

ОТЗЫВ

официального оппонента Рубальского Олега Васильевича на диссертационную работу Фирстовой Виктории Валерьевны на тему «Экспериментально-иммунологическое обоснование выбора стратегии оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.09 - Клиническая иммунология, аллергология

Актуальность темы.

В России и странах СНГ для профилактики чумы и туляремии используются живые вакцины. В формировании протективного противочумного и противотуляремийного иммунитета большая роль отводится и гуморальному и клеточному звеньям иммунитета. Оценку иммунологической эффективности вакцинации осуществляют на основании выявления антител к липополисахариду (ЛПС) *Francisella tularensis* и F1 *Yersinia pestis*. Антитела играют определенную роль в защите от заражения, но их уровень не всегда коррелирует с защитой организма от инфекции. Для получения точной информации о защите организма от туляремии и чумы необходимо учитывать наличие специфических клеточных реакций, отражающих клеточный противочумный и противотуляремийный иммунитет. 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 вытекает из актуальности темы и сформулирована достаточно четко: разработать алгоритм оценки напряженности поствакцинального иммунитета к чуме и туляремии в реакциях *in vitro*.

Вышеизложенное позволяет классифицировать диссертационное исследование В.В. Фирстовой как своевременное и актуальное для клинической иммунологии, в части комплексного изучения механизмов формирования и поддержания иммунологической памяти в ответ на живую бактериальную прививку и создания научной базы для разработки методов оценки иммунологической памяти.

Научная новизна исследования.

Научная новизна полученных автором результатов несомненна. Диссертант провел исследования на экспериментальных животных, которых иммунизировали вакцинными штаммами, а затем заражали вирулентной культурой для выявления корреляции между показателями клеточного иммунитета и протективностью поствакцинального иммунитета. Результаты экспериментальных исследований подтверждены экстраполированием клеточных реакций с антигенами возбудителей *in vitro* для оценки протективности поствакцинального иммунитета у людей.

Так, например, выявленное диссертантом специфическое усиление экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т хелперов под влиянием кислото-нерастворимого комплекса *F. tularensis*, коррелирующее с защитой мышей против заражения *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*), было обнаружено и у вакцинированных против туляремии доноров и предложено в качестве одного из маркеров для выявления клеточного противотуляремийного иммунитета у людей. У доноров было проведено более глубокое исследование Т-клеток памяти, позволившее обнаружить у иммунизированных живой туляремийной вакциной людей появление маркера поздней активации HLA-DR на поверхности Т-клеток памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺) под влиянием кислото-нерастворимого комплекса *F. tularensis*, что было также предложено использовать для оценки клеточного противотуляремийного иммунитета у людей.

Новизна результатов заключается также в том, что диссертант выявил необходимость участия разных субпопуляций клеток в формировании клеточных реакций, достаточных для защиты от заражения *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*) и Schu *F. tularensis* subsp. *tularensis* (более вирулентного штамма туляремийного микроба). В частности, показано, что для защиты от заражения Schu *F. tularensis* subsp. *tularensis* необходима более выраженная активация цитотоксических клеток.

В процессе скрининга маркеров лимфоцитов были выявлены разные пути активации Т лимфоцитов под влиянием тулярина или кислото-нерастворимого комплекса у не вакцинированных и вакцинированных против туляремии доноров. Под влиянием тулярина или кислото-нерастворимого комплекса лимфоциты вакцинированных доноров активировались через CD28 и CD154 рецепторные молекулы. Лимфоциты неиммунных доноров активировались без участия CD154, что свидетельствовало об отсутствии активации Th1 иммунного ответа.

Большая часть работы была посвящена изучению клеточных реакций против возбудителя чумы. В работе показано, что в отличие от невакцинированных доноров у иммунизированных живой чумной вакциной людей, под влиянием F1 антигена на поверхности В лимфоцитов происходило усиление экспрессии CD86, что отражает активацию не только гуморального, но и клеточного звена иммунитета.

Выявлены разные механизмы межклеточной активации Т и В лимфоцитов, полученных от интактных и иммунных мышей под влиянием F1 антигена. Активация клеток у иммунных животных происходила по CD28-независимому пути за счет взаимодействия рецепторов В лимфоцитов CD40L с индуцибельной мембранной молекулой CD154, способствующей развитию иммунного ответа по Th1 пути.

Установлена экспрессия маркера поздней активации HLA-DR, под влиянием F1 антигена *Y. pestis* на поверхности CD45RO⁺ Т хелперов и на поверхности CD45RO⁺ цитотоксических лимфоцитов крови доноров.

