

ОТЗЫВ

**официального оппонента, доктора медицинских наук, доцента
Малышева Владимира Васильевича на диссертацию
Тимошичевой Татьяны Александровны на тему: «Разработка
моноклональных антител к гексону аденовирусов человека»,
представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.02.02 – вирусология.**

Актуальность темы выполненной работы.

Острые респираторные заболевания доминируют в структуре инфекций с аэрозольным механизмом передачи возбудителей и занимают первое место в России, и в мире. Этиологическая структура этих инфекций представлена большим количеством респираторных вирусов (риновирусы, аденовирусы, РС-вирусы и другие).

Определенные эпидемиологические проблемы испытывают организованные коллективы взрослых и детей, где активно циркулируют, наряду с другими, аденовирусы. Именно убиквитарный характер распространения аденовирусов, отсутствие в годовой динамике заболеваемости четкой сезонной зависимости и регистрация аденовирусной инфекции на протяжении всего года, делают это заболевание крайне актуальным. При респираторной форме клинического течения аденовирусной инфекции поражаются верхние дыхательные пути, часто протекает с осложнениями в виде пневмоний, бронхитов, бронхоолитов, энцефалитов, менингитов и др. В отличие от других респираторных вирусов, аденовирусы поражают и детей, и взрослых лиц из организованных коллективов. Так, в Вооруженных Силах Российской Федерации, в эпидемический период, около 50% военнослужащих переболевает острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ), где аденовирусы являются этиологическим фактором в 30-65 % случаев. К сожалению, аденовирусная инфекция является предтечей большого количества внебольничных пневмоний. Регистрируются случаи смертельных исходов аденовирусной пневмонии среди детей, а также среди военнослужащих Вооруженных сил России, Канады, США и других стран. Эта проблема непосредственно связана с необходимостью изучения причин возникновения и распространения эпидемиологически значимых актуальных инфекций среди военнослужащих. Особой категорией являются курсанты военных образовательных организаций: существенные отличия условий и организации военной службы между курсантами и военнослужащими по призыву определяют и различное развитие эпидемического процесса актуальных для воинских контингентов

инфекций. Причины, по которым такие серьезные заболевания возникают и приводят к летальному исходу пациентов без нарушений иммунитета, остаются неясными. Многообразие клинических форм аденовирусной инфекции определяет необходимость разработки эффективных средств специфической лабораторной диагностики аденовирусов и их маркёров. Применение этиологически выверенных диагностических тестов дает возможность постановки клинического диагноза, что актуально для пациентов из групп риска, клиническая картина у которых осложнена сопутствующими заболеваниями. В настоящее время для диагностики аденовирусной инфекции используют иммунофлуоресцентный метод (ИФЛ) с применением поликлональных специфичных сывороток, метод иммуноферментного анализа (ИФА) полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и др. Чувствительность методов лабораторной диагностики аденовирусной инфекции составляет 44,6% для ИФЛ, 48,7% для ИФА и 83,0% для ПЦР. При всей эффективности и надежности ПЦР диагностики, традиционные методы лабораторной диагностики остаются широко востребованными. Значительно повысить эффективность лабораторной диагностики аденовирусной инфекции может разработка моноклональных антител (МКА) и включение их в состав высокоспецифичных диагностических тестов.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверность обеспечена использованием современных вирусологических, эпидемиологических, клинико-лабораторных, молекулярно-генетических, иммунологических (серологических), математических, статистических методов и репрезентативным числом проведенных исследований.

Актуальной являлась задача разработки МКА, высокоспецифичных к белкам патогенных для человека аденовирусов, включение которых в тест-системы нового поколения позволило бы повысить качество и доступность лабораторной диагностики аденовирусной инфекции. Одним из ключевых моментов при создании МКА являлся выбор иммуногена. Для получения МКА, специфичных к аденовирусам различных типов, необходимо было использовать высокоочищенный белок, обладающий сходной антигенной структурой для всего рода *Mastadenovirus*. Гексон составляет около 60% массы вирионов аденовирусов и несет в своем составе обширный консервативный участок с родоспецифическими детерминантами, вариабельность аминокислотного состава этого участка составляет менее 15%. В инфицированных клетках гексон синтезируется в избытке: только 20-30% белка используется для сборки вирусных частиц, что позволило эффективно выявлять его в инфицированных клетках.

Для разработки МКА к аденовирусам человека применялись стандартные вирусологические (культивирование вирусов в клеточной культуре), биохимические (выделение очищенного гексона аденовируса б

типа) методы и подходы гибридной технологии. Исследование свойств разработанных МКА и их конъюгатов с пероксидазой хрена, биотином и ФИТЦ проводили иммунологическими методами (вестерн-блоттинг, иммуноферментный и иммунофлуоресцентный анализ). Диссертантом был проведен отбор клинических образцов от больных ОРВИ (назофарингеальные мазки). Идентификацию аденовирусов в исследуемом материале проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Генотипирование обнаруженных аденовирусов осуществляли методом секвенирования по Сенжеру последовательности участка генома, кодирующего фибриллу, и дальнейшего сравнительного анализа с последовательностями, депонированными в международной базе NCBI GenBank. Диагностические свойства разработанных МКА были исследованы автором в иммунологических реакциях с клиническими образцами.

