

ОТЗЫВ

**официального оппонента, доктора медицинских наук
Лаврентьевой Ирины Николаевны на диссертационную работу
Тимошичевой Татьяны Александровны
на тему: «Разработка моноклональных антител к гексону аденовирусов
человека», представленной к защите на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности: 03.02.02 – вирусология**

Актуальность темы. Наряду с гриппом как наиболее серьёзной острой респираторной вирусной инфекцией, важное место в развитии патологии дыхательных путей занимают также респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) и аденовирусы. Для последних не показано сезонной зависимости, и вспышки аденовирусной инфекции регистрируются на протяжении всего года. При респираторной форме аденовирусной инфекции наряду с заболеванием средней тяжести возможно развитие осложнений в виде бронхитов, бронхиолитов, пневмоний, энцефалитов, менингитов, миокардитов, особенно у пациентов с иммуносупрессией. Аденовирусы поражают, помимо пациентов из групп риска - детей и лиц старшего возраста - молодых людей из организованных коллективов, в частности военных подразделений.

Широкий тканевый тропизм аденовирусов приводит к возможности развития самых разных клинических форм заболевания с поражением разных тканей, органов и органокомплексов. В свою очередь, такое многообразие клинических форм аденовирусной инфекции диктует необходимость её ранней и дифференциальной диагностики, что даёт возможность своевременно поставить диагноз, что особенно актуально для пациентов из групп риска. Учитывая, что средства специфической терапии аденовирусной инфекции используются крайне редко, постановка раннего диагноза приобретает особую важность. Помимо этого, недостаточная чувствительность существующих методов лабораторной диагностики и малое количество разработок в этом направлении обосновывают исключительную актуальность разработки средств этиологической диагностики аденовирусной инфекции.

Все изложенное определяет безусловную актуальность представляемых исследований и позволяет сформулировать **основную цель исследования** как разработку панели моноклональных антител (МКА), способных выявлять аденовирусы, в том числе современные их штаммы, в иммунологических реакциях.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций. В представленной работе впервые методом масс-спектрометрического анализа подтверждена аминокислотная последовательность гексона, использованного в качестве иммуногена для получения МКА. Впервые для определения типов аденовирусов, циркулирующих на территории России, применено секвенирование гена, кодирующего фибриллу, и выявлено преобладание аденовирусов 4 и 7 типов в циркуляции среди населения Северо-Западного региона России за период 2014-2017 гг.

В результате проведенных исследований разработана панель аденовирус-специфических моноклональных антител, доказана их способность выявлять аденовирусы, принадлежащие к различным группам, в вирусологических и иммунологических реакциях. Разработанные МКА 4В7 и МКА 6В12 включены в состав инновационного многопараметрического диагностического комплекса ТОРИ-ТЕСТ, позволяющего определять соответствующий этиологический агент и способствующего проведению рациональной противовирусной терапии, в том числе снижению неоправданного применения антибиотиков.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Выносимые на защиту положения диссертации, отражающие научную новизну и практическую значимость работы, достоверно подтверждены представленными экспериментальными данными, полученными при помощи широкого набора методов. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, основываются на большом объеме экспериментального материала, являются достоверными и логически вытекают из результатов проведенных исследований. Достоверность полученных данных подтверждается также при помощи использования широкого набора адекватных статистических методов.

Содержание диссертации и её оценка. Диссертационная работа оформлена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», собственных исследований, изложенных в четырёх разделах, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка литературы и двух приложений. Работа изложена на 115 страницах текста, оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, содержит 11 таблиц и 20 рисунков. Библиографический указатель включает 198 источников на русском и английском языках.

Введение диссертации посвящено актуальности темы исследования, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе дан исчерпывающий, но занимающий значительную часть диссертации обзор литературных данных по теме исследования за период 1954-2019 гг. Здесь представлены данные об организации вирусного генома, жизненном цикле аденовирусов и их антигенных детерминантах, а также клинической характеристике аденовирусной инфекции. Следуя основной тематике исследования, особое внимание уделено методам диагностики аденовирусов и принципам разработки и производства моноклональных антител.

