

ОТЗЫВ

официального оппонента член-корр. РАН, профессора, доктора биологических наук Гребенниковой Татьяны Владимировны на диссертацию Бязровой Марии Георгиевны «Особенности активации и дифференцировки субпопуляций В-лимфоцитов человека при иммунопатологиях» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология»

Актуальность исследования

Диссертационная работа Бязровой М. Г. «Особенности активации и дифференцировки субпопуляций В-лимфоцитов человека при иммунопатологиях» посвящена изучению различных аспектов В-клеточного иммунного ответа на различных моделях. Изучение процессов активации и дифференцировки субпопуляций В-лимфоцитов человека важно для расшифровки механизмов, лежащих в основе нормального В-клеточного ответа на патогены и вакцинацию, а также при его нарушениях, наблюдаемых при различных иммунозависимых заболеваниях, таких как первичные иммунодефицитные состояния и различные формы аллергии. Исследования в этом направлении имеют как фундаментальную, так и практическую значимость.

Согласно современным представлениям, в процессах активации лимфоцитов участвуют, как контактные межклеточные взаимодействия, так и разнообразные растворимые лимфокины. Актуальным направлением является выявление значения и роли отдельных факторов и молекул в стимуляции В-лимфоцитов. В представленной диссертационной работе процесс активации В-лимфоцитов изучен в системе *in vitro*, что позволяло точно дозировать и комбинировать между собой различные стимулы. Таким образом актуальность диссертационной работы Бязровой М.Г. не вызывает сомнений.

Соответствие темы диссертационной работы научной специальности

Тема диссертации Бязровой Марии Георгиевны соответствует научной специальности «3.2.7. Иммунология» (Направления исследований №2: Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии).

Направления исследований №3: Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты. Направления исследований №5: Изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний.)

Основные результаты диссертационной работы

Для изучения процессов антиген-специфической активации и дифференцировки В-клеток, происходящих в зародышевых центрах лимфоидных фолликулов, автором была разработана модель стимуляции *in vitro*, с использованием клеточных линий, стабильно экспрессирующих молекулу CD40L, а также рекомбинантный ИЛ-21. В целях оптимизации олигоклональной стимуляции В-лимфоцитов *in vitro* была предложена бесфидерная система, в которой фидерные клетки заменялись специально созданными рекомбинантными химерными белками, содержащими рецепторные домены молекулы CD40L.

Разработанная система активации В-лимфоцитов *in vitro* позволила выявить функциональные нарушения В-клеточного ответа у пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью. У таких пациентов наблюдались отклонения в стимуляции IgG⁺-В-клеток памяти под воздействием молекул CD40L и ИЛ-21.

Автором было установлено, что одной из характерных особенностей пациентов с COVID-19 является значительное увеличение доли плазмабластов (CD27⁺⁺CD38⁺⁺) по сравнению с уровнем этой субпопуляции здоровых добровольцев. Метод ELISpot был применен для количественного анализа антиген-специфичных плазмабластов у пациентов с COVID-19. Исследования показали, что при тяжелой форме заболевания наблюдается образование RBD-специфичных плазмабластов. Автор показал, что SARS-CoV-2-специфичные В-клетки памяти и плазмбласты формируются через фолликулярный и экстрафолликулярный иммунные ответы.

Автором диссертационной работы был изучен В-клеточный иммунный ответ у вакцинированных добровольцев, включая реакцию антител на панель из 42 пептидов шиповидного белка SARS-CoV-2. Был выявлен пептид P12, уровень специфических антител к которому коррелировал с эффективностью нейтрализации как штамма SARS-CoV-2 подобного Уханьскому, так и штамма Omicron BA.1. Последовательность пептида P12 является консервативной, что позволяет рассматривать этот пептид как перспективную мишень для разработки новых вакцин. Автор также показал, что RBD-специфичные плазмабласты появляются через 7 дней после первой дозы вакцины, а RBD-специфичные В-клетки памяти выявляются у 37,5% реципиентов спустя 28 дней после вакцинации, демонстрируя увеличение их уровня через три месяца.

Дополнительно автор исследовал влияние нейтрализующих антител против аденовирусных векторов, использованных в составе вакцины. Было установлено, что титры Ad26-нейтрализующих антител повышаются после вакцинации и сохраняются до ревакцинации, что оправдывает использование временного интервала в 6–9 месяцев между первичной вакцинацией и ревакцинацией.

