

ВІДГУК

офіційного опонента

доктора медичних наук, професора Курченка Андрія Ігоровича, завідувача кафедри клінічної імунології та алергології з секцією медичної генетики Національного медичного університету імені О. О. Богомольця на дисертаційну роботу Давидової Тетяни Володимирівни на тему: «Оптимізація складу розщепленої грипозної вакцини модифікацією ад'ювантної та антигенної складових», подану у спеціалізовану вчену раду Д 64.618.01 Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08 – імунологія та алергологія

Актуальність обраної теми. Дисертаційна робота Давидової Т.В. на тему: «Оптимізація складу розщепленої грипозної вакцини модифікацією ад'ювантної та антигенної складових» присвячена вирішенню важливого наукового завдання на сучасному етапі розвитку медичної галузі, а саме з метою удосконалення підходів до створення ефективних та безпечних грипозних вакцин.

Грип має швидкий та глобальний характер розповсюдження і є одним з найпоширеніших гострих респіраторних інфекцій вірусної етіології. Це захворювання не визнає національних кордонів, порушуючи соціально-економічні зв'язки та наносячи великі матеріальні збитки. Особлива небезпека полягає в здатності викликати загрозливі для життя ускладнення, інвалідизацію та смерть. Перспективи розвитку медичної науки свідчать про те, що питання захисту населення від інфекції, яка лише за останнє століття викликала декілька пандемій і забрала життя мільйонів людей, постає як першочергове. Розробка форм і вивчення шляхів імунізації ведеться безприпинно, спрямовуючись на винайдення максимально безпечної та ефективною грипозної вакцини для усіх груп населення, враховуючи сучасні знання будови вірусу й особливостей імунної відповіді. Одним з сучасних напрямів створення вакцин є використання носіїв-наночасток, здатних не тільки відтворити конструкцію віріону, що значно потенціює імунні ефекти, але й слугувати універсальними, надійними та безпечними системами доставки. У зв'язку з вищезазначеним, особливої актуальності набуває питання підвищення ефективності вакцинопрофілактики грипу, що може бути досягнуто шляхом конструювання високоімуногенних і безпечних багатокomпонентних вакцинних препаратів. На шляху вирішення поставленого часом завдання являється важливим всебічне вивчення вакцинального процесу, а також характеру перебудов у ньому в залежності від компонентності препаратів і властивостей їх антигенного складу. У роботі було

використано вітчизняний та світовий науковий досвід задля винайдення оптимальних композицій при створенні грипозних вакцин.

Дослідження, проведене автором з метою оптимізації складу розщепленої грипозної вакцини з використанням модифікації ад'ювантної та антигенної складових, має важливе науково-практичне значення.

Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних робіт на базі Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України»: «Кореляційний взаємозв'язок імуногенності актуальних протигрипозних вакцин з особливостями їх нулеопротейдного складу» № держреєстрації 0110U001418 та «Розробка нових підходів щодо створення вірусних вакцин, вивчення залежності їх специфічної активності від типу та ступеню модифікації компонентів», № держреєстрації 0113U001518. Дисертант є співвиконавцем цих науково-дослідних робіт, ним проведено імунологічні та мікроскопічні дослідження, створення ліпосомальних форм препаратів і ацилювання та модифікація їх антигенного наповнення, виконання досліджень на лабораторних тваринах.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Використання сучасних методів досліджень, достатня кількість експериментальних даних, їх статистична обробка та порівняння із даними інших дослідників дозволило Давидовій Т.В. в дисертаційній роботі обґрунтувати і узагальнити наукові положення, висновки та практичні рекомендації.

При виконанні роботи дисертантом використано сучасні й адекватні з точки зору вирішення поставлених завдань методи досліджень, які ґрунтувались на засадах медичної біоетики та принципах доказової експериментальної медицини. За допомогою сучасних імунологічних методів було вивчено особливості протеїнового складу антигенних субстратів різних видів грипозних вакцин (метод SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel-electrophoresis) за допомогою біоаналізатора «Agilent-2100», США, з вивченням молекулярної маси білкових фрагментів, їх концентрації та відсоткового вмісту у досліджуваних вакцинах), визначення титрів специфічних антитіл за реакцією гальмування гемаглютинації (РГГА) зі специфічним антигеном, активності фагоцитозу перитонеальних макрофагів ліпосом різного заряду поверхні, схильності до реакцій ГУТ *in vivo* методом foot pad swelling assay), мікроскопічні (візуалізація та вивчення стану поверхні ліпосом за допомогою сучасної високодозвільної АССМ, що дає змогу вивчати біологічні об'єкти у нативному стані, atomic-force microscope АСМ NT-206, Білорусь), фізико-хімічні (спектрофотометрія, вивчення показників перекісного окиснення ліпідів та білків периферичної крові, що є важливим показником безпечності для

препаратів, які містять ліпосомальну складову). Для обробки отриманих результатів експериментів використовувалися математико-статистичні методи.

