

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**доктора медицинских наук Топтыгиной Анны Павловны на
диссертационную работу Ляпиной Анны Михайловны на тему
«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 диссертационного исследования

Благодаря слаженной работе различных служб и наличию вакцины, в наше время чума перестала быть причиной пандемий, уничтожавших в прошлом целые города, однако не исчезла совсем. Будучи первичным зоонозным заболеванием, чума имеет свой ареал в дикой природе, что затрудняет ее элиминацию. Кроме того, чумная бактерия обладает широким спектром способов эвазии, позволяющей ей уклоняться от атак иммунитета. Одним из следствий этой эвазии является то, что в ответ на чумную бактерию не удастся получить долговременной иммунологической памяти. Имеющиеся в мире живые аттенуированные вакцины требуют ежегодной ревакцинации для поддержания защиты. Живые вакцины с одной стороны наилучшим образом активируют иммунитет, но с другой стороны всегда есть риск реверсии в сторону дикого штамма. Альтернативой живой вакцине являются химически чистые белковые вакцины, позволяющие получить достаточный уровень защитных антител, производимых долгоживущими плазмócитами, без риска вызвать тяжелое заболевание. Разработка такой вакцины требует детального понимания, какие именно белки чумной бактерии будут индуцировать протективные антитела, какова роль Т-клеточного иммунитета и какие Т-клеточные эпитопы окажутся важными в защите именно от чумы, а также, какие адъюванты потребуются

для такой синтетической вакцины, т.к. без них синтетические вакцины неэффективны. Еще одна проблема: в условиях единичных случаев заболевания чумой невозможно оценить эффективность разрабатываемой вакцины на популяционном уровне, поэтому необходима разработка косвенных критериев иммунологической эффективности вакцины.

В связи с вышесказанным, работа Ляпиной Анны Михайловны, направленная на поиск биомаркеров протективного гуморального и клеточного иммунитета у привитых живой чумной вакциной (ЖЧВ) на основе широкой панели рекомбинантных высокоочищенных белков чумной бактерии и разработку иммунотестов для оценки протективных свойств вакцины, является актуальной и своевременной.

Новизна исследования, полученных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна полученных результатов, выводов и основных положений диссертационной работы очевидна. Исследован спектр антител, пролиферативная реакция мононуклеаров периферической крови и продукция цитокинов в ответ на высокоочищенные рекомбинантные белки чумной бактерии, такие как F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF у людей, привитых ЖЧВ. Помимо уже известных антител к F1, выявлено наличие специфических иммуноглобулинов к линейным эпитопам структурообразующей единицы инъектосомы YscF и белку-эффектору T3SS YopE. Показано, что антитела, специфичные к F1 и YscF, определяются у вакцинированных доноров спустя, в среднем, 15 лет (в отдельных случаях – до 30 лет) после последней вакцинации ЖЧВ, а антитела к YopE не определяются спустя год после вакцинации. Обнаружена индукция Т-клеточного иммунного ответа на вакцинацию ЖЧВ. При этом в индукцию Th1-цитокинов вовлечены белки F1, Pla, YopM, YopE и YscF, Th2-цитокинов – F1, LcrV и YscF, тогда как активатор плазминогена Pla участвует в Th-17-поляризации иммунного ответа.

Антиген-специфичные Т-клеточные ответы на белки чумной бактерии сохраняются от 2х до 30 лет, в среднем, 15 лет. Сформулированные в диссертации выводы и рекомендации полностью соответствуют целям и задачам работы, а также положениям, выносимым на защиту.

Значимость полученных результатов для науки и практики

По результатам диссертационного исследования соискателем получены новые фундаментальные данные о наличии у привитых ЖЧВ широкого спектра антител к различным антигенам чумной бактерии. Показано, что специфичным для привитых ЖЧВ является обнаружение антител не только к капсульному антигену F1, но и к линейным эпитопам YscF и белку-эффектору YopE. Доказано вовлечение в иммунный ответ на вакцину Th1, Th2 и Th17 клеток. Выявлены антигены чумной бактерии, индуцирующие короткие (до 1 года) и длительные (до 30 лет) иммунные ответы.