Важной составляющей работы стало изучение аллергических заболеваний, связанных с реакцией В-лимфоцитов. Автором был разработан метод для детекции аллерген-специфичных IgE-позитивных В-клеток. Было показано, что уровень таких клеток увеличивается во время сезона палинации берёзы и снижается после его окончания. Анализ последовательностей *IGHV* выявил, что Bet v 1-специфичные В-клетки в конце сезона происходят из наивных В-клеток, а не из клеток памяти, что открывает новые перспективы в изучении аллергического ответа.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа Бязровой М.Г. выполнена на высоком научно-методическом уровне. В работе использованы современные экспериментальные методы исследования, которые полностью соответствуют поставленным задачам. Полученные экспериментальные данные обработаны с применением адекватных

методов математической статистики. Полученные результаты достоверны, выводы сформулированы в соответствии с полученными результатами, обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Результаты диссертационной работы Бязровой М.Г. представлены в ведущих иностранных и отечественных журналах

Научная новизна диссертационной работы

. Впервые с использованием метода В-клеточного ELISpot был исследован В-клеточный ответ в острой фазе COVID-19.

Впервые были выявлены циркулирующие и индуцированные антитело-продуцирующие В-клетки, возникающие при данном заболевании.

Автором впервые охарактеризована динамика формирования антиген-специфических плазмбластов, а также процесса формирования пула антиген-специфических В-клеток памяти после вакцинации вакциной «Гам-КОВИД-Вак».

Научная новизна работы состоит также в получении новых знаний о строении консервативного пептида SARS-CoV-2 (P12), расположенного в структуре шиповидного белка, против которого образуются вирус-нейтрализующие антитела.

Впервые доказано, что эффективность ревакцинации препаратами «Спутник Лайт» и «Гам-КОВИД-Вак», основанными на Ad26, не связана с уровнем Ad26-нейтрализующих антител, присутствующих до ревакцинации.

Впервые описана динамика появления IgE-позитивных плазмбластов, специфичных к мажорному аллергену берёзы Bet v 1, в период её цветения.

Теоретическая значимость диссертационной работы

Проведенное исследование продемонстрировало, что важной особенностью В-клеточного иммунного ответа при инфекции SARS-CoV-2, вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак» и аллергических реакциях на пыльцу берёзы является резкое увеличение уровня антиген-специфических плазмбластов. Эти клетки, являясь временной, но крайне активной популяцией В-клеток, играют центральную роль в начальной фазе гуморального иммунного ответа. В результате анализа полученных данных была сформулирована гипотеза о том, что при остром

течении COVID-19 SARS-CoV-2-специфичные плазмабласты формируются преимущественно через экстрафолликулярный путь развития иммунного ответа. Это предположение подтверждается функциональными характеристиками данных клеток. Данная концепция может стать перспективным направлением для дальнейшего изучения механизмов иммунной памяти.

Идентификация консервативного пептида P12, расположенного в шиповидном белке SARS-CoV-2, позволит сформулировать механизм формирования вирус-нейтрализующие антитела класса G у вакцинированных пациентов.

Дополнительно автором была проведена оценка влияния анти-векторных антител на эффективность вакцинации препаратами «Спутник Лайт» и «Гам-КОВИД-Вак». Было установлено, что присутствие таких антител до ревакцинации не оказывает значимого влияния на индукцию SARS-CoV-2-нейтрализующих антител после ревакцинации.

В работе обоснована гипотеза о происхождении Bet v 1-специфичных В-клеток, циркулирующих в конце сезона палинации берёзы из наивных В-лимфоцитов. Данная гипотеза позволяет по-новому взглянуть на механизмы формирования аллергических реакций и открывает перспективы для разработки более точных и эффективных методов диагностики и терапии аллергий. Результаты исследования способствуют расширению представлений о динамике аллергического ответа и механизмах регуляции IgE-специфичных клеток.

Установлено, что созданные рекомбинантные химерные белки, содержащие рецепторный домен молекулы CD40L, способны индуцировать дифференцировку В-лимфоцитов в клетки, активно продуцирующие антитела. Использование таких белков позволяет создавать универсальные модели, применимые для изучения различных иммунопатологических состояний.

Научно-практическая значимость диссертационной работы

Создание рекомбинантных химерных белков, включающих рецепторный домен молекулы CD40L, открывает возможность развития биотехнологической

платформы получения терапевтических моноклональных антител для разработки эффективных биологических препаратов нового поколения для лечения онкологических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний.

Проведённое исследование эффективности вакцин «Гам-КОВИД-Вак» и «Спутник Лайт» имеет практическую значимость для выработки стратегий вакцинации и ревакцинации. Полученные данные о долговременном В-клеточном иммунитете против SARS-CoV-2 позволяют не только прогнозировать защиту от вируса, но и сформировать эпидемиологическую модель коронавирусной инфекции. Данные результаты важны для понимания возможностей ревакцинации и предотвращения реинфекции.

Разработанная методика для измерения уровня Ad26-нейтрализующих антител позволит учитывать индивидуальные характеристики иммунного статуса, что способствует оптимизации проведения вакцинации.

Полученные данные о механизмах активации и дифференцировки В-лимфоцитов при контакте с аллергенами важны для совершенствования методов диагностики и лечения аллергических заболеваний.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Бязровой М.Г. изложена на 195 страницах текста и имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов и выводы. Диссертация иллюстрирована 40 рисунками и содержит 4 таблицы. Библиография включает 241 источника, из них 12 русскоязычных источников и 229 иностранных источников.

