

ОТЗЫВ

официального оппонента.

доктора медицинских наук, доцента Казакова Сергея Петровича на диссертационную работу Ляпиной Анны Михайловны «Особенности иммунного ответа у людей, вакцинированных живой чумной вакциной», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 3.2.7. Иммунология и 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Актуальность темы исследования.

Мировое и отечественное здравоохранение в последние десятилетия сталкивается с постоянно нарастающим трендом возникновения новых инфекционных патогенов и модифицированных известных возбудителей заболеваний, в основном, вирусной и бактериальной природы. Все это требует создания систем мониторинга за данными возбудителями, оценки их иммунобиологических и генетических свойств (характеристик), разработки профилактических, этиотропных, патогенетических методов лечения, а также скрининговой и мониторинговой лабораторной диагностики. Наряду с этиотропной и патогенетической терапией основным инструментом в борьбе с новыми инфекционными угрозами является вакцинопрофилактика, комплекс мер которой направлен не только на приобретение населением популяционного иммунитета, оценку динамики лабораторных, в основном, иммунологических характеристик «хозяина», но и на безопасность поствакцинального иммунного ответа. Среди ре-эмерджентных инфекций особое место занимает чума – природно-очаговая инфекция, возбудитель которой относится к патогенным биологическим агентам I группы опасности. Несмотря на то, что в настоящее время заболеваемость чумой в большинстве стран носит спорадический характер, следует отметить чрезвычайную медицинскую и социальную значимость заболевания, определяемую высокой летальностью, стремительным течением и его значительным эпидемическим потенциалом. Использование чумы в качестве агента биологического оружия во время локальных и масштабных военных конфликтов также определяет актуальность изучения этого патогена. В то же время в гражданском здравоохранении вакцинопрофилактика, проводимая среди декретированного контингента и по эпидемическим показаниям, является перспективным средством борьбы с возникновением спорадических случаев чумы у человека.

На сегодняшний день в вакцинопрофилактике чумы существует целый ряд вопросов, необходимых для изучения и исследования. В целях вакцинации в

Российской Федерации используется живая аттенуированная вакцина «первого поколения» на основе штамма возбудителя, полученного в начале XX века. Поствакцинальный иммунитет после вакцинации этой вакциной нестойк и требует ежегодных ревакцинаций. Анализ эпидемиологической эффективности иммунизации данной вакциной, проведенный ранее, не имел, да и не мог иметь, системного подхода при возникновении вспышек заболевания, которые являлись спорадическими, а также в связи с отсутствием клинических испытаний, проведенных в соответствии с современными стандартами и протоколами.

В условиях периодической заболеваемости чумой в настоящее время на первый план выходит оценка иммунологической эффективности вакцинации иммунологическими методами лабораторной диагностики. Однако иммунологические маркеры, однозначно позволяющие определить степень защищенности привитого человека от чумы, и, соответственно, оценить эффективность вакцинации, на сегодня не установлены. Количественный анализ антител к капсульному антигену чумного микроба с использованием иммунологических методов лабораторной диагностики, широко применяемый для оценки поствакцинального и постинфекционного иммунного ответа, недостаточно информативен, как ввиду отсутствия установленных значений защитных титров специфических иммуноглобулинов разных классов, так и по причине значительной вовлеченности Т-клеточного ответа в протективный иммуногенез при чуме. В этой связи актуальным является разработка альтернативных лабораторных иммунологических тестов для определения антител к другим антигенам возбудителя и поиск иммунологических Т-клеточных маркеров чумного микроба, которые можно использовать для создания антиген-специфичных тестов с целью оценки поствакцинального Т-клеточного ответа на вакцинацию против чумы.

Все это подтверждает актуальность выбранной темы, имеющей важное значение как для фундаментальной, так и для прикладной гражданской и военной области научного знания.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Представленная диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне с использованием релевантных и современных лабораторных, в основном, иммунологических методов, соответствующих поставленной цели и задачам исследования. Исследуемые группы сформированы с учетом заявленных задач, а объем выборки достаточен для получения значимых

экспериментальных данных. В работе использована панель высокоочищенных рекомбинантных антигенов, лишенных примеси липополисахарида, что значительно повышает качество лабораторного анализа. Анализ полученных данных проведен с использованием широкого набора релевантных методов непараметрической статистики, позволивших оценить достоверность различий между связанными и несвязанными группами по количественному и качественному признаку, определить наличие корреляций, рассчитать точность, чувствительность и специфичность с использованием ROC-анализа разработанных экспериментальных иммунологических лабораторных тестов.

