

**Отзыв официального оппонента
доктора медицинских наук, профессора Г.М. Бодиенковой**

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

Диссертационная работа В. С. Половинкиной посвящена актуальной в современный период теме, которая определяется высокой медико-социальной и экономической значимостью проблемы профилактики чумы. Поскольку существование активных природных очагов чумы на территории России, возможность завоза инфекции с расширением транспортных связей и ростом миграции населения, а также угроза применения возбудителя в террористических целях способны привести к эпидосложнениям чрезвычайного характера. Это обосновывает необходимость иметь в наличии надёжные средства специфической профилактики соответствующих контингентов населения. В России и др. странах СНГ в настоящее время, применяется живая сухая чумная вакцина EV НИИЭГ российского производства, которая имеет государственную регистрацию и способствует формированию иммунитета длительностью до года. Тем не менее, учитывая известные трудности использования живой вакцины, включая условия её содержания, возможную при этом утрату иммуногенности, невозможность применения в условиях экстренной профилактики чумы антибиотиками и др., предпочтение отдают разработке и созданию для иммунопрофилактики субъединичных химических вакцин. Одним из путей создания таких вакцин может служить разработка препаратов на основе протективных антигенов чумного микроба (F1, V-антиген, ЛПС, ОСА) и адъювантов. В связи с чем диссертационная работа В.С. Половинкиной, посвященная выявлению механизмов формирования резистентности организма животных к *Y. pestis* под действием искусственно созданных антигенных комплексов на основе клеточных оболочек

чек (КО) и F1 чумного микроба в сочетании с адьювантами представляет несомненный интерес, а ее актуальность не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования состоит в том, что автором впервые установлено стимулирующее влияние комплексного препарата на основе F1 и клеточных оболочек в сочетании с тотальным ДНК (тДНК) чумного микроба или мурамилдипептида (МДП) в условиях *in vitro*. Выявлены особенности влияния антигенного препарата КО+F1 на формирование субпопуляционного состава клеток крови белых мышей. Повышение содержания незрелых популяций Т-лимфоцитов ($CD3^+CD4^-CD8^-$, $CD3^+CD4^+CD8^+$) и их взаимоотношение с активированными Т-лимфоцитами и моноцитами свидетельствует об их роли в формировании реакций адаптивного иммунитета. Получены новые данные о способности комплексного препарата на основе F1-антигена и КО чумного микроба как *per se*, так и в сочетании с тДНК или МДП оказывать стимулирующее влияние на продукцию цитокинов и GM-CSF, а также пролиферацию предшественников тканевых макрофагов и гранулоцитов. Предложена и патогенетически обоснована концептуальная схема механизмов действия искусственного антигенного комплекса на основе КО и F1 антигена чумного микроба и в сочетании с МДП и тДНК на функциональное состояние клеток иммунной системы.

Экспериментально доказано, что полученный препарат обладает высокой протективной активностью для белых мышей. Приоритетными являются сведения о том, что МДП и тДНК возбудителя чумы повышают его иммунологическую эффективность, что указывает на перспективность их использования в качестве адьювантов при конструировании химических вакцин против чумы. Предложена и научно обоснована концептуальная схема особенностей формирования резистентности организма экспериментальных животных под действием искусственного антигенного комплекса КО+F1 в сочетании с МДП и тДНК.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Результаты выполненных автором исследований расширяют и дополняют существующие представления об активации клеточных и гуморальных факто-

ров врождённого иммунитета и функциональных изменениях, происходящих в клетках организма при иммунизации экспериментальных животных искусственным антигенным комплексом в сочетании с адьювантом (тДНК или МДП). Полученные автором новые данные позволяют определить дальнейшие направления изысканий в области исследования механизмов формирования резистентности макроорганизма к *Y. pestis*.

Теоретическая и практическая значимость результатов работы подтверждена патентом на изобретение РФ 2248217 от 22.05.2003 «Способ получения иммуногенного препарата из *Yersinia pestis* EV». Материалы работы включены в монографию «Иммуномодулирующее действие металлосдерживающих наноконструкций» (Иркутск, 2017). Научные и практически значимые результаты диссертационного исследования включены в лекционные курсы послевузовского образования при ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационной работы представляют собой теоретическую основу для дальнейшего совершенствования технологий по разработке и созданию для иммунопрофилактики химических вакцин.

