

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Калининченко Евгения Олеговича «Иммунобиологические свойства комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология»

Актуальность научного исследования

Инфекции, вызываемые у человека синегнойной палочкой *Pseudomonas aeruginosa*, являются актуальной проблемой современного здравоохранения. Эти инфекции значительно усугубляют течение раневых процессов, особенно ожоговых поражений. *Pseudomonas aeruginosa* распространена в госпитальных условиях в качестве внутрибольничного патогена, вызывающего инфекции у ослабленных, иммунокомпрометированных пациентов, особенно после различных инвазивных манипуляций. Этот патоген вызывает хроническую колонизацию дыхательных путей больных муковисцидозом, приводя к ускоренному прогрессированию дыхательной недостаточности и смерти.

В наши дни, в условиях пандемии коронавирусной инфекции, реанимационные отделения переполнены тяжелыми больными, многие из которых, находясь на аппаратах ИВЛ, получают пневмонию, вызванную синегнойной палочкой. Спасти таких больных крайне тяжело, поскольку *P. aeruginosa* отличается малой чувствительностью к антибиотикам.

Широкое распространение штаммов со множественной устойчивостью к антибиотикам не оставляет другого пути борьбы с этой инфекцией. Все надежды на создание эффективной вакцины и иммунопрофилактику. В настоящее время в клинической практике нет общепринятой вакцины с доказанной эффективностью, способной решить проблему множества различных инфекций *P. aeruginosa*. Следовательно, разработка вакцин для иммунопрофилактики инфекций *P. aeruginosa* является одной из самых актуальных задач современной медицины и иммунобиологии.

В НИИВС им И.И. Мечникова получены различные рекомбинантные белки этой бактерии, в том числе белки порин OprF и делеционная нетоксичная форма экзотоксина А, или анатоксин, показавшие свою протективную активность на животных моделях и аддитивный эффект совместного применения. Диссертационная работа Е.О. Калининченко является логическим продолжением этих работ, она посвящена изучению иммунобиологических свойств комплекса белков OprF и анатоксина А, адсорбированных

на адьюванте – гидроксиде алюминия. Фактически, эта работа представляет собой доклинические исследования кандидатного вакцинного препарата для профилактики синегнойной инфекции.

Содержание диссертационной работы

Диссертация Е.О. Калиниченко построена по традиционному плану, включает в себя введение, обзор литературы, методы исследования, четыре главы с результатами исследований, заключение, выводы, список литературы. Работа изложена на 146 страницах, имеет 27 таблиц, иллюстрирована 4 рисунками. Список литературы включает 289 источников, из них 26 — отечественные работы.

В разделе «Введение» автор, обосновывая актуальность исследования, кратко характеризует проблему инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, и современные научные представления об иммунопрофилактике этих инфекций; излагает поставленные цели и задачи исследования, характеризует научную новизну и значимость работы, формулирует положения, выносимые на защиту. Также в этом разделе изложены структура работы, публикации автора по теме и его личный вклад в работу.

В обзоре литературы диссертант дает краткую характеристику бактерии *P. aeruginosa* и ее жизнедеятельности в качестве инфекционного агента, рассматривает вопросы эпидемиологии, факторов риска и механизмов патогенеза вызванных этой бактерией инфекций, особенности иммунного ответа организма при этих инфекциях и связанные с ними направления разработки вакцин. Также в обзоре кратко освещены вопросы разработки и исследования вакцин против *P. aeruginosa*, история и современное состояние этой проблемы, а также дана характеристика белков этой бактерии OprF и экзотоксина А как факторов вирулентности и кандидатных антигенов при разработке вакцин, а также приведены данные об исследованиях этих белков в НИИВС им. И.И. Мечникова.

В главе «Методология и методы исследования» подробно описаны использованные методы исследований, включающие опыты *in vitro* и *in vivo*, посвященные изучению свойств комплекса рекомбинантных белков и воздействия его на механизмы иммунного ответа.

В следующих четырех главах представлены результаты собственных исследований. Автор приводит результаты изучения безопасности комплекса рекомбинантных белков, а именно, исследование острой токсичности, аллергенности, иммунотоксичности, пирогенности, которые свидетельствуют об отсутствии неблагоприятных побочных эффектов. Отдельная глава посвящена исследованиям влияния

препарата на механизмы врожденного звена иммунного ответа. В ней диссертант показывает стимулирующее влияние комплекса на фагоцитарную и бактерицидную активность лейкоцитов, способность его вызывать созревание дендритных клеток и стимулировать секрецию этими клетками спектра цитокинов в культуре дендритных клеток и в организме мыши после иммунизации.

Подробно исследовано влияние иммунизации комплексом рекомбинантных белков на адаптивное звено иммунного ответа, а именно – изменение субпопуляционного состава клеток селезенки, продукцию специфических антител различных классов и субклассов к целевым антигенам *Pseudomonas*, использованным в составе изученного в работе комплекса. Принципиально важными являются результаты автора о протективном действии иммунизации комплексом рекомбинантных белков в модели летального и сублетального заражения мышей *Pseudomonas aeruginosa*. Исследованный комплекс белков, адсорбированный на гидроокиси алюминия, оказывал выраженное протективное действие, что позволяет рассматривать этот комплекс в качестве кандидатной вакцины против синегнойной инфекции.

В главе «Заключение» диссертант проводит анализ полученных данных и сопоставляет их с имеющимися в научной литературе сведениями по проблеме.

