

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ»
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

На правах рукописи

Бязрова Мария Георгиевна

ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СУБПОПУЛЯЦИЙ
В-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИММУНОПАТОЛОГИЯХ

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в лаборатории иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Филатов Александр Васильевич**

Официальные оппоненты:

Гребенникова Татьяна Владимировна – доктор биологических наук, профессор, члена-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе подразделения Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, руководитель Испытательного центра, руководитель лаборатории молекулярной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика им Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Гривцова Людмила Юрьевна – доктор биологических наук, заведующая отделением клинической иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: 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.

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2025 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 68.1.002.01 в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (115522, Москва, Каширское шоссе, д. 24). С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте: <https://nrcii.ru/dissertatsionnyy-sovet/dissertatsii-postupivshie-na-rassmotrenie/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2025 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Гудима Георгий Олегович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В-лимфоциты играют важную роль в иммунной защите, и изучение их функций имеет большое значение для современной иммунологии и медицины. Основной функцией В-лимфоцитов является продукция антител, специфически связывающихся с антигенами и нейтрализующих возбудителей инфекций. Понимание того, как формируется В-клеточный иммунитет, необходимо для усовершенствования существующей иммунотерапии, а также для разработки новых вакцин против вирусных и бактериальных инфекций, включая такие актуальные заболевания, как COVID-19, а также разработки методов получения моноклональных антител человека. Эффективность разрабатываемых вакцин в значительной степени определяется долговременностью иммунной памяти против SARS-CoV-2 на уровне В-клеток памяти. Особый интерес представляет изучение роли В-клеток в патогенезе общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН). Кроме несомненного практического значения, изучение дефектов активации В-лимфоцитов, которые наблюдаются у пациентов с ОВИН, может помочь в изучении процессов нормальной активации и дифференцировки В-лимфоцитов. В-лимфоциты также играют ключевую роль в развитии аллергических реакций. При контакте с аллергеном В-клетки активируются и вырабатывают аллерген-специфичные IgE. Повторный контакт с аллергеном вызывает активацию клеток врожденного иммунитета, таких как тучные клетки и базофилы, которые участвуют в развитии аллергической реакции. В-лимфоциты способны также секретировать протективные антитела G₄ изотипа, однако остается неясным, каким образом регулируется активация их синтеза. Понимание формирования аллерген-специфического В-клеточного ответа лежит в основе разработки аллерговакцин. Диссертационная работа посвящена изучению функциональных свойств В-лимфоцитов, а также определению возможных путей воздействия на В-клетки. Диссертация является актуальным и важным исследованием, поскольку ее результаты могут стать основой для разработки новых подходов для диагностики и терапии иммунозависимых заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

Изучение активации и дифференцировки субпопуляций В-лимфоцитов человека при иммунопатологиях является одной из активно развивающихся областей иммунологии. За последние десятилетия накоплено значительное количество данных о механизмах, регулирующих функциональную активность В-клеток в норме и при иммунопатологиях, включая аутоиммунные заболевания, хронические инфекции и аллергические реакции. Охарактеризованы основные субпопуляции В-лимфоцитов, такие как наивные, В-клетки памяти и плазматические клетки, а также ключевые молекулярные маркеры и сигнальные пути, контролирующие их активацию и дифференцировку. Исследованы механизмы взаимодействия В-лимфоцитов с антигенами, роль Т-зависимой и Т-независимой активации, а также факторы микроокружения, влияющие на дифференцировку В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти. Несмотря на высокий уровень разработанности темы, многие ключевые вопросы, связанные с развитием В-клеточного иммунного ответа остаются нерешенными. К ним в первую очередь относятся те, которые касаются таких иммунозависимых заболеваний как ОВИН, новая коронавирусная инфекция и аллергические заболевания.

Цель работы

Изучение особенностей активации и дифференцировки субпопуляций В-лимфоцитов человека при иммунопатологиях, инфекционных заболеваниях, вакцинации и аллергии.

Задачи работы

1. Создать систему для стимуляции В-лимфоцитов *in vitro* с использованием CD40L и ИЛ-21.
2. Сравнить эффективность стимуляции *in vitro* субпопуляций В-лимфоцитов у здоровых добровольцев и пациентов с ОВИН.
3. Изучить генерацию плазмбластов и В-клеток памяти у пациентов с острой формой COVID-19.
4. Изучить формирование долговременной В-клеточной памяти у реципиентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

5. Определить влияние вектор-нейтрализующих антител на эффективность ревакцинации вакциной «Спутник Лайт» и «Гам-КОВИД-Вак».
6. Изучить особенности В-клеточного ответа у пациентов с сезонной аллергией на пыльцу березы.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлено, что характерной особенностью В-клеточного иммунного ответа при инфекции SARS-CoV-2, вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак» и аллергии на пыльцу березы является массивное образование антиген-специфических плазмбластов, которое служит предиктором эффективности последующего формирования В-клеток памяти.
2. Доказано, что введение вакцины «Гам-КОВИД-Вак», а также инфекция SARS-CoV-2 вызывают формирование антиген-специфических переключённых В-клеток памяти, а нарушение процесса активации переключённых В-клеток памяти ассоциировано с развитием иммунопатологии, в частности, ОВИН.

Научная новизна работы

Впервые с помощью В-клеточного ELISpot был проанализирован В-клеточный ответ в острой фазе COVID-19. Впервые были определены циркулирующие и индуцированные антитело-секретирующие В-клетки при COVID-19. Впервые описана динамика образования антиген-специфических плазмбластов и формирование пула антиген-специфических-В-клеток памяти после вакцинации вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Впервые описан консервативный пептид SARS-CoV-2 (P12), расположенный в шиповидном белке, антитела против которого обладают вирус-нейтрализующей активностью. Впервые показано, что эффективность ревакцинации вакцинами «Спутник Лайт» и «Гам-КОВИД-Вак» на основе 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 цветения березы.

Теоретическая значимость работы

Установлено, что разработанные рекомбинантные химерные белки, включающие в свой состав рецепторный домен молекулы CD40L, способны вызывать дифференцировку В-лимфоцитов в антитело-секретирующие клетки. Показано, что характерной особенностью В-клеточного иммунного ответа при инфекции SARS-CoV-2, вакцинации вакциной «Гам-КОВИД-Вак» и аллергии на пыльцу березы является массивное появление антиген-специфических плазмбластов. На основании полученных результатов была предложена гипотеза о формировании субпопуляции SARS-CoV-2-специфичных плазмбластов в результате экстрафолликулярного ответа при COVID-19. Описан консервативный пептид P12, расположенный в шиповидном белке SARS-CoV-2, на который вырабатываются вирус-нейтрализующие IgG антитела после вакцинации вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Изучено влияние анти-векторных антител на эффективность вакцинации вакцинами «Спутник Лайт» и «Гам-КОВИД-Вак». Проведена модернизация существующих методов детекции антиген-специфических плазмбластов и В-клеток памяти при вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» и у пациентов с COVID-19. Полученные результаты способствуют углублению знаний о механизмах формирования В-клеточного ответа при вакцинацией вакциной «Гам-КОВИД-Вак» и у пациентов с COVID-19, 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 в конце сезона цветения березы, из наивных В-лимфоцитов, но не из IgG-клеток памяти.

