

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор ФГАНУ
«Федеральный научный центр
исследований и разработки
иммунобиологических препаратов»
(Институт полиомиелита)
академик РАН, профессор, д.м.н.

А.А. Ишмухаметов

«11» апреля 2025 г.

ОТЗЫВ

о научно-практической значимости диссертационной работы
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 темы диссертационной работы

Изучение механизмов активации и дифференцировки субпопуляций В-лимфоцитов человека имеет решающее значение для понимания их функционирования в норме и патологии. В-лимфоциты играют важную роль в приобретённом иммунном ответе, в первую очередь за счет продукции антител с последующей генерацией клеток памяти для быстрой реализации ответа при повторной встрече с антигеном. Процесс активации В-клеток, регулируемый антигенами, цитокинами и взаимодействиями с Т-клетками, приводит к дифференцировке наивных В-клеток в различные субпопуляции, включая плазматические клетки и В-клетки памяти. Нарушения функционирования и дифференциации В-клеток приводят к развитию иммунных заболеваний: аутоиммунных заболеваний, при которых aberrантная активация В-клеток приводит к продукции аутоантител, и иммунодефицитных состояний, при которых недостаточные реакции В-клеток ставят под угрозу иммунный ответ. Исследование особенностей активации субпопуляций В-лимфоцитов затрудняется сложностью их культивирования *in vitro*. Создание новых моделей

для изучения В-лимфоцитов человека *in vitro* позволит лучше понять и изучить фундаментальные процессы, происходящие в герминальном центре.

В-лимфоциты участвуют в развитии аллергических реакций. При первичной сенсибилизации аллергеном они активируются и продуцируют IgE-антитела, специфичные к аллергену. Динамика этого звена В-клеточного ответа, а также субпопуляции IgE⁺-В-лимфоцитов остаются малоизученным вопросом. Расширение знаний в этой области может дать основу для разработки алерговакцин.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Содержание диссертации соответствует 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

В диссертации Бязровой М.Г. разработана модель, описывающая процессы активации В-лимфоцитов комбинация ИЛ-21 и лиганда рецептора CD40 (CD40L), которые принимают участие в активации В-клеток в зародышевых центрах лимфоузлов. Для этого созданы 2 системы активации: фидерная с использованием клеток линии A549, экспрессирующих на поверхности мультимерный рекомбинантный CD40L, и бесфидерная с использованием растворимого рекомбинантного CD40L, мультимеризованного путём слияния с коллагеноподобным доменом адипонектина. В рамках этой части работы автором были получены несколько клеточных линий, экспрессирующих на поверхности молекулу CD40L. Применение фидерной и бесфидерной стимуляций приводило

к образованию антитело-секретирующих клеток (АСК) в первичной культуре В-лимфоцитов. Полученная модель была использована для активации В-лимфоцитов в последующих экспериментах. Так, с использованием полученной модели проведена характеристика основных субпопуляций В-лимфоцитов у здоровых доноров и пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью (ОВИН). Показано, что переключенные В-клетки памяти активировались в 2,5 раза меньше в сравнении с непереключенными В-клетками памяти.

Изучение параметров В-клеточного ответа у пациентов COVID-19 показало, что при тяжёлом течении заболевания формируются как общие, так и RBD-позитивные плазмбласты. Стимуляция В-клеток памяти от этих пациентов молекулами ИЛ-21 и CD40L приводила к образованию индуцированных плазмбластов, в том числе и RBD-специфичных АСК. Таким образом, было показано, что при тяжелом течении COVID-19 у пациентов образуются антиген-специфические В-клетки памяти.

Следующим этапом диссертационной работы стало изучение особенностей В-клеточного ответа после вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак» для профилактики коронавирусной инфекции. Было проведено комплексное исследование параметров В-клеточного ответа у вакцинированных субъектов, переболевших и не переносивших COVID-19. Продемонстрировано, что вакцинация препаратом «Гам-КОВИД-Вак» приводит к формированию длительного (не менее 3 месяцев) В-клеточного иммунитета. При этом параметры образования пула В-клеток памяти в значительной степени зависели от присутствия в анамнезе реципиента перенесённого заболевания COVID-19. Также показано, что через 85 дней после введения первой дозы «Гам-КОВИД-Вак» стимулированные В-клетки памяти подавляющего большинства вакцинированных продуцировали перекрёстно-реактивные антитела, которые эффективно нейтрализовали как уханьский вариант, так и вариант Бета (B.1.351) SARS-CoV-2 в псевдовиральной системе. Дополнительный анализ показал, что «Гам-КОВИД-Вак»-индуцированные антитела к консервативному пептиду 12 (P12, 284-313 а.о. белка S) коррелируют с уровнями нейтрализующих антител к

разным вариантам вируса, вероятно, в виду его значимости при переходе в постфьюжен конформацию тримера белка S.