Выводы и перспективы дальнейшей разработки темы соответствуют содержанию работы.

Достоверность результатов исследований, проведенных автором, подтверждена статистическим анализом большого массива данных, полученных в ходе экспериментов

Все изложенное позволяет считать результаты диссертационного исследования Т.А.Тимошичевой достоверными, а выводы обоснованными, соответствующими поставленным задачам.

Научная новизна.

Автором 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 методом Сенжера гена, кодирующего фибриллу. Выявлено преобладание аденовирусов 4 и 7 типов в циркуляции среди населения Северо-Западного региона России за период 2014-2017 гг.

Диссертантом разработана панель МКА, 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 и снижению или отказу от неоправданного применения антибиотиков.

Полученные Т.А. Тимошичевой результаты являются свидетельством активной циркуляции аденовирусов в Северо-Западном регионе Российской Федерации среди детей и военнослужащих.

Практическая значимость.

Диссертантом сформирована коллекция современных штаммов аденовирусов, два штамма аденовирусов 4 типа переданы в коллекцию вирусов гриппа и ОРВИ при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Пополнение коллекции современными штаммами аденовирусов дает возможность их использования, как в научных исследованиях, так и при создании модели аденовирусной инфекции *in vitro* для скрининга и тестирования потенциальных противовирусных препаратов.

Полученные МКА 4В7 и МКА 6В12 могут быть использованы как при изучении этиологической структуры заболеваемости населения, в том числе в рамках осуществления надзора за гриппом и ОРВИ на территории России, так и для диагностики аденовирусной инфекции в практическом здравоохранении.

Разработка отечественного многопараметрического диагностического комплекса, объединяющего в себе чипы для выявления вирусов, бактерий, белковых маркеров системной воспалительной реакции организма-хозяина позволит не только проводить одномоментный высокочувствительный мультиплексный анализ респираторных вирусных инфекций, но и прогнозировать развитие возможных осложнений, а также снизит затраты на приобретение оборудования и расходных материалов по сравнению с зарубежными производителями и обеспечит доступность быстрых и эффективных средств диагностики для системы здравоохранения России.

Методом ПЦР в реальном времени на наличие нуклеиновых кислот респираторных вирусов исследован 991 клинический образец (назофарингеальный мазок) от пациентов, госпитализированных с симптомами ОРЗ в медицинские лечебные учреждения Минобороны России в 2014 - 2017 гг. У госпитализированных военнослужащих наблюдалось повышение температуры тела, недомогание и интоксикация, ринит, фарингит, тонзиллит, конъюнктивит, катаральные явления, такие как гиперемия зева, кашель, заложенность носа и выделения из него (от слизистых до слизисто-гнойных), а также по данным клинического анализа крови - увеличенная СОЭ, лейкоцитоз, лимфопения. Преобладала респираторная форма заболевания средней тяжести, в 9 случаях диагностирована пневмония. Аденовирусы были выявлены в 326 (32,9%) образцах, из них как единственный этиологический агент в 231 (70,9%) случае и в сочетании с другими респираторными вирусами - в 95 (29,1%) образцах. Этиологическим агентом в 5 случаях диагностированной пневмонии также явились аденовирусы. Секвенирование гена, кодирующего фибриллу, 31 аденовируса из клинических образцов показало принадлежность большинства (30 из исследованных аденовирусов) к 4 типу и одного аденовируса к 7 типу. При этом рядом

авторов отмечается связь тяжести течения аденовирусной инфекции с типом аденовируса, вызвавшим заболевание. В частности, отмечается ведущая роль аденовирусов 7 и 14 типов в развитии тяжелой аденовирусной инфекции с поражением нижних дыхательных путей, в том числе с летальным исходом.

Следует отметить, что систематическое типирование аденовирусов, циркулирующих на территории России, в настоящее время не проводится.

Разработанные МКА 6В12 рекомендованы для внедрения в производство отечественного препарата «Иммуноглобулин диагностический флуоресцирующий аденовирусный антигексоновый» взамен используемых в настоящее время гипериммунных поликлональных сывороток.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности, подтверждение публикаций автора.

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, описания использованных материалов и методов, 4 глав собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 198 отечественных и зарубежных источников, и 2 приложений. Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста, иллюстрирована 11 таблицами и 20 рисунками.

Диссертант лично планировала и выполняла все основные лабораторные исследования, проводила анализ и статистическую обработку полученных результатов. Автором лично получены очищенный гексон аденовируса, использованный в качестве иммуногена для разработки МКА, очищенные аденовирус и РСВ, использованные для изучения свойств разработанных МКА.

Работы по созданию МКА, включая работу с лабораторными животными, так же выполняла автор.

