

ОТЗЫВ

официального оппонента заслуженного деятеля науки РФ, доктора медицинских наук, профессора Афанасьева Станислава Степановича 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

Создание препаратов для профилактики пневмококковой инфекции является одним из актуальных направлений современных научных исследований в области иммунологии. По оценке экспертов ВОЗ, данная бактериальная инфекция является наиболее распространенной в мире. Она является причиной заболеваний в таких группах населения как: дети младшего возраста, лица пожилого возраста, а также люди с ослабленным иммунитетом. По данным отечественных авторов, в России в 2017 г. частота случаев внебольничной пневмонии составляла 412 на 100000 населения, а среди детей в возрасте от 1 до 2-х лет – 1470 случаев на 100000. Тяжесть заболевания определяется состоянием иммунитета восприимчивого организма, вирулентностью возбудителя, а также инфицирующей дозой. Формирование типоспецифического иммунитета после перенесенной инфекции предотвращает повторную колонизацию *Streptococcus pneumoniae* соответствующего серотипа и клинически выраженные заболевания, но не позволяет защищать от инфицирования другими серотипами пневмококка. Кроме того, в последние годы наблюдается рост числа инвазивных форм пневмококковой инфекции и увеличение количества штаммов, обладающих резистентностью к антибиотикам.

В связи с этим, единственной эффективной мерой для предотвращения распространения пневмококковых заболеваний является вакцинация. Опыт применения полисахаридных и конъюгированных полисахаридных пневмококковых вакцин свидетельствует о снижении заболеваемости не только среди вакцинированных лиц, но также и среди невакцинированных. Однако необходимо отметить, что данные вакцины формируют строгий серотипспецифический иммунный ответ, что наряду с ограничением количества серотипов, от которых защищает вакцина приводит к увеличению колонизации слизистой носоглотки невакцинными серотипами, а также повышается частота колонизации носоглотки другими бактериями, такими как *Staphylococcus aureus* и *Haemophilus influenzae*.

Поэтому перспективным направлением представляется разработка серотипнезависимой вакцины на основе белков *S. pneumoniae*, которые, как известно, обладают высокой гомологией между собой и могут формировать перекрестную внутривидовую защиту или же разработка конъюгированной вакцины, включающей в себя актуальные полисахариды и белки пневмококка. Вакцины, в состав которых будут входить полисахаридные и белковые антигены пневмококка, предположительно должны создавать более выраженную защиту против *S. pneumoniae* по сравнению с вакцинами, основанными только на полисахаридных или белковых антигенах. В настоящее время в мире нет ни одной такой зарегистрированной вакцины.

Таким образом, изложенное выше определяет актуальность настоящей диссертационной работы, посвященной исследованию иммунобиологических свойств рекомбинантного атоксичного пневмолизина.

Обоснованность и достоверность результатов

Репрезентативность диссертационной работы определяется большим экспериментальным материалом. Автор получил две серии препарата рекомбинантного пневмолизина примерно равнозначные по концентрации. В опытах *in vitro* и *in vivo* было подтверждено отсутствие токсичности у

рекомбинантного белка, что позволило описывать его как рекомбинантный атоксичный пневмолизин (raPly). В опытах на мышах выявлено, что наибольшим протективным эффектом обладала доза белка 25 мкг/мышь. Автором установлено, что для повышения иммуногенности рекомбинантного белка необходимо адсорбировать препарат на гидроксиде алюминия и проводить трехкратную иммунизацию мышей, на фоне которой формировались высокие титры IgG1-антител. В то же время интересно отметить, что в эксперименте не было обнаружено прямой корреляции между кратностью иммунизации и формированием защиты у животных.

В опытах *in vitro* изучено, что raPly увеличивает экспрессию генов *TLR2*, *TLR4*, *TNF- α* и снижает экспрессию гена *IL-6*. Под влиянием raPly происходило созревание дендритных клеток (ДК) мышей. Об этом свидетельствовала экспрессия мембранных молекул CD80/86, CD83 и молекулы главного комплекса гистосовместимости МНС II.

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных микробиологических, иммунологических и молекулярно-биологических методов. Статистические методы, использованные автором в работе, позволили сделать обоснованные выводы.

Все выводы и научные положения диссертации обоснованы и вытекают из логики выполнения работы.

Научная новизна исследования

Научная новизна заключается в изучении иммунобиологической роли рекомбинантного атоксичного пневмолизина. Большинство исследователей получают токсичную форму пневмолизина, а затем с помощью молекулярно-биологических методов переводят ее в нетоксичный вариант, в то время как автором показано, что рекомбинантный пневмококковый пневмолизин исходно не был токсичным.