Научно-практическая значимость работы

Разработка рекомбинантных химерных белков, содержащих рецепторный домен молекулы CD40L, представляет собой важный этап в создании платформы для получения моноклональных антител человека. Полученные данные о В-клеточной иммунологической памяти будут использованы в построении эпидемиологической модели коронавирусной инфекции, а также для ответа на вопрос о возможности реинфекции коронавирусом. Исследования по динамике аллерген-специфического В-клеточного

ответа, открывают новые горизонты для создания аллерговакцин. Учитывая высокую распространенность аллергий, такие разработки помогут улучшить качество жизни пациентов.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии во всех этапах выполнения диссертационного исследования, непосредственном участии в получении исходных данных и научных экспериментах, личном участии в апробации результатов исследования, обработке, анализе и интерпретации полученных данных, подготовке основных публикаций по теме выполненных работ.

Степень достоверности результатов

Результаты получены на откалиброванном и сертифицированном оборудовании. Показана воспроизводимость результатов исследований в различных условиях. Все предоставленные в работе результаты основаны на проработке собранного в ходе исследования экспериментального материала. Установлено качественное и количественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике. Использованы адекватные современные методики сбора и обработки экспериментальных данных; объем проведенных исследований достаточен для выработки обоснованных заключений. Примененные статистические методы адекватны поставленным задачам. Проверка статистических гипотез осуществлялась при допустимом в биологических исследованиях 5 % уровне значимости.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на Конгрессе EAACI 2019 (1-5 июня 2019 г., г. Лиссабон); Европейском иммунологическом конгрессе ECI 2021 (1-4 сентября 2021 г., online); Гибридном конгрессе EAACI 2022 (2 июля 2022 г., г. Прага); XVIII Международном междисциплинарном конгрессе по аллергологии и иммунологии (9 июня 2022 г., г. Москва); XIX Международном междисциплинарном конгрессе по аллергологии и иммунологии (1-2 июня 2023 г., г. Москва); Международном конгрессе по молекулярной иммунологии и аллергологии (23-24 ноября 2023 г., г.

Москва); Международном молодёжном фестивале 2024 (1-7 марта 2024 г., г. Сочи); Научно-практической конференции «Первичные иммунодефициты: от науки к практике» (11–13 апреля 2024 г., г. Москва); Междисциплинарном международном конгрессе по аллергологии и иммунологии (10-11 июня 2024 г., г. Москва); Объединённом иммунологическом форуме-2024 (28 июня – 5 июля 2024 г., Пушкинские Горы); Международном конгрессе по молекулярной иммунологии и аллергологии IMAC-2024 (28-29 ноября 2024 г., г. Москва).

Публикации по теме диссертации

По основным материалам диссертационной работы опубликовано 20 печатных работ, в том числе 15 статей в рецензируемых международных и российских научных изданиях, 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.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 195 страницах машинописного текста, включает 4 таблицы и 40 рисунков. Диссертационная работа написана в традиционном стиле и включает в себя следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список сокращений и условных обозначений», «Список литературы». Библиография включает 241 источник, из них 12 русскоязычных источников и 229 иностранных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение В-лимфоцитов. Мононуклеарные клетки из периферической крови (РВМС) человека выделяли центрифугированием в градиенте плотности фикол-верографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Популяцию общих В-клеток обогащали методом магнитной сепарации. Фенотипирование В-лимфоцитов проводили методом

иммунофлуоресценции с регистрацией на проточном цитометре CytoFlex S. Субпопуляции В-лимфоцитов выделяли с помощью проточного сортировщика SH800S (Sony). Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программы FlowJo.

Получение рекомбинантных белков. Синтез генов, кодирующих растворимые формы CD40L, заказывали в Synbio. Плазмиды, кодирующие CD40L, временно трансфицировали в клетки HEK293T, которые культивировали в бессывороточной среде FreeStyle 293. Через 5 дней культуральный супернатант собирали, концентрировали на патроне Amicon Ultracel 50K в 20 раз и использовали в качестве источника CD40L.

Стимуляция В-лимфоцитов *in vitro*. Фидерные клетки обрабатывали 0,5 мг/мл митомицина, отмывали и рассевали в 96-луночный планшет по 15000 клеток на лунку. В лунки добавляли по 5000 В-лимфоцитов и 25 нг/мл IL-21. В некоторых экспериментах вместо фидерных клеток в лунки добавляли рекомбинантный растворимый CD40L.

ELISpot-анализ. Лунки планшета Multiscreen HTS обрабатывали соответствующими антигенами или антителами кролика против человеческих IgG или IgM. Свежие РВМС или стимулированные В-клетки сеяли в количестве от 250 000 до 2 500 000 клеток на лунку и инкубировали 16 часов при 37°C, 5% CO₂. Секретированные антитела проявляли иммуноферментным методом. Изображения пятен регистрировали с помощью анализатора CTL ImmunoSpot. Количество пятен подсчитывали с использованием программного обеспечения ImmunoSpot.

Серологические тесты. Уровень антиген-специфических IgG, IgA, IgM и IgE антител определяли с помощью ELISA. Анти-пептидные антитела определяли с помощью микрочипов, на которые были сорбированы синтетические пептиды длиной от 25 до 30 аминокислотных остатков. Вирус-нейтрализующую активность антител определяли с помощью псевдотипированных вирусоподобных частиц (VLP). VLP нарабатывали при временной трансфекции в клетки HEK293T трех плазмид: упаковочной плазмиды pCMVD8.2R, репортерной плазмиды pUCHR-GFP и плазмиды pCG1-SARS-S, которая кодировала полноразмерный шиповидный белок SARS-CoV-2

дикого типа или его мутантных вариантов. Для вирус-нейтрализационного теста 20 мкл разведенных сывороток инкубировали с 10 мкл VLP в течение 1 ч, после чего смесь добавляли к 5000 клеток НЕК293, стабильно трансфицированных геном *ACE2*, и инкубировали в течение 48 часов. Долю GFP⁺ клеток определяли с помощью проточной цитометрии. Эффективность вирус-нейтрализации оценивали по разведению антител, при котором достигалось 50% ингибирование инфекции клеток-мишеней (ID₅₀).