Теоретическое значение работы.

Выполненная работа имеет научно-практическую значимость. Результаты проведенного исследования позволили выявить разные механизмы активации Т и В лимфоцитов иммунного и неиммунного организма под влиянием специфических антигенов *Y. pestis* и *F. tularensis*. Автор научно обосновал и подтвердил в экспериментах на животных то, что способность лимфоцитов изменять экспрессию поверхностных маркеров и активность синтеза цитокинов под влиянием антигенов *Y. pestis* и *F. tularensis* *in vitro* отражает наличие специфического клеточного иммунитета, достаточного для защиты от заражения туляремией и чумой. В результате проведенного исследования расширены представления об иммунологических механизмах обеспечения протективного иммунитета против бактерий *F. tularensis* разной вирулентности.

Практическое значение работы.

Фирстовой В.В. предложен комплекс иммунологических показателей, отражающих наличие клеточного противотуляремийного и противочумного иммунитета. Характеристика клеточного иммунитета необходима при оценке иммунобиологических свойств антигенов и штаммов – кандидатов в вакцинные, а также для выявления специфического иммунитета у людей после вакцинации. Применение предложенных методов позволит оптимизировать индивидуальную схему вакцинаций у периодически прививающихся против чумы и туляремии людей.

Результаты проведенных исследований послужили основой при составлении Методических указаний и двух Методических рекомендаций, которые используются в ФБУН ГНЦ ПМБ, ФКУЗ РНИПЧИ «Микроб» для отбора и предварительной оценки иммунобиологических свойств потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis*, изучения свойств потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы против туляремии и чумы,

повышения эффективности оценки противочумного и противотуляремийного поствакцинального иммунитета у людей.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационного исследования.

Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертации Фирстовой В.В., могут быть внедрены для выявления клеточного поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии и других инфекционных заболеваний у людей. Основные положения диссертации рекомендуется включать в учебные программы и практические занятия по иммунологии на курсах повышения квалификации в области вакцинопрофилактики. Разработанные методы могут быть использованы на этапах подбора антигенов при конструировании вакцин и стандартизации оценки иммуногенности вакцинных препаратов.

Оценка содержания диссертации и достоверность результатов исследования.

Содержание диссертации Фирстовой Виктории Валерьевны «Экспериментально-иммунологическое обоснование выбора стратегии оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии», соответствует специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология.

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, восьми глав результатов собственных исследований с обсуждениями полученных результатов, выводов и заключения, включающих практические рекомендации, перспективы дальнейших исследований, а также списка литературы, списка работ, опубликованных по теме диссертации.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования, четко формулирует цель работы и задачи по ее достижению, описывает теоретическую и практическую значимость исследования. В обзоре литературы приведены данные об особенностях формирования иммунного ответа к *F. tularensis* и иммунологические аспекты чумы.

Во второй главе описаны материалы и методы исследований. Достоверность научных результатов и обоснованность научных положений определяется тем, что в работе обследовано значительное число доноров и использовано большое количество экспериментальных животных. Для выполнения исследований выбраны адекватные современные методы исследований. Анализ и проведение лабораторных исследований проводились с использованием современных технологий и оборудования, оснащенного автоматизированным сбором, учетом и анализом данных. При обработке полученных данных были использованы корректные методы статистической обработки.

В третьей главе описаны результаты оценки противотуляремийного клеточного и гуморального иммунитета у мышей линии BALB/c после иммунизации препаратами против туляремии. Автор в соответствии с полученными результатами определяет, что о наличии клеточного противотуляремийного иммунитета можно судить на основании усиления синтеза интерферона- γ и интерлейкина-17 и увеличения экспрессии CD69 рецептора CD3+CD4+ клетками в ответ на рестимуляцию спленоцитов тулярином или кислотонерастворимым комплексом *F. tularensis* (КНК).

В четвертой главе проведена оценка клеточного и гуморального противотуляремийного иммунитета у людей, вакцинированных живой туляремийной вакциной. Подтверждено, что оценка противотуляремийного иммунитета необходима как после, так и перед проведением ревакцинации. Установлено, что по изменению количества клеток, экспрессирующих CD69 или HLA-DR рецепторы, под влиянием тулярина можно судить о наличии противотуляремийного клеточного иммунитета. Выявлено, что после

иммунизации живой туляремийной вакциной у 2 % людей могут не выявляться антитела к ЛПС. Однако у этих доноров синтезируются антитела к белкам бактерий *F. tularensis*. Для оценки противотуляремийного клеточного иммунитета предложено оценивать изменение синтеза лимфоцитами интерферона- γ и интерлейкина-17 и усиление экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т хелперов и HLA-DR маркера на поверхности CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ клеток в ответ на активацию лимфоцитов КНК.

