

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Курашовой Светланы Сергеевны «Оценка эффективности адъювантов различного происхождения, методов инаktivирования вирусов и контроля специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.10 (03.02.02) – «Вирусология».

Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертационная работа Курашовой Светланы Сергеевны посвящена вопросам, затрагивающим различные аспекты создания инаktivированных вакцин для профилактики хантавирусных лихорадок, природноочаговых не трансмиссивных зоонозов, представленных на евроазиатском континенте геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС).

В Российской Федерации ГЛПС занимает ведущее место среди всех природно-очаговых болезней человека. Отсутствие тенденции к снижению заболеваемости ГЛПС, тяжесть клинического течения болезни, сопровождающейся длительным сроком нетрудоспособности, отсутствие специфических средств лечения на фоне малоэффективной неспецифической профилактики ГЛПС свидетельствуют о чрезвычайной социальной и медицинской значимости создания вакцин для контроля этой инфекции. Опыт таких стран как Китай, Южная и Северная Корея показал эффективность применения инаktivированных вакцин для профилактики ГЛПС, вызванной вирусами Хантаан и Сеул. Однако актуальные для этих территорий возбудители не обеспечивают защиту от вируса Пуумала, вызывающего более 95% всей заболеваемости ГЛПС в Российской Федерации. Лицензированные вакцины против ГЛПС к настоящему времени отсутствуют.

В этой связи проблемы, касающиеся выяснения биотехнологических закономерностей, способствующих оптимизации технологии изготовления инаktivированных хантавирусных вакцин, включая выбор адъювантов,

оптимального способа инактивирования хантавирусов, а также разработку методов контроля специфической активности вакцинного препарата относятся к числу наиболее важных, что, в свою очередь, обуславливает актуальность темы исследований данной диссертационной работы.

Научная новизна исследования

Диссертантом впервые на основании полученных результатов исследования проведен анализ иммуностимулирующей и иммуномодулирующей эффективности 4-х адьювантов различного происхождения в составе экспериментальных вакцинных препаратов, а также дана оценка эффективности различных методов инактивирования хантавирусов.

Впервые установлена способность 3-х адьювантов (липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, рекомбинантный термолабильный энтеротоксичный белок В *Escherichia coli* и ремоделированные сферические частицы *Tobacco mosaic virus*) повышать иммуногенную активность хантавирусных вакцинных препаратов.

Показано, что липополисахарид Ac3-S-LPS, помимо наиболее высокой по сравнению с другими адьювантами иммуностимулирующей эффективностью, способствовал повышению стабильности вакцинных препаратов при хранении.

Установлено, что липополисахарид Ac3-S-LPS в составе хантавирусных вакцин активизирует как гуморальное, так и клеточное звено иммунитета, стимулируя индукцию цитокинов ИЛ-12 и ИФН- γ .

Впервые установлено свойство β -пропиолактона снижать агрегацию инактивированных вирусных частиц и фрагментов клеточных белков, что приводит к сокращению потерь вирусного компонента и получению более очищенных кандидатных вакцинных препаратов.

Впервые установлена прямая зависимость между содержанием количества копий вирусной РНК в инактивированном β -пропиолактоном вакцинном препарате и его иммуногенной активностью.

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

В диссертационной работе С.С. Курашовой в полной мере решены поставленные задачи, позволившие достичь поставленной цели исследования. Сформулированные в диссертации научные положения и выводы обоснованы статистически проанализированными экспериментальными данными, полученными в работе, согласуются с известными фактами и не противоречат известным положениям иммунологии.

Теоретическая и практическая значимость работа

Теоретическая значимость настоящего исследования заключается в получении новых данных, устанавливающих адъювантный эффект трех соединений различной природы (низкоэндогенный липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, рекомбинантный термолабильный энтеротоксичный белок В *Escherichia coli* и ремоделированные сферические частицы *Tobacco mosaic virus*) в составе хантавирусных вакцин, что может быть использовано для усовершенствования вакцинных препаратов против возбудителей других вирусных инфекций.

Практическая значимость исследования заключается в подборе эффективного адъюванта, обладающего иммуностимулирующим и стабилизирующим эффектом в составе хантавирусных вакцин, разработке оптимальных условий применения β -пропиолактона для инактивирования вакцинных штаммов хантавирусов, а также метода ПЦР в реальном времени для контроля специфической активности, что позволяет значительно повысить технологичность изготовления вакцинных препаратов против ГЛПС. Разработанные диссертантом методические подходы в соответствии с полученными результатами могут быть использованы при конструировании и освоении промышленного производства хантавирусных вакцин.