Дисертант особисто та детально проаналізував результати експериментів, провів їх критичне порівняння з даними інших дослідників, чітко і логічно сформулював наукові положення та висновки.

Запропоновані автором практичні рекомендації ґрунтуються на об'єктивних даних результатів досліджень і відображають доцільність їх подальшого застосування у науковій, медичній та навчально-освітній сферах.

Перераховане вище дозволяє оцінити наукові положення, висновки та практичні рекомендації, викладені в дисертаційній роботі Давидової Т.В., як цілком обґрунтовані.

Достовірність і новизна положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Достовірність основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих в дисертаційній роботі Давидової Т.В., ґрунтується на: достатньому обсязі виконаних експериментальних досліджень; раціональному дизайні дослідження; використанні адекватних і загальноновизнаних методів досліджень для виконання поставлених завдань. Цифрові результати досліджень оброблено у відповідності із правилами альтернативної та рядової варіаційної статистики. Визначено різні статистичні абсолютні та відносні показники: середня геометрична величина, середня арифметична величина, стандартне квадратичне відхилення, критерій достовірності відмінності порівняних величин Ст'юдента.

Викладене вище засвідчує те, що сформульовані в дисертаційній роботі Давидової Т.В. основні наукові положення та висновки є достовірними, а практичні рекомендації – обґрунтованими, а їх наукова новизна полягає в наступному. Дисертантом, вперше досліджено ефективність одночасної модифікації антигенної та ад'ювантної складових, ліпосомальних носіїв, з метою удосконалення грипозної вакцини, отримання високоімуногенних і, водночас, безпечних для організму препаратів. Вперше в Україні здійснено комплексний кореляційний аналіз активності специфічного антитілоутворення та особливостей антигенного складу, кількісного вмісту вірусних протеїнів і молекулярної маси офіційних грипозних вакцин, дозволених для використання в Україні. Доведено ефективність модифікації вірусного компоненту грипозної вакцини шляхом часткового ацилювання. Показано, що застосований комплекс заходів для оптимізації складу грипозних вакцин дозволяє обмежити антигенне навантаження на організм шляхом значного зменшення кількісного вмісту антигенного наповнення без зміни рівня індукції специфічних антитіл в усіх дослідних вікових категоріях. Вперше визначено роль поверхневого заряду та ультраструктури ліпосом у складі грипозної вакцини. Показано, що катіонні везикули на всіх етапах фагоцитозу мають

найвищу здатність до швидкої адсорбції та інтерналізації у перитонеальні макрофаги. Вперше в Україні проведене вивчення ультрабудови застосованих для оптимізації складу грипозної вакцини ліпосомальних везикул. Доведено високу безпечність застосування модифікованої грипозної вакцини з катіонною ліпосомальною композицією на основі фосфатидилхоліну, що зменшує перекисне окиснення ліпідів та білків, завдяки біодоступності та сумісності з імунокомпетентними системами і не викликає реакцій гіперчутливості уповільненого типу.

Проведене дослідження виявило доцільність комплексної одночасної модифікації антигенної та ад'ювантної складових грипозної вакцини з метою отримання високоімуногенного та безпечного препарату, який, завдяки зменшенню антигенного навантаження, є придатним для використання у широкій віковій категорії.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено комплекс заходів для оптимізації складу грипозних вакцин, що разом з підвищенням імуногенності забезпечує зменшення антигенного навантаження на організм, дозволяючи їх застосування в різних вікових групах. Отримані дані розширюють уявлення про взаємозалежність продукції специфічних антитіл і протеїнового профілю вакцини, кількісного вмісту та молекулярної маси білків у її складі, ролі заряду поверхні ліпосомальних компонентів та її ультраструктури у формуванні повноцінної імунної відповіді та імунної пам'яті для ліпосомальних вірусних вакцин.