Научные положения и выводы диссертации представляют большой интерес для патофизиологов, иммунологов, микробиологов.

Структура диссертации, ее содержание и завершенность в целом Диссертационная работа Половинкиной Валерии Сергеевны изложена традиционно на 153 страницах машинописного текста, является целостным завершенным трудом и состоит из введения, глав, содержащих обзор литературы, характеристику материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Иллюстрирована 10 таблицами и 11 рисунками. Список литературы содержит 298 наименований, в том числе 73 – отечественных и 215 – зарубежных.

Во введении автор аргументировано, со ссылками на источники современной литературы, обосновывает актуальность исследования, научную новизну, практическую и теоретическую значимость, формулирует цель и задачи, положения, выносимые на защиту.

В обстоятельном «Обзоре литературы» (глава 1), диссертант детально останавливается на современных представлениях о механизмах фагоцитоза *Y. pestis* и его роли в формировании резистентности макроорганизма, а также способах повышения иммуногенности и протективной активности бактериальных антигенов противочумных вакцин. Изложенный в обзоре литературы материал позволяет заключить об актуальности и новизне выполненных исследований.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» автор обосновывает методические приемы исследования. Объектом исследования служили субклеточные фракции чумного микроба, полученные из вакцинного штамма *Y. pestis* EV – КО, капсульный антиген (F1), препарат суммарной ДНК и созданный на их основе искусственный антигенный комплекс. Достаточно подробно описаны лабораторные, инструментальные и статистические методы, используемые в работе.

«Результаты собственных исследований и их обсуждение» представлены в третьей главе, в которой Валерия Сергеевна подробно представляет и анализирует полученные результаты, способствующие раскрытию молекулярных механизмов функционирования бактерицидных систем фагоцитов, под воздействием компонентов субклеточных фракций *Y. pestis*. Объем выполненной диссертантом экспериментальной работы достаточен для достижения цели исследования. Автор убедительно обосновывает, что полученные щадящим методом препараты КО и F1 в дозе до 1000 мкг, а также ДНК *Y. pestis* в дозах до 250 мкг не токсичны для лабораторных животных (патент РФ 2248217). Подробно представлены физико-химические и иммунохимические свойства искусственного антигенного комплекса, показана иммунохимическая активность и специфичность, полученных препаратов, а так же их выраженное протективное дей-

ствии в тесте защиты белых мышей. Исследование *in vitro* влияния комплексного препарата самого по себе и в сочетании с тДНК чумного микроба или МДП на функциональное состояние клеток иммунофагоцитарной системы, позволило обосновать его стимулирующее действие на активность кислородзависимого метаболизма и активность NO-синтазы лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов экспериментальных животных. Результаты определения активности кислороднезависимого метаболизма гранулоцитов показали, что сконструированный диссертантом комплексный препарат оказывает стимулирующее воздействие на содержание в фагоцитах неферментных катионных белков. Используемые в экспериментах адъюванты (тДНК чумного микроба, МДП) усиливают стимулирующее влияние комплексного препарата и повышают уровень содержания НКБ в лейкоцитах крови животных. При этом наибольший стимулирующий эффект проявляет комплексный препарат в сочетании с бактериальной ДНК. Таким образом, комплексный препарат на основе F1 и клеточных оболочек в сочетании с ДНК чумного микроба или МДП в условиях *in vitro* стимулирует активность бактерицидных систем фагоцитов (кислородзависимых и кислороднезависимых).

При исследовании влияния комплексного препарата на продукцию цитокинов разного профиля иммунокомпетентными клетками опытных животных получены новые данные о стимулирующем действии препарата на TLR-2, MLR-2, TLR-9 и TLR-4 рецепторы организма, способствующие активации путей синтеза провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α , IFN- γ), и факторов, стимулирующих рост лимфоцитов (IL-2), пролиферацию и дифференцировку клеток (M-CSF, GM-CSF), в.т.ч. предшественников тканевых макрофагов и гранулоцитов, переключение синтеза классов антител (IL-4, IL-5), а также факторов роста (тромбоцитов, эндотелия сосудов и др.) и в конечном итоге приводящих к эффективному провоспалительному антибактериальному ответу.