Достоверность и апробация результатов исследования

Достоверность результатов диссертационной работы С.С. Курашовой не вызывает сомнений и обеспечивается применением современных методов иммунологического, иммунохимического и молекулярно-генетического анализа, достаточным числом исследований, длительным сроком наблюдений, комплексным подходом к проведению исследований, выполненных с использованием современных методов и статистической обработкой полученных результатов. Все выводы и практические рекомендации диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам работы.

Основные положения диссертации были представлены и обсуждены на пяти научных конференциях, включая 2 международных. По теме диссертации опубликовано 39 печатных работ, из них в журналах ВАК - 11 публикаций, в системе РИНЦ - 25 публикаций (14 из них – тезисы), в системе Scopus - 7 публикаций, в системе Web of Science - 4 публикации, тезисы, опубликованные за рубежом – 5, тезисы, опубликованные в сборниках российских конференций – 18.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Рукопись диссертации построена по традиционному плану, оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми ВАК к кандидатским диссертациям и состоит из следующих разделов: введения, основной части, состоящей из обзора литературы (глава 1), материалов и методов (глава 2), результатов собственных исследований (главы 3, 4, 5, 6), заключения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы, содержащего 284 источника. Работа изложена на 162 страницах текста компьютерной верстки, включая 21 рисунок и 13 таблиц.

Во введении диссертант раскрывает актуальность темы, ее научную новизну, теоретическую и практическую значимость. В «Обзоре литературы», представлен логически выстроенный анализ достаточно большого количества источников литературы по теме исследования, большинство из которых – публикации в иностранных научных изданиях. В первом разделе данной главы дана общая характеристика хантавирусов и

хантавирусных лихорадок, включая вопросы иммунопатогенеза заболеваний, ассоциированных с хантавирусами, и особенностей иммунного ответа на инфекцию. Приводится информация, касающаяся разработки хантавирусных вакцинных препаратов и поствакцинального иммунного ответа. Во втором разделе описываются известные методы инактивирования различных вирусов, возможные механизмы воздействия инактиваторов. Третий подраздел литературного обзора посвящен описанию адъювантов различных классов, их иммуномодулирующих характеристик.

В главе «Материалы и методы» подробно изложены использованные в работе вирусологические, иммунологические и молекулярно-генетические методы, представлен дизайн исследований. Контроль иммуногенности экспериментальных вакцинных препаратов выполнен на модели мышей BALB/c. Иммуногенность препаратов оценивалась по стимуляции выработки нейтрализующих антител, а также анализу цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-12 и ИФН- γ . Использованные методы соответствуют цели и задачам проведенного исследования.

Основные результаты, определяющие содержание исследования, представлены в 3, 4, 5 и 6 главах. Глава 3 посвящена разработке контроля специфической активности вакцинных препаратов методом ПЦР в реальном времени. Метод ПЦР-РВ, разработанный на основе данных полногеномного секвенса хантавирусных вакцинных штаммов, показал высокую специфичность и чувствительность количественного определения вирусной РНК в образцах экспериментальных вакцинных препаратов, инактивированных β -пропиолактоном. В отличие от ранее применяемых серологических методов, определение специфической активности вакцинного препарата по содержанию вирусной РНК, наряду с высокой специфичностью, обеспечивает высокую воспроизводимость результатов. Ещё одним преимуществом ПЦР-РВ является возможность анализировать количество РНК каждого вируса в составе поливалентной вакцины.

В 4 главе представлены данные по сравнительной оценке эффективности методов инактивирования хантавирусов. На модели вируса Пуумала показано, что наибольшее повреждающее действие на вирусную РНК

оказывает термоинактивация (при 6 ± 2 °C или 22 ± 2 °C); далее следуют перекись водорода, УФ-лучи, формальдегид, β -пропиолактон. Анализ иммуногенной активности вакцинных препаратов на основе вируса Пуумала (ВАК-ПУУ), инаktivированных β -пропиолактоном, формальдегидом, УФ-лучами и перекисью водорода показал, что все испытанные образцы индуцировали в равной степени высокий уровень нейтрализующих антител, что свидетельствует о сохранности иммуногенных эпитопов вируса. Установлена наибольшая эффективность использования β -пропиолактона, который в качестве инаktivатора, на порядок по сравнению с формальдегидом, перекисью водорода и ультрафиолетовым излучением снижает содержание балластных белков за счет уменьшения их агрегации, что в свою очередь ведет к более эффективной очистке вируса на этапах осветляющей фильтрации, гельфильтрации и стерилизующей фильтрации вакцинного материала. Кроме этого установлена прямая корреляция между числом копий РНК в препарате, инаktivированном β -пропиолактоном, и титром нейтрализующих антител, что позволяет использовать количественное содержание РНК в вакцинном препарате для дозирования вакцины.

