

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Пинегина Бориса Владимировича на диссертацию Петуховой Екатерины Сергеевны «Иммунобиологические свойства рекомбинантного атоксичного пневмолизина как потенциального компонента современных пневмококковых вакцин» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Актуальность темы

Пневмококковые инфекции являются актуальной медико-социальной проблемой для всего мира. По данным ВОЗ ежегодно от пневмококковой инфекции погибает более 1 млн. человек, причем половину из них составляют дети в возрасте до 5 лет. *Streptococcus pneumoniae* вызывает инвазивные (пневмония, менингит, сепсис) и неинвазивные (отит) формы заболеваний, которые нередко приводят к бактерионосительству. Единственным способом профилактики таких осложнений является вакцинация.

В настоящее время успешно применяются зарубежные вакцины: полисахаридная «Пневмо-23» и конъюгированные («Превенар-13», «Синфлорикс») с нейтральным белком-носителем, которые позволяют создать защиту против большинства актуальных серотипов пневмококка. Однако «Пневмо-23» неэффективна у детей младше 2-х лет, а также недостаточно эффективна у пожилых людей старше 65 лет с высоким риском развития пневмококковых заболеваний. Конъюгированные пневмококковые вакцины способны защищать как детей первых 5 лет жизни, так и лиц старше 65 лет, поскольку белок-носитель вызывает формирование Т-клеточного иммунного ответа к конъюгированным полисахаридам. Несмотря на

положительный опыт применения конъюгированных вакцин, остаются такие нерешенные вопросы как: замещение вакцинных серотипов возбудителя на невакцинные; рост числа антибиотикоустойчивых штаммов пневмококка.

В связи с этим актуальным представляется определение защитной роли белков пневмококка, так как последние обладают внутривидовой перекрестной активностью и теоретически могут быть использованы в вакцине против пневмококковой инфекции для усиления специфического иммунного ответа. Исследователи выделяют белки микроба, которые обладают наиболее выраженными вирулентными и иммуногенными свойствами: пневмолизин, поверхностный пневмококковый белок А, поверхностный пневмококковый антиген А и ряд других белков. Пневмолизин занимает одно из центральных мест среди всех белковых антигенов *S. pneumoniae*, поскольку является консервативным белком и обладает высокой гомологией внутри вида, что позволяет использовать его в качестве перспективного кандидата для разработки вакцины с серотипнезависимой активностью.

Таким образом, изучение иммунобиологических свойств пневмолизина необходимо для разработки профилактического препарата от пневмококковой инфекции, что является актуальным и значимым вопросом для современной иммунологии.

Степень обоснованности научных положений и выводов

В диссертационной работе использован большой экспериментальный материал. Получены две серии препарата рекомбинантного пневмолизина, которые были сравнимы по концентрации. Обе серии не были токсичны, что подтверждено в опытах *in vitro* и *in vivo*. В опытах активной защиты животных протективный эффект наблюдался при использовании белка в дозе 25 мкг/мышь. В результате многочисленных экспериментов выявлено, что при трехкратной иммунизации мышей рекомбинантным атоксичным пневмолизином (raPly) в дозе 25 мкг/мышь, адсорбированным на гидроксиде

алюминия в дозе 200 мкг/мышь формировались высокие титры IgG1-антител, которые длительно сохранялись в сыворотке крови животных.

В опытах *in vitro* изучено влияние гаРly на экспрессию генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *TNF-α* и *IL-6*, а также установлено, что гаРly вызывал созревание дендритных клеток (ДК). Об этом свидетельствовала экспрессия молекулы терминальной дифференцировки ДК CD83 и молекулы главного комплекса гистосовместимости МНС II, а также увеличение количества ДК с костимулирующими молекулами CD80/86. Таким образом, препарат рекомбинантного атоксичного пневмолизина оказывал стимулирующее влияние как на эффекторы врожденного, так и адаптивного иммунитета.

В работе использовались современные микробиологические, физико-химические, иммунологические и молекулярно-биологические методы. Методы статистической обработки, использованные диссертантом в работе, позволили сделать обоснованные выводы.

Все выводы и научные положения корректны и вытекают из логики выполнения экспериментальной работы.

Научная новизна диссертационной работы

Научная новизна диссертационной работы заключается в изучении иммунобиологической роли рекомбинантного атоксичного пневмолизина.

Автором показано, что рекомбинантный пневмококковый пневмолизин не был токсичным.

Впервые выявлено, что гаРly формирует серотипнезависимую защиту против вирулентных серотипов *S. pneumoniae* и стимулирует образование IgG1-антител в высоких титрах после трехкратной иммунизации. Титр антител сохранялся в сыворотках мышей после последней иммунизации в течение 3-х месяцев.

Автором установлено, что гаРly повышает экспрессию генов *TLR2*, *TLR4*, *TNF-α* и снижает экспрессию гена *IL-6*. Рекомбинантный атоксичный

пневмолизин вызывает созревание ДК. Полученные результаты свидетельствуют, что гаРly активует эффекторы врожденного иммунитета.

Практическое значение исследования

Несомненно, рекомбинантный атоксичный пневмолизин по итогам диссертационной работы можно рассматривать в качестве перспективного антигена для разработки экспериментальной белковой с серотипнезависимой активностью или конъюгированной пневмококковой вакцины.