В пятой главе описана оценка клеточного и гуморального иммунитета у мышей линии BALB/c после иммунизации коммерческой живой или экспериментальными чумными вакцинами. Описанные и проанализированные в данной главе результаты исследований позволили автору заключить, что для выявления клеточного противочумного иммунитета у мышей необходимо проводить оценку пролиферативной активности В лимфоцитов и Т лимфоцитов; концентрации ИЛ-17 в культуральной жидкости спленоцитов; количества CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ субпопуляций, экспрессирующих CD69 и CD154 рецепторы, в ответ на активацию спленоцитов F1 антигеном *Y. pestis*.

В шестой главе оценен иммунный ответ у людей после иммунизации живой чумной вакциной. Автором на основании проведенных исследований предложено определять у первично вакцинируемых против чумы людей перед иммунизацией уровень антител к F1 антигену, чтобы исключить ложноположительные результаты. Установлено, что об уровне противочумного иммунитета можно судить по увеличению содержания CD19⁺CD138⁺ популяции лимфоцитов под влиянием антигена F1, свидетельствующему о наличии специфических клеток, способствующих дифференцировке В лимфоцитов в плазматические клетки. О наличии противочумного клеточного иммунитета можно судить по увеличению количества CD45RO⁺HLA-DR⁺ Т лимфоцитов под влиянием F1 антигена чумного микроба.

Седьмая глава посвящена оценке специфического клеточного иммунного ответа после иммунизации против сибирской язвы. Основная цель данных исследований заключалась в оценке реакции повреждения сенсibilизированных лейкоцитов под влиянием антраксина в условиях *in vitro* для оценки напряженности иммунитета после иммунизации коммерческой вакциной *Bacillus anthracis* СТИ-1. Проведенные исследования выявили, что у мышей иммунизированных *B. anthracis* СТИ-1 отмечалось специфическое увеличение гиподиплоидных клеток и активация РНК под влиянием антраксина. Оценка клеточного иммунитета против сибирской язвы с использованием антраксина или протективного антигена по усилению экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т лимфоцитов не показала достоверных различий между вакцинированными против сибирской язвы людьми и неиммунными донорами. Уровень изменения экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т лимфоцитов, синтеза РНК, количества гиподиплоидных клеток под влиянием антраксина или протективного антигена характеризовались индивидуальными различиями между донорами не зависимо от наличия специфического иммунитета.

В восьмой главе проведена оценка иммунного статуса людей, постоянно прививающихся против особо опасных инфекций. Установлено, что у людей, вакцинирующихся по профилактическим показаниям на протяжении 15-20 лет против туляремии, чумы и сибирской язвы отсутствуют отклонения от показателей иммунограммы контрольных доноров.

В.В. Фирстова корректно обсуждает и обосновывает полученные результаты, формирует выводы и дает рекомендации.

По теме диссертации автором опубликовано 35 работ, в том числе 13 статей в журналах из списка изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук, одно руководство

и монография. Материалы диссертации доложены и обсуждены на Международных и Всероссийских конференциях.

Список литературы включает в себя 422 источника, в том числе 46 отечественных и 376 зарубежных. Работа изложена на 281 странице, содержит 24 таблицы и 48 рисунков.

Автореферат имеет традиционную структуру, отражает основные положения и содержание диссертационной работы. Диссертация и автореферат соответствуют требованиям ВАК при Минобрнауки России ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». Замечаний по оформлению диссертации и автореферата нет.

Заключение

Диссертационная работа Фирстовой Виктории Валерьевны на тему: «Экспериментально-иммунологическое обоснование выбора стратегии оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология, является законченной научно-квалифицированной работой, в которой решена актуальная научная проблема совершенствования и повышения эффективности оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии на основании выявления клеточных и молекулярных механизмов формирования и поддержания иммунологической памяти с использованием стандартных и оригинальных методических подходов, имеющая большое значение в иммунологии.

По своей актуальности, новизне и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября

2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология.

- **Официальный оппонент**
Проректор по научной и инновационной работе Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор, доктор медицинских наук
Контактные данные:
414000, Астрахань,
ул. Бакинская, 121
Тел.: 8512523658
e-mail: rubalsky.innovation@gmail.com



О.В. Рубальский

Подписи заверяю: 
Ученый секретарь ГБОУ ВПО
«Астраханский государственный
медицинский университет»
Минздрава России,
к.м.н., доцент Ничога В.Д.