Результати досліджень можуть слугувати обґрунтуванням для створення високоімуногенної безпечної ліпосомальної грипозної вакцини, призначеної для імунологічної профілактики населення всіх вікових груп. Розроблений спосіб підвищення імуногенності ліпосомальних вакцин запатентовано (патент України на корисну модель №108844)

Започатковано застосування високодозвільної безконтактної атомно-скануючої мікроскопії для візуалізації поверхневої ультраструктури ліпосомальних везикул при розробці ліпосомальних вакцин.

Наукові положення дисертації впроваджено у навчальний процес кафедр клінічної імунології та мікробіології (акт впровадження від 14.03.2017) та гігієни, епідеміології та професійних хвороб (акт впровадження від 09.10.2017) Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України і Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (акт впровадження від 05.09.2016).

Повнота викладу сформульованих у дисертації наукових положень, висновків і рекомендацій в опублікованих працях і авторефераті. Результати досліджень, основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації кандидатської дисертації Давидової Т.В. оприлюднено й обговорено на 21

науковому форумі (з'їздах і конференціях), опубліковано 31 (8 одноосібно), у тому числі 1 монографія, 8 статей (6 – у наукових фахових журналах, 6 – включено до міжнародних наукометричних баз, 2 – у закордонних виданнях), 1 патент на корисну модель, 1 інформаційний лист, 21 теза у матеріалах конференцій, конгресів, з'їздів.

У матеріалах дисертації після викладення наукових результатів кожного її розділу автором представлено перелік власних робіт, в яких ці результати опубліковано.

Автореферат дисертаційної роботи Давидової Т.В. викладено (на 24 сторінках машинописного тексту, містить 13 рисунків і 1 таблицю) з дотриманням вимог МОН України. Автореферат складається із загальної характеристики дисертаційної роботи, основних положень змісту кожного її розділу з результатами досліджень та їх аналізом, висновків, практичних рекомендацій, списку опублікованих праць, анотацій українською, російською та англійською мовами. Матеріали автореферату є ідентичними дисертації, досить ґрунтовно розкривають основні її положення та дозволяють сформулювати повне уявлення про дисертаційну роботу в цілому.

Вказане вище, дозволяє визначити, що опубліковані праці автора та автореферат повною мірою розкривають основні наукові положення, висновки та рекомендації дисертаційної роботи.

Структура, зміст і завершеність дисертаційної роботи. Кандидатська дисертація Давидової Т.В. викладена на 141 сторінках машинописного тексту і складається із анотації, списку друкованих праць, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, 4 розділів власних досліджень, висновків та практичних рекомендацій, проілюстрована 10 таблицями, 27 рисунками. Список використаних літературних джерел містить 274 посилань.

У вступі лаконічно та переконливо обґрунтовано актуальність для медичної галузі вирішення задачі підвищення імуногенності розщепленої грипозної вакцини за допомогою модифікації ад'ювантної та антигенної складових зі збереженням її безпечності. Висвітлено зв'язок роботи з науково-дослідними темами, сформульовано мету, визначено завдання дослідження для її досягнення, окреслено об'єкт та предмет дослідження, розкрито наукову новизну, теоретичне та практичне значення отриманих результатів, наведено дані щодо апробації й опублікування останніх, а також відомості про обсяг і структуру дисертації.

Розділ 1. Огляд літератури складається з 2 основних підрозділів, у яких досить глибоко та критично проаналізовано сучасний стан знань щодо: особливостей імунної відповіді при грипозній інфекції, а також розглянуті новітні аспекти застосування та переваги системи ад'ювантів на основі ліпосом.

