ОТЗЫВ

официального оппонента Тотоляна Арега Артемовича на диссертационную работу Топтыгиной Анны Павловны на тему «Комплексная оценка процессов формирования и поддержания иммунологической памяти на примере вакцинации против кори, краснухи и эпидемического паротита», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Актуальность темы.

Для многих вирусных заболеваний, в том числе для кори, краснухи и эпидемического паротита, вакцинация является основным средством борьбы, позволяющим не только контролировать эти инфекции, но и ставить вопрос об их глобальной ликвидации. Обычно после перенесенной инфекции формируется пожизненный иммунитет, а поствакцинальный иммунитет постепенно истощается и даже правильно привитой, хорошо ответивший на прививку, без каких-либо генетических недостатков человек со временем может утерять защитные уровни антител. Если при первичных вакцинальных неудачах, несмотря на правильное и своевременное проведение прививки, у человека не формируется защитного титра антител, то при вторичных вакцинальных неудачах сформированный после прививки иммунитет быстро утрачивается и привитый человек вновь оказывается восприимчивым к кори. Количество первичных и вторичных вакцинальных неудач составляет 5-10% от общего количества привитых для каждой группы. Целью любой вакцинации является формирование и длительное поддержание иммунологической памяти против инфекционных антигенов. Наблюдение за развитием адаптивного иммунного ответа и формированием иммунологической памяти у привитых может расширить и детализировать фундаментальные представления о функциях иммунной системы, ее регуляции и поддержании иммунной защиты в течение продолжительного времени.

Цель работы определена достаточно ясно: совершенствование подходов к повышению эффективности вакцинации против кори, краснухи и эпидемического паротита на основании изучения клеточных и молекулярных механизмов формирования и поддержания иммунологической памяти на вирусные антигены с использованием стандартных и оригинальных методических подходов.

Вышеизложенное позволяет классифицировать диссертационное исследование А.П. Топтыгиной как своевременное и актуальное для клинической иммунологии, в части комплексного изучения механизмов формирования и поддержания иммунологической памяти в ответ на живую вирусную прививку и создания научной базы для разработки методов оценки иммунологической памяти и прогнозирования вакцинальных неудач.

Научная новизна исследования.

В диссертационной работе получены новые научные сведения о реакции различных звеньев иммунной системы на введение вакцины Приорикс. Показано, что снижение количества основных субпопуляций лимфоцитов связано с перераспределением лимфоцитов из крови в лимфоидные органы, вызванным начальными процессами ответа иммунной системы на введенную вакцину и сопровождается повышенной экспрессией CD150, являющейся рецептором для вируса кори на Т- и В-лимфоцитах. Впервые показано, что транзиторное повышение уровня провоспалительной субпопуляции Th17 и ее основного цитокина IL-17A в крови после прививки Приорикс компенсируется последующим повышением количества Т-регуляторных клеток и содержанием противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF-β.

Впервые установлено, что спектр подклассов IgG специфических к антигенам вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита зависит от вида антигена и срока, прошедшего с момента прививки в ходе формирования иммунологической памяти: при формировании специфического гуморального

иммунного ответа на вирус кори выявлена задержка процесса переключения с IgG3- на IgG1-субкласс специфичных к нему антител. Также выявлено, что по мере взросления и иммунологического созревания организма ответ на первичную вакцинацию имеет некоторые особенности, например, в спектре подклассов IgG против кори у детей 6-7 лет появляются специфические IgG2-антитела, чего не наблюдается у детей в возрасте 1-2 лет. Первичный и вторичный иммунный ответ на прививку Приорикс различается по спектру подклассов специфических антител, активированных клеток и экспрессии поверхностных маркеров, вовлеченных в иммунный ответ, скорости и величине изменений различных параметров иммунного ответа.

Автором впервые показано, что цитотоксические клетки памяти, специфичные к вирусам кори и краснухи, способны сохраняться и отвечать на антиген спустя многие годы после прививки или перенесенного заболевания. Впервые доказано, что реакция специфически индуцированной дегрануляции цитотоксических $CD8^{hi}$ лимфоцитов может быть использована для оценки активности эффекторных Т-клеток памяти на антигены вирусов кори и краснухи, на основе автором разработан метод оценки специфического клеточного иммунного ответа на антигены вирусов кори и краснухи, защищенный патентом «Способ определения специфического клеточного иммунного ответа к антигенам вируса кори и краснухи» (Патент на изобретение № 2464571).

