

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Института молекулярной биологии им.
В.А. Энгельгардта Российской академии наук
д.б.н., член-корреспондент РАН



Митькевич В.А.

15 сентября 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости
диссертационной работы **Сычевой Анастасии Леонидовны**
«Клональная характеристика Т-клеточного ответа человека при иммунизации
инактивированными вакцинами», представленной на соискание учёной степени кандидата
биологических наук по специальности «1.5.3 – Молекулярная биология».

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 представляют собой первостепенную задачу в обеспечении общественного здравоохранения. Важным этапом в разработке новой вакцины является оценка её иммуногенности, которую долгое время оценивали по уровню нейтрализующих антител в сыворотке крови вакцинированного. 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. Со временем, анализ практических результатов кампаний по массовой вакцинации также показал, что способность вакцины активировать Т-клеточный иммунитет может иметь критическое значение для эффективной защиты.

Т-клеточный ответ на антиген зависит от активации конкретных клонов Т-клеток. Все клетки клона обладают одинаковыми антиген-распознающими Т-клеточными рецепторами (TCR, от англ. «T cell receptor»), поэтому любые процессы, связанные с Т-клеточным иммунным ответом, будут отражены и в репертуаре TCR. С появлением технологии высокопроизводительного секвенирования стало возможным выявлять и анализировать даже мельчайшие изменения в репертуаре TCR, что позволяет получить ценные новые данные для изучения иммуногенности вакцин.

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 (КЭ). Обе вакцины имеют подтверждённую эффективность, но в обоих случаях для поддержания иммунитета требуется регулярная ревакцинация, а также возможны так называемые прорывные инфекции,

представляющие серьёзную 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 А.Л. выполнена на базе ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН и посвящена изучению динамики, фенотипических свойств и клонального состава Т-клеточного ответа на вакцины против гриппа и КЭ. Тематика диссертационной работы полностью соответствует паспорту научной специальности «1.5.3 – Молекулярная биология».

Основные результаты диссертационной работы и их достоверность

Проведённое исследование является тщательно продуманной научной работой, при выполнении которой использовались современные методы изучения Т-клеточного иммунного ответа на вакцинацию. Поставленные задачи соответствуют цели работы и включают в себя сбор материала, реконструкцию репертуаров TCR вакцинированных доноров, выявление вакцин-ассоциированных клонов, изучение динамики Т-клеточного ответа и формирования иммунологической памяти, а также выявление групп клонов с похожей антигенной-специфичностью. Сформулированные задачи были выполнены в полном объёме.

В ходе исследования было секвенировано 278 образцов, полученных от 12 доноров. Результаты работы для каждой вакцины рассматриваются отдельно, однако, в заключении отмечаются общие свойства Т-клеточного ответа, характерные для обеих вакцин. С применением методов сравнительного биоинформатического анализа у каждого донора были выявлены клоны, ассоциированные с вакцинацией, то есть такие, представленность которых значительно увеличилась после вакцинации. Обнаруженные клоны присутствовали в репертуарах TCR как CD4⁺ хелперов, так и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток, но с преобладанием первых как по количеству, так и по силе экспансии. Также было показано, что обе вакцинации привели к формированию новых Т-клеток памяти.

Более глубокий анализ репертуаров TCR, полученных от доноров, вакцинированных против КЭ, позволил выявить несколько волн клональной экспансии в ответ на иммунизацию. В зависимости от наблюдаемой динамики, группы клонов демонстрировали разную силу ответа и разный вклад в формирование Т-клеточной памяти. По результатам сравнительного анализа аминокислотных последовательностей TCR вакцин-ассоциированных клонов были найдены десятки кластеров, состоящих из клонов со сходной антигенной специфичностью. Для кластеров, образованных клонами от разных доноров, были определены характерные мотивы TCR. Существование таких мотивов, вероятно, отражает иммунный ответ на иммунодоминантные эпитопы вируса КЭ.

Достоверность полученных результатов обеспечена применением современных молекулярно-биологических, иммунологических и биоинформатических методов. Для поиска вакцин-ассоциированных клонов были использованы биологические реплики, а причинно-следственная связь клонов с вакцинацией была дополнительно подтверждена с помощью стимуляции клеток *in vitro*. Для анализа полученных данных секвенирования были выбраны корректные статистические подходы.

Объём и структура диссертации соответствует требованиям, предъявляемым к диссертантам на соискание учёной степени кандидата биологических наук. Значительный вклад соискателя на протяжении всего исследования не вызывает сомнений.

