

Утверждаю

Ректор ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАСХН

  
А.А. Стекольников

« 14 » мая 2014 г

### О Т З Ы В

ведущей организации на диссертацию Ульяновой Онеги Владимировны «Методология повышения безопасности бактериальных вакцин на модели вакцинных штаммов *Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – микробиология

Актуальность проблемы.

Повышение безопасности бактериальных вакцин является одним из направлений современной вакцинологии. Более 60 лет для профилактики бруцеллеза, туляремии, чумы в России и СНГ применяют живые аттенуированные вакцины из штаммов *Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Yersinia pestis* EV НИИЭГ. Их использование привело к значительному снижению заболеваемости и смертности. Однако за длительный период применения, названных вакцин, был выявлен ряд недостатков, из-за которых стало невозможным проведение массовой иммунизации. Так были зарегистрированы случаи проявления реактогенности штаммов-продуцентов *B. abortus* 19 ВА и *Y. pestis* EV НИИЭГ; возникновения

поствакцинального бруцеллеза у привитых людей. В крови сельскохозяйственных животных после введения *B. abortus* 19 ВА были обнаружены антитела в таком же титре, как и у больных, что, безусловно, затрудняло определение эпизоотического статуса животных по бруцеллезу. Случаи поствакцинальных осложнений были зарегистрированы после массовой иммунизации населения туляремийной вакциной. Кроме того, следует учитывать увеличение числа лиц, имеющих противопоказания к вакцинации (аллергические состояния, иммунодефицитные состояния, хронические заболевания, алкоголизм, наркомания и др.).

Диссертационная Ульяновой О.В., посвященная повышению безопасности имеющихся в арсенале высокоиммуногенных вакцин *Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ является, несомненно, актуальной.

В настоящее время сохраняется угроза распространения бруцеллеза, туляремии и чумы среди животных и людей, что связано с такими антропогенными факторами как трансформация ландшафтов природных очагов, разрушение скотомогильников; миграционные процессы; культурные, экономические, туристические межгосударственные связи.

В связи с указанным целью диссертации явилось теоретико-экспериментальное обоснование методологии повышения безопасности вакцинных штаммов *Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с использованием фотодинамического воздействия и оценка ее эффективности по показателям безвредности, остаточной вирулентности и реактогенности.

Ключевыми задачами исследования были: разработка фундаментальных основ новой методологии повышения безопасности живых вакцин из штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *Y. pestis* EV НИИЭГ;

создание лабораторной установки для инактивации бактерий методом фотодинамического воздействия; проведение фотодинамической инактивации бактерий *E. coli* разных штаммов и *P. aeruginosa* 27533 (в модельных экспериментах) и *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *Y. pestis* EV НИИЭГ на созданной лабораторной установке; разработка математических моделей взаимодействия бактерий и оптического излучения на основе компьютерного моделирования; сравнительный анализ колониеобразующей способности, культурально-морфологических, тинкториальных и серологических свойств бактерий до и после фотодинамической инактивации; оценка безвредности, остаточной вирулентности, реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после фотодинамической инактивации на морских свинках общепринятыми регламентированными методами, а также оценка на тканевом и организменном уровнях реактогенность вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после фотодинамического воздействия методами спекл-микроскопии и спекл-имиджинга с использованием разработанной компьютеризированной установки, включающей стандартную биосистему (микроорганизм-лабораторное животное).

Научная новизна.

Впервые разработана методология повышения безопасности живых вакцин путем фотодинамической инактивации бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ с предварительной разработкой для каждого штамма математической модели условий воздействия.

Экспериментально доказана возможность фотодинамической инактивации взвесей бактерий *E. coli* разных штаммов, *P. aeruginosa* 27533,

*B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ на оригинальной установке.

Изучены закономерности взаимодействия взвесей бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa* разных штаммов с оптическим излучением на основе математического моделирования и создания статистических моделей, параметры которых были идентифицированы в экспериментальных исследованиях *in vitro*.

Построена статистическая модель влияния синглетного кислорода, образованного в ходе фотодинамического воздействия, на взвесь бактериальных клеток, позволяющая оценить степень их инактивации.

Доказано, что эффективная инактивация происходит при обработке бактериальных взвесей в концентрации  $1 \cdot 10^9$  м.к./мл световыми диодами с длиной волны  $\lambda = 650 \pm 10$  нм, плотностью мощности излучения  $1 \text{ мВт/см}^2$  и концентрацией фотосенсибилизатора метиленового синего 0,005 %.

Установлена полная потеря жизнеспособности клеток *E. coli* В6, *E. coli* O1, *E. coli* K12 после 60 мин фотодинамического воздействия, вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА – после 180 мин и *F. tularensis* 15 НИИЭГ – после 360 мин, что подтверждено отсутствием колониеобразующей способности на питательных средах. При этом выявлено сохранение комплекса антигенов, определяемых коммерческими диагностическими препаратами, у бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

В экспериментах на морских свинках доказаны безвредность, отсутствие остаточной вирулентности и снижение реактогенности бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, инактивированных методом фотодинамического воздействия. После подкожного введения морским свинкам указанных вакцинных штаммов отмечено: 100% выживаемость животных, сохранение исходных значений массы и

температуры тела, отсутствие необратимых изменений внутренних органов и тканей.

Разработаны научно-методические основы применения стандартной биосистемы (микроорганизм – лабораторное животное) для оценки реактогенности вакцинных штаммов на тканевом и организменном уровнях с помощью компьютеризированных лазерных установок методами спекл-микроскопии и спекл-имиджинга. Впервые проведена оценка реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после фотодинамической инактивации в экспериментах на морских свинках когерентно-оптическими методами.

