

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Шубиной Ирины Жановны на диссертационную работу Зайцева Антона Евгеньевича «**Иммуногенность и протективная активность конъюгированных олигосахаридов – синтетических аналогов фрагментов капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3**» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Актуальность темы

Необходимость применения пневмококковых вакцин была научно и статистически обоснована, в связи с чем в 2014г. пневмококковые вакцины были включены в Национальный календарь прививок. Профилактика пневмококковой инфекции привела к снижению количества заболеваний, вызываемых некоторыми серотипами *Streptococcus pneumoniae*.

Современные пневмококковые вакцины конструируют при использовании бактериальных капсульных полисахаридов (КП) соответствующих серотипов пневмококка или конъюгатов капсульных полисахаридов с белком-носителем с добавлением адьюванта.

В последние десятилетия с целью повышения эффективности вакцин и снижения их побочного действия интенсивно развивается направление по конструированию синтетических вакцин. Недостаточная иммуногенность капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3 стала основанием для разработки вакцинных прототипов на базе синтетических олигосахаридов.

Учитывая значительный практический интерес к созданию синтетических вакцин, актуальность диссертационной работы Зайцева Антона Евгеньевича, посвящённой изучению иммунобиологических свойств олигосахаридов, соответствующих фрагментам капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3, не вызывает сомнений. В ходе работы использовались модифицированные методы синтеза олигосахаридов и конъюгации их с белком-носителем, что положительно отличает данное исследование от аналогичных разработок зарубежных авторов.

Степень обоснованности научных положений и выводов диссертации

В настоящем исследовании представлены новые данные по исследованию иммунобиологических свойств конъюгатов бычьего сывороточного альбумина (БСА) с олигосахаридами, соответствующими фрагментам капсульного полисахарида *S.*

pneumoniae серотипа 3. Автор показал, что синтетические ди-, три- и тетрасахариды являются структурно родственными указанному капсульному полисахариду и обладают общими с ним углеводными компонентами. Это положение доказано с помощью разных модификаций ИФА, при этом сделано заключение о том, что именно тетрасахарид более активно взаимодействует с антителами к капсульному полисахариду *S. pneumoniae* серотипа 3, не вступая в реакцию с антителами другой углеводной специфичности, при этом антитела, индуцированные к тетрасахариду, специфичны к капсульному полисахариду. Результаты исследования получены на сертифицированном оборудовании с использованием современных иммунологических методов.

При сравнительном исследовании иммуногенной и протективной активности конъюгатов олигосахаридов опыты проводили на достаточном количестве животных, сравнивали данные по введению конъюгатов с адъювантом и без адъюванта. Используемые адекватные методы статистической обработки полученных результатов свидетельствуют об их достоверности и воспроизводимости. При анализе полученных данных автором сформулировано важное положение о том, что в сравнении с конъюгатами ди- и трисахаридов, конъюгат тетрасахарида с БСА, адсорбированный на геле алюминия гидроксида, после двукратной иммунизации мышей стимулирует образование более высокого уровня опсонизирующих антител, относящихся к иммуноглобулинам разных изотипов, и характеризуется высокой протективной активностью.

Автором выявлены молекулярно-клеточные маркеры, ассоциированные с иммуногенной и протективной активностью у мышей, иммунизированных конъюгатом дисахаридов с БСА, адсорбированным на геле алюминия гидроксида, которые включают IL-17A, (TCR⁺) $\gamma\delta$ Т-клетки, CD5⁺ В1-клетки, активированные клетки с экспрессией МНС II. Результаты обработаны с помощью компьютерных программ и достоверность полученных результатов не вызывают сомнений.

Исследование Антона Евгеньевича Зайцева проведено с применением комплекса современных иммунологических методов, научные обобщения полученных данных грамотно сформулированы.

Цель работы полностью раскрыта в задачах исследования.

Выводы логично вытекают из полученных результатов и соответствуют задачам исследования.

Автореферат диссертации Антона Евгеньевича Зайцева содержит наиболее существенную научную информацию, полученную автором в ходе выполнения работы.

Научная новизна диссертационной работы

Представленная автором работа имеет несомненную научную новизну, как на уровне конкретных экспериментов, так и важных научных обобщений.