Глава «Обзор литературы» включает 6 разделов. В нём изложены сведения о субпопуляциях В-лимфоцитов человека и механизмах их активации. Также подробно рассмотрены аспекты патогенеза первичных иммунодефицитов, связанных с нарушениями активации и дифференцировки В-клеток. Особое внимание уделено гуморальному иммунному ответу, формирующемуся после

вакцинации против SARS-CoV-2, и роли IgE⁺-В-лимфоцитов в течении аллергических заболеваний.

В главе «Материалы и методы» соискателем подробно описаны используемые протоколы, включая методы выделения В-лимфоцитов из периферической крови с использованием магнитной сепарации и проточной цитометрии. Описаны подходы, примененные для анализа фенотипа стимулированных В-лимфоцитов. В работе использованы методы, основанные на современных технологиях.

В главе «Результаты» в 7 разделах изложены полученные соискателем результаты, описаны последовательно и подробно, проиллюстрированы достаточным количеством рисунков и подкреплены таблицами, которые помогают в восприятии материала. Ключевым результатом стала разработка системы стимуляции В-лимфоцитов *in vitro*, которая воспроизводит ключевые процессы, происходящие в герминативных центрах лимфоузлов. Данная модель была применена для изучения функциональных дефектов у пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью, а также для анализа формирования вирус-специфичных В-лимфоцитов при COVID-19. Большая часть исследования посвящена изучению В-клеточного ответа на антигены коронавируса, как в острой фазе SARS-CoV-2 инфекции, так и после вакцинации российскими препаратами «Гам-КОВИД-Вак» и «Спутник Лайт».

В главе «Обсуждение результатов» автор провёл глубокий анализ полученных результатов, что позволило соискателю комплексно оценить особенности активации В-лимфоцитов в норме и при патологии.

Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований, соответствуют поставленным задачам и положениям, выносимым на защиту

Рукопись диссертации и автореферат оформлены в соответствие с требованиями ГОСТ.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 20 печатных работах, в том числе 15 статьях в рецензируемых научных журналах, которые

включены в перечень периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций, и 5 публикациях в материалах конгрессов и конференций.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертации Бязровой М.Г. нет. Есть вопросы уточняющего характера, на которые хотелось бы получить ответы в процессе защиты:

1. Можно ли использовать описанный Вами пептид P12 для создания вакцины для профилактики COVID-19?

2. 15–20% пациентов вырабатывали вируснейтрализующие антитела после стимуляции *in vitro*. Как Вы думаете, это связано с особенностями SARS-CoV-2 или общими дефектами иммунного ответа у тяжелых больных?

3. Какие терапевтические подходы могут исправить дефекты В-клеток при общей вариабельной иммунной недостаточности и аллергии?

Заключение

Диссертационная работа Бязровой Марии Георгиевны «Особенности активации и дифференцировки субпопуляций В-лимфоцитов человека при иммунопатологиях» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» является научно-квалификационной работой, в которой осуществлено решение актуальных научных задач, имеющих существенное значение для иммунологии: разработана экспериментальная модель процессов активации и дифференцировки В-лимфоцитов *in vitro*, исследованы особенности активации В-лимфоцитов у пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью; выявлены характерные особенности формирования В-клеточного ответа при инфекции SARS-CoV-2 и после вакцинации вакциной «Гам-КОВИД-Вак»; в шиповидном белке SARS-CoV-2 обнаружен консервативный эпитоп (P12), антитела против которого обладают широкой вирус-нейтрализующей активностью; доказано, что вектор-нейтрализующие антитела не влияют на эффективность ревакцинации вакцинами «Гам-КОВИД-Вак» и «Спутник Лайт»;

изучена динамика В-клеточного иммунного ответа у пациентов с аллергией на пыльцу березы.

Диссертационная работа Бязровой М.Г. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года в ред. постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. №1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. №1690, 26.01.2023 г. №101, 18.03.2023 г. №415, 26.10.2023 г. №1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 №1382), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология».

Официальный оппонент,
заместитель директора по научной работе
Института вирусологии им. Д. И. Ивановского,
руководитель испытательного центра,
руководитель лаборатории молекулярной диагностики
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России,
член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук, профессор



Гребенникова Т.В.

Подпись члена-корреспондента РАН, д.б.н., профессора Гребенниковой Т.В.
заверяю:

Ученый секретарь, к.б.н.

« 18 » апреля 2025 г.

2025 г.



Сысолятина Е.В.

Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 123098, Российская Федерация, г. Москва, ул. Гамалеи, д.18
Тел.: +7 (499) 193-30-01, e-mail: info@gamaleya.org, сайт: <https://gamaleya.org>