

Отзыв

официального оппонента по диссертации Пименовой Екатерины Владимировны «Разработка метода оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* на модели перевиваемых клеточных культур», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Преимущества клеточной модели для оценки безопасности биологических веществ и медицинских препаратов, вводимых человеку, неоспоримы. Это особенно важно, поскольку их потенциальная токсичность для человека оценивается *in vitro*, причем на клеточном уровне. При этом используются стандартизованные линии клеток с известными свойствами. Немалое значение имеет то, что оценка результатов проводится быстро, с минимальными экономическими затратами, с определением точной пороговой концентрации исследуемого вещества и с высокой степенью чувствительности.

Возбудитель мелиоидоза относится ко II группе патогенности и обладает рядом биологически активных компонентов, ассоциированных с его вирулентными и патогенными свойствами. Токсичность и патогенность биологически активных веществ *B. pseudomallei* на клеточном уровне изучены недостаточно, поэтому цель диссертационной работы, связанная с разработкой оптимального теста микроцитотоксичности биологически активных антигенных компонентов и отдельных высокоочищенных антигенных препаратов, в том числе, перспективных для создания субъединичных мелиоидозных вакцин актуальна и своевременна.

Задачи исследования вытекают из цели работы, сформулированы весьма четко и последовательно отражают решение поставленных в диссертации вопросов, вплоть до конечных научно-практических результатов.

Четыре положения, вынесенные на защиту, дают четкое представление об экспериментальном характере проводимого исследования и открывают неплохие перспективы по использованию полученных результатов для фундаментальных и особенно прикладных исследований, связанных с весьма точной оценкой безвредности профилактических препаратов *in vitro* на клеточном уровне.

Диссертация небольшая по объему (111 страниц), написана в традиционном ключе грамотным языком, включает все необходимые разделы, достаточно богато и качественно иллюстрирована, лаконична, без излишеств и ненужных отступлений.

Обзор литературы состоит из двух подглав, содержание которых удачно вписывается в канву экспериментальной части диссертационной работы Екатерины Владимировны.

Судя по материалам литературного обзора, токсические свойства антигенных субстанций различных микроорганизмов довольно широко изучаются на весьма многочисленных разновидностях клеточных линий. При этом одной из основных задач является подбор адекватной клеточной модели для конкретного опытного образца изучаемого вещества или препарата. Не вызывает сомнений актуальность проведения таких исследований и внедрения в практику моделей *in vitro* с использованием перевиваемых клеточных линий лабораторных животных и человека для определения безопасности субъединичных или химических вакцин в тестах цитотоксичности. Примером тому служит глубокий анализ достаточно обширных экспериментальных данных, представленных Е.В.Пименовой в подглаве 1.1 диссертационной работы. В подглаве 1.2. подробно представлены сведения по характеристике антигенной структуры *V. pseudomallei*, их роли в патогенезе инфекции, наличии цитотоксических свойств у различных антигенных комплексов и антигенов, структурно и функционально различающихся между собой. Несмотря на довольно

большое количество экспериментальных работ в основном зарубежных авторов четкое представление о дифференцированной картине степени цитотоксичности компонентов клетки мелиоидозного микроба отсутствует. Для её уточнения требуется проведение специальных исследований, к которым не без оснований можно отнести подбор адекватных клеточных моделей.

Материальная часть и методическое обеспечение диссертационной работы соответствует всей довольно многообразной палитре научно-практических вопросов, которые предстояло решить уважаемой Екатерине Владимировне. В главе 2 представлены сведения об использованных клеточных линиях, лабораторных животных, условиях их культивирования и содержания, образцов антигенных препаратов возбудителя мелиоидоза, предназначенных для изучения цитотоксичности и цитопатогенности. Дана краткая характеристика антителопродуцирующего гибридом, условий их содержания и хранения, получения препаративного количества моноклональных антител, предназначенных для изучения феномена цитопротекции. Описаны в достаточном объеме микробиологические, биохимические, культуральные, иммунохимические методы исследования. Отдельно выделены методы регистрации цитотоксичности и статистической обработки результатов опытов традиционным способом и с помощью четырех компьютерных программ.

Третья глава диссертации посвящена подготовке и использованию клеточных линий в качестве индикаторов цитотоксичности протективных антигенов мелиоидозного микроба. Обращает на себя внимание очень высокая, практически предельная жизнеспособность хранившихся в жидком азоте образцов перевиваемых клеточных линий животного и человеческого происхождения (от 90 до 98 % жизнеспособных клеток после размораживания).