Секвенирование генов *IGH*. РНК выделяли из образцов РВМС или В-клеток, далее с помощью рандомных праймеров проводили обратную транскрипцию. Гены *IGH* амплифицировали полугнездовым ПЦР. ПЦР-продукты выделяли из агарозного геля и полученную кДНК в векторе pCR4-TOPO TA клонировали в *E. coli* (TOP10). Плазмиды с корректными вставками секвенировали с праймерами Т3 и Т7. Анализ последовательностей *IGH* выполняли с использованием программы IMGT/V-QUEST.

Для статистического анализа данных использовали программу GraphPad Prism (версия 10.1.1). Значимые различия между группами обозначены: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns – статистически недостоверно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание фидерной и бесфидерной системы стимуляции В-лимфоцитов in vitro

При В-клеточном ответе происходит активация антиген-специфических В-клеток и их дифференцировка в одну из следующих популяций: плазмабласты, клетки памяти и плазматические клетки. Для моделирования процессов дифференцировки нами была создана системы стимуляции В-лимфоцитов *in vitro*. Минимальной комбинацией сигналов, которая обеспечивает надежную активацию В-лимфоцитов, является совместное действие CD40L и IL-21. Молекула CD40L является трансмембранным белком, который экспрессируется на активированных Т-клетках. Для создания системы стимуляции В-лимфоцитов нами были получены клетки А549, стабильно экспрессирующие *CD40L*, и которые получили название фидерных клеток А549.40L (рис. 1А). С использованием этих клеток в сочетании с экзогенным IL-21 нами был отработан протокол стимуляции В-лимфоцитов. Использованная система стимуляции

обеспечивала устойчивый рост В-лимфоцитов в течение 7 дней культивирования (рис. 1Б). За это время содержание В-лимфоцитов в среднем увеличивалось в 8 раз. CD40L/IL-21-стимуляция вызывала изменение морфологии В-лимфоцитов и их поверхностного фенотипа. Заметная доля клеток приобретала фенотип плазмбластов, характеризующийся совместной экспрессией CD27 и CD38 при снижении экспрессии CD20 (рис. 1В). Стимулированные В-лимфоциты начинали секретировать IgG и IgM. Лиганд CD40 рецептора относится к TNF суперсемейству белков, для функциональной активности которых необходима гексамеризация этих молекул. Нами были получены два препарата растворимого рекомбинантного CD40L.

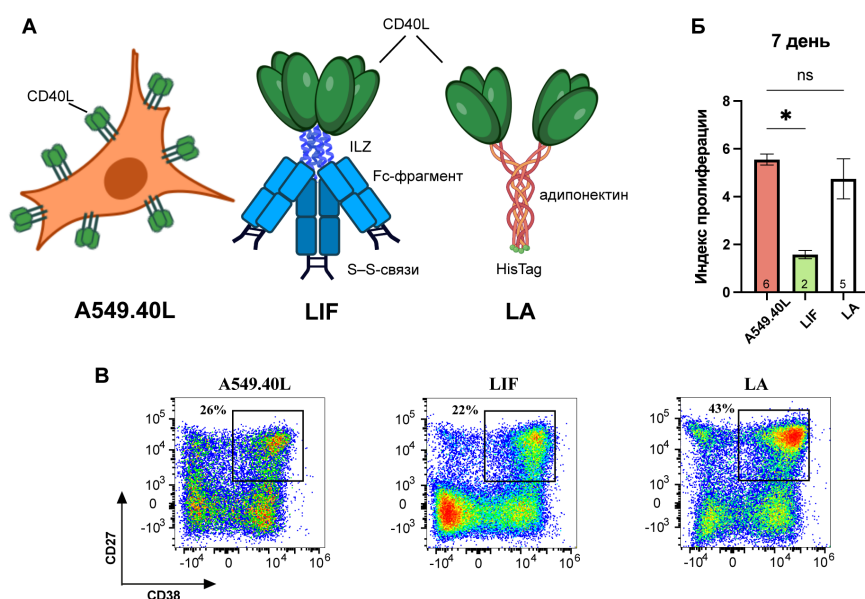


Рис. 1. Фидерная и бесфидерная стимуляция В-лимфоцитов *in vitro* в системе CD40L/IL-21 (А) Схематическое изображение различных форм CD40L. (Б, В) Индекс пролиферации В-лимфоцитов (Б) и доля плазмбластов (В) на 7-ой день культивирования при использовании фидерных клеток или растворимых препаратов CD40L.

Гексамеризация CD40L в одном случае достигалась за счет введения в слитый белок Fc-фрагмента IgG и тримеризующего изолейцинового зиппера, а в другом случае за счет слияния с фибриллярным доменом адипонектина (препараты получили условные названия LIF и LA, соответственно, рис. 1А). При тестировании в бесфидерной системе препараты LA и LIF обеспечивали пролиферацию В-лимфоцитов и их

дифференцировку в плазмбласты, однако LA обладал более высокой физиологической активностью, чем LIF (рис. 1Б, В).

Особенности CD40L/IL-21-стимуляции В-лимфоцитов у пациентов с ОВИН

Общая переменная иммунная недостаточность (ОВИН) относится к первичным иммунодефицитам и характеризуется сниженным уровнем сывороточного Ig и частыми инфекциями. Патогенез ОВИН в значительной степени остается невыясненным. Причинные генетические дефекты удастся найти только в 10% случаев. Очевидно, что для характеристики ОВИН необходимо также привлекать функциональные параметры В-лимфоцитов. У пациентов с ОВИН были обнаружены некоторые отклонения в CD40L/IL-21-стимуляции. Наиболее отчетливо это проявлялось в отношении субпопуляции переключенных В-клеток памяти, которые по сравнению с клетками от здоровых доноров при стимуляции *in vitro* в меньшей степени дифференцировались в плазмбласты ($p < 0,0001$), примерно на порядок меньше секретируют IgG ($p = 0,0006$), однако сохраняли способность к переключению синтеза с IgM на IgG.