Во второй главе перечислены использованные материалы и методы исследования. Из материалов главы следует, что в работе использован комплексный подход к проводимым исследованиям, в частности, использовались вирусологические, иммунологические, серологические, биохимические, молекулярно-биологические и физико-химические методы, а также приведён детальный перечень статистических методов, использованных при обработке полученных результатов.

Третья глава диссертации посвящена собственным результатам исследования. **В первом её разделе «Разработка коллекции гибридом, продуцирующих высокоспецифичные моноклональные антитела к гексону аденовирусов»** автором представлены результаты получения и характеристика очищенного гексона аденовируса, а также разработки моноклональных антител к гексону. Автором получены 9 клонов антител и продемонстрировано, что все они

связываются преимущественно с нативной формой гексона, присутствующей в составе вирионов аденовируса 6 типа.

Во втором разделе «Изучение иммунохимических свойств моноклональных антител» приведена детальная характеристика полученных МКА. Их специфическая активность определена в непрямом иммуноферментном анализе, специфическая активность их пероксидазных конъюгатов моноклональных антител охарактеризована при помощи ИФА, определено оптимальное разведение конъюгатов МКА 4В7-ПХ и 6В12-ПХ для детекции аденовирусного антигена методом ИФА. Минимальные выявляемые концентрации аденовирусного антигена при использовании МКА 6В12-ПХ и 4В7-ПХ составили 15 нг/мл и 3,6 нг/мл соответственно, что определило выбор МКА 4В7-ПХ для дальнейшей работы. Методом конкурентного ИФА была определена направленность моноклональных антител 4В7 и 6В12. Показано, что эти клоны антител являются разнонаправленными, что является предпочтительным для обеспечения наилучших показателей чувствительности и специфичности анализа. Свойства МКА были также изучены в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа и методом непрямой иммунофлуоресценции, а также изучены свойства конъюгата МКА 6В12 с флуоресцеинизотиоцианатом. На основании полученных данных клон 6В12 был идентифицирован как оптимальный для применения в клеточной культуре А549, зараженной клиническими образцами.

В третьем разделе «Изучение генетического разнообразия аденовирусов, циркулирующих на территории Северо-Западного региона России» автором проведён отбор клинических образцов для исследования, проведён филогенетический анализ секвенированных последовательностей и охарактеризовано типовое разнообразие аденовирусов в образцах. Показано, что изученные аденовирусы преимущественно относятся к 4 типу, и один – к 7.

В четвёртом разделе «Изучение диагностических свойств моноклональных антител в отношении современных штаммов аденовирусов» клинические образцы, положительные на наличие аденовируса по данным ПЦР в реальном времени, были исследованы вариантами метода ИФА и ИФЛ с использованием МКА 4В7 и МКА 6В12.

Полученные характеристики подтверждают, что МКА 4В7 и МКА 6В12 являются наиболее перспективными для детекции аденовирусных антигенов в различных иммунологических тестах.

Выводы и практические рекомендации. Выводы диссертации и практические рекомендации представлены четко и обоснованно вытекают из материалов диссертации. Автореферат диссертации адекватно отражает её основные положения и содержание. Апробацию результатов работы, проведенной за период 2016-2019 гг., следует признать достаточной: по теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 5 статей, 3 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК. Материалы исследования доложены на II Российском конгрессе лабораторной медицины (Россия, Москва, 2016), IX Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Россия, Москва, 2017), Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика» (Россия, Москва, 2017), IV научно-практической международной конференции «Современные биотехнологии для науки и практики» (Россия, Санкт-Петербург, 2017), Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии» (Республика Беларусь, Минск, 2017), III Российском конгрессе лабораторной медицины (Россия, Москва, 2017), международной научной конференции «Тенденции в исследовании гриппа» (Trends in Influenza Research) (Россия, Санкт-Петербург, 2017), Двадцать второй Санкт-Петербургской Ассамблеи молодых ученых и специалистов (Россия, Санкт-Петербург, 2017), Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Республика Беларусь, Минск, 2018), Межрегиональной научно-практической конференции «Инфекции и соматическая патология» (Россия, Казань, 2018), Научно-практической конференции «Актуальные вопросы государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Вооружённых Силах Российской Федерации» (Россия, Санкт-Петербург, 2018), Научно-практической конференции с международным участием «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Россия, Санкт-Петербург, 2018), Российско-Китайском конгрессе по

медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии «XXII Кашкинские чтения» (Россия, Санкт-Петербург, 2019).