Показана неинвазивность использованных когерентно-оптических методов. Установлено, что фотоинактивированные клетки вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ при аппликации на брыжейку морской свинки приводят к выраженным, но обратимым изменениям скорости кровотока в сосудах. Изменений топологии церебральных сосудов в течение 40 мин после введения указанных бактерий не зарегистрировано.

В результате проведенных исследований с использованием регламентированных и когерентно-оптических методов доказана безопасность фотоинактивированных вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ на морских свинках.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные данные вносят существенный вклад в разделы фундаментальной микробиологии, связанные с пониманием механизмов инактивации бактериальных клеток при действии оптического излучения, а также имеют значение для прикладной микробиологии в аспекте разработки

методологических подходов повышения безопасности профилактических препаратов или против бактериальных инфекций.

Предложен новый способ инактивации бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, повышающий безопасность бруцеллезной и туляремийной вакцин. Создана и запатентована лабораторная установка для инактивации микроорганизмов методом фотодинамического воздействия (патент Российской Федерации на полезную модель. - № 77278, 2008 г.). Конструкция установки позволяет менять режимы фотоинактивации бактерий.

Построена статистическая модель влияния синглетного кислорода, образованного в ходе фотодинамического воздействия, на бактериальные клетки, с помощью которой впервые определена область эффективного воздействия синглетного кислорода на клеточную мембрану бактерий, близкую к диаметру клетки.

Разработаны математические модели взаимодействия взвесей бактерий *E. coli.*, *P. aeruginosa* разных штаммов, *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ с оптическим излучением и идентифицированы их параметры. С использованием компьютерного моделирования установлены наиболее эффективные условия фотодинамической инактивации бактерий и проведена верификация найденных условий в эксперименте.

Показана возможность использования стандартной биосистемы (микроорганизм – лабораторное животное), включенной в состав компьютеризированных лазерных установок, для оценки реактогенности бактерий *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ (до и после фотодинамической инактивации) на тканевом и организменном уровнях.

Материалы диссертации включены в Методические рекомендации по фотоинактивации бактерий в соавторстве с Ульяновым С.С., рекомендованные для студентов и аспирантов, при изучении микробиологии, биотехнологии, экологической токсикологии (Саратов, 2009).

Теоретические и практические результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, используются при чтении лекций по микробиологии студентам ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Личный вклад автора.

Автором самостоятельно проведен анализ литературных источников, теоретическое обоснование проблемы, постановка и решение основных задач исследования, систематизация, обобщение и интерпретация полученных результатов. Экспериментальные исследования проведены автором лично или в составе научных групп при выполнении НИР. Основные положения диссертации, новизна и практическая значимость сформулированы совместно с научным консультантом.

Характеристика работы.

Диссертационная работа построена по классической схеме и включает введение, пять глав, заключение, выводы и список литературы. Изложена работа на 289 страницах, содержит 15 таблиц, 111 рисунков. Список литературы включает 337 работ отечественных и зарубежных авторов и в полной мере отражает современное состояние изучаемой проблемы..

Актуальность проблемы, положения, выносимые на защиту, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы охарактеризованы автором во введении. Отражен личный вклад автора, заключающийся в самостоятельно проведенном анализе литературных источников, теоретическом обосновании проблемы,

постановке и решении основных задач исследования, систематизации, обобщении и интерпретации полученных результатов. Экспериментальные исследования проведены автором лично или в составе научных групп при выполнении НИР.

В обзоре литературы дана классификация вакцин против бактериальных инфекций. Подробно охарактеризовано современное состояние вакцинопрофилактики бруцеллеза, туляремии и чумы, а также представлен материал, посвященный способам повышения безопасности вакцин против этих инфекций. Приведены, используемые в настоящее время, методы оценки безопасности живых вакцин.

В работе Ульяновой О.В. удачно сочетаются классические методы прикладной микробиологии, биохимии, серологии с современными методами работы с лабораторными животными, а также используются методы математического моделирования и статистической обработки результатов.

Диссертационные исследования были проведены при финансовой поддержке 12 Российских и международных грантов, проектов, государственных контрактов.

Полученные автором диссертации результаты вносят существенный вклад в разделы фундаментальной микробиологии, связанные с пониманием механизмов инактивации бактериальных клеток при действии оптического излучения, а также имеют значение для прикладной микробиологии в аспекте разработки методологических подходов повышения безопасности профилактических препаратов.

Следует отметить, что основные положения и результаты исследований были представлены на Российских (Ульяновск, Санкт-Петербург, Саратов) и международных (Белоруссия, Украина, Китай, Индия, США, Германия) научных конференциях с 2004 по 2013 гг.



Автореферат и публикации соискателя полностью отражают наиболее существенные положения и выводы диссертации. По материалам диссертации опубликованы 69 работ, из них 25 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и 1 патент.

В целом диссертация изложена корректно, прочтение замечаний не вызывает, в тексте встречаются опечатки не влияющие на качество работы в целом.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая вышеизложенное, следует заключить, что диссертация Ульяновой Онеги Владимировны «Методология повышения безопасности бактериальных вакцин на модели вакцинных штаммов *Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ» научно-квалификационным трудом, выполненным самостоятельно. По актуальности, научной новизне, практической значимости, объему и методическому уровню проведенных исследований, 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 автор достоин присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВПО СПбГАВМ. Протокол №12 от 12 мая 2014 года.

Заведующий кафедрой микробиологии,  
вирусологии и иммунологии  
доктор биологических наук, профессор



А.А. Сухинин