

«УТВЕРЖДАЮ»

ФГАОУ ВО РНИМУ

им. Н.И. Пирогова МЗ РФ

проректор по научной работе,

д.б.н., профессор РАН



Ребриков Д.В.

ОТЗЫВ

**ведущей организации о научно-практической значимости
диссертационной работы Петуховой Екатерины Сергеевны на тему:
«Иммунобиологические свойства рекомбинантного атоксичного
пневмолизина как потенциального компонента современных
пневмококковых вакцин», представленной к защите на соискание
ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09
– клиническая иммунология, аллергология.**

Актуальность проблемы

Инфекции, вызываемые *Streptococcus pneumoniae*, являются причиной высокой заболеваемости и смертности во всем мире. Полисахаридная капсула пневмококка признана главным фактором вирулентности, ослабляющим фагоцитоз пневмококка нейтрофилами и макрофагами человека. Исходя из химической структуры полисахаридной капсулы в настоящее время идентифицировано более 95 серотипов микроба. Учитывая повышение уровня антибиотико-резистентных штаммов возбудителя, эффективным средством борьбы с этой инфекцией считают специфическую вакцинопрофилактику.

Применение полисахаридной вакцины «Pneumo 23» позволило снизить заболеваемость пневмококковыми инфекциями у взрослых.

Однако полисахаридная вакцина неэффективна у детей до 2-летнего возраста и у пожилых людей старше 65 лет. Наиболее эффективным методом усовершенствования полисахаридных вакцин является конъюгация капсульных полисахаридов с нейтральным белком-носителем, которая приводит к переключению синтеза антител с класса IgM на IgG, созреванию аффинности антител, формированию иммунологической памяти.

В настоящее время в клинической практике применяют вакцину «Превенар 13», в которой в качестве белка-носителя используют рекомбинантный дифтерийный анатоксин. Масштабные клинические исследования, проведенные в различных регионах мира, свидетельствуют о безопасности и эффективности конъюгированной вакцины. Установлено, что в популяции в результате иммунизации снижается циркуляция штаммов, входящих в состав вакцины, и, соответственно, уменьшается число инвазивных пневмококковых заболеваний, вызванных этими серотипами пневмококка.

Опыт применения конъюгированных вакцин выявил строгую специфичность по серотипу, следствием которой является отсутствие защиты от пневмококковой инфекции при инфицировании невакцированными серотипами; сложность конъюгирования капсульного полисахарида с белком-носителем; недостаточную иммуногенность некоторых капсульных полисахаридов пневмококка.

В результате при замещении клинически-значимых серотипов возбудителя полисахаридные антигены не позволяют создать внутривидовую защиту от *S. pneumoniae*. Поэтому актуальным направлением является разработка вакцины на основе белков пневмококка, которые обладают высокой внутривидовой степенью гомологии между собой и могут формировать перекрестный иммунитет. Одним из таких перспективных белков *S. pneumoniae* является пневмолизин.

Связь с планами соответствующей отрасли науки

Диссертационная работа Петуховой Е.С. выполнена в соответствии с основными направлениями научных исследований, проводимых в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы заключается в определении иммунобиологической роли рекомбинантного атоксичного пневмолизина (raPly).

Впервые выявлено, что raPly формирует серотипнезависимую защиту против 3, 4 и 6В серотипов *S. pneumoniae*.

Впервые установлено, что raPly стимулирует образование IgG1-антител в высоких титрах, причем титр антител после трехкратной иммунизации был существенно выше по сравнению с двукратной иммунизацией. Титр антител сохранялся в сыворотках мышей после последней иммунизации в течение 3-х месяцев.

Продемонстрировано, что raPly повышает экспрессию генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *TNF- α* и снижает экспрессию гена *IL-6 in vitro*. Рекомбинантный атоксичный пневмолизин увеличивает экспрессию молекулы терминальной дифференцировки дендритных клеток CD83, молекулы главного комплекса гистосоместимости класса II (MHC II), экспрессию костимуляторных молекул CD80 и CD86, что подтверждает созревание дендритных клеток.

Значимость для науки и практической деятельности полученных автором результатов

Получение нетоксичных серий рекомбинантного пневмолизина позволило автору подробно исследовать иммунобиологические свойства данного белка. Рекомбинантный атоксичный пневмолизин по итогам

диссертационной работы можно рассматривать в качестве перспективного кандидата для включения в состав экспериментальной пневмококковой белковой вакцины с серотипнезависимой активностью.

На основе пневмолизина можно разработать диагностическую тест-систему для определения сывороточных антител, так как данный белок играет важную роль в развитии воспаления в нижних дыхательных путях и, соответственно, антитела могут быть свидетелем инфекционного процесса.