Глава 5 посвящена сравнительной оценке иммуногенной активности экспериментальных хантавирусных вакцинных препаратов, содержащих адьюванты различного происхождения.

Автором впервые проведен анализ иммуноадьювантной активности веществ различного происхождения в составе экспериментальных вакцинных препаратов: ВАК-ПУУ и поли-ВАК (на основе вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи), соответственно. Установлена способность 3-х адьювантов (липополисахарид Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, рекомбинантный термолабильный энтеротоксичный белок В *Escherichia coli* и ремоделированные сферические частицы *Tobacco mosaic virus*) повышать иммуногенную активность хантавирусных вакцинных препаратов. По данным исследования, липополисахарид Ac3-S-LPS, помимо наиболее высокой по сравнению с другими адьювантами иммуностимулирующей эффективности, способствует повышению стабильности при хранении как

моно- так и трехвалентных экспериментальных вакцинных препаратов, активизирует как гуморальное, так и клеточное звено иммунитета.

В главе 6 представлен анализ иммуномодулирующего эффекта адьювантов по содержанию цитокинов в сыворотках крови мышей BALB/c. Эксперименты показали, что независимо от добавления к хантавирусным вакцинным препаратам испытуемых адьювантов разного происхождения происходит активация эффекторов иммунной системы. В частности, активируется индукция синтеза регуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИНФ- γ , что является показателем поляризации иммунного ответа по типу Th-1. Наиболее выраженным этот эффект наблюдался в присутствии липополисахаридного адьюванта.

В заключительном разделе диссертационной работы автором проведено обобщение результатов исследования и их обсуждение. Этот раздел написан лаконично, с привлечением литературных данных при обсуждении собственных результатов и свидетельствует о профессиональной эрудиции диссертанта. Результаты диссертационного исследования сформулированы в 6 выводах, которые полностью соответствуют цели и задачам исследования и в полной мере соответствуют полученным результатам.

Автореферат полностью отражает все разделы и положения диссертации, резюмирует полученные результаты.

Принципиальных замечаний, которые могли бы повлиять на положительную оценку работы, нет. Однако, в процессе ознакомления с материалами диссертации возникли вопросы, касающиеся методической постановки экспериментов и получения результатов, которые хотелось бы обсудить.

При описании метода фокус образующих единиц для их выявления в лунки добавляли меченые антиавидные антитела или протеин «А». Однако, не описано влияние на конечный результат внесение каждого из этих компонентов.

При описании изготовления полуфабрикатов для кандидатных образцов вакцин не описаны их основные характеристики: содержание общего белка и вируса, рН препарата, которые могут влиять на результаты экспериментов.

При исследовании влияния адъювантов на иммунологические показатели экспериментальных вакцинных образцов не представлены результаты по наличию сорбции антигенов на исследуемые адъюванты, что является одним из основных показателей их использования в вакцинных препаратах.

В целом, диссертация написана ясным научным языком, изложение результатов и обсуждение представленных данных логично, статистическая обработка результатов представлена в полном объеме.

Соответствие специальности

Научные положения диссертации соответствуют специальности 1.5.10 (03.02.02) – «вирусология». Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 2, 7, 10 паспорта специальности «вирусология».

Заключение

Диссертационная работа Курашовой Светланы Сергеевны на тему: «Оценка эффективности адъювантов различного происхождения, методов инактивирования вирусов и контроля специфической активности хантавирусных вакцинных препаратов», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.10 (03.02.02) – «Вирусология» является законченной научно-квалификационной работой по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №335 от 21 апреля 2016 г., №748 от 2 августа 2016 г., №650 от 29 мая 2017 г., №1024 от 28 августа 2017 г., №1168 от 01 октября 2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор - Курашова Светлана Сергеевна заслуживает присуждение искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.10 (03.02.02) - «Вирусология».

Официальный оппонент:

директор НОЦ «Иммунобиотехнология» Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор, доктор биологических наук по специальности 1.5.6 (03.01.06) - «Биотехнология».



Красильников Игорь Викторович

Адрес: НОЦ «Иммунобиотехнология» Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А
тел. +7 (812) 660-06-10, e-mail: kiv06@mail.ru.

Подпись Красильникова Игоря Викторовича удостоверяю.

Ученый секретарь НОЦ «Иммунобиотехнология» ФГБОУ учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» МЗ России, д.б.н.

Королев Александр Михайлович Акафит

Подпись руки Красильникова И.В.
удостоверяю

«12» августа 2021 г.

Начальник отдела документации Палток И.В.
ФГБОУ ВО СПбФУ Минздрава России