Впервые с помощью методов математического моделирования определены информативные показатели иммунного статуса, оказывающие значимое влияние на высоту специфического гуморального ответа на антигены вакцины Приорикс и на продолжительность поддержания защитных уровней соответствующих антител, позволяющие предсказать исход вакцинации против кори, краснухи и эпидемического паротита у детей через 4 недели и 1 год после прививки. Предложен новый алгоритм, позволяющий, используя значения определенных показателей иммунного статуса до

вакцинации, прогнозировать формирование первичных и вторичных вакцинальных неудач через 1 месяц и через 1 год после вакцинации у детей, привитых против кори, краснухи и эпидемического паротита.

Теоретическое значение работы.

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых данных, вносящих вклад в понимание механизмов формирования и поддержания иммунологической памяти на вирусные антигены. Результаты проведенного исследования позволяют оценить вклад гуморального и клеточного иммунитета в специфический противовирусный иммунный ответ. В результате проведенной работы были получены новые сведения, обеспечивающие возможность оценки специфического клеточного иммунитета на современном клеточно-молекулярном уровне, что позволяет осуществлять контроль за эффективностью прививок против кори, краснухи и эпидемического паротита, как у здоровых, так и у детей группы риска.

Практическое значение работы.

Неоспоримо практическое значение работы. Автором предложен способ оценки субклассов специфических IgG к антигенам вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита, рассчитаны значения порогового критерия cut off, позволяющие с вероятностью более 95% различить первичный и вторичный иммунный ответ на эти вирусы, при формировании поствакцинального и постинфекционного иммунитета.

Показано, что реакцию специфически индуцированного пролиферативного ответа мононуклеаров периферической крови на антигены вирусов кори и краснухи можно использовать для оценки Т-клеточной памяти, для чего рассчитаны значения порогового критерия cut off для оценки специфической пролиферации, позволяющие с вероятностью более 99% выявить наличие специфически индуцированного пролиферативного ответа.

Также автором разработан защищенный патентом метод оценки специфического клеточного иммунного ответа цитотоксических лимфоцитов на антигены вирусов кори и краснухи на основе реакции специфически индуцированной дегрануляции цитотоксических $CD8^{hi}$ лимфоцитов и рассчитаны значения порогового критерия cut off, позволяющие с вероятностью более 98% выявить наличие специфически индуцированной дегрануляции $CD8^{hi}$ лимфоцитов.

Показано, что индукция продукции цитокинов антигенами вирусов кори и краснухи может быть использована для оценки специфического Т-клеточного ответа, в особенности Т-хелперов памяти. Выявлены наиболее информативные цитокины для оценки первичного (IL-4, TNF-α и IFN-γ) и вторичного (IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, TNF-α и IFN-γ) иммунного ответа.

На основании математического моделирования, выделены маркеры-предикторы и разработан алгоритм, позволяющий по результатам иммунологических анализов периферической крови предсказать эффективность прививки через месяц и вероятность наличия или отсутствия защитных уровней антител в крови через год после нее. Применение предложенного алгоритма позволяет еще до вакцинации против кори, краснухи и эпидемического паротита выявить когорту лиц, с угрозой развития первичных и вторичных вакцинальных неудач.

Рекомендовано однократное введение полиоксидония в дозе 3 мг одновременно с вакциной Приорикс часто болеющим детям и детям с исходно сниженными показателями иммунного статуса, входящим, по результатам прогнозирования, в группу риска по формированию первичных или вторичных вакцинальных неудач, для усиления синтеза специфических антител.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационного исследования.

Полученные в работе оригинальные данные, сформулированные в положениях, выводах и практических рекомендациях, могут быть рекомендованы при обучении студентов и слушателей факультетов последипломной подготовки медицинских ВУЗов по специальности «аллергология и иммунология», а также для широкого использования в процессе подготовке врачей клинических иммунологов, инфекционистов и специалистов по вакцинопрофилактике. Практические рекомендации целесообразно внедрить в работу специализированных центров по вакцинации, практику инфекционистов.

Оценка содержания диссертации и достоверность результатов исследования.

Методология и содержание диссертационной работы полностью соответствует цели и задачам исследования. Работа представлена в традиционном формате, включает введение, обзор литературы, главу «Материалы и методы», 3 главы результатов собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, рекомендации и список литературы, состоящий из 662 источников. Объем диссертации составляет 343 страницы, иллюстрирована 48 таблицами, 84 рисунками и 2 приложениями.

