

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора, завідувача кафедри епідеміології Харківського національного медичного університету МОЗ України Чумаченко Тетяни Олександрівни на дисертаційну роботу **Єлисеєвої Ірини Віталіївни** «Теоретично-прикладні основи одержання і застосування нативних антигенів *C.diphtheriae* для створення парентеральних та мукозальних протидифтерійних вакцин», подану до захисту в спеціалізовану вчену раду Д64.618.01 при ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова Національної академії медичних наук України» на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Актуальність теми. Незважаючи на наявність специфічних засобів лікування та профілактики, дифтерійна інфекція продовжує реєструватись в світі і спричиняти значні медичні та соціально-економічні наслідки. Всесвітня організація охорони здоров'я повідомила про 8 819 випадків дифтерії в 2017 р. і зазначила неповну реєстрацію випадків, тільки 81 % даних епідеміологічного нагляду були включені до цієї статистики.

Дифтерія відноситься до інфекцій, які контролюються засобами імунопрофілактики. Для щеплень проти дифтерії застосовують дифтерійний анатоксин, який зарекомендував себе високоефективним засобом попередження розвитку захворювання, індукуючи напружений антитоксичний імунітет у щеплених осіб.

Важливою рисою сучасного епідемічного процесу дифтерійної інфекції є наявність прихованого компоненту у вигляді бактеріоносійства та легких, маломаніфестних форм захворювання, які залишаються невиявленими. Ці випадки є небезпечними джерелами збудника інфекції і відіграють суттєву роль в підтриманні епідемічного процесу. Особливістю носійства у теперішній час є його формування на фоні високого рівня антитоксичного протидифтерійного імунітету. Спостерігаються спалахи дифтерійного носійства у колективах з високим рівнем популяційного антитоксичного імунітету. Це викликає занепокоєння, тому що невиявлені носії є джерелами

інфекції і активно розповсюджують збудника, що створює загрози для суспільства в цілому. Яскравим прикладом є епідемія дифтерії, яка спостерігалась в Україні та інших країнах в 90-х роках минулого століття.

Нажаль існуючі сучасні протидифтерійні вакцини здатні викликати тільки анитоксичний протидифтерійний імунітет, який захищає людину від маніфестних форм дифтерійної інфекції і не попереджає формування носійства, що призводить до циркуляції *Corynebacterium diphtheriae* серед населення і створює небезпеку виникнення спалахів дифтерії, зростання захворюваності на дифтерію з тяжким перебігом і високою летальністю навіть у щеплених осіб. Отже, наукові здобутки та позитивні досягнення служб охорони здоров'я та вакцинопрофілактики як їх складової не усунули ризики виникнення епідемічних ускладнень, в першу чергу, через недосконалість існуючих вакцин проти дифтерії.

Світова медична спільнота вимушена була визнати, що дифтерійна інфекція всупереч проведення масової імунізації висуває серйозні виклики, які потребують нових підходів до розв'язання проблеми. Сьогодні стає очевидним необхідність перегляду стратегії масової імунопрофілактики дифтерії дифтерійним анатоксином на основі розробки комплексних профілактичних препаратів, які містять як анатоксин, так і бактерійний компонент. Враховуючи вищевикладене актуальність теми дисертаційної роботи Єлисеєвої І.В. не викликає сумнівів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження за темою дисертації проведені в рамках п'яти науково-дослідних робіт на базі лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова НАМН України» впродовж 2005-2019 р.р.: «Вивчення ад'ювантних властивостей поверхневих антигенів, безстіночних клітин, фрагментів ДНК умовно-патогенних коринебактерій» (№ держреєстрації 0105U001110), «Біологічна характеристика антигенів збудників дифтерії, кашлюку та туберкульозу, виділених за допомогою фізико-хімічних методів» (№ держреєстрації