Положения и выводы диссертации в полном объеме определены результатами исследования, соответствуют содержанию работы, ее цели и задачам, и являются аргументированным логичным заключением обсуждения результатов, полученных в экспериментальной части исследования. Предложенные рекомендации обоснованы и отражают значимые для практического здравоохранения результаты работы. По теме диссертационного исследования опубликовано 25 печатных работ, из них 3 в журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России для опубликования основных научных результатов диссертаций и/или индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus. Результаты исследования и ключевые положения диссертационной работы были неоднократно представлены и обсуждены на 16 научных конференциях всероссийского и международного уровня. Публикации полностью отражают результаты исследования.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

В исследовании приняли участие 51 человек: 34 донора, вакцинированных живой чумной вакциной (ЖЧВ), с разным числом вакцинаций – от 1 до 51 иммунизаций и различной длительностью периода (от 0 до 30 лет) после последней иммунизации ЖЧВ, и 17 условно здоровых добровольцев.

Относительно небольшой объем выборки, взятой в исследование, компенсируется характеристиками изучаемой вакцины и особенностями ее применения у ограниченного круга лиц; а также большим количеством выполненных лабораторных исследований. В этой связи можно с уверенностью утверждать, что данная работа соответствует заявленному уровню и специальностям диссертации. Достоверность результатов и обоснованность выводов базируется на адекватности дизайна исследования, значительном количестве выполненных лабораторных исследований и примененной

статистической обработке результатов с использованием разных методов статистики, являющихся основой доказательности данного исследования.

Результаты представленного диссертационного исследования обладают несомненной новизной. Так, автором впервые проведено комплексное исследование гуморального и клеточного иммунного ответа к ЖЧВ у человека с применением широкой панели очищенных от примесей липополисахарида рекомбинантных антигенов, включающей белки F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF чумного микроба, позволившее получить приоритетные данные:

- об образовании у привитых ЖЧВ, помимо антител кF1, специфических иммуноглобулинов к линейным эпитопам молекулярной единицы инъектосомы YscF и белку системы секреции III типа YopE;

- о различной длительности циркуляции указанных специфических антител (анти-YopE-антител – до года после последней иммунизации, анти-F1- и анти-YscF-антител – в среднем спустя 15 лет (в отдельных случаях – до 30 лет) после последней вакцинации);

- о развитии специфического адаптивного иммунного ответа по смешанному Th1/Th2/Th17-типу;

- об антигенной специфичности и длительности клеточных реакций поствакцинального иммунного ответа – установлена роль отдельных антигенов чумного микроба в индукции различных типов медиаторных молекул привитых ЖЧВ: Th1-цитокинов – белков F1, Pla, YopM, YopE и YscF, Th2-цитокинов – белков F1, LcrV и YscF, Th-17-цитокинов – белка Pla. Впервые получены данные о длительной (от 2 до 30 лет) циркуляции в периферической крови доноров, вакцинированных ЖЧВ, пула лимфоцитов, специфичных к этим белкам.

Автором разработаны оригинальные экспериментальные иммунологические лабораторные тесты для оценки поствакцинального антительного ответа на основе методов твердофазного иммуноферментного анализа, иммуноблоттинга с детекцией антител к рекомбинантным белкам чумного микроба, определены некоторые лабораторные показатели клинической информативности, в частности, точности, клинической (диагностической) чувствительности и специфичности. Показано, что оптимальной клинической информативностью среди предложенных лабораторных маркеров обладают иммунологические тесты с белками F1 и YscF в качестве сенситинов.

Достоверность результатов представленной диссертационной работы определена грамотным построением научного исследования, его фундаментальным научно-методическим уровнем с использованием широкого

арсенала современных методов лабораторной иммунологии, а также выбором адекватных статистических критериев для обработки полученных данных.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы.