Разработаны иммунотесты на основе ИФА и блоттинга на рекомбинантные белки чумной бактерии, пригодные для оценки иммунного ответа у вакцинированных ЖЧВ, рассчитаны чувствительность и специфичность для каждого теста. Выявленные иммунные реакции на широкую панель антигенов чумной бактерии могут быть использованы в качестве маркеров оценки напряженности поствакцинального иммунитета у людей, вакцинированных ЖЧВ.

Научные положения, сформулированные в диссертации, внедрены в научно-исследовательскую работу кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России и используются для обучения в виде лекционного материала и практических занятий студентов, ординаторов и аспирантов по дисциплинам «инфекционные болезни» и «клиническая лабораторная диагностика».

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

Диссертационная работа Ляпиной Анны Михайловны выполнена на основе комплексного подхода и на современном методологическом уровне. Дизайн исследования и методы соответствуют его целям и задачам. Был исследован достаточный объем клинического материала с помощью оптимальных лабораторных методов. Были применены актуальные иммунологические методы, в том числе с использованием автоматизированных современных систем сбора и анализа результатов исследования. Полученные результаты были обработаны адекватными статистическими методами, позволяющими оценить достоверность выявленных изменений.

Основные положения, выносимые на защиту, и выводы аргументированы и достоверны, являются логическим следствием полученных результатов, полученные данные сопоставлены с результатами других исследователей.

Результаты диссертационной работы прошли всестороннюю апробацию на российских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 25 печатных работ, из которых 3 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России и индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus (Q1 и Q2).

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация Ляпиной А.М. имеет классическую структуру, изложена на 190 страницах, содержит 12 таблиц, 8 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений. Список

литературы представлен 380 источниками, из которых 84 отечественных и 296 зарубежных.

Введение включает в себя обоснование актуальности и степень разработанности темы исследования, цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследования, выносимые на защиту основные положения, обоснование достоверности полученных результатов и личного вклада автора, сведения о внедрении результатов работы в практику.

В главе «Обзор литературы» представлены общие сведения о реакциях адаптивного иммунитета на вакцинацию методами оценки эффективности прививки. Затем подробно описаны особенности постинфекционного и поствакцинального адаптивного иммунитета против чумы и антигенная специфичность гуморальных и клеточных иммунных реакций. Подробно изложены данные о различных вакцинах против чумы от начала таких разработок до современного состояния проблемы. Обзор очень подробный и занимает 62 стр. печатного текста.

Глава «Материалы и методы исследования» содержит описание когорты обследованных вакцинированных и группы сравнения, методов получения антигенного материала, методов иммуноферментного анализа, иммуноблотинга, электрофореза белковых фракций, реакции антиген-индуцированной бластной трансформации лимфоцитов и продукции цитокинов, методы статистического анализа полученных результатов.

В главе 3 представлены собственные результаты исследования. При исследовании гуморального ответа привитых живой чумной вакциной (ЖЧВ) методом твердофазного иммуноферментного анализа наибольшее число серопозитивных ответов было зарегистрировано на белки YscF, F1, YopM, и Pla: антитела к ним были обнаружены у половины привитых, а на белки LcrV и YopE антитела были обнаружены только у единичных доноров. При этом антитела к F1 и Pla чаще выявлялись у недавно

вакцинированных доноров, повышение титров анти-F1-антител также было характерно для недавно привитых ЖЧВ. Важно, что в группе сравнения все невакцинированные имели антитела к Pla, часть непривитых людей имели антитела к YopM, YscF и F1 и ни у кого из них не были обнаружены антитела к LcrV и YopE. Определение антител к тем же белкам методом иммуноблотинга оказалось немного более специфичным для вакцинированных ЖЧВ, что позволило установить более четкие маркеры иммунного ответа на вакцину. Важно подчеркнуть, что исследования проводили с помощью оригинальных тест-наборов собственной разработки, позволивших анализировать антитела к различным белкам чумной бактерии. С помощью ROC-анализа были рассчитаны чувствительность и специфичность разработанных тест-наборов для каждого белка бактерии чумы. Для части белков эти критерии оказались не информативными, но для F1 и YscF – высокоинформативными.