0108U001295), «Підвищення безпеки та ефективності вакцинопрофілактики дифтерії і кашлюку шляхом перорального щеплення з подальшим проведенням парентеральної вакцинації» (№ держреєстрації 0111U004734), «Дослідження імуногенності дифтерійного анатоксину сумісно з поверхневими антигенами *C. diphtheriae* і методи подвійного контролю їх безпеки» (№ держреєстрації 0114U000246), «Визначити вплив кашлюково-дифтерійних антигенів на клітинно-опосередкований імунітет та обґрунтувати концептуальні положення створення вакцин у форсуючому режимі» (№ держреєстрації 0117U002276). Дисертант була відповідальним виконавцем зазначених тем.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації підтверджується наявністю чітко сформульованої програми дослідження, чималим обсягом проведених досліджень, об'єктами яких були музейні штами мікроорганізмів (музейні штами ДУ «ІМІ НАМН» *Corynebacterium diphtheriae*, var. *mitis*, tox-, № 58, *Corynebacterium xerosis*, № 47, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, № 49, *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis*, tox+, № 255, *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis*, tox+, *massachussets*, *Lactobacillus plantarum* № 10, виділений при профілактичному обстеженні штаму *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis*, tox+, new); виготовлені з них бактеріальні антигенні препарати; нативний очищений дифтерійний анатоксин; експериментальна комбінована дифтерійна вакцина з бактеріальним компонентом.

Застосований широкий спектр методів дослідження (бактеріологічних, біохімічних, серологічних, імунологічних та інших), адекватний меті та поставленим завданням, та статистична обробка даних забезпечили одержання достовірних та репрезентативних результатів для об'єктивних висновків.

Представлені в роботі наукові положення, висновки і рекомендації ґрунтуються на фактичних матеріалах дисертаційного дослідження. Проведений аналіз та узагальнення даних при оцінці отриманих результатів власних досліджень логічні та обґрунтовані, висновки відповідають завданням, які поставив дисертант.

Викладення матеріалу дисертації супроводжується достатньою кількістю рисунків та таблиць, що необхідно для розуміння викладеного матеріалу.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що вперше запропоновано комбіновану дифтерійну кандидат-вакцину з бактеріальним компонентом без хімічного ад'юванта гідроксиду алюмінію; вперше, на основі застосування фізичних факторів дезінтеграції бактерій розроблено технологію отримання нативних поверхневих антигенних комплексів дифтерійних штамів як біологічних платформ для нового класу парентеральних та мукозальних дифтерійних вакцин; обґрунтовано оптимальний продуктивний режим дезінтеграції мікробних клітин для одержання препарату поверхневих антигенів *C. diphtheriae*.

Показано, що експериментальні препарати субклітинних комплексів дифтерійних штамів здатні істотно стимулювати антитоксичний імунітет при їх введенні з нативним очищеним дифтерійним анатоксином у парентеральних, пероральних, комбінованих схемах щеплень.

Встановлено, що експериментальні бактеріальні антигенні препарати, виготовлені авторським способом з мікробних культур різних представників коринебактерій посилюють процеси фагоцитарної активності нейтрофілів при першому й повторних щепленнях.

Вперше показано антиколонізаційну активність експериментальних антигенних препаратів шляхом двотижневого моніторинга елімінації збудника з слизових носу щеплених досліджуваними кандидат-вакцинами кролів, заражених інтраназально культурою *C. diphtheriae*, на основі запропонованого способу моделювання транзитного дифтерійного

бактеріоносійства. Встановлено, що основою анти-адгезивної спрямованості комбінованої кандидат-вакцини є можливість впливу за допомогою фізичних факторів на адгезивні властивості культури *C.diphtheriae*, про що свідчить також антиадгезивна активність сироваток крові кролів, щеплених дослідними антигенними препаратами.

Охарактеризовано практичні шляхи підвищення безпеки розроблених препаратів. Вперше реалізовано принцип пероральної антиген-специфічної імунотерапії щодо застосування десенсибілізуючих комбінованих схем щеплення і показано, що попереднє пероральне введення компонентів експериментальної комбінованої дифтерійної вакцини усуває формування шкірної реакції у кролів при наступному внутрішньошкірному їх введенні.

Вперше показано ефективність пероральної бустер-імунізації проти дифтерії, наведені схеми введення та дози препарату.

Дістало подальший розвиток положення про те, що існуюча стратегія специфічної вакцинопрофілактики, що націлена на екстенсивний шлях масового охоплення населення щепленнями, не перешкоджає поширенню дифтерійної інфекції через здорових бактеріоносіїв та легкі, не діагностовані, форми інфекції, і потребує перегляду.

Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що науково обґрунтовано принципи застосування комбінованих дифтерійних вакцин з бактеріальним компонентом як перспективного заходу щодо підвищення безпеки вакцинопрофілактики дифтерії, перешкоджання бактеріоносійству та циркуляції збудника серед населення в парентеральних, пероральних та комбінованих схемах імунізації при здійсненні екстреної профілактики в осередках захворювання на дифтерію та для бустер-імунізації населення. Одержані експериментальні зразки антигенних препаратів з імуногенною та ад'ювантною дією.

