

ОТЗЫВ

кандидата биологических наук

Кособоковой Екатерины Николаевны

на диссертационную работу Половинкиной Валерии Сергеевны «Закономерности формирования резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса на примере *Yersinia pestis* (экспериментальное исследование)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 14.03.03 – патологическая физиология

Актуальность темы исследования

Работа Половинкиной Валерии Сергеевны «Закономерности формирования резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса на примере *Yersinia pestis* (экспериментальное исследование)» посвящена актуальной проблеме в области разработки эффективных и слабо реактогенных вакцин против чумы.

На сегодняшний день чума продолжает оставаться актуальной инфекцией, поскольку в мире сохраняются активные природные очаги, регистрируются единичные случаи и вспышки, сопровождающиеся высокой летальностью. Что обуславливает актуальность проблемы специфической профилактики этой особо опасной инфекции.

Одним из перспективных направлений исследований, является изучение иммуногенеза и иммунопрофилактики чумы, поиск средств, природного и синтетического происхождения, способных потенцировать реакции клеточного иммунитета макроорганизма и тем самым повысить эффективность применяемых вакцин.

Таким образом, диссертационная работа Половинкиной В.С., несомненно, посвящена актуальной проблеме исследования.

Диссертационная работа Половинкиной Валерии Сергеевны написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы собственных результатов исследования,

заключения, выводов и списка литературы, иллюстрирована 10 таблицами и 11 рисунками, изложена на 153 страницах машинописного текста. Список литературы содержит 298 наименований, в том числе 73 – отечественных и 215 – зарубежных. Объем выполненной Половинкиной Валерией экспериментальной работы, соответствует цели и задачам исследования.

Для выполнения данной работы диссертантом проведён значительный объём исследований. Представлены актуальность исследования, степень разработанности темы, цель работы, в соответствии с целью исследования определены задачи работы, положения, выносимые на защиту. Изложены современные представления о механизмах фагоцитоза *Yersinia pestis* и его роли в формировании резистентности макроорганизма, а так же на способах повышения иммуногенности и протективной активности бактериальных антигенов противочумных вакцин. Диссертантом представлены описания экспериментальных моделей, лабораторных и диагностических методов, методов статистической обработки полученных данных, а так же объектов исследования (антигенные препараты КО, F1 и их комплексы с адьювантами), использовавшихся в работе. Далее представлены полученные автором данные, способствующие выявлению механизмов формирования резистентности организма животных к *Y. pestis* под действием искусственно созданных антигенных комплексов на основе клеточных оболочек (КО) и фракция 1 (F1) чумного микроба в сочетании с адьювантами.

Подобраны щадящие способы обработки микробной массы, наиболее подходящие для выделения протективных антигенов и субклеточных фракций чумного микроба, из вакцинного штамма *Y. pestis* выделены F1, КО, препарат суммарной ДНК. На способ получения иммуногенного препарата путём обработки микробной массы чумного микроба цетавлоном выдан патент на изобретение (Патент РФ 2248217).

Исследование острой токсичности субклеточных фракций и антигенов чумного микроба в эксперименте на белых мышах позволило установить, что полученные данным методом препараты КО и F1, в дозе до 1000 мкг, а также ДНК *Y. pestis* в дозах 15,625 – 250 мкг являются не токсичными для лабораторных животных. На основе выделенных препаратов КО и F1 сконструированы

искусственные антигенные комплексы (за счёт механического смешивания, химического конъюгирования глутаровым альдегидом и сорбции на частицах коллоидного золота).

Для характеристики полученных препаратов применены аналитические методы. Диссертантом изучены физико-химические и иммунохимические свойства полученных препаратов. Исследование иммунохимической активности и специфичности препаратов с помощью: иммуноблоттинга, дот-иммуноанализа, реакции иммунодиффузии, иммуноферментного анализа и реакции прямой гемагглютинации, иммуноблоттинга показало наличие капсульного антигена в полученных препаратах F1 и КО. При этом мажорный полипептид с мол. массой 17 кДа, как считает автор, является иммунодоминантным компонентом, что подтверждается в иммуноблоттинге и реакции иммунодиффузии. Показано выраженное протективное действие препаратов в тесте защиты белых мышей.

Исследование возможности усиления протективного действия искусственного антигенного комплекса чумного микроба, за счёт применения иммуномодуляторов различного происхождения, показало, что все взятые в испытание адъюванты повышают защитное действие комплексного препарата из субклеточных фракций чумного микроба, данное обстоятельство свидетельствует о перспективности их использования в качестве адъювантов при конструировании химических вакцин против чумы.

Диссертантом исследовано влияние искусственного антигенного комплекса на функциональное состояние клеток иммунофагоцитарной системы *in vitro*, получены новые данные о его стимулирующем влиянии на активность нитроксидзависимого, кислородзависимого и кислороднезависимого метаболизма лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов экспериментальных животных. Адъюванты, использованные в экспериментах, усиливают стимулирующее влияние комплексного препарата. При этом, наибольший стимулирующий эффект проявляет комплексный препарат в сочетании с бактериальной ДНК или МДП.

