

Отзыв

**официального оппонента, д.б.н. Гривцовой Людмилы Юрьевны
на диссертационную работу 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

Диссертация Бязровой М.Г. «Особенности активации и дифференцировки субпопуляций В-лимфоцитов человека при иммунопатологиях» посвящена проблеме, связанной с изучением фундаментальных механизмов ответа иммунной системы. Важной задачей в современной иммунологии является исследование механизмов активации и дифференцировки В-клеток. Дефекты В-клеточного ответа наблюдаются при таких иммунопатологиях, как общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН), аутоиммунные и аллергические заболевания. Нарушения в иммунной системе являются значимой проблемой для клинической практики, что подчёркивает необходимость поиска новых подходов к их диагностике и лечению.

Актуальность темы исследования возрастает с связи с пандемией COVID-19, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Изучение роли В-лимфоцитов в формировании иммунного ответа на коронавирусные антигены имеет не только фундаментальное значение для понимания механизмов иммунной памяти, но и практическую ценность для оптимизации стратегий вакцинации. Исследование формирования антиген-специфических плазмбластов и В-клеток памяти позволяет определить эффективность формирования В-клеточного ответа и долговременную защиту от инфекции после вакцинации.

Исследование аллерген-специфического В-клеточного ответа открывает перспективы для создания новых алерговакцин и методов терапии аллергических заболеваний. Понимание механизмов активации и дифференцировки В-клеток при взаимодействии с аллергенами позволит разработать более целевые и эффективные подходы к лечению аллергий. Таким образом, диссертационная работа Бязровой

М.Г. направлена на решение актуальных проблем современной иммунологии и медицины.

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. Направления исследований №6: Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов).

Основные результаты диссертационной работы

Автором диссертационной работы была разработана модель активации В-лимфоцитов, которая позволила воспроизвести ключевые процессы, происходящие в герминативных центрах лимфоидных органов. Для этого были получены клеточные линии, стабильно экспрессирующие на поверхности CD40L, а также рекомбинантные химерные белки, содержащие рецепторный домен молекулы CD40L. Полученные клеточные культуры и рекомбинантные белки успешно индуцировали дифференцировку В-лимфоцитов в антитело-продуцирующие клетки, что дало возможность использовать систему стимуляции для изучения антительного ответа В-клеток памяти.

Полученная модель *in vitro* активации В-лимфоцитов была использована для изучения функциональных особенностей В-клеток памяти у пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью (ОВИН). Было установлено, что у пациентов ОВИН наблюдаются нарушения в дифференцировке переключенных В-клеток памяти в плазмабласты. Индуцированные плазмабласты, полученные в

системе активации молекулами CD40L и ИЛ-21 из IgG⁺-В-клеток памяти, показывали сниженную секрецию IgG.

В ходе исследования была проведена оценка В-клеточного ответа у пациентов с COVID-19. Было показано, что инфекция SARS-CoV-2 вызывает значительное увеличение числа антиген-специфических плазмбластов. Метод ELISpot был впервые применён для выявления антиген-специфических плазмбластов, образующихся при COVID-19. Результаты показали, что формирование SARS-CoV-2-специфичных В-клеток памяти начинается уже в острой фазе инфекции и не зависит от тяжести течения COVID-19.

Автором диссертационной работы проведён анализ В-клеточного ответа после вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак». Было показано, что через 7 дней после введения первой дозы вакцины появляются RBD-специфичные плазмбласты, а спустя 28 дней формируется пул RBD-специфичных В-клеток памяти. В составе шиповидного белка SARS-CoV-2 был выявлен консервативный пептид P12, антитела против которого обладают высокой вирус-нейтрализующей активностью против уханьского варианта SARS-CoV-2 и Omicron BA.1.

В работе исследовано влияние анти-векторных антител на эффективность вакцинации препаратами «Спутник Лайт» и «Гам-КОВИД-Вак». Было установлено, что присутствие Ad26-нейтрализующих антител до ревакцинации не оказывает значимого влияния на уровень SARS-CoV-2-специфичных антител после ревакцинации.

Автор исследовал динамику аллерген-специфического В-клеточного ответа на примере аллергии к пыльце берёзы. Было показано, что в период палинации берёзы происходит увеличение числа IgE⁺-плазмбластов, специфичных к аллергену Bet v 1. Анализ нуклеотидных последовательностей генов иммуноглобулинов, полученных из IgE⁺-клеток, в совокупности с серологическим анализом, подтвердил гипотезу о том, что большая часть этих клеток происходит из наивных В-лимфоцитов, а не из IgG⁺-клеток памяти.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа Бязровой М.Г. выполнена на высоком научно-методическом уровне. В работе использованы современные методы исследования. Результаты исследования получены с использованием сертифицированного и откалиброванного оборудования, обработка результатов выполнена с использованием адекватных методов математической статистики. Полученные результаты достоверны.

