе.

Отзыв **ведущей организации**. Отзыв **положительный** и серьезных замечаний не вызывает, содержит два вопроса в рамках научной дискуссии:

1) Следует ли ожидать, что существование в организме T-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 КЭ у донора #9 как такую особенность? Можно ли предположить, что сходный 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 рассуждений о возможности создания метода лабораторной диагностики для определения напряженности T-клеточного иммунитета против КЭ? Если

да, то насколько практичным может оказаться такой метод с точки зрения сложности реализации? Если нет, то в каком направлении следует развивать исследования, чтобы создать основания для подобных рассуждений?

Отзыв на **автореферат** старшего преподавателя кафедры иммунологии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», к.б.н. Шилова Евгения Сергеевича. Отзыв *положительный*, без замечаний.

Отзыв на **автореферат** научного сотрудника лаборатории клеточных взаимодействий отдела иммунологии ИБХ РАН, к.б.н. Стрельцовой Марии Алексеевны. Отзыв *положительный*, без замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области иммунологии, молекулярной биологии и биоинформатики, которые подтверждены сериями публикаций в ведущих российских и международных журналах. В ведущей организации – ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН – проводятся исследования в области иммунологии, в том числе по изучению иммунного ответа на вирусные инфекции и применения вакцин, а также применяются современные методы высокопроизводительного секвенирования. Официальный оппонент д.б.н. проф. Апт Александр Соломонович является ведущим специалистом в области изучения взаимодействия иммунной системы с инфекционными патогенами. Официальный оппонент к.б.н. Храмева Екатерина Евгеньевна является высококвалифицированным специалистом в области биоинформатики и имеет большой опыт статистического анализа больших объемов данных секвенирования. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской работы и высокой квалификацией, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны и достоверности результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований был предложен новый способ изучения Т-клеточного ответа на вакцинацию как совокупности волн клональной экспансии, каждая из которых вносит разный вклад в формирование приобретенной иммунологической памяти. Для каждой вакцинации был выполнен анализ репертуаров Т-клеточных рецепторов, что позволило обнаружить экспансию вакцин-ассоциированных клонов и формирование иммунологической памяти в результате вакцинации. Также новый подход к изучению иммунного ответа на вакцину против клещевого энцефалита позволил впервые обнаружить ответ CD8⁺ Т-клеток.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что в нем впервые был изучен Т-клеточный ответ на вакцины против гриппа и клещевого энцефалита на уровне отдельных клонов. Детальное изучение клональной динамики позволило выявить как общие черты, так и принципиальные отличия в ответе на две инактивированные вакцины, включающие разные типы антигенов и отличающиеся по протоколу иммунизации. Выявление отдельных волн клональной экспансии поднимает вопрос о роли различных фенотипических субпопуляций в иммунном ответе и их вкладе в формирование иммунной

защиты. Анализ сходства антигенной специфичности ответивших клонов дает представление о разнообразии эпитопов вируса клещевого энцефалита, к которым был сформирован иммунный ответ, что на данный момент является недостаточно изученной темой.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что было продемонстрировано формирование новых Т-клеток памяти в ответ на иммунизацию вакцинами против гриппа и против клещевого энцефалита, что подтверждает эффективность выбранных вакцин в обеспечении Т-клеточной защиты. Также существенную значимость имеют полученные мотивы Т-клеточных рецепторов, ассоциированных с ответом на вакцину против клещевого энцефалита. С учетом известных аллелей HLA для каждого донора это может значительно продвинуть поиск иммуногенных эпитопов и создание первых мультимеров комплекса HLA-пептид. Также изучение механизмов вовлечения и роли различных по функциональным свойствам Т-клеток позволит создавать более эффективные вакцины и оптимизировать стратегии вакцинации в будущем.