Введение включает обоснование актуальности темы, корректно сформулированные цель, задачи исследования и ключевые положения, выносимые на защиту. Обзор литературы написан хорошим языком, полно и последовательно отражает изучаемую проблему с детализацией освещения неразрешенных вопросов и может стать основой для написания самостоятельной монографии на данную тему.

В главе 2 дана общая характеристика обследованных лиц и подробно описаны методы исследования. Четко изложены критерии включения и исключения обследованных. В качестве дизайна исследования автором выбран

формат клинического открытое сравнительного проспективного контролируемого рандомизированного группового исследования. В работе обследованы большие контингенты больных разных возрастных групп, сформировавших основную группу и группу сравнения, а также контрольные лица, при обследовании которых использованы самые современные методы иммунологического анализа: многоцветная проточная цитометрия, мультиплексный метод определения цитокинов с помощью X-MAP технологии, различные варианты иммунохимического анализа, методы культивирования клеток и другие. Указанные методы были осуществлены с помощью современных автоматических диагностических приборов, обладающих системами автоматизированного сбора, учета и анализа данных. Для обработки полученных данных были применены корректные современные методы статистической обработки материала и адекватные методы математического моделирования.

В главе 3 представлены общие реакции иммунной системы в ответ на введение живой вирусной вакцины Приорикс. Описана динамика популяций и субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, клеток памяти, регуляторных клеток, про- и противовоспалительных цитокинов продуцируемых различными клетками крови, уровень иммуноглобулинов различных классов.

В главе 4, посвященной специфическому иммунному ответу на вакцинацию Приорикс описаны результаты оценки специфического клеточного и гуморального иммунитета.

Крайне важной является глава 5, в которой представлено математическое моделирование процессов формирования и поддержания иммунологической памяти у детей, привитых Приорикс.

Обсуждение результатов исследования проведено с учетом современных литературных данных и дополняет целостное восприятие работы.

Поставленные задачи исследования решены полностью. Выводы строго обоснованы фактическими результатами исследования и соответствуют

поставленным задачам. Практические рекомендации обоснованы, сформулированы конкретно и могут внедряться в работу отделений вакцинопрофилактики.

По теме диссертации опубликовано 60 печатных работ, в том числе 26 статей в ведущих российских и зарубежных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Принципиальных замечаний диссертация не вызывает.

Одновременно с этим имеется ряд вопросов, требующих уточнения и обсуждения.

1. Насколько корректно выделение половины обследованных детей, которые обращались в кабинет вакцинопрофилактики в группу «иммунокомпрометированных»? Насколько четкими являются клинические и лабораторные критерии для выделения такой группы?
2. При обследовании больных и практически здоровых детей были ли выявлены дети с подозрением на первичный иммунодефицит?
3. Была ли проведена апробация предложенного алгоритма на независимой выборке?
4. Планируется ли валидация прогностических критериев эффективности вакцинации на независимой выборке?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационное исследование Топтыгиной Анны Павловны на тему «Комплексная оценка процессов формирования и поддержания иммунологической памяти на примере вакцинации против кори, краснухи и эпидемического паротита» является законченной научной квалификационной работой, в которой решена актуальная научная проблема совершенствования и повышения эффективности вакцинации против кори, краснухи и эпидемического паротита на основании изучения клеточных и молекулярных механизмов формирования и поддержания иммунологической памяти на

вирусные антигены с использованием стандартных и оригинальных методических подходов, имеющая большое значение в иммунологии.

Актуальность, методология, научная новизна, теоретическая и практическая значимость диссертационной работы Топтыгиной А.П. полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент
Заместитель директора по научной работе
Федерального бюджетного учреждения науки
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»,
заведующий лабораторией молекулярной иммунологии
и сероэпидемиологии, член-корреспондент РАН, доктор
медицинских наук (14.03.09. – клиническая иммунология,
аллергология), профессор А.А.Тотолян

(ФБУН НИИЭМ имени Пастера).
197101, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14.
тел: (812) 2320066
totolian@pasteurorg.ru

Подпись член-корреспондента РАН, доктор медицинских наук, профессора Арега Артемовича Тотоляна ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь ФБУН НИИЭМ
имени Пастера, к.м.н. Г.Ф.Трифонова

«14» мая 2015 года