Особенности В-клеточного ответа у пациентов с острым COVID-19

В исследование были включены 72 пациента с COVID-19, в том числе со среднетяжелой ($n = 42$) и тяжелой формой ($n = 30$) течения заболевания. Характерной особенностью пациентов с COVID-19 являлось значительное увеличение количества плазмбластов (CD27^{hi}CD38^{hi}), тогда как у здоровых добровольцев они практически отсутствовали (рис. 2А). В некоторых случаях ($n = 19$) доля плазмбластов превышала 20% от общей популяции В-клеток (рис. 2Б). Среди плазмбластов детектировался довольно большой процент RBD-связывающих клеток (медиана 10%), тогда как в наивной популяции В-лимфоцитов RBD⁺-клетки не обнаруживались (рис. 2В, Г). Циркулирующие плазмбласты конститутивно секретируют антитела. При этом наблюдалась сильная корреляция между содержанием RBD-специфичных АСК, секретирующих антитела IgG и IgM изотипа ($r = 0,95$, $p < 0,0001$). В отличие от плазмбластов покоящиеся В-клетки памяти антитела не секретируют. Для их

дифференцировки в АСК, тотальную популяцию В-лимфоцитов стимулировали в системе CD40L/IL-21 в течение 7 дней, которая приводила к образованию АСК. В супернатантах стимулированных В-клеток у трех из 23 пациентов были обнаружены RBD-специфические IgG антитела (рис. 3А). Эти супернатанты также демонстрировали заметный уровень вирус-нейтрализующей активности (рис. 3Б). Эти результаты показывают, что во время острой SARS-CoV-2 инфекции начинают формироваться В-клетки памяти, которые при стимуляции секретируют антитела, связывающие и нейтрализующие вирус SARS-CoV-2. Следует отметить, что корреляции между частотой встречаемости АСК, полученных из В-клеток памяти, и спонтанных АСК, представленных плазмабластами, не обнаруживалось.

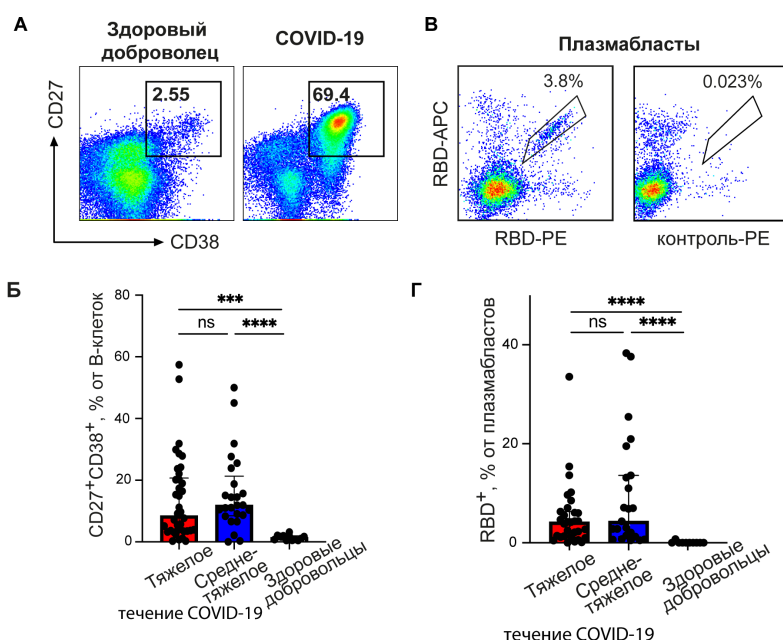


Рис. 2. Увеличение количества плазмбластов у пациентов с COVID-19 (А) Репрезентативные цитогаммы. (Б) Уровни плазмбластов у пациентов с COVID-19. (В) Определение RBD-специфических плазмбластов. (Г) Уровни RBD-специфических плазмбластов у пациентов с COVID-19.

Иммунный ответ у добровольцев, вакцинированных препаратом «Гам-КОВИД-Вак»

Векторная вакцина «Гам-КОВИД-Вак» была одной из первых вакцин против SARS-CoV-2. В настоящее время «Гам-КОВИД-Вак» используется в более чем в 70 странах. Мы провели анализ гуморального, а также В-клеточного иммунного ответа в

когорте из 22 вакцинированных добровольцев, среди которых 5 ранее переболели легкой формой COVID-19, а остальные ($n = 17$) ранее не были подвержены экспозиции антигенами SARS-CoV-2 (рис. 4). Несмотря на то, что исследуемая группа была сравнительно ограниченной, наш углубленный анализ позволил проследить динамику и произвести количественную оценку иммунного ответа как у наивных, так и переболевших COVID-19 добровольцев, что отражало реальную эпидемиологическую ситуацию на тот момент. Гуморальный иммунный ответ был измерен по таким общеупотребительным параметрам как уровни Spike- и RBD-специфических IgG, IgA и IgM антител, а также их активности в тестах вирус-нейтрализации SARS-CoV-2 дикого типа и некоторых мутантных вариантов. После этого для более детального изучения гуморального ответа мы провели анализ реакции антител вакцинированных добровольцев с панелью из 42 пептидов, покрывающих весь Spike белок. Уровень IgG антител против пептидов P12, P32, P46A, а также против RBD, коррелировал с титром вирус-нейтрализации SARS-CoV-2 WT. Особенно выделялся пептид P12, для которого уровень P12-специфических антител высоко коррелировал не только с вируснейтрализацией WT, но также варианта Omicron BA.1 ($r = 0,7594$ и $r = 0,6857$ соответственно). Последовательность пептида P12 является высококонсервативной. Пептид P12 (aa 284-313) расположен в S1 домене вблизи от N-конца RBD и, следовательно, входит в состав участка, который может иметь значение для перехода из pre- к post-fusion конформации Spike белка. Одним из самых ранних проявлений В-клеточного ответа является появление общих и антиген-специфических плазмбластов, пик частоты встречаемости которых приходится на седьмой день после иммунизации. Плазмбласты определяли как клетки $CD19^+IgD^-CD27^{hi}CD38^{hi}$. До вакцинации частота встречаемости плазмбластов ($CD19^+IgD^-CD27^{hi}CD38^{hi}$) была на уровне здоровых доноров, но заметно увеличилась после первой дозы вакцины ($T0$ vs $T1$, $p = 0,0076$ и $p = 0,0289$ для наивных и выздоровевших лиц соответственно, рис. 5A). Вторая доза приводила к незначительному увеличению процента общего количества плазмбластов по сравнению с исходным уровнем. В дальнейшем содержание плазмбластов снижалось и в точке T3 они полностью исчезали из циркуляции. RBD-специфичный плазмбластный ответ был обнаружен у 18 добровольцев (86%) после

первой дозы вакцины «Гам-КОВИД-Вак» и только у восьми участников (40%) после второй дозы (рис. 5Б). В целом уровень RBD⁺-плазмабластов был невысокий, значительно ниже, чем у пациентов с COVID-19 средней степени тяжести.

