

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ
им. В.И. Разумовского
Минздрава России
д.м.н. доцент

А.С. Федонников
« 27 » 2024 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация «Особенности иммунного ответа у людей, вакцинированных живой чумной вакциной», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.2.7. Иммунология, 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, выполнена на кафедре общей гигиены и экологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России).

В период подготовки диссертации соискатель Ляпина Анна Михайловна работала в Саратовском научно-исследовательском ветеринарном институте – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» в должности научного сотрудника, с января 2024 г. по настоящее время – в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова», в должности старшего преподавателя кафедры «Микробиология и биотехнология» и научного сотрудника лаборатории фундаментальных и прикладных исследований.

В 2008 году Ляпина А.М. с отличием окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (в настоящее время – ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава) по специальности «лечебное дело» с присуждением квалификации «врач» (диплом № ВСА 0387275, регистрационный номер 152).

С июля 2008 по сентябрь 2012 г. обучалась в заочной аспирантуре при кафедре общей гигиены и экологии «Саратовского государственного медицинского университета имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (в настоящее время – ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава) по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология (справка «Об обучении» № 09/372 от 30.01.2020).

В 2022 г. для окончания работы над диссертационным исследованием Ляпина Анна Михайловна в соответствии с приказом ректора (№ 545-О от 10.06.2022 г.) была прикреплена в качестве соискателя к кафедре общей гигиены и экологии ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России по специальности 3.2.7. Аллергология и иммунология (с 2023 года наименование научной специальности 3.2.7. Аллергология и иммунология изложено в новой редакции – 3.2.7. Иммунология согласно Приказа Министерства науки и высшего образования РФ от 20 декабря 2022 г. № 1278 "О внесении изменений в номенклатуру научных специальностей...»). В мае 2024 г. решением Ученого совета ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России в диссертационное исследование была введена вторая специальность 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана 12 июля 2024 г. ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России.

Научные руководители:

– Елисеев Юрий Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей гигиены и экологии ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России;

– Федорова Валентина Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры «Микробиология и биотехнология» ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» Минсельхоза России.

По итогам обсуждения принято следующее **заключение**:

Оценка выполненной соискателем работы. В диссертационной работе Ляпиной А.М. изучены особенности иммунного ответа у людей, вакцинированных живой чумной вакциной. С применением панели рекомбинантных антигенов чумного микроба проанализирован специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ у привитых живой чумной вакциной доноров, разработаны экспериментальные иммунотесты для оценки поствакцинального гуморального иммунитета привитых. Диссертация является актуальной законченной самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой и заслуживает положительной оценки.

Текст диссертации был проверен в системе «Антиплагиат» и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. Ляпина А.М. принимала непосредственное участие в планировании исследования, постановке цели и задач диссертационной работы, написании публикаций. Личный вклад соискателя состоит в получении первичных данных, их статистической обработке, систематизации и обобщении, анализе результатов.

Степень достоверности результатов проведенных исследований. Проверка первичной документации проведена комиссией ФГБОУ ВО Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России в составе: председатель – Астафьева Н.Г., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии, члены комиссии: Новокрещенова И.Г., д.м.н., профессор, заместитель директора по науке и здравоохранению, заведующий кафедрой экономики и управления здравоохранением и фармацией и Микеров А.Н., д.б.н., профессор кафедры общей гигиены и экологии (*приказ ректора № 200-О от 14.03.2023 г.*). Первичная документация оформлена в соответствии с фактическими данными, полностью отражает объем и материалы исследования и признана достоверным материалом (*акт проверки достоверности первичной документации и личного участия от 11.04.2023 г.*).

Актуальность темы диссертационного исследования. Поиск маркеров иммунологической эффективности, отражающих состояние вакциноиндуцированного иммунитета у индивидуума, представляет трудности для инфекций со сложными механизмами протекции, опосредованной гуморальным и клеточным звеном иммунитета.

Показательной моделью такого иммунитета является иммунитет к чуме, индуцированный живой чумной вакциной на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. Несмотря на более чем 80-летнюю историю ее применения, особенности поствакцинального ответа, в частности, антигенная специфичность и длительность реакций вакциноиндуцированного иммунитета, не изучены, что тормозит разработку соответствующих тестов для оценки эффективности вакцинации живой чумной вакциной. Большинство исследований было сосредоточено вокруг иммунных реакций, специфичных к капсульному антигену F1 и антигену вирулентности LcrV. Однако имеются сведения, что, несмотря на высокий протективный потенциал, они не могут служить универсальными маркерами эффективного поствакцинального иммунитета. При этом идентифицирован ряд других антигенов чумного микроба, индуцирующих образование значимых титров специфических антител или продукцию провоспалительных цитокинов как при экспериментальном, так и естественном заражении или иммунизации биомоделей, человека и других чувствительных млекопитающих. Среди них – белки-эффекторы T3SS YopE, YopM, структурная субъединица инъектосомы T3SS YscF и поверхностная протеаза Pla.