Диссертант лично проводила выделение и оценивала характеристику циркулирующих штаммов аденовирусов из клинического материала от больных и исследовала диагностические свойства разработанных МКА в иммунологических реакциях с выделенными вирусами. Систематизация полученных данных, подготовка материалов для публикации и их представление на научных конференциях международного и российского уровня также выполнены непосредственно автором.

По теме диссертационного исследования Татьяной Александровной Тимошичевой опубликовано 16 печатных работ, в том числе 5 статей, 3 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК, а также тезисы докладов российских и международных конференций.

Весьма примечательно то, что работа была поддержана грантом для студентов, аспирантов, молодых учёных, молодых кандидатов наук ВУЗов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга в 2017 году. Также работа выполнена при поддержке

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий № 075-15-2019-1241 от 10.06.2019 г. (ранее № 14.604.21.0180 от 26.09.2017 г.), проект по теме «Разработка многопараметрического диагностического комплекса ТОРИ-ТЕСТ для детекции и прогноза тяжести течения острых респираторных инфекций».

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Полученные МКА 4В7 и МКА 6В12 включены в состав многопараметрического диагностического комплекса ТОРИ-ТЕСТ для детекции и прогноза тяжести течения острых респираторных инфекций.

Полученные МКА 6В12 рекомендованы для внедрения в производство отечественного препарата «Иммуноглобулин диагностический флуоресцирующий аденовирусный антигексоновый» взамен используемых в настоящее время гипериммунных поликлональных сывороток.

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.

Доказана диагностическая эффективность МКА 4В7 и МКА 6В12 при выявлении современных штаммов аденовирусов в клинических образцах в различных иммунологических и вирусологических реакциях. Чувствительность методов мКИФА составила 96%, сэндвич-ИФА - 86%, ИФЛ – 84% при выявлении аденовирусов в клинических образцах с использованием МКА 4В7 и 6В12 по сравнению с данными ПЦР.

Внедрение в практику здравоохранения МКА 4В7 и МКА 6В12, позволяющих выявлять аденовирусы в различных реакциях, основанных на специфическом взаимодействии антиген-антитело, позволит не только проводить высокочувствительную диагностику аденовирусной инфекции, но и снизит затраты на приобретение оборудования и расходных материалов по сравнению с зарубежными производителями и обеспечит доступность быстрых и эффективных средств диагностики для системы здравоохранения Российской Федерации. Крайне актуально будет применение в диагностических целях полученных диссертантом моноклональных антител медицинской службой Вооруженных Сил Российской Федерации для снижения заболеваемости военнослужащих аденовирусной инфекцией и внебольничными пневмониями. Можно говорить о повышении обороноспособности страны, сохранении трудо-боеготовности военнослужащих при выполнении задач боевой подготовки, дальних походах, участии воинских контингентов для решения поставленных задач, в том числе, и за пределами страны.

Автореферат и опубликованные работы в полной мере отражают содержание диссертации, поставленные цели и задачи.

Вопросы и замечания по диссертации

При детальном ознакомлении с диссертацией принципиальных замечаний по существу работы не возникло. Однако при оформлении работы диссертанту необходимо было бы оперировать по отношению к МКА терминами, не «разработанные», а «полученные». Местами, в диссертации, слово «конъюгат» чередуется с «антителами, связанными с пероксидазой хрена».

Эти замечания не умаляют научной и практической значимости диссертационной работы, общего впечатления от представленных материалов, объема и качества проведенных исследований.

Вопрос: Автор многократно позиционирует многопараметрический диагностический комплекс ТОРИ-ТЕСТ для детекции и прогноза тяжести течения острых респираторных инфекций, куда вошли моноклональные антитела для детекции аденовирусов. Какие перспективы практического применения этого комплекта в эпидемических очагах ОРВИ? Сроки? Стоимость исследования одной пробы?

Соответствие диссертации критериям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней

Диссертационная работа Тимошичевой Татьяны Александровны «Разработка моноклональных антител к гексону аденовирусов человека», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи – разработка панели моноклональных антител, способных выявлять в иммунологических реакциях актуальные штаммы аденовирусов.

По актуальности темы, научному и методическому уровню исследований, качеству полученных результатов, объему выполненной работы, по научной новизне и практической значимости диссертационная работа и автореферат полностью соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г.

№1168 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Тимошичева Татьяна Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Официальный оппонент:
Заслуженный работник высшей школы
Российской Федерации
профессор кафедры микробиологии,
доктор медицинских наук, доцент

Специальность - 14.02.02–эпидемиология Малышев Владимир
Васильевич

ФГБВОУ ВО Военно-медицинская
академия имени С.М. Кирова
Министерства обороны Российской
Федерации
Почтовый адрес: ул. Академика Лебедева,
д. 6, г. Санкт-Петербург, 194044
e-mail: vladmal_spb@list.ru
тел. +7 (812) 499 44 65
« 8 » ноября 2019 г.

Подпись профессора кафедры микробиологии
Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова
доктора медицинских наук, доцента
Малышева Владимира Васильевича

«Заверяю»
Начальник отдела кадров



Гусев Дмитрий Евгеньевич

« 8 » ноября 2019 г.