

Отзыв

официального оппонента кандидата биологических наук Тухватулина Амира Ильдаровича на диссертацию Астаховой Екатерины Андреевны на тему: “Особенности В-клеточного иммунного ответа на антигены SARS-CoV-2”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология (биологические науки).

Актуальность темы исследования

Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, стала глобальным вызовом для систем здравоохранения, экономики и фундаментальной науки. За короткое время был создан арсенал вакцин на основе различных платформ (мРНК, рекомбинантные вирусные векторы, инактивированные, субъединичные и др.), применяющихся как для первичной иммунизации, так и для ревакцинации (doi: 10.1007/s13337-022-00755-1). Новизна патогена и вакцинных препаратов требует продолжения исследований, направленных на детализацию иммунных реакций, играющих важную роль в формировании и сохранении протективного иммунитета у вакцинированных.

Существенным усложнением вышеупомянутой важной задачи науки является продолжающаяся циркуляция SARS-CoV-2 в популяции человека, сопряженная с постоянным эволюционированием вируса, появлением новых вариантов, обладающих свойствами частичного ускользания от иммунитета. В этой связи определение и сравнение напряженности иммунитета, сформированного после естественной (перенесенного COVID-19), искусственной иммунизации (вакцинации), а также после сочетания этих событий (приводящих к развитию гибридного иммунитета) важно не только для детализации принципов функционирования иммунной системы человека в целом, но и для того, чтобы иметь полноценные данные об иммуногенности вакцин против COVID-19 в определенном эпидемиологическом ландшафте.

Ранее было показано, что В-клеточный (гуморальный) иммунитет способен самостоятельно (без наличия антиген-специфичных Т-лимфоцитов) обеспечивать защиту животных от летальных доз SARS-CoV-2 [10.1038/s41586-020-03041-6, 10.1038/s41467-021-21239-8]. Представленная работа, фокусирующаяся на детальном изучении особенностей формирования (как поствакцинального, так и гибридного) В-клеточного звена иммунного ответа, приобретает принципиальную важность для решения продолжающими быть актуальными задач современной медицинской науки, а именно: 1) детальной характеристики и определении напряженности показателей В-клеточного поставакцинального иммунитета, как одного из важных маркеров иммунной защиты человека от SARS-CoV-2; 2) определения изменений в показателях В-клеточного иммунитета после проведенной ревакцинации; 3) определении кросс-реактивности сформированного поставакцинального иммунитета человека в отношении различных вариантов SARS-CoV-2 и др.

Стоит также подчеркнуть, что работа, в частности, ставит перед собой задачи по оценке В-клеточного иммунитета, сформированного, после вакцинации российскими препаратами «Спутник V», «Спутник Лайт» и «Салнавак». Представленные в диссертационной работе данные приобретают особенную актуальность для отечественной науки, расширяя понимание об иммуногенности и потенциале применения этих вакцин.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Для решения поставленных задач, автор использует большое число современных методов исследования, относящихся к различным областям науки: молекулярной и клеточной биологии, иммунологии, вирусологии и др. Достоверность и адекватность полученных результатов подтверждается включением в исследование помимо экспериментальных групп, также контрольной группы невакцинированных добровольцев, с которой

проводилось сравнение. Сравнивая результаты между группами данных, автор применяет адекватные статистические методы анализа. Методы статистического анализа указываются как в главе «Материалы и методы», так и в подписях представленных к каждому графическому изображению полученных данных, что сильно облегчает их понимание читателем.

В целом научные положения и выводы, сформулированные автором, основываются на достаточном объеме проведенного исследования, не вызывают сомнений и видятся обоснованными, исходя из представленного материала.