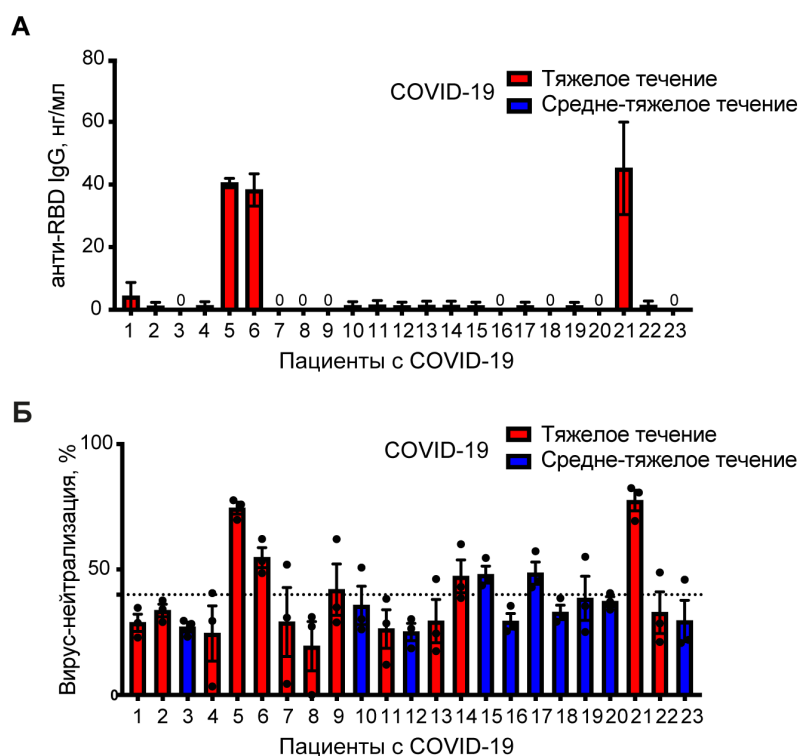


Рис. 3. Секреция В-клетками памяти у пациентов с COVID-19 RBD-связывающих (А) и вирус-нейтрализующих (Б) антител при стимуляции *in vitro* в системе CD40L/IL-21

SARS-CoV-2-специфические циркулирующие IgG-секретирующие АСК были обнаружены у всех конвалесцентных реципиентов после первой дозы (рис. 5В, Г). Появление SARS-CoV-2-специфических IgG-секретирующих АСК детектировалось у 7 из 15 наивных реципиентов только после второй дозы. Тот факт, что после первой дозы вакцины частота встречаемости RBD-специфичных IgG-секретирующих клеток была выше у лиц, перенесших SARS-CoV-2, чем у лиц из группы наивных реципиентов, согласуется с идеей о том, что в первой когорте это увеличение обусловлено реактивацией ранее сформировавшихся В-клеток памяти. Еще до вакцинации переболевшие реципиенты имели заметный процент RBD⁺-В-клеток памяти, которое было выше уровня отрицательного контроля (рис. 6А). В течение последующих 3

месяцев процент RBD⁺-В-клеток памяти у конвалесцентных реципиентов оставался неизменным. У наивных добровольцев RBD⁺-В-клетки памяти появлялись через 7 дней после введения первой дозы. Через 28 дней после первой вакцинации (T2) RBD⁺-В-клетки памяти обнаруживались у 37,5% наивных реципиентов и демонстрировали дальнейшее увеличение в T3 (T1 vs T3, $p = 0,0023$), приближаясь к уровню, наблюдаемому у переболевших доноров (рис. 6Б). Для оценки функциональной активности В-клеток памяти, связывающих белки SARS-CoV-2, измерение их количества было дополнено ELISpot-анализом. Для получения АСК В-клетки памяти стимулировали *in vitro* в системе CD40L/IL-21. В точке T2 у всех конвалесцентных (5/5) и у некоторых наивных реципиентов (7/17) число SARS-CoV-2-специфических индуцированных АСК было выше исходного уровня (T0). Через 3 месяца (T3) содержание АСК у переболевших доноров оставалось неизменным, в то время как у наивных добровольцев оно увеличилось в 14 раз и приближалось к уровню конвалесцентной группы (T2 vs T3, $p < 0,0001$ и $p = 0,0002$ для RBD- и S-специфических АСК) (рис. 6В).

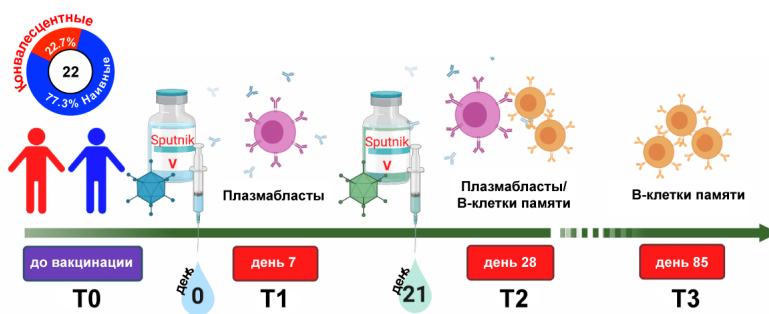


Рис. 4. Дизайн исследования иммунного ответа у добровольцев, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак»

Стимулированные В-клетки памяти всех конвалесцентных добровольцев секретируют значительное количество RBD-специфичных IgG как в T2, так и в T3. В группе добровольцев наивных в отношении SARS-CoV-2 в точке T3 уровень секреции

RBD-специфичных IgG был снижен в пять-шесть раз по сравнению с группой выздоровевших. Секретируемые В-клетками памяти антитела у переболевших реципиентов в точке Т3 ингибировали проникновение SARS-CoV-2 WT в диапазоне от 42 до 99% (рис. 6Г). Подобно сывороточным антителам, антитела, полученные из В-клеток памяти, продемонстрировали более слабую нейтрализацию варианта Beta, которая была дополнительно снижена в образцах от наивных реципиентов ($p = 0,0066$ и $p = 0,0317$ для наивных и конвалесцентных доноров, соответственно). Несмотря на общее снижение перекрестной нейтрализации варианта Beta, около половины вакцинированных субъектов (15/22) показали заметную вирус-нейтрализующую активность супернатантов в точке Т3 (рис. 6Г). Таким образом, почти у всех вакцинированных на 85-й день после введения первой дозы «Гам-КОВИД-Вак» появлялись RBD- и Spike-специфические В-клетки памяти. У наивных реципиентов этот процесс значительно отставал от кинетики образования сывороточных антигенспецифических антител.