Представленная диссертационная работа обладает несомненной теоретической и практической значимостью для специальностей «Иммунология» и «Клиническая лабораторная диагностика». Результаты диссертационной работы А.М.Ляпиной существенно расширяют методологию теоретического обоснования особенностей поствакцинального иммунного ответа у привитых ЖЧВ и имеют важное фундаментальное значение. Полученные лабораторные данные позволяют понять механизмы формирования поствакцинального противочумного иммунитета, его типы, продолжительность и антигенную специфичность. Полученные лабораторные данные о таргетных иммуногенах чумного микроба создают теоретическую базу для дальнейшей разработки не только в качестве маркеров иммунологической эффективности вакцинации, как заявлено в диссертационной работе, но и для выбора антигенной основы современных рекомбинантных противочумных вакцин, методов лабораторной иммунологической диагностики за антигенным составом, способным индуцировать оптимальный для продолжительной защиты Т-хелперный тип ответа.

Полученные в ходе диссертационного исследования результаты имеют несомненную практическую значимость, заключающуюся в разработке экспериментальных иммунологических лабораторных методов, основанных на иммуноферментном анализе и иммуноблоттинге, пригодных для выявления специфических иммуноглобулинов и оценки качества поствакцинального иммунного ответа у привитых ЖЧВ.

Оценка содержания, законченности и оформления диссертации.

Диссертация изложена на 190 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, глав с описанием материалов и методов исследования и результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 380 источников, из которых 84 отечественных и 296 зарубежных авторов. В то же время за последние 5 лет в списке литературы автор ссылается на более чем 15,3 % литературных источников (показатель, рекомендованный ВАК, – 25 %). Диссертация иллюстрирована 8 рисунками и содержит 12 таблиц.

Во введении изложены актуальность темы и степень ее разработанности, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов исследования, внедрение результатов в практику, место выполнения работы и личный вклад автора, публикации, объём и структуры диссертации. Во введении отсутствует такой важный пункт как соответствие диссертации паспортам научных специальностей.

В обзоре литературы (глава 1) представлены исчерпывающие сведения об общей проблематике методов оценки эффективности вакцинации и места иммунологических маркеров в ней. Дана подробная характеристика типов поствакцинального иммунного ответа и использование реакций адаптивного иммунитета и его лабораторных маркеров. Приведены характеристики иммунологических реакций, необходимые для разработки тестов для оценки иммунного ответа на вакцину. В специальной части обзора литературы подробно описаны аспекты, касающиеся модельной вакцины исследования на основе аттенуированного штамма *Yersinia pestis* EVНИИЭГ: представлены исторические и современные данные о противочумных вакцинах, гуморальном и клеточном иммунном ответе, развивающихся в результате инфицирования и вакцинации, его продолжительности. Освещены известные в настоящее время подходы и лабораторные иммунологические методы оценки поствакцинального ответа на ЖЧВ.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» представлены сведения об исследуемых группах (привитые с разным сроком поствакцинального периода и различным количеством ежегодных вакцинаций, а также контрольная группа доноров), дана характеристика панели рекомбинантных и цельноклеточных антигенов и описание биохимических и иммунологических методов (белковый электрофорез, иммуноблоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ, реакция бластной трансформации лимфоцитов, оценка цитокинового профиля в клеточных супернатантах). Подробно описаны протоколы, использованные автором для разработки экспериментальных иммунологических методов для определения специфических антител. Приведены методы статистического анализа экспериментальных данных.

В главе 3 представлены результаты собственных исследований. Гуморальный иммунный ответ привитых доноров изучен лабораторными биохимическими, иммунологическими методами, такими как белковый электрофорез, твердофазный иммуноферментный анализ и иммуноблоттинг. Автором было показано значительное разнообразие антигенной специфичности выявляемых сывороточных антител у привитых, а также наличие кросс-реакций

ряда антигенов чумного микроба с сыворотками доноров контрольной группы. Анализ полученных данных позволил автору установить статистически достоверные особенности поствакцинального ответа на ЖЧВ: повышение титров антител к белку F1 и обнаружение антител к белку YopE в течение года после иммунизации, а также высокую серопревалентность к белкам F1 и YscF и длительное сохранение соответствующих антител у доноров даже спустя 15 лет после вакцинации. Кроме того, были определены маркерные комбинации белков, вовлеченных в гуморальный ответ привитых ЖЧВ доноров, что в дальнейшем является перспективным направлением для создания мультиплексных тестов. Проведенная оценка клинической информативности разработанных экспериментальных тестов для выявления специфических антител позволила автору определить те иммунологические тесты, которые способствуют оптимальными показателями дифференцировать привитых доноров от непривитых.