Одной из проблем применения векторных вакцин является образования антивекторных антител, что может привести к снижению эффективности последующих введений препарата при ревакцинации. В диссертационной работе с использованием плазмы реципиентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак» до и после ревакцинации препаратом «Спутник Лайт» было показано, что первичная вакцинация препаратом на основе аденовируса Ad26 индуцировала выработку Ad26-нейтрализующих антител, которые присутствовали в крови в течение как минимум 9 месяцев. Однако, высокие титры Ad26-нейтрализующих антител перед ревакцинацией не влияли на эффект ревакцинации препаратом «Спутник Лайт» по уровням нейтрализующих и RBD-связывающих антител, более того данные показатели были сравнимы с эффектом от ревакцинации гетерологичным препаратом.

Аллергическими заболеваниями, связанными с иммуноглобулин E (IgE)-опосредованными реакциями, страдает 20-30 % населения развитых стран. Тем не менее, клеточные механизмы сезонной активации IgE-зависимых реакций у человека до конца не изучены. В диссертационной работе Бязровой М.Г. было показано, что сезонное увеличение концентрации пыльцы березы в воздухе избирательно повышает выработку IgE против специфических эпитопов основного аллергена пыльцы березы Bet v 1, но не влияет на продукцию Bet v 1-специфического IgG. Полученные результаты свидетельствуют о том, что во время первичной аллергической сенсibilизации аллергены активируют определенные наивные В-клетки с родственными рецепторами иммуноглобулинов, при этом количество IgE-продуцирующих плазмбластов увеличивается после контакта с аллергеном.

Достоверность полученных результатов

Эксперименты проведены с использованием современных методов исследования на адекватно подобранном современном оборудовании. Полученные экспериментальные данные обработаны с применением адекватных статистических методов, описание которых приведено в главе «Материалы и

методы», а также в соответствующих разделах глав «Результат». Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения.

Научная новизна диссертационной работы

Впервые была описана динамика образования антиген-специфических плазмбластов и формирование пула антиген-специфических-В-клеток памяти после вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак» для профилактики коронавирусной инфекции.

Впервые показано, что эффективность ревакцинации вакцинами «Спутник Лайт» и «Гам-КОВИД-Вак» на основе аденовируса Ad26 не зависит от уровня Ad26-нейтрализующих антител, присутствующих до ревакцинации.

Впервые была показана динамика появления IgE-позитивных плазмбластов, специфичных к мажорному аллергену березы Bet v 1, в сезон палинации березы.

Теоретическая значимость работы

В диссертационной работе показано, что рекомбинантные мультимеризующиеся химерные белки, включающие в свой состав рецепторный домен молекулы CD40L, способны вызывать дифференцировку В-лимфоцитов в АСК.

Было установлено, что характерной особенностью формирования В-клеточного иммунного ответа при COVID-19 и вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак» является массированное появление антиген-специфических плазмбластов.

Описан консервативный пептид P12 (284-313 а.о.) белка S SARS-CoV-2, являющийся мишенью для вирус-нейтрализующих антител, индуцированных вакцинацией препаратом «Гам-КОВИД-Вак». Высказано предположение о роли пептида P12 в изменении конформации тримера белка S.

Изучено влияние нейтрализующих антител к векторному вирусу на эффективность ревакцинации препаратами «Спутник Лайт» и «Гам-КОВИД-Вак». Полученные результаты способствуют углублению знаний о механизмах формирования В-клеточного ответа при вакцинации препаратами на основе

аденовирусного вектора, а также обеспечивают научную базу для оптимизации подходов к вакцинации и мониторингу иммунного ответа.

Выдвинута гипотеза о происхождении $Bet\ v\ 1$ -специфичных В-клеток, циркулирующих во время палинации березы, из наивных В-клеток с родственными рецепторами иммуноглобулинов после первичной аллергической сенсibilизации.

Научно-практическая значимость работы

Диссертационная работа имеет несомненную высокую научно-практическую значимость.