Научная новизна работы

В рассматриваемой работе впервые проведён детальный анализ иммунного ответа на вакцины против гриппа и против КЭ 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 была продемонстрирована активация CD8⁺ Т-клеток в ответ на вакцинацию против КЭ. Таким образом, был сделан важный шаг на пути к изучению особенностей антиген-специфичного ответа на вакцину против КЭ.

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. Благодаря дополнительно собранным фракциям отдельных Т-клеточных субпопуляций была получена фенотипическая характеристика ответивших клонов Т-клеток.

Рассмотрение Т-клеточного ответа как совокупности отдельных волн клональной экспансии поднимает вопрос о вкладе отдельных субпопуляций Т-клеток в формирование иммунной защиты. Более детальное изучение механизмов вовлечения и роли различных фенотипических субпопуляций позволит создавать более эффективные вакцины и оптимизировать стратегии вакцинации в будущем.

Анализ сходства антигенной специфичности вакцин-ассоциированных клонов даёт представление о возможном разнообразии эпитопов вируса КЭ, 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 КЭ. В сочетании с известными для каждого донора аллелями HLA это может продвинуть поиск иммунодоминантных эпитопов вируса КЭ и разработку реагентов на основе мультимеров комплекса HLA-пептид для более детального изучения иммунного ответа на инфекцию и вакцинацию.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа написана в соответствии с общепринятым планом, изложена на 103 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, благодарности, список сокращений и список литературы. Материал проиллюстрирован 35 рисунками и 2 таблицами, а также дополнен 3 приложениями. Библиографический указатель включает ссылки на 172 источника.

Обзор литературы полностью соответствует теме работы и создаёт необходимый фундамент для понимания последующих результатов. В обзоре много внимания уделено формированию клонов с уникальным TCR и их участию в иммунном ответе. Также кратко

изложены результаты ранее выполненных работ по изучению Т-клеточного ответа на вакцины против гриппа и КЭ. В завершение обзора приведена глава, посвящённая развитию методов анализа репертуара TCR применительно к изучению иммунного ответа.

В главе «Материалы и методы» очень подробно описаны методы, использованные автором в процессе исследования. Последующие результаты включают общий дизайн исследования для каждой из вакцин, подробное описание особенностей обработки данных секвенирования и анализ Т-клеточного ответа для вакцин против гриппа и КЭ. Полученные результаты изложены последовательно и логично, в каждом случае приведена их интерпретация с учётом современных представлений о работе иммунной системы. Выводы работы обоснованы и вытекают непосредственно из полученных диссертантом данных.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 7 конференциях всероссийского и международного уровней. Основные положения диссертации изложены в двух статьях, в которых Анастасия Леонидовна является первым автором, и еще четыре работы, выполненные ранее с соавторством Анастасии Леонидовны, непосредственно связаны с диссертационной работой концептуально и методически. Таким образом, по теме диссертации опубликовано 6 статей, все они представляют собой печатные работы, опубликованные в международных журналах, которые входят в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертации. Ни одна из этих 6 статей не является обзором. Такая структура списка публикаций производит очень хорошее впечатление и отражает высокую квалификацию Анастасии Леонидовны, а также большой объем проведенной ею продуктивной экспериментальной работы.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Замечания

Диссертационная работа производит очень хорошее впечатление 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 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 Т-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?

Заключение

Диссертационная работа Сычевой Анастасии Леонидовны «Клональная характеристика Т-клеточного ответа человека при иммунизации инактивированными вакцинами», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3 – Молекулярная биология», представляет собой завершённую научно-

квалификационную работу высокого уровня, в которой впервые подробно изучен иммунный ответ на вакцины против гриппа и КЭ на уровне отдельных клонов Т-лимфоцитов.

Диссертационная работа Сычевой Анастасии Леонидовны соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 г. № 1690), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3 – Молекулярная биология».

Отзыв обсуждён и одобрен на объединенном семинаре лабораторий молекулярных механизмов иммунитета, пролиферации клеток, биохимии вирусных инфекций и передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии (протокол № 1 от 26 июля 2023 г.)

Отзыв подготовил

Иванов Александр Владимирович
доктор биологических наук
заместитель директора по научной работе

Адрес: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), тел.: +7 (499) 135-23-11 ; e-mail: aivanov@yandex.ru

«Подпись Иванова Александра Владимировича удостоверяю»

Учёный секретарь ИМБ РАН, к.в.н.

Бочаров А.А.

15 сентября 2023 г.