Исследование *in vitro* влияния полученного комплексного препарата на продукцию цитокинов разного профиля иммунокомпетентными клетками опытных животных выявило его стимулирующее воздействие на TLR- и NLR-подобные

рецепторы организма, участвующие в активации синтеза провоспалительных цитокинов и факторов, стимулирующих рост лимфоцитов, пролиферацию и дифференцировку клеток, приводящих к эффективному провоспалительному антибактериальному ответу.

Установлено статистически значимое повышение абсолютного и относительного содержания незрелых популяций Т-лимфоцитов ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$). Следует отметить, что при анализе взаимосвязей между субпопуляциями лимфоцитов установлено наличие корреляционных связей относительных показателей незрелых популяций Т-лимфоцитов с активированными Т-лимфоцитами и моноцитами, что указывает на участие полученных автором препаратов, в сочетании с адьювантами, в формировании реакций адаптивного иммунитета, что является также новизной работы.

Таким образом показано, что сконструированный антигенный препарат, включающий КО + F1 *Y. pestis* в сочетании с адьювантами (тДНК и МДП), обладающий защитными свойствами, ярко выраженной способностью активировать неспецифический иммунитет и стимулировать формирование адаптивного иммунного ответа организма, может рассматриваться в качестве возможного кандидата для создания вакцинного препарата

Диссертантом предложена и научно обоснована концептуальная схема механизмов действия искусственного антигенного комплекса в сочетании с адьювантами на функциональное состояние клеток иммунной системы.

Для выполнения данной работы Полвинкиной В.С. проведён значительный объём исследований. материал изложен последовательно и логично подводит к выводам.

Научная новизна исследования.

Диссертантом впервые установлено стимулирующее влияние искусственного антигенного комплекса на формирование субпопуляционного состава клеток крови белых мышей.

Приоритетными являются данные о влиянии данного препарата на активность нитроксидзависимого, кислородзависимого и кислороднезависимого

метаболизма лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов экспериментальных животных.

Показано, что искусственный антигенный комплекс обладает высокой протективной активностью для экспериментальных животных.

Получены новые данные о стимулирующем воздействии созданного препарата в сочетании с адьювантами на активацию сигнальных путей синтеза цитокинов.

Установлено, что адьюванты МДП и тДНК возбудителя чумы повышают иммунологическую эффективность искусственного антигенного комплекса.

Предложена и научно обоснована концептуальная схема закономерностей формирования резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса в сочетании с адьювантами.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Основой достоверности научных положений и выводов, полученных автором диссертации, является использование достаточного числа методов исследования, а так же необходимого количества репрезентативного фактического материала полученного и обработанного автором. Научные положения и выводы обоснованы значительным объём исследований, аргументированных анализом полученных результатов. Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью пакета современных статистических компьютерных программ.

Полнота изложения основных результатов работы в научной печати.

Исследования выполнены в рамках двух государственных плановых научных тематик. По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе шесть – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук, две – в иностранных журналах, а так же монография и патент на изобретение.

Основные положения диссертационного исследования Половинкиной В.С., прошли всестороннюю апробацию на научно-практических конференциях различного уровня.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Теоретическая значимость работы определяется полученными в результате исследования новыми данными об изменениях в гуморальном и клеточном звеньях иммунитета, происходящих в клетках организма экспериментальных животных, под действием искусственного антигенного комплекса. Несомненна практическая значимость работы. Результаты исследований включены в лекционные курсы дополнительного послевузовского образования ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (г. Иркутск), а также легли в основу патента на изобретение РФ 2248217 от 22.05.2003 «Способ получения иммуногенного препарата из *Yersinia pestis* EV». Материалы работы вошли в монографию «Иммуномодулирующее действие металлосодержащих нанокompозитов» (Иркутск, 2017).

В автореферате отражены основные идеи и выводы диссертации, показана новизна и практическая значимость результатов исследований, приведен список публикаций, в которых отражены основные научные результаты диссертации.

Работа написана грамотным научным языком с минимальным количеством опечаток. Материалы работы изложены с соблюдением внутренней логики, что способствует легкому пониманию хода мыслей автора и последовательности проводимых им работ. Есть несколько несущественных замечаний, касающихся формулировки, которые не снижают ценности работы и не влияют на общую, несомненно, высшую оценку проделанной работы.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Половинкиной Валерии Сергеевны по актуальности, методологическому и методическому подходам, объему выполненных исследований, новизне, теоретической и практической значимости соответствует критериям ВАК Министерства образования и науки РФ п.9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 29.09.2013 №842 (с изменениями от 21.04.2016г. №335 «О внесении изменений в «Положение о порядке присуждения ученых степеней»), в части требований, предъявляемых кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – Патологическая физиология.

Старший научный сотрудник
лаборатории трансгенных препаратов
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.
Блохина» Минздрава России, к.б.н.

27.09.2018
Е.Н. Кособокова

Подпись Е.Н. Кособоковой
удостоверяю

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ
онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, к.м.н.



И.Ю. Кубасова

Сведения об организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени Н.Н.Блохина» Министерства
Здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д.24

тел./факс: 8(499) 324-11-14

www.ronc.ru