Повышение содержания незрелых популяций Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) и наличие корреляционных связей этих клеток с акти-

вированными Т-лимфоцитами и моноцитами указывают на участие полученных автором препаратов (F1+КО в сочетании с тДНК или МДП) в формировании реакций адаптивного иммунитета, что также является новизной работы.

Высокие защитные свойства и установленные механизмы действия позволяют рассматривать сконструированный антигенный комплекс (КО+F1) в сочетании с адъювантами в качестве возможного кандидата для создания вакцинного препарата, обладающего выраженной способностью активировать неспецифический иммунитет и стимулировать формирование адаптивного иммунного ответа организма.

Диссертантом предложена и научно обоснована концептуальная схема механизмов действия искусственного антигенного комплекса на основе КО и F1 антигена чумного микроба и в сочетании с МДП или тДНК на функциональное состояние клеток иммунной системы.

Материал изложен последовательно и логично подводит к выводам диссертации.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Результаты, представленные в работе, базируются на достаточном объеме исследований, научном анализе и применении широкого спектра современных и адекватных поставленным задачам методов исследования, выполненных в соответствии с утвержденными методическими указаниями, рекомендациями. Статистическая обработка полученных результатов проведена в соответствии с международными правилами и стандартами. Положения, выносимые на защиту, обоснованы и сформулированы на основе системного подхода к решению поставленных задач. Выводы также обоснованы, соответствуют задачам исследования и сформулированы на основе анализа фактического материала и логично вытекают из содержания работы.

Полнота изложения основных результатов работы в научной печати

Исследования выполнены в рамках двух плановых научных тем. По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 6 – в рецензируемых

изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук, две – в иностранных журналах, монография и патент на изобретение. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на представительных научных международных, всероссийских и региональных конференциях, симпозиумах.

Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные положения диссертации.

По существу изложенных в диссертации материалов принципиальных замечаний нет. Вместе с тем, в процессе ознакомления с диссертационным исследованием возникли вопросы для обсуждения:

1. Чем обоснован выбор экспериментальных животных (белые мыши и морские свинки) при изучении иммуногенных свойств искусственного антигенного комплекса?

2. В чем заключается преимущество запатентованного Вами способа получения КО и F1 чумного микроба и тДНК от существующих на данный момент методов получения этих антигенов?

Заключение

Диссертационная работа В. С. Половинкиной «Закономерности формирования резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса на примере *Yersinia pestis* (экспериментальное исследование)», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение новой актуальной задачи, в основу которой положен значительный объем материала многолетних исследований по конструированию возможного кандидата для создания вакцинного препарата и всестороннему исследованию механизмов формирования резистентности организма на примере *Y. pestis*, что имеет существенное значение для патологической физиологии. По своей актуальности, научной и теоретической значимости, объему выполненных исследований, дис-

сертификационная работа В. С. Половинкиной «Закономерности формирования резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса на примере *Yersinia pestis* (экспериментальное исследование)», соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» постановления Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 года, а ее автор заслуживает присуждение степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Указанная область исследования соответствует формуле специальности 14.03.03 – патологическая физиология, а именно п. 2 «Изучение общих патогенетических механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенного фактора, в том числе механизмов формирования патологических систем и нарушений информационного процесса, обуславливающих развитие заболеваний» и п.8 «Анализ взаимоотношений общего и частного, части и целого, единства и борьбы противоположностей в динамике развития патологического процесса».

Официальный оппонент
заведующая лабораторией иммуно-
биохимических и молекулярно-
генетических исследований в гигиене
ФГБНУ «Восточно-Сибирский
институт медико-экологических
исследований» Федерального
агентства научных организаций
Российской Федерации,
доктор медицинских наук, профессор
«30» августа 2018 г.



Бодиенкова Г.М.

Подпись д.м.н., профессора Г.М. Бодиенковой
Заверяю:
Начальник отдела кадров



Мандрик Е.А.

Сведения об официальном оппоненте:

Бодиенкова Галина Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» Федерального агентства научных организаций Российской Федерации. 665827, СФО, Иркутская область, г. Ангарск, 12а микрорайон, 3; моб. тел. 89041446849, 8(3955)55-96-63; <http://vsimeir.ru>; immun11@yandex.ru.