



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

**Федеральное казённое учреждение
здравоохранения «Ставропольский научно-
исследовательский противочумный
институт» Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека**

(ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора)

355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д.13-15

Тел/факс: (865-2) 26-03-12

E-mail: snipchi@mail.stv.ru

ОКПО 01897080 ОГРН 1022601949930

ИНН 2636000641 КПП 263601001

04.05.2016 № 03-08-741

на № _____ от _____

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу 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 – микробиологии

Мелиоидоз относится к группе особо опасных бактериальных инфекций, характеризуется высокой летальностью, тяжелым течением. Известно, что возбудитель мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei* продуцирует ряд биологически активных соединений, в том числе токсины. Кроме того, наличие тяжелых форм мелиоидоза, осложненных септицемией с множественными некротическими поражениями внутренних органов, трудно поддающихся антибактериальной терапии, а также молниеносных форм этой инфекции, косвенно свидетельствуют об участии в патогенезе заболевания токсичных продуктов, синтезируемых этой бактерией. Однако,

исследования, касающиеся определения степени токсичности или цитопатогенности антигенов возбудителя мелиоидоза, очень ограничены. Поэтому диссертационная работа Е.В. Пименовой, посвященная изучению потенциально токсичных компонентов в составе микробных клеток *B. pseudomallei in vitro* на модели перевиваемых клеточных культур, несомненно, актуальна.

Цель исследования, связанная с разработкой оптимизированных условий постановки теста микроцитотоксичности для выявления *in vitro* токсичных компонентов антигенов возбудителя мелиоидоза, а также с изучением возможности их нейтрализации с помощью специфических моноклональных антител различной эпитопной направленности, в полной мере соответствует специальности представленной диссертационной работы – микробиология.

Задачи исследования адекватны поставленной цели и включают ряд этапов, касающихся стандартизации постановки реакции цитотоксичности с учетом индивидуальных особенностей каждой из перевиваемых клеточных линий, изучения цитотоксичности и цитопатогенности различных антигенов *B. pseudomallei*, а также изучения эффективности применения мелиоидозных МКА в качестве цитопротекторов для защиты индикаторных клеток от токсического воздействия антигенов возбудителя мелиоидоза.

Задачи работы отражены в положениях, выносимых на защиту, а результаты их решения представлены в заключении и выводах.

Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований, выводов, списка сокращений и списка цитированной литературы. Последний включает 211 источников, в том числе зарубежных – 166. Работа иллюстрирована 23 рисунками и 5 таблицами.

Во введении автором представлена актуальность и степень разработанности темы исследования, цель и задачи работы, ее теоретическая

и практическая значимость, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из двух разделов. В нем достаточно подробно дана характеристика экспериментальных моделей, используемых для проверки токсических свойств различных биополимеров, в том числе и перевиваемых клеточных линий. Автор справедливо отмечает, что изучение потенциально токсичных биополимеров *in vitro* с применением стандартных и паспортизированных перевиваемых клеточных культур актуально, при этом результаты воспроизводимы на всех этапах работы по оценке цитотоксичности и цитопатогенности этих веществ.

В обзоре литературы весьма обстоятельно представлены свойства антигенов *B. pseudomallei*, однако, как отмечает автор, до сих пор не выяснено, какие компоненты клетки возбудителя мелиоидоза оказывают наиболее выраженное цитотоксическое действие на макроорганизм.

Анализируя раздел «Материалы и методы», следует отметить, что диссертантом в качестве антигенов изучены восемь образцов водно-солевых экстрактов (ВСЭ) из обеззараженных ацетоном восьми штаммов буркхольдерий II группы патогенности и семь образцов формамидных экстрактов (ФЭ) гликопротеина капсулы *B. pseudomallei*. В работе были использованы коллекционные паспортизированные линии клеток животных и человека с известными свойствами. Методы исследования, применяемые в работе, описаны диссертантом достаточно подробно.

В главе 3 диссертационной работы представлены материалы по оптимизации условий подготовки и использования популяций перевиваемых клеточных линий в качестве индикаторных культур в тестах микроцитотоксичности. Наиболее значимыми итогами данного раздела работы явились данные о высоких показателях жизнеспособности клеток коллекционных линий животных (L 929 и CHO – K1) и человека (HeLa S3 и HeLa ТК), выведенных из криоконсервированного состояния (более 90%), сроках их адаптации к оптимизированным условиям культивирования (не

менее 2 недель), сроках выполнения эксперимента без смены среды культивирования (3суток).