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 стимуляция клеток *in vitro* очищенными инактивированными частицами вируса клещевого энцефалита (препарат предоставлен Воровичем М.Ф., лаб. клещевого энцефалита и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»). Основной сравнительный анализ был выполнен с использованием биологических реплик, результаты которого затем были подтверждены независимыми статистическими подходами.

Личный вклад соискателя состоит в активном участии на всех этапах выполнения диссертационной работы. В исследовании, посвященном противогриппозной вакцинации, Сычева А.Л. участвовала в приготовлении библиотек кДНК β -цепей TCR и анализе полученных данных секвенирования совместно с Погорелым М.В (лаб. сравнительной и функциональной геномики ИБХ РАН). Для исследования, посвящённого 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 было выполнено Комеч Е.А., лаб. сравнительной и функциональной геномики ИБХ РАН), подготовкой библиотек кДНК β -цепей TCR и библиотек для секвенирования транскриптома *in vitro* стимулированных клеток (под руководством Мамедова И.З., лаб. сравнительной и функциональной геномики ИБХ РАН), постановкой иммуноферментного анализа, первичной обработкой данных секвенирования, подбором статистических методов обработки, анализом полученных данных, и интерпретацией полученных результатов. Данные HLA-генотипов доноров были ранее получены Минервиной А.А. и Сальниковой М.А. (лаб. сравнительной и функциональной геномики ИБХ РАН).

Диссертационный совет 24.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Сычевой Анастасии Леонидовны является законченной научно-квалификационной работой, в

которой впервые был изучен иммунный ответ на вакцины против гриппа и против клещевого энцефалита на уровне отдельных клонов Т-клеток.

Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3. – Молекулярная биология. Таким образом 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 1.5.3. – Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; № 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. № 1690).

В ходе защиты диссертации не было высказано критических замечаний.

Соискатель Сычева Анастасия Леонидовна ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

Вопрос 1: в начале доклада на графиках были показаны клоны, уровень которых уменьшился. Есть ли у вас объяснение почему такие клоны появляются и, может быть, исследовали что это за клоны и какая у них специфичность?

Ответ: это может быть связано с тем, что донор находится не в стерильных условия и продолжает контактировать с окружающим миром и какие-то патогены, с которыми он регулярно встречается могут стимулировать иммунитет, в результате чего какие-то клетки снова пролиферируют, потом снова чуть-чуть уходят. К сожалению, мы не можем точно отследить какие именно патогены это вызывают.

Вопрос 2: какие вакцины вы брали для исследования? Возможно ли так, что если взять другие, то результат исследования сильно изменится?

Ответ: мы брали 2 вакцины. Это были инактивированная субъединичная вакцина против гриппа Инфлювак и инактивированная цельновирионная вакцина против клещевого энцефалита Клещ-Э-Вак. Я не думаю, что это сильно зависит от производителя, здесь важнее принцип производства вакцин, т.е. является ли она цельновирионной или субъединичной, аттенуированной или инактивированной.

Вопрос 3: в основе вашей классификации лежит анализ динамики появления этих клонов. Но там очень мало точек, на основе которых вы говорите о распределении и относите график к какой-либо из категорий. Насколько надёжны эти данные?

Ответ: я считаю, что эти данные достаточно надёжны для того, чтобы оценить тренды того, как реагировали клоны, т.е. насколько быстро, например, их Т-клетки пролиферировали и когда клоны достигли своей наивысшей концентрации. Или, например, понять, что группа d30 практически не ответила, так как по этим двум точкам можно было бы отследить наличие клональной экспансии.

На заседании 4 октября 2023 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по изучению динамики, фенотипических свойств и клонального состава Т-клеточного ответа на вакцины против гриппа и клещевого энцефалита присудить Сычевой Анастасии Леонидовне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 5 докторов наук (отдельно по каждой научной специальности рассматриваемой диссертации), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН



Мирошников Анатолий Иванович

Врио ученого секретаря
диссертационного совета
д.х.н.

Уткин Юрий Николаевич

05.10.2023 г.