

## О Т З Ы В

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Терехова В.И. на диссертацию Ульяновой Онеги Владимировны «Методология повышения безопасности вакцин на модели вакцинных штаммов *Brucella abortus* 19 VA, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

**Актуальность темы исследования.** Несмотря на значительные достижения в области эпидемиологии и микробиологии таких зоонозов как бруцеллез, туляремия и чума, тем не менее, данные инфекционные болезни продолжают существовать и наносить экономический ущерб связанный как с заболеваемостью животных, так и людей.

Одним из эффективных методов контроля над инфекционными болезнями является вакцинопрофилактика. Не исключение бруцеллез, туляремия и чума, для специфической профилактики которых, как в нашей стране, так и за рубежом используются соответствующие вакцины. Однако слабая иммуногенность возбудителей перечисленных болезней послужила обоснованием для использования в качестве вакцинных штаммов живых аттенуированных бактерий. Между тем усиление уровня иммунного ответа макроорганизма в ответ на введение живой вакцины и размножение вакцинного штамма в ряде случаев сопровождается побочным действием в виде развития крайне нежелательных иммунных реакций и/или осложнений, что в значительной степени нивелирует положительный эффект вакцинации. Кроме того, постоянно существует угроза реверсии аттенуированных штаммов и появлению у них болезнетворных свойств.

Чтобы избежать побочного действия живых противобруцеллезных, противотуляремийных и противочумных вакцин в России и других странах осуществляются работы по созданию безмикробных препаратов, основанных на ДНК-технологии или использовании отдельных компонентов бактериальных клеток, но, к сожалению, дальше опытных образцов дело не дошло. Поэтому в

настоящее время корпускулярные вакцины остаются основными препаратами при осуществлении специфической профилактики бруцеллёза, туляремии и чумы. Однако для обеспечения их безопасности используемый антигенный материал должен быть максимально безвредным. Последнее в большинстве случаев обеспечивается инактивацией микробной массы с использованием различных химических или физических методов воздействия. Между тем, одна из существенных проблем, возникающих в процессе инактивации бактериальной клетки это сохранение её «первозданного» образа, позволяющего клеткам иммунной системы безошибочно определять и идентифицировать микроорганизм не только как генетически чужеродный, но и как опасный объект.

В связи с этим работа Ульяновой О.В., посвященная разработке методов повышения безопасности бактериальных вакцин с использованием фотодинамического воздействия представляется весьма актуальной и нужной для медицинской и ветеринарной науки и практики.

**Степень обоснованности научных положений и выводов.** Обоснованность научных положений, изложенных в диссертации и касающихся вопросов фундаментальной основы повышения безопасности корпускулярных вакцин из штаммов *Brucella abortus* 19 BA, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с использованием щадящего метода инактивации с помощью фотодинамического воздействия не вызывает сомнений, т.к. базируется на значительном объеме экспериментальных бактериологических и патофизиологических исследований, математическом моделировании процесса инактивации бактерий с использованием различных источников света и концентраций фотосенсибилизатора.

Сформулированные выводы вытекают непосредственно из результатов собственных исследований.

**Новизна и достоверность исследований.** Впервые диссертантом экспериментально была доказана возможность использования красного спектра света в присутствии фотосенсибилизатора (метиленовая синь) в качестве щадящего метода инактивации различных бактерий, в т.ч. вакцинных штаммов

*Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ. В ходе данных исследований эмпирически и экспериментально установлен режим эффективного воздействия красного света и фотосенсибилизатора, позволяющий полностью подавить жизнеспособность тест-объектов при сохранении целостности клеточной стенки и антигенной структуры. Инактивированные методом фотодинамического воздействия вакцинные штаммы теряли реактогенность и остаточную вирулентность, а поэтому были безвредны при их парентеральном введении лабораторным животным. Новизна проведенных автором исследований по разработке метода инактивации микроорганизмов методом фотодинамического воздействия подтверждена патентом РФ на полезную модель №77278 от 20.10.2008 г.