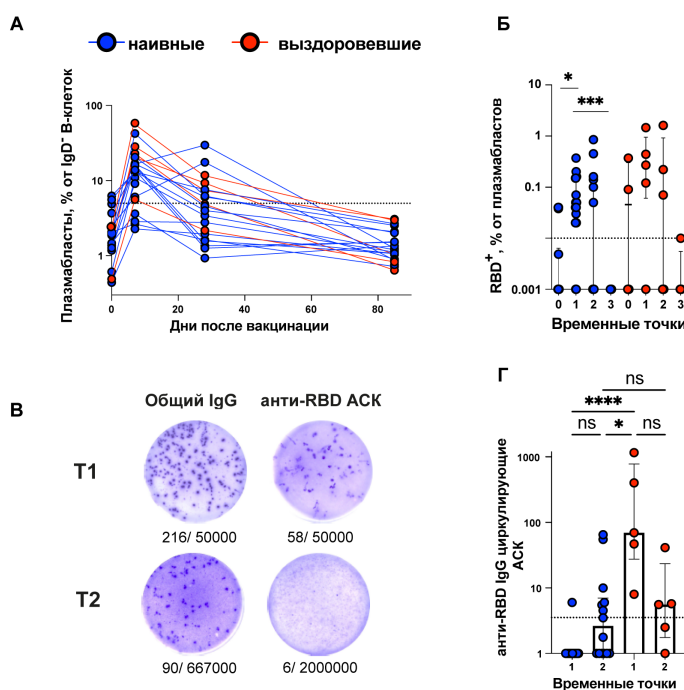


Рис. 5. Плазмабластный иммунный ответ у добровольцев, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак» (А, Б) Динамика общей (А) и RBD⁺ (Б) субпопуляций плазмабластов. (В) Репрезентативный ELISpot плазмабластов, секретирующих общий или RBD-специфический IgG во временных точках Т1 и Т2. (Г) Динамика RBD-специфичных IgG-секретирующих клеток (АСК).

Ревакцинация препаратом «Гам-КОВИД-Вак» индуцирует образование анти-векторных нейтрализующих антител

Иммунизация с помощью аденовекторных вакцин может приводить к образованию анти-векторных нейтрализующих антител (Ad NAb). Существуют противоречивые данные о возможном влиянии Ad NAb на успешность последующей вакцинации. Для того чтобы выяснить насколько эффективна ревакцинация «Спутник Лайт» зависит от уровня Ad26 NAb, индуцированных первичной вакцинацией «Гам-КОВИД-Вак», мы провели сравнительное исследование. Все участники исследования ($n = 58$) были вакцинированы двумя инъекциями «Гам-КОВИД-Вак» и через 9 месяцев были ревакцинированы. В основной группе бустером служил «Спутник Лайт», произведенный на основе Ad26, а в когорте сравнения ($n = 10$) бустером была мРНК вакцина «Comirnaty». Ревакцинация вакциной «Спутник Лайт» привела к 2,5-кратному увеличению RBD-специфических IgG ($p < 0,0001$), и 2 кратному повышению SARS-CoV-2 WT вирус-нейтрализующих антител ($p = 0,0017$). Далее мы проверили взаимосвязь между уровнями Ad26-специфических NAb до бустерной вакцинации с одной стороны и RBD-специфических IgG или SARS-CoV-2 WT нейтрализующих антител после бустерной вакцинации с другой стороны. Корреляционный анализ Спирмена не выявил какой-либо взаимосвязи между этими параметрами ($r = -0,18, p = 0,21$; $r = -0,13, p = 0,36$ соответственно), что указывает на то, что Ad26 NAb до бустерной вакцинации не влияли на эффективность ревакцинации.

Основываясь на этих данных, проведение ревакцинации через 6–9 месяцев после первичной вакцинации представляется вполне обоснованным, поскольку указанный временной промежуток дает преимущество в снижении титров Ad26 NAb при сохранении гуморального иммунитета к SARS-CoV-2.

В-клеточный ответ у пациентов с аллергией на пыльцу березы

Во время сезона палинации березы у пациентов моносенсибилизированных к аллергенам семейства PR-10 ($n = 10$) наблюдалось увеличение Bet v 1-специфических IgE-антител, при том, что уровень Bet v 1-специфических IgG антител в течение сезона

не менялся (рис. 7А). Динамика IgE⁺-В-клеток примерно следовала за изменениями Bet v 1-специфических IgE-антител. Процент общих IgE⁺-, а также Bet v 1⁺-В-клеток возрастал во время сезона палинации, достигал максимума в образцах, собранных в мае-июне, и снижался сразу после окончания экспозиции аллергена (рис. 7Б, В). У 5 пациентов из образцов крови с помощью полугнездового ПЦР были амплифицированы вариабельные гены тяжелой цепи IgE (*VHε*). Нами были получены 71 нуклеотидная последовательность генов *VHε*. При этом количество уникальных последовательностей перед сезоном (*n* = 8) было ниже, чем в конце сезона после экспозиции аллергена (*n* = 11). Большинство полученных последовательностей принадлежали к семейству VH3 (40/71), остальные семейства были распределены следующим образом: VH1 (23/71), VH4 (2/71), VH5 (4/71) и VH6 (2/71). Мы не обнаружили идентичных клонов в образцах, собранных до и в конце сезона. Поскольку последовательности были получены от моносенсibilизированных пациентов, весьма вероятно, что они соответствуют Bet v 1-специфичным IgE.

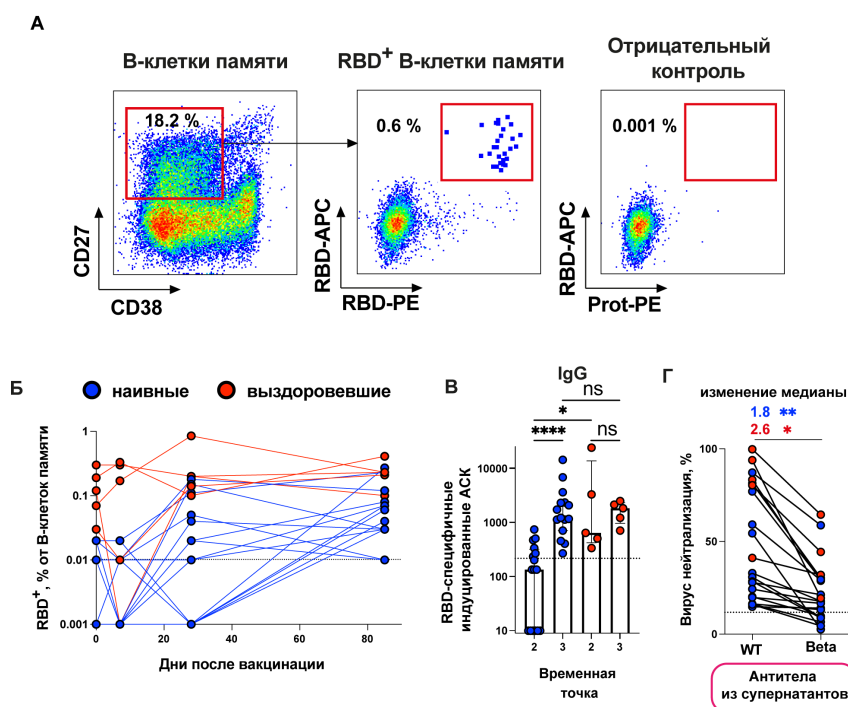


Рис. 6. Ответ В-клеток памяти у добровольцев, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак» (А) Репрезентативные цитограммы, показывающие RBD⁺-В-клетки памяти в популяции CD19⁺CD27⁺CD38⁻-лимфоцитов. (Б) Динамика RBD⁺-В-клеток памяти. (В, Г) Динамика RBD-связывающих (В) и вирус-нейтрализующих (Г) антител в супернатантах CD40L/IL-21-стимулированных В-клеток памяти.