Разработка рекомбинантных химерных белков, включающих рецепторный домен молекулы CD40L, является важным этапом в создании платформы для получения моноклональных антител человека. Традиционными подходами к получению моноклональных антител являются гибридомная технология и фаговый дисплей, которые обладают рядом ограничений. В последнее время особую популярность приобретают методы получения человеческих моноклональных антител с помощью секвенирования генов иммуноглобулинов единичных В-лимфоцитов, с последующей экспрессией этих генов в клетках-продуцентах. Для того чтобы прицельно получать последовательности генов, которые будут обеспечивать экспрессию высокоспецифичных и высокоаффинных антител, перед секвенированием необходимо оценивать нейтрализующую активность антител и проводить отбор клонов В-лимфоцитов. Поставленную проблему позволяет решить внедрение этапа *in vitro* стимуляции В-лимфоцитов, что открывает новые перспективы для создания более эффективных методов производства терапевтических антител для лечения онкологических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний.

Оценка эффективности вакцинации и ревакцинации препаратами на основе аденовирусного вектора «Гам-КОВИД-Вак» и «Спутник Лайт» имеет ключевое значение для понимания формирования В-клеточной иммунной памяти векторными вакцинами, в общем, и на антигены SARS-CoV-2, в частности. Полученные сведения об особенностях формирования В-клеточной памяти могут быть использованы при построении эпидемиологических моделей

распространения коронавирусной инфекции, а также важны для понимания возможности повторного заражения.

Разработанная в рамках диссертационной работы система измерения нейтрализующей активности плазмы против Ad26 представляет собой эффективный метод для оценки иммунного ответа на вакцинацию. Этот метод позволяет не только контролировать эффективность применения аденовирусных вакцин, но и корректировать стратегии ревакцинации с учетом данных об уровне антивекторных антител у конкретного реципиента. Данная методика, может быть, в дальнейшем модифицирована для оценки уровня нейтрализующих антител против других серотипов аденовирусов и использована для скрининга популяции на наличие вектор-нейтрализующих антител.

Исследования динамики аллерген-специфического В-клеточного ответа открывают новые возможности для разработки алерговакцин. Понимание механизмов активации и дифференцировки В-клеток при распознавании аллергенов может быть использовано для совершенствования диагностики пациентов с аллергическими заболеваниями, что особенно важно у пациентов с низким уровнем аллерген-специфических антител или с их полным отсутствием. В этих случаях определение аллерген-специфических IgE^+ -В-лимфоцитов может помочь достоверно диагностировать гиперчувствительность. Расшифровка нуклеотидных последовательностей генов иммуноглобулинов, полученных из IgE^+ -лимфоцитов пациентов с аллергией, позволит выявить основные эпитопы аллергена, на которые формируется иммунный ответ. Изучение репертуара IgE^+ -лимфоцитов открывает новые возможности для создания вакцин и разработки терапевтических моноклональных антител.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа имеет традиционную структуру, изложена на 195 страницах машинописного текста и включает главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», Выводы, Список литературы. Работа иллюстрирована 40 рисунками и 4 таблицами. Список литературы включает 241 источник, в том числе 12 русскоязычных и 229 иностранных источников.

В главе «Введение» обоснована актуальность темы и необходимость проведения настоящего исследования, поставлена цель и задачи, суммированы научная новизна, теоретическая и научно-практическая значимость работы.

Обзор литературы соответствует теме диссертации, демонстрирует знание диссертантом современной научной литературы по теме исследования, написан лаконично, содержит описание только знаний, абсолютно необходимых для понимания смысла работы без широко введения в проблематику, чувствуется написание текста специалистом в своей области.

Глава «Материалы и методы» написана достаточно детально, хотя также лаконично. Содержит описание использованных в работе культур клеток, методов получения, культивирования и анализа первичных В-лимфоцитов, особое внимание уделено фенотипированию субпопуляций В-лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии. При этом приведение разбиения главы на пункты в оглавлении упростило бы читателю поиск деталей методов при знакомстве с результатами работы.

В главе «Результаты» подробно описаны экспериментальная часть диссертационной работы, а также модель активации В-лимфоцитов с использованием комбинации ИЛ-21 и лиганда рецептора CD40, которая способствует получению первичных В-клеточных культур. С использованием разработанной модели были определены функциональные дефекты IgG⁺-В-клеток памяти, полученные от пациентов с ОВИН. Подробно описаны результаты изучения В-клеточного ответа у пациентов с COVID-19 и анализ формирования В-клеток памяти после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак». Показано, что вакцинация способствует долговременному иммунному ответу. Также исследованы механизмы IgE-опосредованной аллергической реакции на мажорный аллерген пыльцы березы и выявлены механизмы сезонной активации аллерген-специфических IgE⁺-плазмобластов.