Розроблено і апробовано на Харківському виробництві АТ «Біолік» технологічну схему процесу одержання комбінованих дифтерійних вакцин з бактеріальним компонентом у виробничих умовах з використанням

відходів дифтерійного виробництва; дано наукове обґрунтування технологічного процесу їх виготовлення.

Запропоновано макет аналітико-препаративної установки для ультразвукової дезінтеграції мікробної маси виробничого штаму, призначений для одержання нативних антигенів бактеріальних клітин у єдиному технологічному процесі у промислових об'ємах виробництва.

Практичне значення отриманих результатів підтверджується наявністю 3 патентів України на корисну модель: «Спосіб отримання бактерійного дифтерійного антигену»: патент України № 86891, «Спосіб моделювання транзитного дифтерійного бактеріоносійства»: патент України № 112583, «Спосіб підвищення резистентності слизових оболонок дихальних шляхів організму до інфікування збудником дифтерії (в експерименті)»: патент України № 111081.

Основні матеріали й положення дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес і наукову роботу кафедри клінічної мікробіології та імунології Харківської медичної академії післядипломної освіти, кафедри молекулярної та медичної біофізики ХНУ ім. В.О. Каразіна, кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії НТУ «Харківський політехнічний інститут»), АТ «Біолік», про що є шість актів впровадження.

Відповідність дисертації профілю спеціалізованої вченої ради. Дисертація за актуальністю обраної теми, змістом та обсягом матеріалу, науковою новизною, практичним значенням відповідає спеціальності 03.00.07 – мікробіологія та профілю спеціалізованої вченої ради Д64.618.01.

Характеристика розділів, оцінка змісту дисертації, її завершеність в цілому. Дисертація викладена українською мовою, має традиційну структуру, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 11 розділів власних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел та трьох додатків.

У вступі проілюстровано актуальність теми дисертаційного дослідження, визначено її зв'язок із науковою діяльністю ДУ «ІМІ НАМН»,

окреслено мету та завдання дослідження, вказано наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, представлено інформацію щодо апробації та публікації результатів дослідження.

В *першому розділі* наводиться огляд літератури, в якому проаналізовано сучасні погляди на актуальні питання боротьби з дифтерійною інфекцією, обговорюються можливі причини захворюваності на дифтерію щеплених осіб. Автором зроблено акцент на новій парадигмі конструювання профілактичних препаратів широкого спектру дії, що базуються на тренуваному уродженому імунітеті, висвітлюються негативні ефекти, спричинені ад'ювантами вакцин, та шляхи їх запобігання. оцінюються переваги фізичних факторів дезінтеграції мікробних клітин. Наведений аналітичний (критичний) огляд наукових публікацій за заданою тематикою підтверджує важливість та необхідність виконання обраної теми.

В *другому розділі* описуються матеріали та методи дослідження, наведена методологія дослідження. Обсяг проведених досліджень визначався завданнями роботи. Автором було залучено бактеріологічні (культивування штамів *C. diphtheriae*, накопичення мікробної маси коринебактерій для подальшої дезінтеграції, дослідження мікрофлори слизової оболонки носу піддослідних тварин); дезінтеграція мікроорганізмів фізичними чинниками (ультразвук, ЕМВ НЗВЧ); метод рідинної гель-хроматографії (очищення експериментальних антигенних препаратів); біохімічні (склад експериментальних антигенних препаратів); серологічні (РПГА з сироватками крові вакцинованих тварин); імунологічні (визначення активності фагоцитозу, показників пошкодження нейтрофілів, рівня циркулюючих імунних комплексів, шкірних алергічних реакцій, феномену Артюса); біологічні (вакцинація, зараження, специфічна нешкідливість експериментальних вакцин); аналітичні та медико-статистичні (аналіз одержаних результатів та обчислення їх достовірності).

Основними розділами роботи є результати власних досліджень (розділи 3 - 13). В роботі представлено авторське бачення стратегії стосовно профілактичної роботи проти дифтерії, яка включає стимуляцію природженого імунітету, застосування адгезинів, можливість проведення бустер-імунізації, контроль безпечності профілактичних препаратів.