Научная новизна исследования

Научная новизна исследования проявляется не только в ряде полученных впервые результатах отдельных экспериментов, степень новизны увеличивается за счет комплексного подхода использованного автором для оценки В клеточного иммунного ответа у добровольцев со сформированным иммунитетом против SARS-CoV-2. Во-первых, автор использует образцы крови (клетки периферической крови, сыворотку крови) добровольцев с различными анамнезом в отношении сформированного иммунитета к SARS-CoV-2 (вакцинированные и/или перенесшие COVID-19). Во-вторых, автор провел оригинальное исследование, сравнив на одной и той же выборке вирус-нейтрализующую активность сывороток добровольцев тремя различными методами (сVNT, pVNT, sVNT). В-третьих, при оценке напряженности В клеточного иммунного ответа в различных группах добровольцев автор определял не только «гуморальную» (титр антиген-связывающих и вирус-нейтрализующих антител), но и «клеточную» составляющую, определив число антиген-специфичных В-лимфоцитов, а также их функциональную способность - секретировать антитела, связывающие и нейтрализующие SARS-CoV-2. В-четвертых, автор определил, как изменяются количественные (титр вирус-нейтрализующих антител), и качественные (авидность) показатели антительного ответа после

различных схем ревакцинации добровольцев. В-пятых, была определена широта вирус-нейтрализующего ответа в отношении различных вариантов SARS-CoV-2, сформированного после ревакцинации различными вакцинами, в том числе с помощью построения антигенных карт.

Не вызывает сомнений, что результаты каждой из перечисленных групп экспериментов, представленных автором в работе, отличаются новизной и крайне востребованы медицинской наукой. Об этом, в частности, свидетельствуют 7 публикаций автора в рецензируемых научных журналах.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Высокая теоретическая и практическая значимость исследования во многом определяется крайне актуальными задачами исследования, а также комплексным подходом исследования В-клеточного поствакцинального и постинфекционного иммунного ответа человека. В теоретическую значимость работы без сомнений вносят свой вклад данные полученные при оценке напряженности иммунитета у добровольцев, вакцинированных различными вакцинами, а также у лиц, инфицированных SARS-CoV-2 или получивших гибридный иммунитет. Полученные знания имеют высокую ценность не только для детализации иммуногенности вакцин, применяемых в практике, но и создают основу для рационализации схем и средств вакцинопрофилактики против COVID-19. В частности, в работе нейтрализующая активность сывороток определялась у добровольцев, ревакцинированных отечественными вакцинами «Салнавак», «Спутник Лайт» на основе рекомбинантных аденовирусных векторов, а также вакциной «Comirnaty» на основе мРНК. На фоне сохраняющегося дефицита опубликованных данных такого рода, полученные результаты крайне ценны, позволяя сравнить напрямую иммуногенность вакцин, а также рациональность применяемых схем ревакцинации.

Представленная диссертационная работа отличается тем, что все полученные автором результаты имеют практическое применение. Так,

например, сравнение результатов, полученных тремя различными тестами вирус-нейтрализации, а также с использованием микрочипов позволяет оценить применимость того или иного теста для выполнения будущих работ в области инфекционной иммунологии.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа, выполненная Астаховой Екатериной Андреевной на тему: «Особенности В-клеточного иммунного ответа на антигена SARS-CoV-2» по целям, задачам, методическому подходу и полученным результатам соответствует пунктам 3 (Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противопаразитарной иммунной защиты) и 9 (Разработка и усовершенствование методов оценки качества постинфекционного и поствакцинального иммунитета, эффективности и безопасности новых вакцинных препаратов.) паспорта специальности 3.2.7. Иммунология.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 7 научных статьях в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, 6 тезисов в материалах международных и отечественных научных конференций. Опубликованные работы и содержание реферата соответствует основным научным положениям диссертации.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа написана в традиционном стиле и состоит из глав «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» «Обсуждение», «Заключение», а также включает списки сокращений и

использованной литературы. Диссертация изложена на 116 страницах, включает 47 рисунков и 1 таблицу. Список цитируемой литературы включает 179 источника, из которых 3 отечественных научных изданий и 176 англоязычных. В главе «Введение» представлены актуальность исследования, сформулированы цель и задачи исследования, определен объект исследования, представлены теоретическая и практическая значимость, указана методология и выбранные методы исследования, положения, выносимые на защиту, личный вклад автора, а также степень достоверности и апробация результатов исследования.