Все вышеизложенное подтверждает, что исследование особенностей иммунного ответа у привитых живой чумной вакциной доноров с применением расширенной панели высокоочищенных рекомбинантных белков чумного микроба, включающих F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF, наряду с разработкой экспериментальных иммунотестов на их основе, является актуальным.

Научная новизна результатов проведенных исследований. Впервые проведена комплексная характеристика иммунного ответа, изучена иммунореактивность сывороток, пролиферативная активность мононуклеаров периферической крови и профили продуцируемых ими цитокинов у людей, привитых

живой чумной вакциной, с использованием панели высокоочищенных рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF.

Впервые в сыворотках крови вакцинированных живой чумной вакциной людей, помимо антител к капсульному антигену 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 живой чумной вакциной, а антитела к YopE не определяются спустя год после вакцинации.

Впервые у людей, вакцинированных живой чумной вакциной, установлено развитие специфического адаптивного иммунного ответа по смешанному, Th1/Th2/Th17-типу. Впервые определена специфичность и длительность выявленных клеточных реакций: показано, что в индукцию Th1-цитокинов вовлечены F1, Pla, YopM, YopE и YscF, Th2-цитокинов – F1, LcrV и YscF, тогда как активатор плазминогена Pla участвует в Th-17-поляризации иммунного ответа. Впервые получены данные о длительной (от 2-х до 30 лет, в среднем – 15 лет) циркуляции в периферической крови доноров, вакцинированных живой чумной вакциной, пула лимфоцитов, специфичных к указанным белкам.

Показаны перспективы применения выявленных гуморальных и клеточных маркеров для усовершенствования методов оценки качества поствакцинального иммунитета, индуцированного живой чумной вакциной, с использованием экспериментальных тестов на основе рекомбинантных сенситинов.

Теоретическая и практическая значимость работы. В диссертационной работе представлены новые данные об особенностях иммунного ответа, индуцированного вакцинацией живой чумной вакциной у людей: определены таргетные иммуногены и дана характеристика иммунологических реакций с их участием. Показано, что специфичным для привитых живой чумной вакциной является обнаружение антител к капсульному антигену F1, линейным эпитопам YscF и белку-эффектору YopE, а также достоверное повышение уровня Th1/Th2/Th17-цитокинов при стимуляции мононуклеаров периферической крови вакцинированных доноров панелью исследуемых белков. Выявлены иммуногены, участвующие в

раннем (до одного года) или отдаленном (от 2 до 30 лет) специфическом иммунном ответе на вакцинацию живой чумной вакциной.

Практическая значимость работы заключается в том, что обнаруженные специфические реакции вакциноиндуцированного иммунитета могут служить основой для выявления иммунологических маркеров оценки напряженности поствакцинального иммунитета у людей, вакцинированных живой чумной вакциной, в том числе, для разработки соответствующих коррелятов протекции. Разработаны экспериментальные иммунотесты для определения специфических антител, индуцированных живой чумной вакциной.

Внедрение в практику. Основные результаты исследования и разработанные методологические подходы внедрены:

- в научно-исследовательскую работу кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России для определения гуморального и клеточного иммунного ответа при оценке качества поствакцинального иммунитета.

- в практику учебной работы ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России – для обучения студентов, ординаторов, аспирантов по дисциплине «инфекционные болезни», ординаторов и слушателей циклов профессиональной переподготовки и повышения квалификации по специальности «клиническая лабораторная диагностика».

Ценность научных работ соискателя ученой степени. Ценность научных работ Ляпиной А.М. заключается в установлении антигенной специфичности и длительности реакций гуморального и клеточного иммунитета, индуцированного вакцинацией живой чумной вакциной у привитых доноров. Научные работы соискателя опубликованы в зарубежных и российских изданиях и используются в научной деятельности специалистов, занимающихся проблемами иммунологии, вакцинологии и поствакцинального ответа.

Научная специальность, которой соответствует диссертация. По объему и новизне полученных автором данных, разработанных теоретических положений диссертационная работа Ляпиной Анны Михайловны на тему «Особенности иммунного ответа у людей, вакцинированных живой чумной вакциной» полностью

соответствует паспортам заявленных специальностей: 3.2.7. Иммунология и 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, медицинские науки.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. По теме диссертации опубликовано 25 работ, из них 3 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России и / или индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus (Q1 и Q2). Опубликованные работы полностью отражают основные положения диссертационного исследования.

Наиболее значимые публикации:

1. Serologic Markers for Long-Term Immunity in Humans Vaccinated with Live *Yersinia pestis* EV NIEG / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, O.V. Ulianova [et al.] // *Procedia in Vaccinology*. - 2012. - Vol. 6. - P. 10-13.

2. Рекомбинантные полипептиды как биомаркеры оценки иммунологической эффективности вакцинации живой чумной вакциной у людей / **A.M. Ляпина**, В.А. Федорова, М.А. Хижнякова [и др.] // *Медицинский академический журнал*. - 2012. - Т.12., № 3, - С. 85-87.