Дана робота присвячена вирішенню актуальних проблем і визначає нові шляхи підвищення ефективності профілактичної роботи. Перш за все це стосується бактеріального компонента кандидат-вакцини. Автор розробила технологію щадної дезінтеграції мікробних клітин фізичними факторами, яка забезпечує накопичення поверхневих антигенів при збереженні життєдіяльності клітин збудника і не викликає попадання в дезінтеграт нуклеїнових кислот в концентраціях, перевищуючих нормативні показники. Суттєва особливість технології пов'язана з тим, що виділення антигену вперше було проведено за допомогою обробки ультразвуком поверхневих клітинних структур збудника. Це дозволило одержати низькомолекулярні багаті епітопами структури клітинних стінок патогену без застосування модифікуючих хімічних реагентів.

Виділені за допомогою фізичних технологій антигени характеризуються високими імуногенними властивостями, не викликають побічних реакцій у щеплених тварин і мають значно різнобічний характер дії та, відповідно, сферу застосування..

Так, дані структури проявляють ад'ювантну дію по відношенню до дифтерійного анатоксину і являються одночасно адгезинами. Це дозволяє розробляти препарати проти колонізації збудником слизових оболонок. Перспективність такого напрямку дослідження доведена на моделі бактеріоносійства носоглоткової локалізації на лабораторних тваринах. Цей фрагмент роботи має стратегічне значення в разі практичної реалізації його.

Слід виділити, як один із ключових розділів дисертації, розділ, в якому наведені дані про можливість реалізації програми стосовно бустер-імунізації дитячого та дорослого населення. Для цього автор пропонує створити на

основі поверхневих антигенів пероральну вакцину, яка, завдяки фізіологічному способу введення препарату, може бути використана серед широких верств населення. Здобувач експериментально довела ефективність такої стимуляції специфічного імунітету.

Про значення процесу бустер-імунізації свідчать дані літератури, згідно яким до введення вакцинопрофілактики та на початку її виконання процес набуття природного імунітету був швидким: в деяких країнах понад 80 % дітей були імунними до 10-річного віку. Це свідчить про високу значимість у формуванні колективного імунітету інтенсивності циркуляції штамів збудника серед населення.

Проблема бустер-імунізації має відношення не тільки до вакцинації проти дифтерії. Застосування профілактичних препаратів вплинуло на інтенсивність циркуляції патогенів при багатьох інфекційних захворюваннях. Тому приведені в розділі підходи до вирішення даної проблеми по відношенню до профілактичної роботи проти дифтерії на основі бустер-імунізації за допомогою пероральних вакцин може набути узагальнюючого значення.

В дисертації велика увага приділена питанням безпечності протективних антигенів в залежності від доз та схем їх парентерального введення. Автор оцінювала вплив кандидат-вакцин на організм щеплених тварин впродовж більш тривалого часу, ніж визначено в нормативних документах. В роботі показано, що пізні післявакцинальні ускладнення, які не спостерігалися впродовж перших чотирьох днів, можуть супроводжуватися розвитком некрозу в ділянці пробного введення профілактичних препаратів, в тому числі і експериментальних зразків. Проведені дослідження з урахуванням даних подовження контролю проявів шкірних реакцій дозволили автору визначити безпечні дози кандидат-вакцин та оптимальні схеми їх застосування.

Одержання безпечних протективних антигенів при збереженні високих імуногенних властивостей можна віднести до основних вагомих результатів проведених досліджень.

Робота відзначається теоретичною передмовою, сформульованою у вигляді авторської доктрини з включенням для вирішення важливих питань, спрямованих на підвищення ефективності вакцинопрофілактики, яка поєднана з практичною реалізацією її основних положень на основі створення нативних профілактичних препаратів та обґрунтування нових шляхів підвищення ефективності профілактичної роботи проти дифтерії.

Апробація результатів дисертації. Дисертація пройшла широку апробацію. Матеріали дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на Першому національному форумі імунологів, алергологів, мікробіологів, паразитологів (за участю міжнародних спеціалістів) (Харків, 16-17 травня 2019 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення» (Київ, 2-3 листопада 2018 р.); з'їзді Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Одеса, вересень 2017 р.); науково-практичній конференції «Здобутки та перспективи у боротьбі з інфекційними захворюваннями (мікробіологія, ветеринарія, фармація)» (Харків, 18-19 травня 2017 р.); науково-практичній конференції, присвяченій щорічним Читанням пам'яті академіка Л. В. Громашевського та 120-річчю ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського Національної академії медичних наук України». (Київ, 12-13 жовтня 2016 р.); 8-му національному з'їзді фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (Харків, 13-16 вересня 2016 р.); The II International Scientific Conference on Microbiology and Immunology-the development outlook in the 21st century (Kiyiv, April 2016); науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями», присвяченій 170-річчю з дня народження І. І. Мечникова (Харків, травень 2015 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Епідеміологічні