Глава «Обзор литературы» включает 10 подразделов. Автор детально рассматривает сам патогенный для человека вирус SARS-CoV-2, а также приводит важные с точки зрения здравоохранения особенности пандемии, вызванной SARS-CoV-2. Далее, учитывая фокус диссертационного исследования, автор переходит к детальной характеристике В-клеточного иммунитета формирующегося против SARS-CoV-2 как в краткосрочной, так и долгосрочной перспективе, особенностям формирования мукозального иммунитета. Автор представляет описание лабораторных методов оценки напряженности гуморального иммунитета против SARS-CoV-2, включая определение вирус-нейтрализующей активности антител. Отдельное внимание автор уделяет методу антигенной картографии для оценки антигенных различий между вариантами SARS-CoV-2, который затем будет использован в собственном исследовании.

В главе «Материалы и методы» автор детально указывает использованные в работе методы исследования, включая выделение, стимуляцию В лимфоцитов из периферической крови добровольцев, оценку их фенотипа и функциональную активность.

Глава «Результаты» включает четыре независимых исследования:

1) сравнение подходов (методов) к оценке вирус-нейтрализующей активности антител в сыворотке добровольцев;

- 2) исследование по оценке долговременного В-клеточного и гуморального иммунитета после вакцинации Спутником V и/или перенесенного COVID-19 добровольцев;
- 3) определение изменения в титрах вирус-нейтрализующих антител (ВНА) при ревакцинации;
- 4) определение изменения авидности сывороточных антител у добровольцев после ревакцинации от COVID-19 вакцинами Спутник V и Салнавак.

Все четыре исследования объединяются общей темой диссертационной работы, дополнительные рисунки, демонстрирующие порядок работ в каждом исследовании (дизайн), облегчают понимание информации читателем.

Стоит отметить высокий методический уровень, продемонстрированный автором при выполнении экспериментальной работы. В частности, обнаружение сформированных долгоживущих антиген-специфических В-клеток памяти, демонстрирующих способность к дифференцировке в клетки, секретирующие вирус-связывающие и вирус-нейтрализующие антитела при стимуляции *in vitro* было проведено с использованием крайне сложных к выполнению методик, требующих большого опыта экспериментальной работы. Полученные данные вносят свой вклад в понимание механизма сохранения иммунной защиты человека против COVID-19 который наблюдается спустя шесть месяцев после перенесенной инфекции/вакцинации.

В главе «Обсуждение» автор интерпретирует полученные результаты в контексте данных литературы по теме диссертации. Работа завершается общим заключением, рекомендациями и выводами, которые обобщают основные результаты исследования.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации полностью отражает основные результаты и содержание диссертации.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

При прочтении текста возникло несколько замечаний, которые касаются по большей части оформления диссертационной работы:

1. Непривычным видится использование жирного текста для зависимых пунктов в оглавлении, тогда как более крупные пункты оставлены без выделения.
2. В тех случаях, когда автор апеллирует к известным фактам, желательно указывать после описания опубликованного факта ссылки на соответствующую публикацию для возможности ознакомления. Например, «В частности, мировой литературе существуют единичные публикации о прямом сравнении иммунного ответа после повторного введения вакцины Спутник V и мРНК-вакцин» (стр.4).
3. Не ясна причина представления титров вирус-нейтрализующих антител у переболевших COVID-19 добровольцев на рисунке 9 в двух видах одновременно: точечной (dot plot) и скрипичной (violin plot) диаграмм. Тогда как для неинфицированных («здоровых») доноров использована только точечная диаграмма.
4. По аналогии с Рис 9б,в, на рис 9а для возможности сравнения методов определения вирус-нейтрализующей активности желательно было бы отобразить значения группы «здоровых» доноров.
5. Для получения новых корреляционных взаимосвязей видится ценным указать в главе «Материалы и методы» характеристику (половозрастные параметры, дата вакцинации/инфекции COVID-19 и др.) выборки добровольцев, участвовавших в исследованиях, критериев их включения/исключения.
6. Автор указывает, что «образцы второй когорты добровольцев (правая часть рисунка 3) были собраны в рамках рандомизированного двойного слепого многоцентрового клинического исследования 3-ей фазы, проведенного с февраля 2022 года по октябрь 2023 года АО

«Генериум». Для облегчения поиска желательно указать номер проведенного клинического исследования.