В части главы 3, посвященной исследованию клеточного поствакцинального иммунного ответа, автором показано, что оценка антиген-индуцированных профилей клеточных супернатантов более информативна, чем пролиферативной функции лимфоцитов в реакции бласттрансформации. Установлена Th-поляризация иммунного ответа у привитых, которая развивается с продукцией Th1, Th2 и Th17-цитокинов. Очевидным достоинством работы является определение антигенной специфичности выявленных реакций клеточного иммунитета, что создает перспективы для разработки соответствующих лабораторных иммунологических тестов для оценки клеточного звена противочумного иммунитета. Важным также является наблюдение о сохранении способности Т-лимфоцитов к антиген-индуцированной продукции цитокинов на протяжении длительного периода времени после вакцинации (более 15 лет), что свидетельствует о формировании долговременной Т-клеточной памяти у привитых ЖЧВ.

В Заключение Ляпиной А.М. обобщены и обсуждены результаты собственных исследований в сопоставлении с современными литературными данными, представленными исследователями по данной тематике.

Выводы автором сформулированы конкретно, логично вытекают из содержания работы и четко дают ответы на вопросы, поставленные в цели и задачах исследования.

Практические рекомендации обоснованы и имеют важное значение для разработки и производства отечественными производителями наборов реагентов, основанных на иммуноферментном анализе и иммуноблоттинге.

Невзирая на фундаментальность данной работы, важно, чтобы в практических рекомендациях звучали конкретные указания для производителей и специалистов клинической лабораторной диагностики.

Результаты исследования проиллюстрированы достаточным количеством рисунков, таблиц, соответствующих содержанию глав.

Диссертация оформлена согласно действующим требованиям и представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, выполненную на достаточном и адекватном методологическом уровне с использованием современных лабораторных, в большей степени научных, методов. Работа заслуживает положительной оценки. Принципиальных замечаний и возражений против положений работы нет.

Замечания.

Хотел бы отметить, что проведена значительная работа с использованием биохимических и иммунологических методов исследований, выполненная на стыке двух специальностей, и носящая, несомненно, междисциплинарный характер. *Принципиальных замечаний, влияющих на общую положительную оценку диссертационного исследования, не имею.*

Вместе с тем, существует несколько пожеланий:

1. В тексте диссертационного исследования довольно часто встречается термин «серологические тесты» (с.132, 134), «серологические методы» (с.139, 144), «серологический мониторинг» (с.147), «серологические иммунотесты» (с. 147) и т.д., где упоминается вид (методы) клинической лабораторной диагностики. Однако согласно приказу МЗ РФ №464н от 18.05.2021 года «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований», такого термина нет, а вместо него используется «иммунологические виды (методы) исследования»;

2. В диссертационном исследовании также часто встречается термин «диагностическая информативность» (с.7, 9,104, 125,144) и т.д. Но, хотя этот термин и является широко распространенным и применяемым среди научных исследователей, тем не менее согласно Национальному стандарту РФ ГОСТ Р 53022.3-2008 рекомендуется использовать термин «клиническая информативность», «клиническая (диагностическая) чувствительность», «клиническая (диагностическая) специфичность». К тому же «клиническая информативность» в ГОСТ определяется как «способность лабораторного теста на основе информации, полученной в результате исследования определенного аналита в биологическом материале, характеризовать состояние внутренней среды организма у обследуемого лица и выявлять патологические отклонения»;

3. В разделе «Материалы и методы» (с.81) указаны параметры центрифугирования сыворотки в оборотах в минуту, что не совсем корректно, так как эта скорость зависит от радиуса ротора и может ввести в заблуждение последующих исследователей. При этом уже на с.82 приводятся правильные параметры центрифугирования, указанные в единицах ускорения (g);

4. В Заключение повторно приводятся цифровые данные распределения исследуемых пациентов по группам, что повторяет эту же информацию из главы 2 «Материалы и методы исследования». На мой взгляд, эта информация не носит необходимого смыслового значения, а лишь повторяет ее;

5. Также несколько удивило наличие в рукописи перечня опубликованных автором научных работ, хотя в классическом виде перечень научных работ приводится только лишь в автореферате.