Попытка оценить клеточный иммунитет у вакцинированных ЖЧВ с помощью антиген или митоген индуцированной пролиферации не увенчалась значительным успехом, однако в группе вакцинированных индексы пролиферации на белки YopE, Pla, YopM и F1 были выше, чем в группе сравнения в течении года после вакцинации.

Продукция цитокинов *in vitro* в ответ на стимуляцию препаратами ЖЧВ Yp26 и Yp37 повышалась для IFN- γ и IL-17A в группе вакцинированных, независимо от давности прививки. При использовании для стимуляции продукции цитокинов рекомбинантных белков чумной бактерии у привитых ЖЧВ выявлено усиление продукции Th1-цитокинов в ответ на F1 (IFN- γ , TNF), Pla, YopM, YopE (IFN- γ) и YscF (TNF); Th2-цитокинов в ответ на F1 (IL-4); Th-17-цитокинов в ответ Pla (IL-17A), а в ответ на LcrV и YscF повышалась продукция IL-10 (цитокин-маркер Treg). Указанные реакции выявлялись как у недавно привитых, так и через 15 лет после последней вакцинации ЖЧВ.

В заключении автор обобщает и подробно обсуждает полученные результаты в контексте современных представлений о проблеме. Работа завершается 6 выводами, содержание которых соответствует целям и задачам исследования.

Материалы диссертации изложены последовательно, в полном соответствии с поставленными задачами. Решение задач, обоснованность выводов, сформулированных на основании фактических данных, позволяют считать диссертацию завершённой. Личный вклад соискателя в состоит в проведении экспериментальных исследований, изучении и анализе литературы по профилю диссертационной работы, описании и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций по теме НИР.

Автореферат оформлен в соответствии с рекомендациями актуального ГОСТ, полностью отражает основное содержание диссертации.

Принципиальных замечаний и вопросов к автореферату и диссертации нет.

Заключение

Диссертация Ляпиной Анны Михайловны «Особенности иммунного ответа у людей, вакцинированных живой чумной вакциной», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.2.7. Иммунология и 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, является законченной, самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи: выявления маркеров формирования поствакцинального иммунитета в ответ на прививку ЖЧВ и разработки экспериментальных тестов для оценки *in vitro* сформированного иммунитета, имеющей важное значение для иммунологии и лабораторной диагностики иммунной защиты против чумы.

Диссертационная работа «Особенности иммунного ответа у людей, вакцинированных живой чумной вакциной» полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук (п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 г., 21.04.2016 г., 2.08.2016 г., 29.05.2017 г., 28.08.2017 г., 1.10.2018 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.), а её автор Ляпина Анна Михайловна заслуживает искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7 «Иммунология» и 3.3.8 «Клиническая лабораторная диагностика».

Официальный оппонент:

Руководитель лаборатории цитокинов
Федерального бюджетного учреждения
науки «Московский научно-
исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Г.Н. Габричевского»
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека, доктор медицинских наук

«23» января 2025г.



Топтыгина Анна Павловна

Подпись А.П. Топтыгиной заверяю
Ученый секретарь
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора, к.б.н.



удова Наталия Владимировна

Топтыгина Анна Павловна, доктор медицинских наук (14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология), главный научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательских институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору и сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора), 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10. Адрес электронной почты: toptyginaanna@rambler.ru, телефон: +7 (495)452-18-01, факс: +7 (495) 452-18-30

Отзыв официального оппонента Топтыгиной А.П. поступил «23» января 2025 г.
Ученый секретарь Совета 24.1.063.01



Ю.А. Журавлева

С отзывом официального оппонента ознакомлена «23» января 2025 г.
Соискатель



А.М. Ляпина