7. Автор использует различные термины «псевдовирус», «вирусоподобные частицы» при описании активного агента для постановки теста рVNT. На мой взгляд для облегчения как написания, так и прочтения диссертационной работы следует остановиться на каком-либо одном варианте. Также по крайней мере в главе «Материалы и методы» желательно указать, что полученные вирусоподобные частицы представляют собой лентивирусные частицы, псевдотипированные S белком.
8. Автор категорично указывает, что несмотря на то, что анти-N антитела появляются в сыворотках в первые 7 дней после инфицирования SARS-CoV-2 [Brochot et al., 2020], этот показатель, в отличие от ОТ-ПЦР, не используется для диагностики COVID-19 (стр 18). К сожалению, автор не уточняет на основании чего сделан такой вывод. Отмечу, что такое утверждение хоть и имеет под собой основание, но имеет исключение. Действительно в случае использования вакцин, содержащих в качестве вакцинного антигена N белок (например, препараты «КовиВак», «Конвасэл») детекция анти-N антител не будет маркером только лишь перенесенного COVID-19. В случае же, применения вакцин на основе S белка SARS-CoV-2 (например, «Спутник V», «Спутник Лайт», «Салнавак») появление анти-N антител может наблюдаться только в случае перенесенного COVID-19.
9. В тесте были найдены досадные опечатки:
 - «вакцинамимогут» (стр 6),
 - на рисунке 27 указаны титры нейтрализующих антител против псевдовирусов SARS-CoV-2 в сыворотках лиц до (А) и после (Б) ревакцинации Comirnaty. На соответствующих рисунках А и Б указано что обе выборке данных получены от добровольцев после ревакцинации Comirnaty.

Также возникло несколько вопросов к диссертанту, носящих дискуссионных характер:

1. На Рисунке 22 указан титр ВНА антител, полученных из стимулированных *in vitro* В-клеток памяти, против WT, вариантов Delta и Omicron. Учитывая примерно равные титры ВНА сывороток (рис. 14) между группой добровольцев переболевших COVID-19 и прошедших курс вакцинации (П/В) и группой добровольцев только лишь перенесших инфекцию SARS-CoV-2 и невакцинированных (П/нВ), как автор объясняет полученные результаты (рис. 22), свидетельствующие о том, что ВНА полученные из стимулированных *in vitro* В-клеток в группе П/В оказались ниже по сравнению с группой П/нВ?
2. На рисунке 9 в качестве группы сравнения взята группа здоровых доноров. Не ясны причины выбора такого названия. Быть может более точно назвать данную группу – «неинфицированные» добровольцы?
3. Как автор может проинтерпретировать полученные результаты, показывающие, что метод sVNT с использованием живого вируса SARS-CoV-2 определяет больший процент добровольцев, имеющих вирус-нейтрализующие антитела (101/111), по сравнению с другими методами: pVNT (91/111) и sVNT (88/111) (стр 47-48)?

Заключение

Стоит отметить, что найденные замечания по оформлению текста диссертации, а также вопросы, выносимые на дискуссию с автором, несколько не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 3.2.7. Иммунология (по биологическим наукам), а также

критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Астахова Екатерина Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Заведующий лабораторией микоплазм и L-форм бактерий
ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России,
кандидат биологических наук, Тухватулин Амир Ильдарович

16.02.2026 г.

Контактные данные:

тел.: _____, e-mail: _____

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.02.03 Микробиология, 14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология

Адрес места работы:

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18.

Тел.: +7 (499) 193-30-01; e-mail: info@gamaleya.org