

Отзыв

на автореферат диссертации Пименовой Екатерины Владимировны
«Разработка метода оценки цитотоксичности антигенов возбудителя
мелиоидоза *in vitro* на модели перевиваемых клеточных культур»,
представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Мелиоидоз — острая инфекционная болезнь, протекающая в виде тяжелого сепсиса с образованием множественных абсцессов в различных органах или в виде относительно доброкачественных легочных форм.

Актуальность создания эффективных средств диагностики мелиоидоза определяется реальной угрозой возникновения в любом регионе мира неблагоприятной эпидемической ситуации по этим инфекциям в связи со значительным ростом грузо- и пассажиропотоков, появления возбудителей за счёт завоза больных животных, а также пищевых продуктов, контаминированных патогенными буркхольдериями. Способность к длительной бессимптомной персистенции возбудителя мелиоидоза в организме являются дополнительными причинами расширения ареала инфекции в результате миграции людей и животных с латентной формой заболевания

В 2015 году зарегистрировано 165 тысяч случаев псевдосапа, 95 тысяч из них имели летальный исход. Врачи-инфекционисты предупреждают, что мелиоидоз — опасная болезнь, от которой можно умереть, индикатор смертности доходит до 70%. Ситуация осложняется тем, что диагностировать недуг проблематично, симптоматика схожа с другими инфекционными болезнями. Возбудитель мелиоидоза относится ко II группе патогенности и, по мнению отечественных и зарубежных специалистов, является потенциальным агентом биотерроризма. В ряде случаев имеют место молниеносные формы заболевания, что косвенно свидетельствует об участии в патогенезе инфекционного процесса токсических продуктов, синтезируемых бактериальной клеткой. Опубликованы данные о том, что *B. pseudomallei* продуцирует ряд биологически активных соединений, в том числе токсина, отнесенных к факторам вирулентности и патогенности возбудителя мелиоидоза. Для оценки потенциально токсичных биологических и химических веществ в настоящее время широко используют метод клеточной биоиндикации взамен общепринятой модели *in vivo*. Наиболее простой и доступной системой для оценки цитотоксичности и цитопатогенности *in vitro* являются перевиваемые клеточные линии. Сравнивая опыты, которые проводят на первичных клеточных культурах и эксперименты на перевиваемых клеточных линиях в условиях *in vitro*, можно выделить ряд преимуществ. Во-первых, в работе используют паспортизированные и стандартизированные однородные клеточные линии с известными свойствами, полученные из ряда государственных специализированных банков клеточных линий, выбор которых обусловлен областью их применения. При этом результаты, полученные на перевиваемых клеточных линиях, всегда воспроизводимы на всех этапах работы. Таким образом, изучение на практике альтернативных моделей с применением перевиваемых клеточных линий в тесте микроцитотоксичности на сегодняшний день актуально. Модель *in vitro* для оценки потенциально токсичных биополимеров соответствует современным требованиям биоэтики, полученные результаты

воспроизводимы на всех этапах работы с применением стандартных паспортизированных клеточных линий для оценки цитотоксичности и цитопатогенности этих веществ.

Диссертационная работа Е.В. Пименовой посвящена разработке оптимизированных условий постановки теста микроцитотоксичности, предназначенного для выявления *in vitro* токсичных компонентов в биологически активных комплексах, изолированных из микробных клеток возбудителя мелиоидоза, и изучение возможности нейтрализации токсических свойств антигенов *B. pseudomallei*, вызывающих гибель клеток-мишеней, с помощью специфических МКА различной эпитопной направленности.

Автором разработана методика постановки микроварианта теста определения цитотоксичности и цитопатогенности сложных по составу компонентов смесей антигенов возбудителя мелиоидоза, используемых при иммунизации животных с целью получения гипериммунных сывороток или в качестве компонентов экспериментальных вакцинных препаратов.

Оптимизированы условия постановки ряда вариантов теста микроцитотоксичности, предназначенных для оценки биологической активности антигенов *B. pseudomallei in vitro*. Конкретизирована этапность и условия подготовки клеточных культур для последующего применения в тестах по определению цитотоксичности *in vitro*, определены критерии оценки результатов опытов, сроки регистрации морфологических изменений клеток-мишеней в ответ на воздействие токсичных субстанций.

Даны рекомендации по применению использованных в работе перевиваемых линий клеток в качестве индикаторных культур, обеспечивающих выявление токсичности испытуемых образцов антигенов.

Впервые представлены доказательства того, что мелиоидозные моноклональные антитела к антигенам капсулы (Ag 8 и 200kDa) и ЛПС(Aгб) *Burkholderia pseudomallei* являются эффективными цитопротекторами, способными защитить клетки-мишени от гибели, обусловленной токсическим воздействием на них антигенами данного микроорганизма. Представлены доказательства достоверного увеличения числа живых клеток в популяциях вследствие применения МКА в качестве цитопротекторов.

Представлены доказательства эффективности применения альтернативной модели не только для оценки токсичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro*, но и для отбора цитопротекторов, в качестве которых апробированы мелиоидозные моноклональные антитела.

Работа выполнена на высоком научном уровне, с использованием самых современных методов исследования и имеет выраженную практическую направленность. Выводы автора убедительны и подтверждены лабораторными испытаниями. Обоснована значимость альтернативного метода определения токсичности с использованием перевиваемых клеточных линий для оценки цитотоксичности и цитопатогенности антигенов возбудителя мелиоидоза и возможность его применения в качестве метода скрининга на этапе предварительной проверки большого числа образцов антигенов различного целевого назначения.

Теоретические и экспериментальные исследования Е.В. Пименовой нашли отражение в 10 научных публикациях, в том числе в трех статьях из списка изданий,

рекомендованных ВАК России. Публикации автора в достаточной степени отражают основные результаты и положения диссертации.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению автореферата нет.

По автореферату диссертационная работа Пименовой Екатерины Владимировны на тему «Разработка метода оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* на модели перевиваемых клеточных культур» (научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор Н.П. Храпова), представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, по актуальности, новизне и значимости для медицинской микробиологии полностью отвечает требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, а ее автор Пименова Екатерина Владимировна заслуживает присвоения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Ведущий научный сотрудник отдела коллекционных культур
ФБУН «Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии» (ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора,
(адрес: 142279, Россия, Московская область,
Серпуховский р-н, п. Оболенск),
Тел.8(4967)31-19-15; факс 8(4967)36-00-10
info@obolensk.org
кандидат биологических наук

Е.В. Белова

Подпись Е. В. Беловой заверяю.
Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ПМБ,
доктор биологических наук



Л.В. Коломбет