Научная новизна диссертационной работы

Метод В-клеточный ELISpot впервые был использован для детального изучения динамики появления RBD-специфичных В-клеток памяти и плазмбластов у пациентов с COVID-19, что позволило детектировать не только антиген-связывающие В-лимфоциты, но и антитело-секретирующие клетки при COVID-19.

Впервые была проведена оценка В-клеточного ответа на вакцинацию вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Исследование показало, что через семь дней после введения первой дозы вакцины появляются RBD-специфичные плазмбласты, а через 28 дней формируется пул RBD-специфичных В-клеток памяти. Был выявлен консервативный пептид P12, антитела против которого обладают высокой вирус-нейтрализующей активностью.

Впервые показано, что уровень Ad26-нейтрализующих антител до ревакцинации не оказывает значимого влияния на эффективность последующего формирования SARS-CoV-2-специфичного иммунитета.

Впервые описана динамика появления IgE⁺-плазмбластов у пациентов с аллергией на пыльцу березы в сезон палинации березы.

Теоретическая значимость диссертационной работы

Автором диссертационной работы была разработана экспериментальная модель, воспроизводящая механизмы активации В-лимфоцитов в герминативных центрах лимфоузлов. Полученная модель позволяет изучать процессы, происходящие в герминативных центрах лимфоидных органов, включая

активацию и дифференцировку В-клеток в плазмабласты и клетки памяти, что дает возможность исследовать механизмы, лежащие в основе формирования гуморального иммунного ответа, а также выявлять ключевые функциональные дефекты В-лимфоцитов при различных патологических состояниях, таких как общая переменная иммунная недостаточность (ОВИН).

Автором работы показано, что характерной особенностью В-клеточного иммунного ответа при инфекции SARS-CoV-2, вакцинации вакциной «Гам-КОВИД-Вак» и аллергии на пыльцу березы является массированное появление антиген-специфических плазмбластов. На основании полученных данных была предложена гипотеза о формировании субпопуляции SARS-CoV-2-специфичных плазмбластов в результате экстрафолликулярного ответа при COVID-19.

Полученные результаты подтверждают важность отдельных эпитопов, таких как описанный в работе консервативный пептид P12, в контексте создания универсальных вакцин, способных эффективно нейтрализовать различные штаммы вируса.

Исследование механизмов формирования аллерген-специфического В-клеточного ответа расширяет представления о патогенезе аллергических заболеваний. Полученные данные о происхождении IgE⁺-В-лимфоцитов и их динамике в сезоны воздействия аллергенов важны для понимания механизмов развития аллергических заболеваний.

Научно-практическая значимость диссертационной работы

Исследование эффективности вакцинации и ревакцинации с использованием препаратов «Гам-КОВИД-Вак» и «Спутник Лайт» позволяет понять механизмы длительного формирования В-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2. Полученные данные о формировании иммунологической памяти помогают прогнозировать долговременную защиту и оценивать риск реинфекции, а также разрабатывать стратегии массовой вакцинации.

Полученные автором диссертационной работы данные о формировании В-клеточной иммунологической памяти будут использованы в построении

эпидемиологической модели коронавирусной инфекции, а также для прогнозирования ответа на вопрос о возможности реинфекции.

Разработанная система для определения уровня Ad26-нейтрализующих антител представляет собой удобный метод для оценки иммунного ответа на вакцинацию. Использование разработанного метода позволяет не только контролировать эффективность аденовирусных вакцин, таких как «Гам-КОВИД-Вак», но и адаптировать стратегии ревакцинации, с учетом персонализированных данных по иммунному статусу реципиента. Кроме того, данный подход может быть применен к вакцинным препаратам на основе других серотипов Ad. Подобные системы могут быть использованы в клинической практике для оценки эффективности вакцинации с помощью аденовирусных вакцин.