Последовательности, полученные в конце сезона палинации, показали более низкий уровень гипермутаций (медиана - 5,4%) и по этому показателю приближались к наивным IgM^+ -клеткам. Поскольку последовательности были получены от моносенсибилизированных пациентов, весьма вероятно, что они соответствуют Bet v 1-специфичным IgE . Последовательности, полученные в конце сезона палинации, показали более низкий уровень гипермутаций (медиана - 5,4%) и по этому показателю приближались к наивным IgM^+ -клеткам. Это может указывать на то, что Bet v 1-специфичные В-клетки, циркулирующие в конце сезона, произошли из наивных IgM^+ -, но не из IgG^+ -В-клеток памяти.

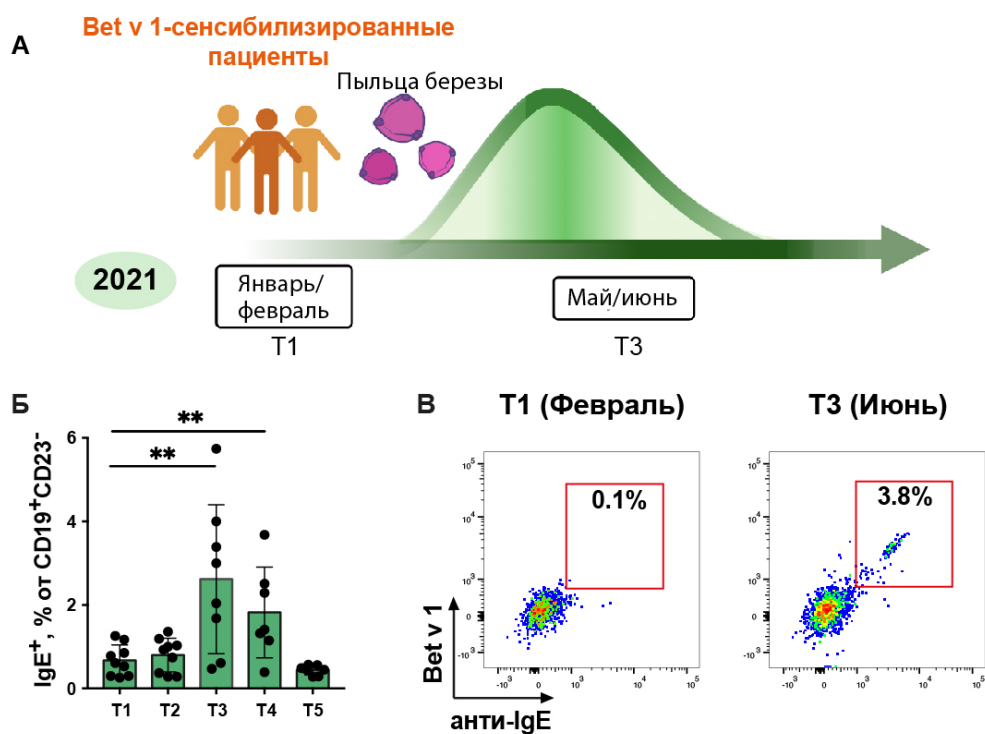


Рис. 7. Динамика Bet v 1-специфичного ответа в течение сезона палинации березы у пациентов моносенсибилизированных к аллергенам семейства PR-10 (А) Дизайн исследования. (Б) Динамика IgE^+ -В-лимфоцитов. (В) Репрезентативные цитогаммы, демонстрирующие определение Bet v 1-специфических IgE^+ -В-лимфоцитов.

ВЫВОДЫ

1. Разработана оригинальная экспериментальная модель активации и дифференцировки В-лимфоцитов *in vitro*, позволяющая выявлять нарушения активации В-клеток при иммунопатологиях, а также особенности образования антиген-специфических В-клеток памяти при инфекционных заболеваниях и при вакцинации.
2. Показано, что при ОВИН наблюдается нарушение процесса активации переключённых В-клеток памяти, при этом у пациентов с ОВИН переключённые В-клетки менее активно дифференцируются в IgG-секретирующие плазмбласты.
3. Характерной особенностью В-клеточного иммунного ответа при инфекции SARS-CoV-2 и вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак» является массивное образование вирус-специфических плазмбластов, которое служит предиктором эффективности последующего формирования В-клеток памяти. Уровень плазмбластов при острой инфекции SARS-CoV-2 выше, чем при вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак».
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.
5. Ответ В-клеток памяти на вакцинацию препаратом «Гам-КОВИД-Вак» зависит от наличия инфекции SARS-CoV-2 в анамнезе. У реципиентов, которые перед вакцинацией переболели COVID-19, гуморальный и В-клеточный ответы развиваются быстрее и достигают более высокого уровня, чем у неболевших реципиентов.
6. Выявлен неизвестный ранее консервативный нейтрализующий эпитоп шиповидного белка SARS-CoV-2 (aa 284-313), расположенный в непосредственной близости от N-конца рецептор-связывающего домена, против которого при введении вакцины «Гам-КОВИД-Вак» образуются вирус-нейтрализующие IgG-антитела.
7. Вакцинация препаратом «Гам-КОВИД-Вак» индуцирует выработку вектор-нейтрализующих антител, уровень которых снижается в течение последующих месяцев. Эффективность бустерной ревакцинации препаратом «Спутник Лайт» через 9 месяцев после первичной вакцинации не зависит от уровня вектор-нейтрализующих антител на момент ревакцинации.