Принципиальных замечаний по диссертации нет.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Сформированная в ходе выполнения исследования коллекция современных штаммов аденовирусов может быть использована как в научных исследованиях, так и в целях создания модели аденовирусной инфекции *in vitro* для скрининга и тестирования потенциальных противовирусных препаратов. Внедрение в практику диагностики МКА 4В7 и МКА 6В12 позволит проводить высокочувствительную диагностику аденовирусной инфекции, а также снизить затраты на приобретение оборудования и расходных материалов зарубежных производителей, что обеспечит проведение в этой области мероприятий в рамках программы импортозамещения и доступность быстрых и эффективных средств диагностики для системы здравоохранения Российской Федерации.

Вопросы.

1. Разработанные автором клоны антител позволяют детектировать антиген аденовируса в образцах назофарингеальных мазков при респираторной форме заболевания. Для диагностики других клинических форм аденовирусной инфекции, в том числе при осложнениях, требуется другой клинический материал. Могут ли, по мнению автора, разработанные МКА быть использованы для дифференциальной диагностики, например, аденовирусных нефритов, менингитов, гепатитов и т.п. Достаточно ли количество антигена в подобных клинических образцах при этих формах патологии?

2. При описании иммунологических методов диагностики автор утверждает, что «Для генерации измеримого сигнала используют метки, конъюгированные с антителами или антигенами, сенсibilизированными на твердой фазе, и используются для захвата соответствующих антигенов или антител, присутствующих в клинических образцах». Каким образом может меняться количество иммобилизованной метки в зависимости от концентрации (количества) целевой молекулы в образце?

Из оформительских недочётов следует упомянуть следующие:

- Раздел, посвящённый методам диагностики аденовирусной инфекции, написан несколько нелогично. В равнозначные его подразделы включены реакция связывания комплемента, иммунологические методы, радиоиммуноанализ (в котором описан, кроме того, принцип иммуноферментного анализа), ИФА и ИФЛ, тогда как все это методы являются частными случаями методов иммунологических.

- В разделе 2.18, посвящённом определению специфической активности моноклональных антител в непрямом иммунофлуоресцентном анализе, наряду с описанием критериев оценки интенсивности свечения, следовало бы привести микрофотографии, иллюстрирующие эти критерии.

Перечисленные замечания, однако, ни в коей мере не умаляют заслуг автора при выполнении, написании и представлении работы.

Заключение.

Диссертационная работа Тимошичевой Татьяны Александровны «Разработка моноклональных антител к гексону аденовирусов человека», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.02 – вирусология, представляет собой самостоятельно выполненную и законченную научно-квалификационную работу, содержащую результаты разработки, иммунологическую и молекулярно-биологическую характеристику новых моноклональных антител, направленных на белок гексона аденовируса.

По научной новизне, актуальности, высокому методическому уровню, научной ценности и практической значимости результаты диссертационной работы отвечают требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842), в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г. и №748 от 02.08.2016 г., предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.02 – вирусология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании отдела вирусологии Федерального бюджетного учреждения науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Официальный оппонент: доктор медицинских наук (03.02.02. – вирусология), заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Лаврентьева Ирина Николаевна

«21» ноября 2019 г.

Почтовый адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д.14

тел: +7 812 232 9411

e-mail: pasteur.lawr@mail.ru

<http://www.pasteurorg.ru/>

*Людмила Лаврентьевой И. Н. удостоверено,
Народный отдел кадров;
Л.В. (Иванов)*