Исследования по динамике аллерген-специфического В-клеточного ответа, открывают новые горизонты для создания аллерговакцин. Знание о том, как происходит активация и дифференцировка В-клеток при распознавании аллергена, поможет разработать более эффективные персонализированные терапии для пациентов с аллергическими заболеваниями. Кроме того, разработанная методика детекции IgE⁺-клеток дает возможность прицельного удаления IgE-секретирующих клеток, включая субпопуляцию плазмбластов. Учитывая высокую распространенность аллергий, такие разработки помогут улучшить качество жизни пациентов. Изучение репертуара IgE⁺-лимфоцитов является важным этапом выбора эпитопов аллергенов для последующего использования в разработке вакцин. Кроме того, полученные последовательности аллерген-специфических IgE-антител могут лечь в основу получения препаратов моноклональных антител.

Разработка рекомбинантных химерных белков с рецепторным доменом молекулы CD40L является важным шагом в создании платформы для получения моноклональных антител, которые могут найти применение в лечении онкологических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация Бязровой М.Г. «Особенности активации и дифференцировки субпопуляций В-лимфоцитов человека при иммунопатологиях» изложена на 195 страницах текста и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список сокращений и условных обозначений», «Список литературы». Диссертация содержит 40 рисунков и 4 таблицы. Список литературы состоит из 241 источника, из них 12 русскоязычных источников и 229 иностранных источников.

В главе «Введение» автором обоснована актуальность выбранной темы, подчеркнута её значимость для фундаментальной и прикладной медицины. Поставлены цель и задачи исследования, которые охватывают широкий спектр вопросов, связанных с изучением особенностей активации и дифференцировки В-клеток при различных иммунопатологиях. Также представлены новизна и практическая значимость работы, а её основные положения вынесены на защиту. В разделе «Обзор литературы» представлены основные сведения о субпопуляциях В-клеток, механизмах их активации и роли в иммунных процессах. Особое внимание уделено патогенезу первичных иммунодефицитов, аллергическим реакциям, связанным с активацией IgE^+ -В-клеток, и формированию гуморального иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2. Обзор выполнен глубоко и всесторонне, с привлечением отечественных и зарубежных источников. В главе «Материалы и методы» описаны используемые методики и подходы, включая протоколы выделения В-лимфоцитов, методы их стимуляции и фенотипирования, а также способы анализа продукции антител. Особое внимание уделено описанию экспериментальных моделей, таких как система стимуляции В-лимфоцитов *in vitro*. «Результаты» изложены соискателем последовательно и подробно, сопровождаются таблицами и рисунками, которые облегчают восприятие информации. Автором была разработана система для стимуляции В-лимфоцитов *in vitro*, что позволило воспроизвести ключевые процессы активации и дифференцировки клеток при иммунопатологиях. Показаны нарушения в работе В-клеток у пациентов с ОВИН, описаны особенности В-клеточного ответа при COVID-19, включая формирование вирус-специфических плазмабластов и В-

клеток памяти. Также исследованы механизмы формирования аллерген-специфического ответа при аллергии к пыльце берёзы. В разделе «Обсуждение результатов» автор всесторонне анализирует полученные данные, сравнивает их с результатами ранее проведённых исследований. Выводы обоснованы результатами работы.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 15 статьях в рецензируемых научных журналах, которые включены в перечень периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций, и в 5 публикациях в материалах конференций и конгрессов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Критических недостатков в работе не обнаружено.

Заключение

Диссертационная работа Бязровой М.Г. «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 система для активации В-лимфоцитов *in vitro* с использованием молекул CD40L и IL-21; исследованы особенности активации В-лимфоцитов у пациентов с ОВИН; доказано, что острая фаза COVID-19 при тяжелом или умеренном течении характеризуется образованием большого количества вирус-специфических плазмбластов; показано, что SARS-CoV-2 инфекция и вакцинация препаратом «Гам-КОВИД-Вак» приводит к образованию вирус-специфических В-клеток памяти; в составе шиповидного белка SARS-CoV-2 обнаружен консервативный пептид P12, антитела против которого обладают вирус-нейтрализующей активностью; доказано, что эффективность ревакцинации препаратом «Спутник Лайт» через 9 месяцев после первичной вакцинации не зависит от уровня Ad26-нейтрализующих антител на момент ревакцинации,

изучена динамика появления IgE⁺-плазмабластов 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,

заведующая отделением клинической иммунологии

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава РФ,

доктор биологических наук,

Л. Ю. Гривцова

Подпись д.б.н. Л. Ю. Гривцовой заверяю:

Ученый секретарь МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор В.А. Петров

« 18 » 04 2025 г.



Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации Адрес: 249036, Российская Федерация, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, д. 4; Тел.: +7 (800) 250-87-00, e-mail: mrrc@mrrc.obninsk.ru, сайт: <https://new.nmicr.ru/mrrc/>