В главе «Обсуждение результатов» проведено тщательное сравнение полученных результатов с данными современных литературных источников, которое позволяет оценить вклад данной работы в мировое научное знание.

Выводы суммируют полученные в диссертационной работе данные, и в общем обоснованы. Однако, утверждение вывода 4 (Инфекция SARS-CoV-2 и

вакцинация препаратом «Гам-КОВИД-Вак» приводят к образованию вирус-специфичных В-клеток памяти, которые циркулируют в крови и обеспечивают протективный иммунитет по меньшей мере в течение трех месяцев) о том, что именно циркулирующие в крови вирус-специфичные В-клетки памяти обеспечивают именно протективный эффект в работе не показано. Из результатов, полученных в ходе диссертационной работы, следует, что у вакцинированных лиц В-клетки памяти способны секретировать антитела, которые в состоянии нейтрализовать SARS-CoV-2-псевдовирусные частицы, что несомненно является коррелятом протекции.

Материалы диссертации доложены на российских и международных конгрессах и конференциях. Основные результаты диссертации представлены в 20 печатных работах, в том числе 15 статьях в научных журналах, входящих в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и доктора наук, 5 публикаций в сборниках материалов конференций.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

По диссертации имеются некоторые замечания.

В диссертации приводятся результаты исследований с участием пациентов и отбором клинического материала. Описание этики исследований, прохождения этических комитетов, времени и места набора пациентов, а также сравнение по демографическим параметрам (возраст, соотношение М/Ж) и коморбидным состояниям подробно приведены в статьях, опубликованных по теме диссертационной работы. Было бы рациональным включить эти разделы также в текст самой диссертации.

Текст диссертации и автореферата содержит некоторые орфографические и пунктуационные ошибки. Вместо выздоровевшие реципиенты, лучше писать реконвалесценты или переболевшие. В некоторых местах используется разный формат для подписей к рисункам; подписи к таблицам можно было бы сделать более полными, некоторые таблицы и рисунки отнесены далеко от текста. Однако это, в общем, не мешает пониманию изложенного. Список сокращений и обозначений содержит не все использованные аббревиатуры.

Высказанные замечания не затрагивают полученных результатов и сущности сделанных выводов, а также не влияют на общую положительную оценку рассматриваемой диссертации.

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 содержится решение актуальных задач, имеющих существенное значение для иммунологии: разработана модель активации В-лимфоцитов *in vitro* для выявления дефектов активации при иммунопатологиях и изучения образования антиген-специфических В-клеток памяти при инфекции и вакцинации; предложена гипотеза о формировании субпопуляции SARS-CoV-2-специфичных плазмбластов при COVID-19; доказана перспектива использования стимуляции В-клеток памяти для предсказания специфичности антител при повторной встрече с антигеном, а также разработана методика определения аллерген-специфичных IgE-позитивных В-клеток; в белке S SARS-CoV-2 обнаружен неизвестный ранее консервативный эпитоп, антитела к которому эффективно блокируют проникновение вируса в клетку; установлено, что анти-векторные антитела не влияют на эффективность вакцинации аденовирусными вакцинами («Гам-КОВИД-Вак» и «Спутник Лайт»); модернизированы методы детекции антиген-специфических плазмбластов и В-клеток памяти.

Диссертация Бязровой М. Г. полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 в редакции 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),
предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук,
а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических
наук по специальности «3.2.7. Иммунология».

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на заседании отдела актуальных и
вновь возникающих инфекций с пандемическим потенциалом (протокол №4 от
10.04.2025 г.)

Отзыв составил:

Заведующий отделом актуальных и вновь возникающих
инфекций с пандемическим потенциалом

ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

(Институт полиомиелита)

доктор биологических наук

e-mail: kozlovskaya_li@chumakovs.ru

тел.+7 (495)841 90-54, доб. (3137)

Любовь Игоревна Козловская

Подпись д.б.н. Л.И. Козловской заверяю:

Ученый секретарь

ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

(Институт полиомиелита),

кандидат биологических наук

«11» апреля 2025 г.



А.В. Белякова

Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. 108819, город Москва, внутренний территориальный городской муниципальный округ Филимонковский, посёлок Института полиомиелита, дом 8, корпус 1, тел. (495) 841-90-02, факс (495) 549-67-60. E-mail: sue_polio@chumakovs.ru, www.chumakovs.ru