Глава 4 посвящена изучению цитотоксических свойств антигенных комплексов *B. pseudomallei*. На модели двух индикаторных линий: фибробластов мыши (L 929) и овариальных клеток китайского хомячка (СНО – К1), которые показали себя как более «технологичные» в работе, обеспечивающие высокий уровень воспроизводимости результатов, автору удалось получить достоверные данные о цитотоксичности четырех ВСЭ из восьми проверенных образцов и цитопатогенности гликопротеина 200kDA, маркера вирулентных штаммов возбудителя мелиоидоза.

В главе 5 диссертационной работы Е.В. Пименовой представлены результаты исследований по изучению возможности нейтрализации цитотоксического действия антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* моноклональными антителами против антигенов *B. pseudomallei* различной эпитопной направленности. Установлено, что практически все варианты МКА обладали индивидуальным профилем активности в отношении компонентов смеси растворимых антигенов *B. pseudomallei* штаммов 100, 57576, 51274, «узнавая» гомологичные им эпитопы в каждой из этих смесей, и в зависимости от использованной дозировки того или иного МКА, способствуя увеличению числа выживших клеток в тесте микроцитотоксичности по сравнению с контролем.

В заключении диссертационной работы подводятся краткие итоги проведенных исследований и даются практические рекомендации по использованию полученных результатов.

Научная новизна диссертационной работы Е.В. Пименовой несомненна. Автором получены приоритетные данные, свидетельствующие об эффективности применения перевиваемых клеточных линий животных и человека в качестве альтернативной модели для изучения цитотоксического и цитопатогенного воздействия растворимых антигенов возбудителя мелиоидоза на эти мишени. Впервые на модели монослойных перевиваемых

клеточных линий L 929 и CHO – K1 изучены протективные свойства мелиоидозных МКА против различных эпитопов антигенов, экспонированных на поверхности микробных клеток возбудителя мелиоидоза. Новизна исследований подтверждена патентом РФ на изобретение №2465592 от 27.10.2012 г.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанный вариант тестирования цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* с использованием клеточной модели относительно прост в исполнении, универсален, воспроизводим и пригоден для проведения множественного скрининга антигенов *B. pseudomallei*, используемых при иммунизации животных с целью получения гипериммунных сывороток или в качестве компонентов экспериментальных вакцинных препаратов. Эта модель эффективна не только для оценки токсичности антигенов, но и для отбора цитопротекторов, в качестве которых апробированы мелиоидозные МКА.

Результаты исследований использованы при оформлении «Методических рекомендаций по применению клеточной модели для оценки токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro*» (рассмотрены Ученым советом Волгоградского противочумного института и утверждены директором института 23.06.2011 г.).

Два новых варианта гибридных клеток были депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск».

Полученные автором результаты достоверны. Автореферат диссертации полностью отражает содержание работы, соответствующей специальности 03.02.03 – микробиология.

Основные исследования, представленные в диссертации, выполнены Е.В. Пименовой самостоятельно, что подтверждено публикациями и методическими рекомендациями. Материалы диссертации были

представлены на научных конференциях разного уровня и отражены в 9 опубликованных работах, в том числе трех, рекомендованных ВАК.

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Некоторые погрешности в тексте диссертации не умаляют достоинств работы.

Таким образом, анализ диссертации Е.В. Пименовой свидетельствует о том, что цель исследования, направленная на разработку метода оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* на модели перевиваемых клеточных культур, достигнута.

Заключение: Диссертация «Разработка метода оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* на модели перевиваемых клеточных культур» является научно-квалификационной работой, отвечающей критериям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор Пименова Екатерина Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:
И.о. главного научного сотрудника
научно-производственной лаборатории
препаратов для диагностики особо
опасных и других инфекций
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

И.С. Тюменцева

Подпись И.С.Тюменцевой заверяю
Начальник отдела кадров
ФКУЗ Ставропольский противочумный
институт Роспотребнадзора



В.В. Демченко

04 мая 2016 г.