Хочется отметить хороший стиль изложения рукописи и малое число грамматических и стилистических ошибок.

При знакомстве с рукописью возник *ряд вопросов*:

1. Скажите, пожалуйста, почему при исследовании Th-1 профиля цитокинов Вы определили TNF- α , кроме γ -INF, как цитокин, который характеризует именно этот профиль? Корректно ли это?

2. С учетом полученных Вами показателей достоверности, диагностической чувствительности и специфичности сенситинов F1 (капсульного антигена) и YscF (субъединицы инъектосомы) в сыворотке крови пациентов, привитых ЖЧВ, и контрольных доноров, возможно ли использовать математическую модель, рассчитанную с использованием логистической регрессии, позволяющую дифференцировать вакцинированных доноров от «наивных» пациентов с гораздо лучшими показателями клинической информативности?

3. Может, целесообразно для практической цели оценки поствакцинального иммунитета у пациентов, привитых ЖЧВ, разработать и создать набор реагентов (диагностикум) на основе одновременного выявления антител к YscF-антигену и капсульному F1-антигенам?

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат выполнен соискателем в соответствии с предъявляемыми требованиями, представляет собой краткое содержание диссертации с достаточно необходимой информацией и оформлен согласно требованиям ГОСТ и существующим рекомендациям. Замечаний по оформлению автореферата нет, за исключением единичных грамматических ошибок (с. 8), в

названии специальностей должны быть указаны отрасли науки (медицинские науки).

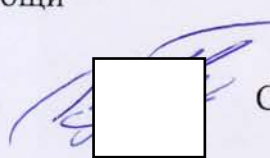
Заключение.

Диссертационная работа Ляпиной А.М. «Особенности иммунного ответа у людей, вакцинированных живой чумной вакциной», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 3.2.7. Иммунология и 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная **научная задача**, заключающаяся в выявлении перспективных иммунологических маркеров для оценки поствакцинального гуморального и клеточного иммунного ответа на вакцинацию живой чумной вакциной, разработке соответствующих иммунологических тестов и определении их информативности, что имеет существенное значение для развития таких областей науки как иммунология и клиническая лабораторная диагностика.

По своей актуальности, научной новизне и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует требованиям раздела II, пп. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, (с изм. и доп. от 30.07.2014 г., 21.04.2016 г., 02.08.2016 г., 29.05.2017 г., 28.08.2017 г., 01.10.2018 г., 20.03.2021 г., 11.09.2021 г., 26.09.2022 г., 26.01.2023 г., 18.03.2023 г., 26.10.2023 г., 25.01.2024 г., 16.10.2024 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Ляпина Анна Михайловна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 3.2.7. Иммунология (медицинские науки) и 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки).

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, доцент
профессор кафедры клинической лабораторной диагностики,
медицинской микробиологии и патологической анатомии
Академии постдипломного образования
ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр
специализированных видов медицинской помощи
и медицинских технологий» ФМБА России

  С.П. Казаков

«Согласен на обработку персональных данных»

«20» февраля 2025 г.



С.П. Казаков

Подпись д.м.н., доцента Казакова С.П.

ЗАВЕРЯЮ

Ведущий специалист по кадрам
Академии постдипломного образования
ФГБУ ФНКЦ ФМБА России



О.Л. Полякова

Название и адрес организации: Академия постдипломного образования федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России).

Адрес: 125371, г. Москва, Волоколамское ш., 91.

Тел. +7(495)617-10-50,

E-mail: info@medprofedu.ru

Отзыв официального оппонента Казакова С.П. поступил «26» февраля 2025 г.
Ученый секретарь Совета 24.1.063.01 Ю.А. Журавлева

С отзывом официального оппонента ознакомлена «26» февраля 2025 г.
Соискатель А.М. Ляпина