



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ростовский -на- Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

(ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора)

344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, д.117/40

Тел. (863) 240-27-03, Факс: (863) 267-02-23, E-mail: plague@aaanet.ru, Сайт:

<http://antiplague.ru>

ОКПО 01898316, ОГРН 1026103278959, ИНН 6164101841, КПП 616401001

УТВЕРЖДАЮ

Директор

ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный институт
Роспотребнадзора

К.м.н.  Титова С.В.

« » 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора на диссертацию Пименовой Екатерины Владимировны «Разработка метода оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза in vitro на модели перевиваемых клеточных культур», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 - микробиология

Актуальность темы диссертации: Любое новое химическое соединение, независимо от целей его будущего применения, должно быть охарактеризовано по биологической активности и цитотоксичности в отношении макроорганизма. Особенно это касается потенциальных лекарственных и профилактических средств. Оценка цитотоксичности лекарственных препаратов в рамках стандартов Надлежащей лабораторной практики (GLP) является необходимым этапом их исследования на доклиническом этапе, что позволяет получить достоверную токсикологическую оценку.

Под цитотоксичностью понимают появление патологических изменений в клетках при действии физических, химических и биологических агентов. В зависимости от силы и мишени воздействия возможна широкая гамма изменений, ограниченная с одной стороны цитостатическим эффектом, нарушающим прохождение клетки по клеточному циклу, а с другой стороны – цитоцидным эффектом, ведущим клетку к гибели, запуску механизмов апоптоза и включению процессов некроза.

До недавнего времени токсикологические исследования на теплокровных животных (мыши, крысы, морские свинки, кролики, реже — кошки и собаки, как исключение — обезьяны) считались «золотым стандартом». Однако, эти методы являются трудоемкими, их проведение осложняется наличием структурной и функциональной гетерогенности клеток, что затрудняет анализ молекулярных механизмов действия изучаемых препаратов. Использование лабораторных животных для оценки потенциальных лекарственных и профилактических препаратов приводит к увеличению экономических и временных затрат, которые значительно удорожают и удлиняют исследования. Необходимо учитывать, что на уровне организма конечный эффект цитотоксического действия агента на клетки может зависеть от процессов его транспорта в крови или лимфе, трансмембранного переноса, особенностей организации тканей и органов, характера рецепторного и неспецифического связывания с молекулами-мишенями, степени адекватности систем защиты клеток (антиоксидантной, репаративного синтеза ДНК, эффективности лизосомального аппарата, активности белков теплового шока – шаперонов и пр.). Поэтому в последние годы для оптимизации оценки цитотоксичности биологически активных веществ предпочтение отдается сочетанию экспериментов *in vivo*, *in vitro* и *in silico* (компьютерное моделирование). Преимущество методов *in vitro* состоит в том, что они являются достаточно информативными для оценки общей цитотоксичности препаратов и выявления их специфической токсичности, что позволяет уменьшить количество используемых животных

для биологического тестирования, а также в некоторых случаях проводить быстрый скрининг биологически активных веществ непосредственно на клетках и тканях человека.

Несмотря на существование различных тест-систем для исследований цитотоксичности *in vitro* (изолированные перфузируемые органы/органеллы/мембраны/ферменты; тканевые срезы; клеточные культуры/суспензии; системы беспозвоночных; *nonliving* системы; компьютерные модели), продолжается поиск клеточных моделей и разработка стандартизированных методов с использованием культур клеток различной органной природы, позволяющих получать информацию о влиянии различных агентов на метаболизм клеток макроорганизма.

Научная и практическая ценность диссертации определяется получением данных о возможности использования перевиваемых клеточных линий животного и человека в качестве модели для изучения цитотоксического и цитопатогенетического действия антигенов возбудителя мелиоидоза, перспективных в плане использования их для специфической профилактики этого заболевания. Подобрана наиболее адекватная клеточная модель для изучения цитотоксичности и цитопатогенности антигенов *Burkholderia pseudomallei* – монослойные клеточные линии мышинных фибробластов L929 и овариальных клеток китайского хомячка СНО-K1. Оптимизированы и стандартизированы условия подготовки этих линий для постановки теста по выявлению токсичных компонентов в биологически активных комплексных антигенах возбудителя. Определены критерии, позволяющие оценивать цитотоксическую и цитопатогенетическую способности исследуемых образцов - морфофункциональные изменения индикаторных культур и абсолютные и относительные показатели динамики гибели клеток-мишеней в течение срока наблюдения. Показана эффективность применения предложенной модели при оценке токсичности восьми образцов водно-солевых экстрактов из обеззараженных ацетоном микробных клеток возбудителя мелиоидоза и семи образцов формамидных

экстрактов гликопротеина его капсулы. Кроме этого, благодаря использованию монослойных перевиваемых клеточных линий мышинных фибробластов L929 и овариальных клеток китайского хомячка СНО-К1 удалось изучить протективные свойства моноклональных антител, полученных против различных эпитопов поверхностных антигенов патогена. Новизна предложенного метода подтверждена патентом «Способ определения цитотоксичности антигенов *Burkholderia pseudomallei* in vitro». Практическая значимость работы определяется участием Пименовой Екатерины Владимировны в разработке методических рекомендаций по применению клеточной модели для оценки токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза in vitro. Методические приемы, заложенные в них, помимо использования в диссертационной работе, могут быть применены в других исследованиях по изучению иммунобиологических свойств антигенов возбудителя мелиоидоза и других инфекций.

Значимость полученных соискателем результатов для развития соответствующей отрасли науки (микробиологии) заключается в том, что предложенный метод оценки цитотоксичности различных антигенов, при относительной простоте исполнения, универсальности, позволяет проводить скрининг потенциальных компонентов противомелиоидозной химической вакцины. Тест микротоксичности может быть использован в качестве дополнительного метода при выборе антигенного материала для иммунизации животных с целью получения гипериммунных сывороток, при изучении накопления токсичных метаболитов в питательных средах при культивировании различных по вирулентности штаммов *B. pseudomallei*, при отборе штаммов-продуцентов иммуногенов, а также при выборе эффективных цитопротекторов, защищающих клетки от токсического действия буркхольдерий. Предложенная модель может быть полезна при реализации научно-исследовательских и прикладных работ, посвященных изучению иммунобиологической активности антигенов возбудителей различных инфекций.

Таким образом, диссертация Пименовой Екатерины Владимировны «Разработка метода оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза in vitro на модели перевиваемых клеточных культур», является научно-квалификационной работой, в которой содержится новый подход к оценке цитотоксичности и цитопатогенности антигенов *B. pseudomallei*, заключающийся в применении для этого перевиваемых клеточных линий животного и человека, что имеет существенное значение при отборе и характеристике наиболее перспективных компонентов экспериментальных химических вакцин против мелиоидоза, и соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным п. 9 Постановления Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г.

Отзыв обсужден и одобрен на Ученом совете ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (Протокол № 2 от 18.04.2016 г.).

Заведующая лабораторией
гибридом
ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный институт
Роспотребнадзора
д.б.н., профессор

Л.П. Алексеева

Заведующая лабораторией
иммунологии ООИ
ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный институт
Роспотребнадзора
к. б. н.

И.А. Иванова

Подписи
заверяю:

Специалист по кадрам
ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный институт
Роспотребнадзора



Т.А. Петренко