Работу завершают 8 выводов и список литературы. Выводы диссертационной работы вытекают из основных результатов диссертационной работы, в полной мере соответствуют поставленным целям и задачам. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость

Научная новизна представленной диссертационной работы заключается в иммунобиологической характеристике комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина синегнойной палочки как перспективного иммунобиологического препарата. Автором показано отсутствие неблагоприятных побочных эффектов в опытах на животных, что позволяет рекомендовать препарат к исследованию на людях. Доказан протективный эффект иммунизации комплексом рекомбинантных белков в отношении заражения *Pseudomonas aeruginosa*. Впервые охарактеризовано влияние препарата на механизмы врожденного иммунитета, в том числе на неспецифическую фагоцитарную и бактерицидную активность лейкоцитов, доказана способность его индуцировать созревание дендритных клеток и секрецию ими Th1\Th2\Th17 цитокинов. Показано индуцированное иммунизацией изменение уровня цитокинов в крови и изменение профиля цитокинов, которые секретируют клетки селезенки мышей, иммунизированных

комплексным препаратом белков OprF и анатоксина А, адсорбированных на гидроокиси алюминия.

Впервые выявлены изменения субпопуляционного состава клеток селезенки после иммунизации исследованным иммуногенным комплексом. Они заключаются в нарастании уровня Т-хелперов и В-лимфоцитов, а также клеток с маркерами активации. Детально охарактеризован антительный ответ на иммунизацию комплексом рекомбинантных белков, включая спектр изотипов антител и продолжительность их продукции после иммунизации.

Полученные диссертантом данные значительно расширяют знания о реакциях иммунной системы на белковые компоненты актуального патогена – *P. aeruginosa*. Кроме того, результаты работы создают отличную основу для дальнейшего доклинического и клинического изучения комплекса рекомбинантных белков *P. aeruginosa* в качестве кандидатной вакцины.

Степень обоснованности научных положений и выводов

В диссертационной работе получен большой экспериментальный материал с использованием хорошо стандартизованных методик. Безопасность комплекса рекомбинантных белков исследована на животных с помощью общепринятых методов доклинических исследований иммунобиологических препаратов. Исследования воздействия препарата на механизмы врожденного и адаптивного иммунитета проведены на высоком научном уровне, с использованием современных точных методов, таких как проточная цитометрия и иммуноферментный анализ. Протективный эффект комплекса рекомбинантных белков был доказан в опыте с внутрибрюшинным заражением мышей.

Полученные экспериментальные данные достоверны, имеют необходимое количество повторностей, обработаны с применением адекватных методов статистики. Объем проведенных исследований достаточен для выработки обоснованных заключений и выводов.

Недостатки и замечания

Принципиальных замечаний по работе нет. Есть непринципиальные замечания и комментарии, имеющие характер пожеланий на будущее:

1. Считаю неудачными использованные диссертантом термины: «биопленкообразование», «опсонофагоцитоз», «антибиотикоустойчивость» (стр. 16, 17).
2. Результаты влияния исследованного препарата на продукцию клеток, секретирующих антитела против антигенов гетерологичных (бараньих) эритроцитов (стр. 42), следовало трактовать не как поликлональное, а адьювантное действие, поскольку через

полчаса после внутривнутрибрюшинного введения препарата туда же (внутрибрюшинно) вводили антиген – бараньи эритроциты.

3. Неудачно выражение «вторичные антимышьи антитела» (стр. 51), лучше было бы использовать «кроличьи антитела, специфичные к иммуноглобулинам мыши».

4. При изучении иммуногенного комплекса в культуре клеток *in vitro* (стр. 48-49) следовало указать, каким методом стерилизовали исследуемый комплекс белков на гидроокиси алюминия.

5. При исследовании влияния препарата на дендритные клетки (стр. 70-75) диссертант идентифицировал две популяции дендритных клеток – миелоидные CD11c⁺CD123⁻ и плазмацитоидные CD11c⁻CD123⁺. Было бы полезно отнести усиление экспрессии CD80, CD86, МНС-I, МНС-II не ко всем клеткам в культуре, а к каждой из двух популяций дендритных клеток, в отдельности.

Личный вклад автора и публикация результатов диссертационной работы.

Автор принимал непосредственное участие в выполнении всех разделов представленной диссертационной работы, в анализе и статистической обработке полученных данных.

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них 10 - в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией. Материалы диссертации представлены автором на пяти научных конференциях.

Заключение

Диссертационная работа Калиниченко Евгения Олеговича «Иммунобиологические свойства комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*», является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для иммунологии: исследована безопасность комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* с адьювантным гелем гидроокиси алюминия, в том числе, доказано отсутствие общих токсических, пирогенных, иммунотоксических и алергизирующих свойств при введении лабораторным животным; описаны механизмы действия исследованного комплекса на важнейшие звенья врожденного и адаптивного иммунитета, заключающиеся в активации фагоцитарной и бактерицидной активности моноцитов и гранулоцитов, стимуляции дифференцировки дендритных клеток в зрелые антиген-презентирующие клетки, усиленно экспрессирующие молекулы МНС классов I и II, ко-активационные рецепторы CD80, CD86

и секретирующие спектр иммуностимулирующих цитокинов, необходимых для интенсивной продолжительной продукции антител, а также Th1-, Th2- и Th17-клеток, определяющих развитие защитных реакций против инфекции; детально охарактеризованы антигенная специфичность, интенсивность и динамика продукции, а также изотипический состав специфических антител к целевым антигенам (OprF и анатоксин), использованным в составе иммуногенного комплекса; показан высокий уровень протекции иммунизированных экспериментальных животных от заражения летальными и сублетальными дозами *Pseudomonas aeruginosa*.

Диссертация полностью соответствует требованиям к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология».

Официальный оппонент:

Атауллаханов Равшан Иноятovich,
 доктор медицинских наук, профессор,
 руководитель отдела иммунной биотехнологии
 ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
 ФМБА России