8. Доказано, что у пациентов, моносенсибилизированных к аллергену пыльцы березы, в период палинации в периферической крови значительно увеличивается количество IgE-позитивных плазмбластов, специфичных к аллергену Bet v 1. На основании анализа нуклеотидных последовательностей генов *VH* показано, что сезонные аллерген-специфичные IgE-позитивные плазмбласты генерируются из наивных В-клеток, а не из В-клеток памяти.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Лушова А.А., Жеремян Э.А., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., **Бязрова М.Г.**, Филатов А.В. Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры. Иммунология. 2019; 40 (6), 63–76.
2. Eckl-Dorna J., Villazala-Merino S., Campion N., **Byazrova M.**, Filatov A., Kudlay D., Karsonova A., Riabova K., Khaitov M., Karaulov A., Niederberger-Leppin V., Valenta R. Tracing IgE-Producing Cells in Allergic Patients. Cells. 2019; 8 (9): 994.
3. **Бязрова М.Г.**, Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., Васильева Ю.В., Прилипов А.Г., Филатов А.В. Стимуляция В-лимфоцитов человека *in vitro* с помощью ИЛ-21/CD40L и их характеристика. Иммунология. 2020; 41 (1): 18–27.
4. **Бязрова М.Г.**, Топтыгина А.П., Митина Т.Н., Филатов А.В. Стратегия гейтирования плазмбластов на примере иммунизации вакциной против гепатита В. Медицинская иммунология. 2020; 22 (6): 1185–1194.
5. **Byazrova M.**, Yusubalieva G., Spiridonova A., Efimov G., Mazurov D., Baranov K., Baklaushev V., Filatov A. Pattern of circulating SARS-CoV-2-specific antibody-secreting and memory B-cell generation in patients with acute COVID-19. Clin. Transl. Immunology. 2021; 10 (2): e1245.
6. Zghaebi M., **Byazrova M.**, Flicker S., Villazala-Merino S., Campion N., Stanek V., Tu A., Breiteneder H., Filatov A., Khaitov M., Niederberger-Leppin V., Eckl-Dorna J. and Valenta R. Tracing Human IgE B Cell Antigen Receptor-Bearing Cells With a Monoclonal Anti-Human IgE Antibody That Specifically Recognizes Non-Receptor-Bound IgE. Front. Immunol. 2021; 12: 803236.

7. Астахова Е.А., Фролов Е.А., Шилкина А.Б., **Бязрова М.Г.**, Латышева Е.А., Латышева Т.В., Филатов А.В. Стимуляции В-клеток в системе ИЛ-21/CD40L в норме и у пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью. Иммунология. 2021; 41 (6): 631–640.
8. **Byazrova M.**, Kulemzin S., Astakhova E., Belovezhets T., Efimov G., Chikaev A., Kolotygin I., Gorchakov A., Taranin A., Filatov A. Memory B Cells Induced by Sputnik V Vaccination Produce SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies Upon Ex Vivo Restimulation. Front. Immunol. 2022; 13: 840707.
9. **Byazrova M.**, Astakhova E., Minnegalieva A., Sukhova M., Mikhailov A., Prilipov A., Gorchakov A., Filatov A. Anti-Ad26 humoral immunity does not compromise SARS-CoV-2 neutralizing antibody responses following Gam-COVID-Vac booster vaccination. NPJ Vaccines. 2022; 7 (1): 145.
10. **Byazrova M.**, Gattinger P., Astakhova E., Hofer G., Khaitov M., Filatov A. and Valenta R. Dissection of Antibody Responses of Gam-COVID-Vac-Vaccinated Subjects Suggests Involvement of Epitopes outside RBD in SARS-CoV-2 Neutralization. Int. J. Mol. Sci. 2023; 24 (6): 5104.
11. Lin N., Yin W., Miller H., **Byazrova M.**, Herrada A., Benlagha K., Lee P., Guan F., Lei J., Gong Q., Yan Y., Filatov A. and Liu C. The role of regulatory T cells and follicular T helper cells in HBV infection. Front. Immunol. 2023; 14: 1169601.
12. Wang X., Guan F., Miller H., **Byazrova M.**, Cndotti F., Benlagha K., Camara N., Lei J., Filatov A., Liu C. The role of dendritic cells in COVID-19 infection. Emerg Microbes Infect., 2023. Emerg. Microbes Infect. 2023; 12 (1): 2195019.
13. Yang Y., Miller H., **Byazrova M.**, Cndotti F., Benlagha K., Camara N., Shi J., Forsman H., Lee P., Yang L., Filatov A., Zhai Z., Liu C. The characterization of CD8⁺ T-cell responses in COVID-19. Emerg. Microbes Infect. 2024; 13 (1): 2287118.
14. **Бязрова М.Г.**, Смольников Е.В., Литовкина А.О., Амзаева Л.У., Сухова М.М., Михайлов А.А., Чернушевич Д.Д., Феденко Е.С., Филатов А.В., Елисютина О.Г. Определение аллерген-специфических В-лимфоцитов у пациентов с аллергическими заболеваниями при отсутствии специфических IgE-антител. Иммунология. 2024; 45 (5): 604–614.

15. Бязрова М.Г., Сухова М.М., Михайлов А.А., Гусева П.П., Романова А.Ф. Прилипков А.Г., Филатов А.В. Секвенирование генов Ig из единичных циркулирующих плазмбластов при острой SARS-CoV-2-инфекции. Иммунология. 2024; 45 (6): 678-690.

Работы, опубликованные в сборниках материалов конференций

1. Byazrova M., Eckl-Dorna J., Niederberger V., Elisyutina O., Khaitov M., Valenta R., Filatov A. Increase of IgE⁺ lymphocytes in allergic patients after allergen exposure: A possible target for allergy treatment. Allergy. 2019; 74 (S106): PD1746.

2. Byazrova M., Astakhova E., Spiridonova A., Prilipov A., Filatov A. The interaction of CD40 receptor on B cells with different forms of recombinant CD40L. FEBS OPEN BIO. 2021; 11: 218.

3. Byazrova M., Eckl-Dorna J., Niederberger V., Elisyutina O., Smolnikov E., Litovkina A., Filatov A., Khaitov M. and Valenta R. Tracing Cells Producing Allergen-Specific IgE in Allergic Patients. Eur. J. Immunol. 2021; 51(Suppl.1): 21.

4. Byazrova M., Astakhova E., Frolov E., Shilkina A., Latysheva E., Latysheva T., Filatov A. Revealing functional defects in the IL-21/CD40L activation of B-lymphocytes in patients with COVID. Allergy: Special Issue. 2023; 78 (S111): 001259.

5. Бязрова М.Г., Сухова М.М., Михайлов А.А., Романова А.Ф., Юсубалиева Г.М., Филатов А.В. Плазмбластный ответ при острой SARS-CoV-2-инфекции. Инфекция и иммунитет. 2024; 14 (3): 471–475.