Автором выявлено, что rаPly формирует защиту против 3-его, 4-ого и 6В серотипов *S. pneumoniae* и стимулирует образование IgG1-антител в высоких титрах после трехкратного введения препарата мышам.

При изучении влияния rаPly на экспрессию генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *TNF- α* и *IL-6* установлено, что под действием рекомбинантного белка снижается экспрессия гена *IL-6*, что можно характеризовать как противовоспалительный эффект.

Практическое значение исследования

Диссертационная работа выполнена в рамках темы НИР НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова: «Создание современных вакцин для специфической профилактики и лечения бактериальных респираторных и внутрибольничных инфекций» и, безусловно, имеет большое прикладное значение, так как рекомбинантный атоксичный пневмолизин можно рассматривать в качестве перспективного кандидата для создания экспериментальной серотипнезависимой пневмококковой белковой вакцины или конъюгированной вакцины, где в качестве белка-носителя можно будет использовать rаPly.

Второе прикладное направление – разработка диагностической тест-системы на основе рекомбинантного пневмококкового белка пневмолизина для идентификации тяжелых клинических заболеваний пневмококковой этиологии методом ИФА – выполняется в рамках соглашения о сотрудничестве между ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова и ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Структура диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному плану, изложена на 113 страницах машинописного текста, иллюстрирована 12 рисунками и 17 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов и списка цитируемой

литературы, включающего в себя 179 источников, 158 из которых – иностранные работы.

Цель и задачи сформулированы четко и ясно. Для достижения поставленных задач автором использованы современные методы. Для обработки результатов применено программное обеспечение статистического анализа.

В обзоре литературы подробно описаны современные данные по проблеме пневмококковых заболеваний. Автор анализирует роль белковых факторов патогенности микроба в развитии пневмококковой инфекции; рассматривает полисахаридные и конъюгированные пневмококковые вакцины, отмечая их достоинства и недостатки; определяет современные направления в разработке экспериментальные пневмококковых вакцин с серотипнезависимой протективной активностью.

Результаты собственных исследований изложены со 2 по 5 главы. Во второй главе автор описывает получение 2-х серий препарата рекомбинантного пневмолизина. Третья глава содержит данные, подтверждающие отсутствие токсичности препарата *in vitro* и *in vivo*. Четвертая глава является определяющей по изучению иммунобиологической активности рекомбинантного атоксичного пневмолизина. В многочисленных опытах *in vivo* доказано, что при внутрибрюшинном заражении животных исследуемый рекомбинантный белок защищает мышей от вирулентных серотипов пневмококка и вызывает задержку гибели животных от серотипа 5 *S. pneumoniae*. Определена оптимальная иммунизирующая доза гаРly – 25 мкг/мышь. Автором доказано, что на выработку IgG1-антител влияет кратность иммунизации, а именно при трехкратном введении препарата образуются наиболее высокие титры антител у мышей. Установлено, что гидроксид алюминия усиливает иммунный ответ к рекомбинантному белку в дозе 200 мкг/мышь. В пятой главе приведены данные по оценке влияния гаРly на ключевые эффекторы врожденного иммунитета. Автором показано,

что рекомбинантный белок влияет на экспрессию генов *TLRs* и *цитокинов* и вызывает созревание ДК.

В заключении автором подробно анализируются полученные данные и сопоставляются результаты исследования с данными других авторов.

Выводы содержательны и соответствуют поставленной цели и задачам исследования, вытекают из данных, представленных в работе.

Диссертационная работа Петуховой Е.С. написана хорошим литературным языком, грамотно.

Автореферат отражает основное содержание диссертации.

Принципиальных замечаний нет. Имеются стилистические погрешности, которые не влияют на высокую положительную оценку работы.

Каковы перспективы повышения иммуногенности предлагаемого препарата и сокращения кратности его введения?

Заключение

Диссертационная работа Петуховой Екатерины Сергеевны «Иммунобиологические свойства рекомбинантного атоксичного пневмолизина как потенциального компонента современных пневмококковых вакцин», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» является законченной научно-квалификационной работой, имеющей существенное значение для науки и практики. Полученные данные об отсутствии токсичности рекомбинантного пневмолизина позволяют рассматривать его в качестве потенциального вакцинного кандидата для разработки отечественной пневмококковой вакцины с серотипнезависимой активностью.

Таким образом, диссертационная работа 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 заслуживает присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология».

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,

заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор,

Афанасьев Станислав Степанович

27 апреля 2021 г.

Место работы:

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора

125212, г. Москва, Адмирала Макарова, д. 10

Тел.: +7 903 667-20-68 эл. почта: afanasievss409.4@bk.ru

<http://www.gabrich.com>

Подпись С.С. Афанасьева «заверяю»:

Начальник отдела кадров

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского

Роспотребнадзора



Т.М. Лазунина