

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН

А.Н. Куличенко

«12» 2018 г

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической ценности диссертационной работы Половинкиной Валерии Сергеевны на тему: «Закономерности формирования резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса на примере *Yersinia pestis*» (экспериментальное исследование), представленной в диссертационный совет Д 001.038.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология

Диссертационная работа В.С. Половинкиной посвящена изучению механизмов формирования резистентности макроорганизма к возбудителю чумы под действием искусственно созданных антигенных комплексов на основе клеточных оболочек и F1 чумного микроба в сочетании с адьювантами.

Актуальность избранной темы исследования. В международных медико-санитарных правилах (2005 г.) чума включена в перечень карантинных инфекционных болезней, способных вызвать чрезвычайные ситуации в общественном здравоохранении, имеющих межгосударственное значение. Даже единичные случаи заболевания чумой человека рассматриваются как основание для проведения экстренных профилактических мероприятий.

В последние годы в Российской Федерации сохраняется нестабильная эпизоотологическая ситуация в природных очагах чумы, при этом наиболее сложная

эпидемиологическая обстановка сложилась на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага, где в 2014, 2015 и 2016 гг. зарегистрированы случаи заболевания чумой людей. В 2017 г. эпизоотии чумы зарегистрированы на территории Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного природных очагов чумы.

Наличие эпизоотически активных природных очагов чумы на территории Российской Федерации, риски завоза инфекции из неблагополучных стран и применения *Yersinia pestis* в качестве агента биотерроризма, обуславливает необходимость совершенствования подходов и средств для специфической профилактики.

В России для иммунопрофилактики чумы применяется живая сухая чумная вакцина отечественного производства, на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, которая, в настоящее время, остается единственным в мире лицензированным препаратом для специфической профилактики чумы. Применение вакцины способствует уменьшению уровня заболеваемости чумой, более легкому течению болезни и снижению риска осложнения.

Очевидно, что используемый вакцинный препарат требует совершенствования. Имеется необходимость в модернизации самой вакцины и разработке эффективных мер по повышению иммуногенности и снижению реактогенности препарата, нивелированию рисков по возможной утрате специфической активности при хранении живых вакцин. Так же, необходимо учитывать, что применяемая вакцина EV непригодна для использования в условиях проведения экстренной профилактики антибиотическими препаратами.

Диссертационная работа В.С. Половинкиной «Закономерности формирования резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса на примере *Y.pestis*» (экспериментальное исследование), направлена на изучение закономерностей молекулярных механизмов взаимодействия возбудителя чумы с системами врожденного и адаптивного иммунитета, выявление причин недостаточной длительности поствакцинального иммунитета к чумной инфекции, уточнение особенностей персистенции Т-клеток иммунологической памяти, роли экзо- и эндогенных факторов в регуляции антиинфекционной резистентности макроорганизма.

Диссертационные изыскания В.С. Половинкиной несомненно актуальны и значимы, так как направлены на разработку чумных вакцин, основанных на комплексировании изолированных антигенов с клеточной стенкой чумного микроба содержащей иммунодоминантный материал. Внедрение полученных результатов может позволить усилить иммуногенную и протективную активность вакцинного препарата.

Научная новизна исследований, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации.

На основании экспериментальных данных выявлены закономерности влияния, разработанных исследователем, антигенных комплексов на основе клеточных оболочек (КО) и F1 чумного микроба в сочетании с различными адьювантами (КО+F1, КО+F1+ДНК, КО+F1+МДП), на активность кислородзависимого

метаболизма лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов. Впервые установлена способность комплексного препарата на основе F1-антигена и КО чумного микроба как *per se*, так и в сочетании с тДНК или МДП (адьювантами) оказывать стимулирующее влияние на продукцию цитокинов, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и пролиферацию предшественников тканевых макрофагов и гранулоцитов. В.С. Половинкиной доказана возможность использования антигенных комплексов для активации бактерицидных систем фагоцитов. Так же было установлено, что комплексный препарат (F1-антиген и КО *Y. pestis*) обладает выраженной протективной активностью, обеспечивающей 100 % выживаемость экспериментальных животных после заражения высоковирулентным штаммом возбудителя чумы.

Изучена роль искусственных антигенных комплексов на основе КО и F1 антигена чумного микроба, в сочетании с МДП и тДНК, в реализации бактерицидных механизмов фагоцитоза клеток иммунофагоцитарной системы.

В.С. Половинкиной установлено, что комплексный препарат КО+F1+МДП оказывает лейкопоэтическое действие, стимулирует пролиферацию и функциональную активность субпопуляций Т-лимфоцитов.

Полученные диссертантом новые знания позволили ему разработать иммунофизиологически обоснованную схему (модель) действия на макроорганизм антигенного препарата *per se* и в сочетании с адьювантами для формирования адаптивного противочумного иммунитета.