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа построена по общепринятому плану и включает в себя введение, обзор литературы, 4 главы собственных исследований, заключение, выводы, список литературы. Работа изложена на 113 страницах, имеет 12 рисунков и 17 таблиц. Список литературы включает 179 источников, из них 21 – отечественные работы.

В разделе «Введение» автор обосновывает актуальность исследования, формулирует цель и задачи исследования, отражает научную новизну, практическую значимость, положения, выносимые на защиту, сведения об апробации и публикациях. Пять поставленных задач полностью соответствуют поставленной цели работы.

В обзоре литературы автор анализирует современное состояние проблемы пневмококковых инфекций, существующие пневмококковые вакцины, отмечая их достоинства и недостатки; подробно рассматривает современные экспериментальные пневмококковые вакцины, акцентируя внимание на отсутствии коммерческих вакцин, содержащих пневмолизин.

В разделе «Материал и методы исследования» подробно описаны используемые экспериментальные методы в работе.

Результаты собственных исследований представлены в 4-х главах. Во второй главе автор приводит данные о получении 2-х серий препарата рекомбинантного пневмолизина и его иммунохимической характеристике.

Третья глава содержит данные об отсутствии токсичности препарата рекомбинантного пневмолизина. В эксперименте *in vitro* в культуре клеток Vero показано, что при добавлении рекомбинантного пневмолизина в концентрации до 10 мкг/мл не происходило нарушения клеточного метаболизма и, соответственно, гибели клеток. При внутрибрюшинном введении мышам препарата в дозах от 12,5 мкг/мышь до 100 мкг/мышь белок не влиял на снижение веса животных.

В четвертой главе изучаются иммунобиологические свойства рекомбинантного атоксичного пневмолизина. В серии экспериментов *in vivo* доказано, что изучаемый препарат защищает мышей в модели системной инфекции от 3-его, 4-ого и 6В серотипов *S. pneumoniae* и вызывает задержку гибели животных от 5 серотипа *S. pneumoniae*. Выявлено, что оптимальная иммунизирующая доза гаР1у составила 25 мкг/мышь. Автором установлено, что есть прямая корреляция между кратностью иммунизации и выработкой IgG1-антител. Так, при трехкратной иммунизации мышей формируется более высокий титр антител, чем при двукратной иммунизации. Кроме того, отмечена роль адьюванта – гидроксида алюминия – для усиления иммуногенности рекомбинантного белка.

В пятой главе представлены материалы по изучению действия гаР1у на эффекторы врожденного иммунитета. Автором получены данные, демонстрирующие, что рекомбинантный белок влияет на экспрессию генов Toll-подобных рецепторов и цитокинов и вызывает созревание ДК.

В разделе «Заключение» автор проводит подробный анализ полученных данных и сопоставляет их с литературными данными. Работу завершают семь выводов, полностью соответствующих поставленным задачам. Автореферат содержит основные результаты исследований, представленные в диссертации, и полностью отражает ее содержание. Тема диссертации, основные положения, выносимые на защиту, и выводы полностью соответствуют специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология».

Личный вклад автора

Автор непосредственно принимала участие в выполнении всех разделов данного исследования, в анализе и статистической обработке полученных данных. Автор освоила метод выделения образцов РНК из клеточных культур и осуществляла постановку реакции обратной транскрипции и ПЦР-РВ для оценки влияния *gaP1y* на экспрессию генов-эффекторов врожденного иммунитета.

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 3 статьи – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ. Материалы диссертации представлены автором на четырех международных научно-практических конференциях.

Принципиальных замечаний нет. Однако в порядке дискуссии хотелось бы задать автору несколько вопросов:

- 1) Почему в качестве модели для оценки токсичности рекомбинантного пневмолизина использовали клеточную линию Vero?
- 2) Формирует ли иммунный ответ у животных рекомбинантный атоксичный пневмолизин без добавления адьюванта?
- 3) При изучении экспрессии генов провоспалительных цитокинов рекомбинантный пневмолизин вызывал снижение экспрессии гена *IL-6*. Связано ли это с отсутствием токсичности препарата или же с возможным механизмом действия, описанным в литературе?

Заключение

Представленная работа является законченным научным исследованием, выполненным на современном методическом уровне и значительном экспериментальном материале. Поставленные в работе цель и задачи выполнены в полном объеме. Полученные результаты по иммунобиологическим свойствам рекомбинантного атоксичного пневмолизина дополняют знания в фундаментальном и прикладном аспекте

современной иммунологии. Полученные данные об отсутствии токсичности рекомбинантного пневмолизина позволяют использовать рекомбинантный белок в качестве перспективного антигена для разработки серотипнезависимой пневмококковой вакцины.

По своей актуальности, решению поставленных задач, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертация Петуховой Екатерины Сергеевны полностью отвечает 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 заслуживает присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология».

Официальный оппонент:

Заведующий отделом иммунодиагностики и иммунокоррекции
ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России,
доктор медицинских наук, профессор,

Пинегин Борис Владимирович

26 апреля 2021 г.

Место работы:

ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России
115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 2

Тел.: +7 916 593-86-18 эл. почта: bvpinegin@yandex.ru

<https://nrcii.ru>