Автором впервые экспериментально доказано, что синтетические ди-, три- и тетрасахариды, соответствующие по химической структуре фрагментам капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3, имеют общие углеводные антигены, характеризующиеся иммунологической активностью, сопоставимой с активностью капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3. На основании многочисленных экспериментальных данных, представленных в работе, автором сделано важное заключение о наиболее высокой иммуногенной и протективной активности тетрасахарида.

Показано, что в ответ на введение конъюгата тетрасахарид-БСА происходило образование антител различных изотипов, что является важным условием эффективной защиты от *S. pneumoniae* серотипа 3. Автором эффективно использована модель пневмококковой инфекции у мышей, вызванной *S. pneumoniae* серотипа 3, для доказательства протективной активности конъюгированных олигосахаридов. Установлено, что для защиты мышей от инфекции необходимо использовать двукратную иммунизацию конъюгатами, адсорбированными на геле алюминия гидроксида.

Для оценки влияния гликоконъюгатов на молекулярно-клеточные показатели у мышей обоснован выбор дисахарида, который является минимальным структурным звеном капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3. Более слабая иммуногенность конъюгата дисахарида позволила оценить влияние адъюванта на иммунный ответ. При этом автору удалось раскрыть на молекулярно-клеточном уровне новые свойства конъюгированных олигосахаридов а именно, их способность повышать уровень IL-17A, и содержание (TCR⁺) $\gamma\delta$ Т-клеток, CD5⁺ В1-клеток, а также активированных клеток, экспрессирующих продукты генов главного комплекса гистосовместимости II класса.

Практическая значимость исследования

В диссертационной работе автором детально охарактеризованы иммунобиологические свойства конъюгированных олигосахаридов, соответствующих фрагментам капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3. На основании полученных данных автор предполагает, что для создания полусинтетической пневмококковой вакцины против *S. pneumoniae* серотипа 3 целесообразно использовать тетрасахарид, конъюгированный с разрешенными к применению в клинической практике белками-носителями, такими как нетоксичная форма рекомбинантного дифтерийного анатоксина - CRM₁₉₇, дифтерийный или столбнячный анатоксин. Такой гликоконъюгат

можно использовать как компонент поливалентной пневмококковой вакцины. Биотинилированный тетрасахарид можно использовать для конструирования ИФА тест-систем, позволяющих выявлять антитела к капсульному полисахариду *S. pneumoniae* серотипа 3, а также точно определять принадлежность исследуемого полисахарида к КП *S. pneumoniae* серотипа 3.

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа построена по традиционному плану. Материалы диссертации изложены на 134 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 19 таблицами, 5 рисунками, 1 схемой и 1 фотографией. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав, содержащих результаты собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 202 источника (из них – 10 отечественных и 192 зарубежных авторов).

В разделе «**Введение**» обоснована актуальность диссертационной работы, при этом сделан акцент на роли *S. pneumoniae* серотипа 3 в патологии человека, и современных способах профилактики пневмококковой инфекции. Отмечена недостаточная иммуногенность и профилактическая эффективность бактериального капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3 по данным ряда исследований в этой области. Обоснована возможность повышения иммуногенности КП *S. pneumoniae* серотипа 3, при использовании конъюгатов синтетических олигосахаридов, имеющих точно охарактеризованную химическую структуру. Автор указывает на то, что ранее не проводились углубленные иммунологические исследования конъюгированных олигосахаридов. Цель диссертационной работы четко сформулирована и достигается решением поставленных задач.

В **обзоре литературы** приведены данные о распространенности *S. pneumoniae* серотипа 3 в различных странах мира, в том числе, в России. Автор проанализировал работы последних лет, свидетельствующие о том, что, несмотря на вакцинопрофилактику полисахаридными и конъюгированными пневмококковыми вакцинами, уровень заболеваемости в результате инфицирования *S. pneumoniae* серотипа 3 остается достаточно высоким. Рассмотрены также современные достижения в области разработки иммунопрофилактических препаратов на основе синтетических олигосахаридов. Завершая обзор литературы, автор делает заключение о целесообразности развития этого направления.