Практическая и научная значимость результатов, полученных автором диссертации.

Диссертантом научно обоснованы возможность и перспектива применения разработанных антигенных комплексов в сочетании с адьювантами для повышения иммунологической резистентности организма к возбудителю чумы. Исследователем определены оптимальные подходы к конструированию химических вакцин для специфической профилактики чумы.

Результаты диссертационных исследований В.С. Половинкиной стали основой для конструирования антигенных комплексов на основе КО, F1 антигена чумного микроба и получения иммуногенного препарата из *Y. pestis* EV (патент на изобретения RUS 2248217 22.05.2003).

Полученные В.С. Половинкиной новые данные о механизмах формирования резистентности макроорганизма к возбудителю чумы под действием искусственно созданных антигенных комплексов на основе клеточных оболочек и F1 чумного микроба в сочетании с адьювантами, дополняют теоретические знания по проблеме специфической профилактики чумы и позволяют определить наиболее приоритетные направления дальнейших исследований по совершенствованию вакцинных препаратов.

Материалы диссертационных исследований используются на курсах дополнительного послевузовского образования (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) при подготовке специалистов по особо опасным инфекциям.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, заключений и выводов диссертации.

Обоснованность выводов, сделанных на основании результатов исследований, не вызывает сомнения. Автором использован достаточный объем фактического материала и репрезентативная выборка экспериментальных животных. Применяемые при выполнении диссертационных исследований методы (биологические, биохимические, иммунологические) общеприняты и полностью соответствуют задачам диссертационной работы. Статистическая обработка данных проведена современными методами статистического анализа с применением пакета программ «Statistica» версия 6 (Copyright©StatSoft, Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897). Статистическая значимость результатов определена с использованием по t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни.

Выводы по диссертации научно обоснованы и опираются на большой объем материала и адекватный комплекс методов исследования. Научные положения, выносимые на защиту, логически следуют из полученных результатов и выводов диссертационной работы.

Материалы, изложенные в диссертации, представлены и обсуждены на большом количестве научно-практических конференций различного уровня.

Диссертационная работа по сути изучаемой проблемы соответствует паспорту специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Личный вклад автора.

Диссертантом освоен и использован целый комплекс сложных биологических, иммунологических, химических и физико-химических методов исследования с применением современного высокотехнологичного оборудования. Автором лично проведены анализ и обобщение полученных результатов, что позволило сделать вывод о стимулирующем влиянии комплексного препарата КО+F1, в том числе совместно с тДНК или МДП, на метаболизм лейкоцитов крови и перитониальных макрофагов, функциональную активность Т-лимфоцитов и их субпопуляций. В.С. Половинкиной разработана и предложена схема (модель) действия антигенного препарата *per se* и в сочетании с адьювантами на функциональное состояние клеток иммунной системы макроорганизма.

Оценка содержания диссертационной работы.

Диссертация хорошо структурирована, состоит из введения, обзора литературы (глава 1), материалов и методов для проведения исследований (глава 2), результатов собственных исследований и их обсуждения (глава 3), заключения, выводов, перечня сокращений и условных обозначений, списка литературы. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, иллюстрирована 10 таблицами и 11 рисунками. Список литературных источников содержит 298 наименования, в том числе 215 – зарубежных.

Автором проведены обзор и анализ данных современной научной литературы по проблеме диссертационных исследований. Достаточно подробно освещено современное состояние проблемы по вакцинопрофилактике чумы у людей. В полной мере раскрыты вопросы о механизмах фагоцитоза *Yersinia pestis* и его роли в

формировании резистентности макроорганизма. В литературном обзоре большое внимание автор уделяет приемам и методам повышения иммуногенной активности и выраженности протективных свойств бактериальных антигенов противочумных вакцин. Охарактеризована особенность протективного действия антигенов поверхностных структур грамотрицательных бактерий на примере *Y. pestis*. По результатам анализа большого количества литературных источников, диссертант делает обоснованное заключение о том, что несмотря на значительные достижения в изучении иммуногенеза чумы и факторов патогенности *Y. pestis*, участие искусственно созданных антигенных комплексов, на основе клеточных оболочек и очищенных протективных антигенов чумного микроба, в сочетании с адьювантами при формировании резистентности организма к чумной инфекции остается не до конца изученным. Автором высказывается предположение, что изучаемые антигены чумного микроба играют важнейшую роль в стратегии выживания чумного микроба в макроорганизме. Сделанные диссертантом выводы о роли антигенных комплексов на основе клеточных оболочек и очищенных протективных антигенов в сочетании с адьювантами в иммуногенезе чумы, обосновывают перспективу их использования при создании средств, для специфической профилактики инфекции.