3. YscF is a Highly Specific Marker for Evaluation of Antibody Response to Live Plague Vaccine in Humans / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.V. Telepnev [et al.] // *Procedia in Vaccinology*. - 2013. - Vol. 7. - P. 44-48.

4. Selectivity in IgG Subclass Response to Live Plague Vaccine in Humans / V.A. Feodorova, M.A. Khizhnyakova, **A.M. Lyapina** [et al.] // *Procedia in Vaccinology*. - 2014. - Vol. 8. - P. 34-37.

5. Характеристика клеточного иммунного ответа к F1 и LcrV доноров, привитых живой чумной вакциной / **A.M. Ляпина**, В.А. Федорова, В.Л. Мотин // *Российский иммунологический журнал*. - 2015. - Т. 9 (18), № 2 (1). - С. 524-526.

6. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* Pla antigen in humans immunized with live plague vaccine / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova [et al.] // *PLoS Negl Trop Dis*. - 2018. - Vol. 12(6). - P. e0006511.

7. New Promising Targets for Synthetic Omptin-Based Peptide Vaccine against Gram-Negative Pathogens / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, S.S. Zaitsev [et al.] // *Vaccines (Basel)*. - 2019. - Vol. 7(2). - P. 36.

8. *Yersinia pestis* Antigen F1 but Not LcrV Induced Humoral and Cellular Immune Responses in Humans Immunized with Live Plague Vaccine - Comparison of Immunoinformatic and Immunological Approaches / V.A. Feodorova, A.M. Lyapina, M.A. Khizhnyakova [et al.] // *Vaccines* (Basel). - 2020. - Vol. 8(4). - P. 698.

9. Маркерные комбинации антигенов чумного микроба для оценки поствакцинального гуморального иммунитета у привитых живой чумной вакциной доноров / А.М. Ляпина, Ю.Ю. Елисеев, В.А. Федорова // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. - 2024. - Т. 13, № 1: Приложение. - С. 230-233.

Заключение. Ляпина Анна Михайловна – сформировавшийся высококвалифицированный научный работник. Диссертационная работа Ляпиной А.М. «Особенности иммунного ответа у людей, вакцинированных живой чумной вакциной» является законченным, самостоятельно выполненным научно-квалификационным исследованием, которое вносит существенный вклад в специальности 3.2.7. Иммунология и 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, так как в исследовании выявлены маркеры гуморального и клеточного вакциноиндуцированного иммунного ответа у привитых живой чумной вакциной доноров, определена длительность сохранения выявленных реакций, разработаны экспериментальные тест-системы для определения специфических антител, индуцированных вакцинацией живой чумной вакциной.

Диссертационная работа Ляпиной А.М. по актуальности проблемы, новизне результатов, научно-практической значимости соответствует требованиям раздела II «Положения о присуждении учёных степеней» (утв. Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, с изм. и доп. от 30.07.2014, 21.04.2016, 02.08.2016, 29.05.2017, 28.08.2017, 01.10.2018, 20.03.2021, 11.09.2021, 26.09.2022, 26.01.2023, 18.03.2023, 26.10.2023, 25.01.2024, 16.10.2024), а ее автор по своим профессиональным качествам достойна присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология и 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Диссертация «Особенности иммунного ответа у людей, вакцинированных живой чумной вакциной» Ляпиной Анны Михайловны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.2.7. Иммунология и 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Заключение принято на расширенном заседании проблемной комиссии по медико-профилактическому и социально-гуманитарным наукам с участием представителей кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России.

Присутствовали на заседании – 17 человек. Результаты голосования: «за» – 17 человек, «против» – нет, «воздержалось» – нет (*Протокол № 4 от «25» ноября 2024 г.*).

Заместитель председателя проблемной комиссии:
заведующий кафедрой экономики и управления
здравоохранением и фармацией
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ
им. В.И. Разумовского Минздрава России
д.м.н., профессор



И.Г. Новокрещенова

Подпись д.м.н., профессора Новокрещеновой И.Г.
ЗАВЕРЯЮ:

Ученый секретарь Ученого совета
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ
им. В.И. Разумовского Минздрава России
д.м.н., доцент



Т.Е. Липатова



**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Саратовский государственный медицинский университет
имени В.И. Разумовского»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России)**

Выписка из приказа от 10.06.2022 № 545-О

Ляпину Анну Михайловну, полагать прикрепленной к ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России для подготовки диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по научной специальности 3.2.7. Аллергология и иммунология, медицинские науки сроком на три года с 15.06.2022 по 14.06.2025.

Научным руководителем утвердить д-ра мед. наук, профессора, заведующего кафедрой общей гигиены Елисеева Ю.Ю.

Основание: заявление Ляпиной А.М., решение конкурсной комиссии по вопросам прикрепления лиц для подготовки диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, протокол от 25.05.2022 № 2.



Ректор

А.В. Еремин