Раздел «**Материалы и методы**» включает подробное описание использованных в работе различных методов изучения объектов и экспериментальных исследований в системах *in vitro* и *in vivo*. Приводится соответствующая характеристика гликоконъюгатов. Из представленного описания очевидным образом следует, что результаты получены на основании многочисленных и разнообразных экспериментов с использованием необходимого количества лабораторных животных. Методы статистической обработки позволили грамотно систематизировать и обобщить экспериментальные данные.

В первой главе раздела «**Результаты исследования**» автор доказывает, что синтезированные химические структуры, которые отражают строение фрагментов капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3, обладают антигенной активностью. Используя различные модификации иммуноферментного анализа (ИФА) автор доказывает наличие общих антигенных структур у синтезированных олигосахаридов и капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3. При этом автор подчеркивает, что наибольшей антигенной активностью, сопоставимой с активностью капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3, обладает тетрасахарид, состоящий из двух повторяющихся звеньев.

Во второй главе автором представлены исследования по способности исследуемых конъюгатов вызывать образование антител различных изотипов, специфичных к олигосахаридной части конъюгатов, опсонизирующей активности антител и протективной активности гликоконъюгатов в экспериментах на лабораторных животных с использованием летальной дозы штамма *S. pneumoniae* серотипа 3. Результаты исследований показали, во-первых то, что гликоконъюгаты без адъюванта не индуцируют образования антител, а для повышения их иммуногенной и протективной активности необходима адсорбция конъюгатов на геле алюминия гидроксида. Важно, что гель алюминия гидроксида, разрешен к применению в практике здравоохранения. Его воздействие поляризует иммунный ответ по пути Th2, что способствует выработке антител. Известно, что антитела к капсульному полисахариду пневмококка являются основными эффекторами в защите от инфекции. Автором показано, что конъюгат тетрасахарида с БСА обладает наиболее высокой иммуногенной активностью.

В третьей главе представлены абсолютно новые данные о влиянии конъюгированных синтетических олигосахаридов на продукцию цитокинов и экспрессию поверхностных молекул на спленоцитах мышей. Изучение уровня цитокинов проведено в опытах *in vitro* и *ex vivo*. Для исследований *ex vivo* автором выбран конъюгат дисахарида, состоящий из одного повторяющегося звена, обладающий наименее выраженными

антигенными и иммуногенными свойствами. Это позволило автору оценить действие конъюгата дисахарида с адьювантом и без адьюванта, используя эффективную схему иммунизации мышей. В результате полученных данных сделан вывод о том, что IL17A, гамма-дельта Т-клетки и В1-клетки являются ключевыми эффекторами, ассоциированными с иммуногенной и протективной активностью исследуемого гликоконъюгата. В качестве референс-препарата автором использовался капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 3.

В разделе «**Заключение**» автор обобщает полученные экспериментальные данные и обсуждает их в сопоставлении с данными мировой литературы.

В целом, принципиальных замечаний к диссертационной работе А.Е.Зайцева нет.

Заключение

Представленная работа является законченным научно-квалификационным исследованием, выполненном на современном методическом уровне и значительном экспериментальном материале. Полученные данные об иммунобиологических свойствах синтетических олигосахаридов различной длины, конъюгированных с белком-носителем, вносят вклад в понимание иммунологических механизмов поствакцинальной защиты от пневмококковой инфекции и расширяют научные знания в области вакцинологии и фундаментальной иммунологии.

По своей актуальности, решению поставленных задач, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Зайцева Антона Евгеньевича на тему: «**Иммуногенность и протективная активность конъюгированных олигосахаридов – синтетических аналогов фрагментов капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3**» полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.(с изменением 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., № 426 от 20 марта 2021 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник

лаборатории клеточного иммунитета

НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей


Федерального государственного бюджетного учреждения
«Научный медицинский исследовательский
центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
доктор биологических наук


И.Ж. Шубина

Подпись И.Ж. Шубиной заверяю.

Директор НИИ ЭДиТО ФГБУ
«НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
кандидат биологических наук




В.С. Косоруков

14 апреля 2022 г.

Гербовая печать

Место работы: НИИ ЭДиТО Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

115552 г. Москва, Каширское шоссе, д.24

Тел.: +7 (499) 612-80-39

Электронная почта: irinashubina@mail.ru