Кроме того, новизна диссертационной работы заключается и в том, что для проведения скрининговых исследований по тестированию безвредности вакцинных штаммов автором дополнительно был разработан и апробирован метод оценки реактогенности с использованием компьютеризированных лазерных установок, в основе которых лежат спекл-микроскопия и спекл-имиджинг.

Достоверность результатов, изложенных в диссертации, не вызывает сомнения, т.к. они были получены в ходе многочисленных опытов и экспериментов с использованием большого количества животных, современного оборудования и программного обеспечения для осуществления математической и биометрической обработки.

**Значение исследований для науки и практики.** Результаты многолетних масштабных исследований осуществленных диссертантом имеют громадное фундаментальное и прикладное значение.

В первую очередь доказана состоятельность метода инактивации вакцинных штаммов *Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ методом фотодинамического воздействия для получения безопасных биопрепаратов. Кроме того, путём математического моделирования была установлена область воздействия синглетного кислорода, образуемого в ходе взаимодействия красного света с фотосенсибилизатором – мети-



леновой синью, на клеточную стенку бактерий, что послужило основанием для понимания общих принципов работы оптического излучения и расчёта эффективного режима инактивации бактерий.

Практическая значимость работы состоит также в том, что предложен достаточно точный, показательный и быстрый метод оценки безвредности и безопасности биопрепаратов, заключающийся в использовании принципа спекл-микроскопии и спекл-имиджинга.

Материалы диссертации были использованы при разработке Методических рекомендаций по фотоинактивации бактерий, а также включены в лекционный материал по микробиологии для студентов различных профилей подготовки.

Диссертация написана методически грамотно, в научном стиле и аккуратно оформлена.

Содержание автореферата полностью отражает основные научные положения диссертационной работы и объем проведенных исследований.

В тоже время в результате рецензирования работы возникли следующие вопросы, которые требуют пояснения автора.

1. Уверен ли автор в том, что взятые в опыт штаммы, обозначаемые им как *P.aeruginosa* ATCC 27533 и ATCC 27853, действительно синегнойная палочка? Ведь для синегнойной палочки не свойственно образовывать сероводород, окислять лактозу и расщеплять фенилаланин.
2. Автором показано, что вакцинные штаммы, подвергнутые ФДВ, сохраняют антигенный профиль, но сохраняют ли они при этом иммуногенность?
3. С чем связывает автор потерю реактогенности у бактерий, подвергнутых ФДВ?
4. Насколько реализуем предложенный метод инактивации бактериальной массы в условиях биопредприятий?
5. Чем объясняется, что метиленовая синь в концентрации 0,5% оказывает большее ингибирующее действие на тест-штаммы бактерий, чем в концентрации 5%?

6. С чем связывает автор отсутствие повторяемости результатов ФДВ полученных методом математического моделирования и эксперимента проведенного в условиях *in vivo*?

7. При изучении реактогенности вакцинных штаммов методом спекл-имиджинга автор оценивал состояние микрососудов самого мозга или его оболочек?

**Заключение.** Диссертационная работа Ульяновой Онеги Владимировны, представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является самостоятельно выполненным, завершенным научным трудом, имеющим важное теоретическое и прикладное значение и прямой выход в медицинскую и ветеринарную практику.

Считаю, что диссертация и автореферат Ульяновой О.В. «Методология повышения безопасности вакцин на модели вакцинных штаммов *Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ», соответствует требованиям п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а диссертант достоин присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:  
Профессор кафедры микробиологии,  
эпизоотологии и вирусологии ФГБОУ ВПО  
«Кубанский государственный аграрный  
университет» д-р биол. наук, профессор

Адрес: 350044, г. Краснодар,  
ул. Калинина, 13  
тел.: 8-988-47-42-115  
e-mail: vterekhov@list.ru

Подпись В.И. Терехова заверяю:  
Секретарь ученого совета ФГБОУ ВПО  
«Кубанский государственный аграрный  
университет», д-р экон. наук, профессор

15.05.2014г.



В.И. Терехов



Н.К. Васильева