В главе 2 – «Материалы и методы исследования» содержится подробное описание всего комплекса экспериментальных исследований, включающих характеристику объектов изучения: культуры *Y. pestis*, экспериментальные биомодели (морские свинки и белые лабораторные мыши), иммуномодуляторы, субклеточные фракции и антигены чумного микроба. Подробно представлены методики химических, физико-химических, иммунологических и биологических исследований.

В главе 3 – «Результаты собственных исследований», представлены результаты и заключения исследований по получению субклеточных фракций, антигенов чумного микроба, созданию искусственного антигенного комплекса, изучению физико-химических свойств конструированных антигенов *Y. pestis* EV. В главе изложены результаты исследования иммуногенной активности и протективных свойств искусственного антигенного комплекса чумного микроба, в том числе в сочетании с адьювантами.

Резюмируют содержание работы Заключение и Выводы. В Заключении представлены анализ и обсуждение результатов диссертационных исследований. Выводы, в количестве пяти, сформулированы достаточно корректно и обоснованы полученными данными.

Таким образом, в соответствии с целями и задачами диссертационной работы, автором разработан антигенный комплекс на основе клеточных оболочек, F1 и ДНК *Y. pestis*, обладающий высокой специфичностью, достаточной иммуногенной (специфической) активностью и выраженными протективными свойствами. Диссертантом изучены закономерности влияния комплексного антигенного препарата КО+F1 (в том числе совместно с адьювантами) на бактерицидные системы фагоцитов, динамику субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, активность синтеза иммуно-опосредованными клетками цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-

4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-18, TNF- α , IFN- γ), а также M-CSF, GM-CSF, PDGF-BB, VEGF и MIG.

К наиболее важным результатам диссертационной работы можно отнести следующее:

- создание концептуальной схемы механизмов действия антигенного препарата *per se* и в сочетании с адьювантами на функциональное состояние клеток иммунной системы макроорганизма;

- конструирование антигенных комплексов на основе КО, F1 антигена чумного микроба;

- получение иммуногенного препарата на основе штамма *Y. pestis* EV.

По материалам диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 6 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, 2 – в иностранных журналах, монография и патент на изобретение.

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ. Анализ автореферата показывает, что он соответствует содержанию диссертации.

В целом работа заслуживает положительной оценки. По содержанию диссертации нет принципиальных замечаний. Имеются лишь частные замечания и вопрос к диссертанту:

1. Остается непонятным, с какой целью автор при изучении субпопуляционного состава клеток крови экспериментальных животных объединил результаты исследований, полученные на 14 и 21 сутки. Согласно данным главы 2 «Материалы и методы исследования», взятие материала у животных для анализа производилось на 14 и 21 сутки, а не в промежутке указанных сроков.

2. Имеются разногласия в разделе «Материалы и методы исследования» - в автореферате указано, что субпопуляционный состав клеток крови определяли, анализируя 100 000 событий, в диссертации – 10 000 событий. Также приводится разное количество используемых экспериментальных биомоделей (в автореферате 366 морских свинок в диссертации 346).

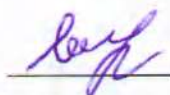
Высказанные замечания не носят принципиального характера и скорее относятся к оформлению диссертационной работы.

Заключение.

Диссертационная работа «Закономерности формирования резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса на примере *Yersinia Pestis*» является научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение актуальной задачи – выявить механизмы формирования резистентности организма животных к *Y. pestis* под действием искусственно созданных антигенных комплексов на основе клеточных оболочек и F1 чумного микроба в сочетании с адьювантами. Диссертационная работа по актуальности, научной новизне, практической значимости и представленным результатам отвечает всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Половинкина Валерия Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Отзыв обсужден и одобрен на межлабораторной конференции лаборатории бруцеллеза с сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний, научно-профилактической клинко-диагностической лаборатории, лаборатории чумных вакцин (04.09.2018 г., протокол № 5) ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Заведующая сектором иммунологии
и патоморфологии особо опасных
инфекционных заболеваний
лаборатории бруцеллеза,
кандидат биологических наук



О.В. Логвиненко

Врач клинической лабораторной
диагностики сектора иммунологии
и патоморфологии особо опасных
инфекционных заболеваний
лаборатории бруцеллеза,
кандидат медицинских наук



Е.Л. Ракитина

Заведующий лабораторией
бруцеллеза, кандидат биологических наук



Д.Г. Пономаренко

Подписи Ольги Васильевны Логвиненко,
Екатерины Львовны Ракитиной и Пономаренко
Дмитрия Григорьевича заверяю:

начальник отдела кадров ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт Роспотребнадзора



В.В. Демченко

12.09.2018 г.

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, 355035, г.
Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15. Тел/факс: (865-2)26-03-12,
E-mail: stavnipchi@mail.ru