Розділ 2. Матеріали та методи складається з 4 підрозділів. Методологія та методика дослідження ґрунтувалась на засадах медичної біоетики та принципах доказової експериментальної медицини. Розроблений дизайн дослідження є доцільним і раціональним. Використовувалися наступні сучасні методи дослідження: імунологічні (метод SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel-electrophoresis) за допомогою біоаналізатора «Agilent-2100», США, з вивченням молекулярної маси білкових фрагментів, їх концентрації та відсоткового вмісту у досліджуваних вакцинах), визначення титрів специфічних антитіл за реакцією гальмування гемаглютинації (РГГА) зі специфічним антигеном, активності фагоцитозу перитонеальних макрофагів ліпосом різного заряду поверхні, схильності до реакцій ГУТ in vivo методом foot pad swelling assay), мікроскопічні (візуалізація та вивчення стану поверхні ліпосом за допомогою сучасної високороздільної АССМ, що дає змогу вивчати біологічні об'єкти у нативному стані, atomic-force microscope АСМ NT-206, Білорусь, вивчення фагоцитозу перитонеальних макрофагів), фізико-хімічні (спектрофотометрія, вивчення показників перекісного окиснення ліпідів та білків периферичної крові, що є важливим показником безпечності для препаратів, які містять ліпосомальну складову). Для обробки отриманих результатів експериментів використовувалися математико-статистичні методи.

Повнота викладення автором методів досліджень, дизайн дослідження, підбір груп лабораторних тварин є цілком достатнім для оцінки їх актуальності, доцільності та сучасності, обґрунтованості вибору з точки зору виконання поставлених завдань, забезпечення якості проведення експериментів та можливості їх відтворення.

Розділ 3. Принципи конструювання протигрипозних вакцин з високими показниками імуногенності та безпечності містить важливі, з наукового-практичної точки зору, дані отримані дисертантом у результаті виконаних на базі лабораторії імунореабілітології ДУ «ІМІ НАМН» досліджень та аналізу сучасного стану розробки ліпосомальних препаратів, щодо обґрунтування сучасних принципів створення ліпосомальних вакцин, впливу фізико-хімічних характеристик ліпосом (розміру, заряду, складу, способу прикріплення антигену), що мають значущі наслідки для потенційної імуногенності препарату та повинні бути ретельно підібрані для вирішення конкретних задач. Обґрунтовані підходи до створення ліпосомальної грипозної вакцини з високою імуногенністю та показниками безпечності.

Розділ 4. Ефективність модифікації вірусних вакцин складається з 5 підрозділів, в яких викладено результати досліджень автора. Автором встановлено, зв'язок між протеїновим складом різних типів тривалентних протигрипозних вакцин та індукцією специфічних антитіл, переваги катіонної ліпосомальної композиції та антигенної складової, що містить широкий

протеїновій профіль при вивченні продукції специфічних антитіл, яка демонструвала найвищі рівні серед досліджуваних вакцин, зокрема у групах піддослідних мишей молодшого та старшого віку. При вивченні впливу поверхневого заряду ліпосомальної мембрани на етапи фагоцитозу визначено достовірну перевагу катіонних везикул, в порівнянні з нейтральними та негативно зарядженими ліпосомами, для тварин усіх вікових категорій на відміну від зниження активності для ліпосом іншого заряду у групах молодшого та старшого віку. Застосування комплексного підходу до конструювання грипозних вакцин дозволило значно обмежити антигенне навантаження на організм шляхом значного зменшення кількісного вмісту антигенного наповнення без зміни рівня індукції специфічних антитіл в усіх дослідних вікових категоріях та в різні періоди після імунізації, що дозволяє значно знизити можливий спектр побічних дій.

Розділ 5. Дослідження морфологічної структури ліпосомальних везикул офіційної та експериментальної грипозних вакцин викладено результати дослідження та візуалізація ультраструктури ліпосомальних везикул вакцини «Інфлексал В» та новоствореного експериментального зразка грипозної вакцини вищого ступеня модифікації. Здобувачем вперше було використано атомно-скануючу мікроскопію як методику вивчення ліпосомальних протигрипозних вакцинних препаратів з подальшою інтерпретацією отриманих даних, що відображає кореляцію поверхневих молекулярних ультраструктурних особливостей та імуногенність досліджуваних вакцин. Таким чином, дослідження ліпосомальних препаратів за допомогою АССМ має практичне прогностичне значення, що здатне допомогти передбачити ефективність нових препаратів у подальших розробках.