Следующим важным этапом подготовки перевиваемых клеток к изучению цитотоксичности явился подбор посевной дозы для формирования плотного монослоя, обеспечивающего объективную оценку изменения морфологии клеток при воздействии цитотоксических препаратов. Для получения статистически достоверных результатов диссертант закономерно предусмотрела проведение всех опытов в шестикратной повторности. В процессе экспериментов с привлечением клеточных линий животного происхождения L 929 и СНО – К 1 происходило незначительное в течение первых двух суток истощение среды, поэтому сроки наблюдения были увеличены до трех суток. Затем были подобраны оптимальные посевные дозы в каждую лунку культуральных пластин различного формата индивидуально для каждой перевиваемой линии клеток, Такой тщательный, я бы сказал, скрупулезный подход на предварительном подготовительном этапе подготовки к основным экспериментам во многом способствовал получению объективных результатов, не зависящих от ряда побочных причин, способных в той или иной степени исказить их.

В четвертой главе собственных исследований диссертант представил материалы по изучению цитотоксических свойств двух антигенных комплексов *B. pseudomallei*, которые представляют наибольший интерес в качестве компонентов химической вакцины против мелиоидоза. Это водносолевые экстракты (ВСЭ) восьми штаммов возбудителя и семь образцов гликопротеина (200 кДа) капсулы референтного штамма с индексом 100. Необходимо отметить, что химический состав водносолевых экстрактов различных штаммов *B. pseudomallei* и формамидного экстракта гликопротеида различных серий *B. pseudomallei* 100 как по количеству белка, так и углеводов значительно колебался, Сравнительное изучение цитотоксичности и цитопатогенности антигенов мелиоидозного микроба в отношении индикаторных линий выявило преимущество по чувствительности клеток линии СНО – К 1. Результаты исследований

четвертой главы диссертации позволили решить не только основную задачу, связанную с определением цитотоксичности протективных антигенов *B. pseudomallei*, но и не менее важные вопросы, касающиеся гибридной технологии получения МКА заданной специфичности. Опыты по использованию человеческих клеточных линий для определения цитотоксичности бактериальных антигенов *in vitro* оказались не столь удачными и закономерно не были рекомендованы в качестве индикаторного субстрата для определения цитотоксичности.

При изучении эффективности использования панели мелиоидозных МКА в качестве цитопротекторов токсичных антигенных комплексов *B. pseudomallei* (5 глава собственных исследований) Екатериной Владимировной также, как и при проведении предыдущих исследований тщательно был продуман и реализован наиболее оптимальный методический подход, учитывающий все нюансы подготовительного этапа, включая, в том числе, контрольные процедуры, практически исключающие возможное искажение результатов. Все основные эксперименты этого раздела диссертации были проведены на хорошо себя зарекомендовавшей модели перевиваемой клеточной линии L 929

Насколько мне известно, панель моноклональных антител в коллекции Волгоградского НИПЧИ создавалась изначально для разработки диагностических мелиоидозных препаратов, решающим критерием для отбора которых являлось видо- или группоспецифичность иммуноглобулинов, активные центры которых могли быть не комплементарны эпитопам антигенов или антигенных препаратов, отвечающих за проявление токсических свойства. В связи с этим отсутствие цитопротективной активности отдельных образцов МКА, например, при попытках нейтрализации *B. pseudomallei*, Екатерина Владимировна, на мой взгляд, справедливо увязывает с их комплементарностью к антигенным детерминантам, отвечающим за иные функции микроорганизма.

Тем не менее предложенная диссертантом модель изучения цитопротективной активности панели МКА несомненно может быть использована для целенаправленного отбора протективных МКА в качестве препаратов для пассивной превентивной защиты от мелиоидозной инфекции.

В заключении диссертант в краткой форме представила и обсудила результаты проведенных исследований, подчеркнула актуальность развития альтернативных методов оценки токсичности различных биополимеров *in vitro* вместо традиционного метода постановки биопробы. Хочу еще раз отметить очень импонирующее мне качество диссертанта, которое порой не хватает некоторым научным работникам, связанное с тщательной проработкой подготовительных этапов экспериментального исследования, от которых иногда в решающей степени зависят объективность и достоверность сформулированных выводов.

Диссертация выполнена с привлечением большого объема экспериментального материала, Выводы основаны на результатах собственных исследований диссертанта и логично вытекают из представленных в работе данных, а их достоверность подтверждена результатами статистической обработки. Несмотря на краткость формулировок в них содержится вся основная полученная в процессе работы научная информация.