дослідження в клінічній та профілактичній медицині: досягнення та перспективи», присвяченій 210-й річниці Харківського національного медичного університету та 85-річчю кафедри епідеміології (Харків, 12-13 березня 2015 р.); 4-й Міжнародної науково-практичної конференції «Современные достижения фармацевтической технологии и биотехнологии» (Харьков, 16-17 октября 2014 г.); науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Стратегія і тактика боротьби з інфекційними захворюваннями» (Харків, 17-18 жовтня 2012 р.); науково-практичній конференції «Довкілля і здоров'я» (Тернопіль, 27-28 квітня 2012 р.); XV з'їзді українського науково-медичного товариства мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ім. Д. К. Заболотного «Проблеми та еволюція епідемічного процесу і паразитарних систем провідних інфекцій сучасності» (Харків, 23-25 листопада 2011 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології та гігієни» (Львів, 20-21 травня 2010 р.); XII з'їзді товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Ужгород, 25-30 травня 2009 р.); науково-практичній конференції «Епідеміологія, сучасні методи діагностики та профілактики гострих інфекцій дихальних шляхів» (Київ, 7-8 лютого 2007 р.); науковій конференції «Пошук та розробка нових профілактичних і лікувальних протимікробних засобів, антисептиків, дезінфектантів та пробіотиків» (Харків, 20-21 листопада 2006 р.); міжнародної наукової конференції «Стратегия и тактика борьбы с инфекционными заболеваниями» (Харьков, 23-24 октября 2001 г.).

Повнота викладених матеріалів в опублікованих працях. Усі результати дисертаційного дослідження повною мірою представлені в опублікованих працях. За матеріалами дисертації опубліковано 47 наукових праць, серед них одна зарубіжна монографія, 26 статей (24 – у наукових фахових виданнях України, одна – у міжнародному виданні, 24 – включено до міжнародних наукометричних баз), 3 патенти України на корисну модель, 17 тез доповідей у матеріалах наукових форумів, з'їздів та конференцій.

Зауваження та пропозиції. Суттєвих зауважень до змісту і оформлення дисертації немає, однак слід відмітити наявність деяких «русизмів» та друкарських помилок (наприклад, с.67, 184). В літературному джерелі 555 неправильно вказаний рік видання та дата звернення. В рис. 1.1 легенда представлена російською мовою. У підпису к рис. 1.3 не вказано, який саме календар щеплень в Україні наведений. Ці дані представлені тільки в тексті дисертації, що утруднює сприйняття інформації.

Також, на мій погляд, дисертаційна робота містить багато розділів. Для поліпшення сприйняття матеріалу можна було б об'єднати розділи 3 та 9, розділи 4, 5 та 7; розділи 6 та 8. Розділ 1 теж було б потрібно скоротити до 20% обсягу дисертації.

Вказані зауваження не зменшують цінності та практичної значущості дисертаційної роботи та її загальної позитивної оцінки.

Високо оцінюючи дисертаційну роботу Єлисеєвої І.В., у порядку дискусії бажано отримати від дисертанта відповіді на наступні запитання:

1. Яку роль на Вашу думку відіграють в епідемічному процесі дифтерії нетоксигенні штами коринебактерій?
2. Який механізм ад'ювантної дії запропонованого препарату *C.diphtheriae*?
3. Як Ви вважаєте, наскільки ефективна система контролю за можливою реверсією анатоксину в екзотоксин?

Дисертаційна робота Єлисеєвої Ірини Віталіївни за актуальністю, науковою новизною отриманих результатів, методичним рівнем проведених досліджень, теоретичною та практичною цінністю є такою, що цілком відповідає вимогам щодо докторських дисертацій, які визначено пп. 11-13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року № 567 (із змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України від 19.08.2015 р. № 656, від 30.12.2015 р. № 1159, від 17.07.2017 року № 40 «Про затвердження вимог до

оформлення дисертації», а її автор – Єлисеєва Ірина Віталіївна заслуговує присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Завідувач кафедри
епідеміології Харківського
національного медичного
університету,
доктор медичних наук, професор



Т.О. Чумаченко