Полученные данные о способности gaPly активировать эффекторы врожденного иммунитета и модулировать экспрессию генов врожденного иммунитета имеют большое фундаментальное значение, так как открывают подходы к изучению механизма действия рекомбинантного белка.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии в выполнении всех разделов данного исследования, в анализе полученных данных и статистической обработке. Автор принимала участие в получении серий рекомбинантного пневмолизина, в иммунизации лабораторных животных, в постановке опытов по заражению и выявлению активной защиты. Автор осуществляла забор крови у мышей из хвостовой вены для постановки ИФА с целью определения титра антител к gaPly. Автор выделяла образцы РНК и осуществляла постановку реакции обратной транскрипции и ПЦР-РВ для оценки влияния gaPly на экспрессию генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *IL-6* и *TNF- α* .

Степень достоверности и обоснованности научных положений и выводов

Достоверность полученных данных и научных положений подтверждается достаточным объемом исследований, использованием современных микробиологических, физико-химических, иммунологических и молекулярно-биологических методов. Статистические методы обработки,

использованные соискателем в работе, позволили сделать обоснованные выводы.

Оценка оформления диссертации, ее завершенности

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 21 отечественных и 158 зарубежных источников. Работа изложена на 113 страницах, содержит 12 рисунков и 17 таблиц.

Цель исследования сформулирована четко и заключается в изучении способности рекомбинантного атоксичного пневмолизина формировать иммунный ответ к разным серотипам *Streptococcus pneumoniae* и влиять на эффекторы врожденного иммунитета. Пять поставленных задач полностью соответствуют поставленной цели работы.

В обзоре литературы автор анализирует современное состояние проблемы пневмококковых инфекций, разнообразные факторы патогенности микроба и существующие пневмококковые вакцины, отмечая их достоинства и недостатки. Соискатель приводит современные экспериментальные пневмококковые вакцины, акцентируя внимание на отсутствии зарегистрированных вакцин, содержащих белки пневмококка, и, в частности, пневмолизина.

В первой главе диссертации автор детально описывает материалы и методы исследования, в том числе методы статистического анализа.

Во второй и третьей главах собственных исследований автор приводит данные о наработке и иммунохимической характеристике двух серий препарата рекомбинантного пневмолизина, об отсутствии его токсичности *in vivo* и *in vitro*.

В четвертой главе автором изучены иммунобиологические свойства рекомбинантного атоксичного пневмолизина (raPly). В частности, показано, что изучаемый препарат защищает мышей в модели системной инфекции от

серотипов 3, 4 и 6В *S. pneumoniae*. Установлена прямая корреляция между кратностью иммунизации и выработкой IgG1-антител. При трехкратной иммунизации определялся более высокий титр антител, чем при двукратной иммунизации. Интересно отметить, что не было обнаружено прямой корреляции между кратностью введения белка и выживаемостью мышей. Кроме того, отмечена роль адьюванта – гидроксида алюминия, который усиливает иммуногенность гаРly.

В пятой главе представлены материалы по изучению действия гаРly на экспрессию генов Toll-подобных рецепторов и цитокинов, а также на эффекторы врожденного иммунитета.

В разделе «Заключение» отражена актуальность работы, обобщены собственные данные, отмечена практическая значимость выполненной работы. Диссертационную работу завершают семь выводов полностью соответствующих поставленным задачам и вытекающих из проведенного исследования.

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК и полностью отражает содержание диссертации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 3 статьи – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Имеются некоторые неточности в описании методов исследования, стилистические погрешности, которые, однако, не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Петуховой Екатерины Сергеевны «Иммунобиологические свойства рекомбинантного атоксичного пневмолизина как потенциального компонента современных пневмококковых вакцин» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством кандидата медицинских наук

Воробьева Дениса Сергеевича, содержащей новое решение актуальной научной задачи по разработке профилактического препарата против пневмококковых заболеваний на основе белков *S. pneumoniae*, имеющей существенное значение для клинической иммунологии.

Диссертация Петуховой Екатерины Сергеевны полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г.), предъявляемым кандидатским диссертациям, а ее автор, Петухова Е.С., заслуживает присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Отзыв на диссертацию Петуховой Екатерины Сергеевны рассмотрен и утвержден на заседании кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России от 19 апреля 2021 г., протокол № 26.

Отзыв составила:

Профессор кафедры иммунологии, доктор медицинских наук Стенина Марина Александровна Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, ФГАОУ ВО РНИМУ

Подпись проф., д.м.н. Стениной М.А. заверяю.
Ученый секретарь
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова
Минздрава России
к.м.н., доцент


Демина Ольга Михайловна

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1
Тел.:(495) 434-14-22 e-mail:rsmu@rsmu.ru