Розділ 6. Дослідження безпечності модифікованих ліпосомальних вірусних вакцин складається з 2 підрозділів, де викладено результати дослідження загальної та місцевої реактогенності у імунізованих тварин широкої вікової категорії, а також визначені показники перекісного окиснення ліпідів і білків периферійної крові після введення ліпосомальних препаратів (рівні вмісту гідроперекисів ліпідів (ГПЛ), карбонілів білків та активність глутатіон-пероксидази (Gpx3)) у сироватках крові щурів різних вікових груп через 2 години після імунізації. Визначено доцільність комплексу заходів по оптимізації розщепленої грипозної вакцини, що відбивалось зменшенням проявів загальної та місцевої реактогенності й показників перекісного окиснення ліпідів і білків усіх вікових груп. Доведено високу безпечність застосування модифікованої грипозної вакцини з катіонною ліпосомальною композицією на основі фосфатидилхоліну, що зменшує перекисне окиснення ліпідів та білків, завдяки біодоступності та сумісності з імунокомпетентними системами і не викликає реакцій гіперчутливості уповільненого типу.

Висновки (їх 7) включають стисле формулювання здобувачем наукових узагальнень та обґрунтування принципів конструювання ефективних грипозних вакцин, які в сукупності повною мірою відображають теоретичні та практичні результати роботи та вирішення завдання щодо оптимізації складу розщепленої грипозної вакцини за допомогою модифікації ад'ювантної та антигенної складових, шляхом часткового ацилювання антигенного наповнення 3% за масою та використання у якості ад'ювантів відповідних ліпосомальних систем. Висновки сформульовані чітко та зрозуміло, їх послідовність і зміст логічно відображає завершеність дисертаційної роботи.

Практичні рекомендації. Результати дисертаційної роботи Давидової Т.В. мають науково-прикладне спрямування: удосконалюючи принципи створення грипозних вакцин, зі застосуванням комплексу заходів по модифікації антигенної складової та використанню ліпосомальних носіїв, у якості ад'ювантів, що дає можливість отримання високоімуногенних і, водночас, безпечних для організму препаратів; висвітлюють доцільність та безпечність створення ліпосомальних систем на основі фосфатидилхоліну; демонструють перспективність використання АССМ при розробці ліпосомальних препаратів; використовуються у навчально-педагогічному процесі на кафедрах клінічної імунології та мікробіології, а також гігієни, епідеміології та професійних хвороб закладів післядипломної медичної освіти України, а також у науково-дослідній роботі Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України».

Список використаних джерел викладено після відповідних розділів із дотриманням чинних бібліографічних вимог МОН України. Список складено у порядку появи посилань у тексті. Всього в списку 274 джерел, у тому числі: 210 латиною та 64 – кирилицею. Близько 80 % використаних джерел опубліковані за останні 10 років.

Додатки, які представлено на 17 сторінках, містять копії титульних аркушів актів впровадження результатів дисертаційної роботи Давидової Т.В., патенту України, апробацію результатів роботи та опубліковані наукові праці здобувача за темою дисертації

Зауваження щодо змісту дисертації. Суттєвих зауважень до змісту дисертації немає.

Перелік і суть запитань:

1. З якою метою для розробки експериментальних вакцинних препаратів використовувався антигенний матеріал офіційних грипозних вакцин?
2. Які переваги перед класичними методами було отримано при дослідженні структури ліпосомальних мембран атомно-силовою мікроскопією?

3. Чи вивчалася можливість застосування ліпосомальних композицій з використанням інших катіонних ліпідів природного походження? У чому, на погляд автора, переваги фосфотидилхоліну?

Висновок щодо відповідності дисертаційної роботи встановленим вимогам. Кандидатська дисертація Давидової Тетяни Володимирівни «Оптимізація складу розщепленої грипозної вакцини модифікацією ад'ювантної та антигенної складових» є актуальною, самостійною, завершеною науковою працею, виконаною на сучасному науково-методичному рівні. Робота містить нові експериментальні дослідження та науково обґрунтовані узагальнення, які у сукупності вирішують важливу наукову задачу в галузі імунології та вакцинології – підвищення ефективності грипозних вакцин зі збереженням їх безпечності.

Оцінка мови та стилю дисертації. Дисертація та автореферат написані грамотною мовою, стиль викладу матеріалів досліджень, наукових положень, висновків і рекомендацій чіткий, логічний, що забезпечує легкість і доступність їх сприйняття.

Дисертаційна робота Давидової Т.В. цілком відповідає вимогам щодо кандидатських дисертацій, які визначено п. 11-13 “Порядку присудження наукових ступенів”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08 – імунологія та алергологія.

Завідувач кафедри клінічної імунології та алергології з секцією медичної генетики Національного медичного університету імені О.О.Богомольця МОЗ України, доктор медичних наук, професор

Гідпис:  Курченко А.І.