Автореферат в полной мере отражает структуру оформления и содержания диссертации, а её результаты опубликованы в 9 научных работах, в том числе, в научно-практических изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые создана модель с использованием монослойных перевиваемых клеточных линий животного происхождения L 929 и СНО – К 1, пригодная для адекватного *in vitro* определения цитотоксичности и цитопатогенности антигенных препаратов *V. pseudomallei*. В отличие от двух сублиний человеческой эпителиоидной

карциномы HeLa S3 и HeLa ТК, она проста в техническом исполнении, достаточно легко воспроизводима и производительна, Разработан способ нейтрализации цитотоксического действия антигенов возбудителя мелиоидоза с использованием моноклональных антител и определения их превентивных возможностей на уровне взаимодействия отдельных эпитопов с активными центрами конкретного моноклонального иммуноглобулина. Новыми являются сведения о возможности скрининга большого количества образцов антигенов различного назначения с использованием перевиваемых клеточных линий на примере *B. pseudomallei*. Новизна работы подтверждена патентом на изобретение №2465592 от 27.10.2012 г. «Способ определения цитотоксичности антигенов *Burkholderia pseudomallei* in vitro».

Практическая значимость работы заключается в разработке нескольких оптимизированных вариантов определения in vitro цитотоксичности антигенов мелиоидозного микроба, определяющих возможность их использования для получения диагностических поликлональных антител из гипериммунных сывороток или превентивных моноклональных антител, а также компонентов экспериментальных химических или субъединичных мелиоидозных вакцин. По результатам проведенных исследований подготовлены «Методические рекомендации по применению клеточной модели для оценки токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза in vitro» (утверждены директором Волгоградского НИПЧИ 23.06.2011г.). Подготовлены и депонированы два штамма гибридом – продуцентов моноклональных антител в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМБ – Оболенск» под номерами Н – 30 и Н – 40.

Позвольте остановиться на одном замечании и на некоторых вопросах, которые возникли при ознакомлении с диссертацией.

Что касается замечания, то хотелось бы обратить внимание диссертанта на более осторожное отношение к обозначению препаратов, использованных

для определения цитотоксичности. В одних случаях они обозначены как биологически активные комплексные антигены (2 вывод), в других – как смесь антигенов (стр.52), в третьих – как исследуемые образцы антигенов (3 вывод). На мой взгляд, наиболее бы корректным было бы название – антигенный препарат или препарат антигена.

Вопросы:

1. Скажите, пожалуйста, каковы средние значения сроков забора асцитической жидкости у зараженных антителопродуцирующими гибридами линейных мышей и с чем связан такой большой временной разброс её накопления в брюшной полости - от 10 до 30 дней ?

2. В Вашей работе зафиксирована очень высокая выживаемость перевиваемых клеточных линий животного и человеческого происхождения (от 90 до 99 %), а какова выживаемость антителопродуцирующих гибридом после хранения в жидком азоте ?

3. Зависела ли цитотоксичность двух антигенных препаратов (ВСЭ и ФЭ) от их химического состава (концентрации белков и углеводов).

Хочу подчеркнуть, что высказанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Екатерины Владимировны.

Таким образом диссертация Пименовой Екатерины Владимировны является самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой в результате выполненных автором исследований содержится новое решение актуальной проблемы – научно-обоснованный выбор актуальной биологической клеточной модели для определения токсических свойств антигенных мелиоидозных препаратов и превентивных свойств видоспецифических моноклональных антител, обладающей рядом таких преимуществ перед постановкой биологической пробы *in vivo* и другими клеточными тестами, как доступность, техническая простота исполнения и учета результатов, стандартность, высокая производительность и чувствительность.

Считаю, что по актуальности темы, методическому уровню и объему проведенных исследований, научной новизне, практической значимости, полноте изложения основных научных результатов, опубликованных, в том числе, в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, диссертационная работа Пименовой Екатерины Владимировны на тему: «Разработка метода оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза in vitro на модели перевиваемых клеточных культур» соответствует «Положению о порядке присуждения ученых степеней» (Утверждено постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Главный научный сотрудник организационно-методического отдела с научной частью
Российского научно-исследовательского
противочумного института «Микроб»,
доктор медицинских наук, профессор

З.Л. Девдариани

Подпись З.Л. Девдариани
удостоверяю
начальник отдела кадров
РосНИПЧИ «Микроб»



Шамшурина

Е.Ф.Шамшурина