

О Т З Ы В

официального оппонента 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», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Известно, что специфическую профилактику таких опасных зооантропонозных инфекций как бруцеллез, туляремия и чума в России и государствах СНГ уже более 60 лет проводят лицензированными живыми аттенуированными вакцинами из штаммов *Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Yersinia pestis* EV НИИЭГ. Применение этих вакцин привело к значительному снижению заболеваемости и смертности, особенно в послевоенные годы 20 столетия.

Но к настоящему времени накоплены данные, свидетельствующие о ряде недостатков применяемых живых вакцин. Так выявлены проявления реактогенности штаммов-продуцентов *B. abortus* 19 ВА и *Y. pestis* EV НИИЭГ. Зарегистрированы случаи возникновения поствакцинального бруцеллеза; в крови сельскохозяйственных животных после введения *B. abortus* 19 ВА определяют антитела в таком же титре, как и у больных, что, безусловно, затрудняет определение эпизоотического статуса животных по бруцеллезу. Случаи осложнений были отмечены при массовой вакцинации населения туляремийной вакциной В зарубежных странах живые вакцины не используют опасаясь реверсии вакцинных штаммов в вирулентную форму. Хотя следует отметить, что за длительный период использования живых вакцин против бруцеллеза, туляремии и чумы случаев реверсии зарегистрировано не было.

Необходимость проведения специфической профилактики социально-значимых инфекций сохраняется и в наши дни, что обусловлено длительным

существованием обширных природных очагов в РФ и сопредельных странах, наличием локальных эпизоотий, ростом заболеваемости в мире.

Таким образом, диссертация Ульяновой О.В. посвящена актуальной проблеме повышения безопасности живых вакцин против бруцеллеза, туляремии и чумы для возможности проведения массовых профилактических прививок населения и сельскохозяйственных животных.

Докторская диссертация О.В. Ульяновой представляет собой законченный научный труд объемом 289 страниц текста, построена по традиционному плану. Работа включает введение, обзор литературы, три главы собственных исследований, в которых представлены объекты, материалы и методы; полученные соискателем экспериментальные данные; заключение; выводы; список литературы, состоящий из 337 источников, в том числе, 192 – отечественных и 145 - зарубежных.

Научные положения обоснованы и полностью соответствуют результатам, полученным в диссертационной работе.

Во введении автором обоснована актуальность проблемы, сформулированы положения, выносимые на защиту, цель и задачи исследования, охарактеризованы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В литературном обзоре Ульянова О.В. представила классификацию вакцин против бактериальных инфекций. Соискатель подробно охарактеризовала современное состояние вакцинопрофилактики бруцеллеза, туляремии и чумы. Уделено большое внимание способам повышения безопасности вакцин против указанных инфекций, а также методам оценки безопасности живых вакцин.

Во второй главе содержится информация о штаммах бактерий (*E. coli* spp., *P. aeruginosa* spp., *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ), которые были использованы в модельных и основных экспериментах; методах определения жизнеспособности, культурально-морфологических и серологических свойств бактерий; методах оценки безо-

пасности вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА по определению остаточной вирулентности, безвредности и реактогенности; о лабораторных животных; об используемом оборудовании, реактивах и материалах; методах статистической обработки полученных результатов.

В третьей главе представлены результаты первого этапа исследований. Были охарактеризованы культурально-морфологические и тинкториальные свойства штаммов грамотрицательных бактерий *E. coli* В6, *E. coli* К12, *E. coli* О1, *P. aeruginosa* 27533, *P. aeruginosa* 27853, которые использовали в модельных экспериментах по инаktivации бактерий методом фотодинамического воздействия. Представлены результаты по разработке и созданию оригинальной лабораторной установки для проведения фотодинамической инаktivации бактерий. Дано аргументированное обоснование выбора фотосенсибилизатора метиленового синего и его концентрации 0,005 %; длины волны облучения (650 ± 10 нм) и источника излучения (световые диоды). Для проведения результативной фотодинамической инаktivации бактерий определена методом компьютерного моделирования область эффективного воздействия синглетного кислорода на клеточную мембрану бактерий, установлено, размеры которой составили порядка диаметра клетки. Создана математическая модель взаимодействия бактериальных клеток и излучения, проведена идентификация параметров ФДВ на бактерии *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp.; на основе математического моделирования и компьютерного эксперимента найдены коэффициенты, определяющие нелинейную модель взаимодействия света с клетками, и показана вероятность инаktivации всех клеток взвеси при длительности облучения более 40 мин. В эксперименте *in vitro* получены полностью инаktivированные клетки штаммов *E. coli* spp. методом ФДВ при облучении световыми диодами ($I = 1$ мВт/см²) в течение 60 мин взвесей, содержащих $1 \cdot 10^9$ м.к./мл, с добавлением фотосенсибилизатора МС в концентрации 0,005 %.

В четвертой главе приведена сравнительная характеристика культурально-морфологических, тинкториальных и биохимических свойств бакте-

рий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ до и после фотодинамической инактивации. Показано щадящее фотодинамическое воздействие на бактерии указанных вакцинных штаммов, при котором сохраняются антигены, определяемые коммерческими диагностикумами. С помощью полученных экспериментальных данных *in vitro* и математического моделирования проведена оптимизация основных параметров фотодинамического воздействия на бактерии штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ. При верификации найденных параметров получены полностью инактивированы клетки вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА (после 3 ч воздействия) и *F. tularensis* 15 НИИЭГ (после 6 ч воздействия).

В пятой главе представлены результаты изучения безопасности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после фотодинамической инактивации на морских свинках как традиционными методами, так и модифицированными когерентно-оптическими методами. Экспериментально доказаны безвредность, отсутствие остаточной вирулентности и снижение реактогенности фотоинактивированных вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 на морских свинках методами прижизненных наблюдений; а также по макроскопическим морфологическим показателям.

В заключении Онега Владимировна последовательно и логично изложила и обсудила основные результаты проведенных исследований, сформулировав их теоретическое и практическое значение.

Выводы сформулированы четко соответствуют положениям, выносимым на защиту, полностью отражают суть проведенных экспериментов, обоснованы достаточным фактическим материалом.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Исследования были проведены на современном методическом уровне с использованием общенаучных и специальных методов при поддержке 12 Российских и международных грантов, проектов, государственных контрактов. Основные

положения и результаты исследований были представлены с 2004 по 2013 гг. на Российских и международных научных конференциях.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые была 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 мВт/см^2 и концентрацией фотосенсибилизатора метиленового синего 0,005 %.

Установлена полная потеря жизнеспособности клеток *E. coli* В6, *E. coli* О1, *E. coli* К12 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.

Полученные в ходе диссертационного исследования данные вносят также 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.

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.

В автореферате и публикациях соискателем полностью отражены наиболее существенные положения и выводы диссертации.

В то же время следует отметить некоторые недочеты диссертации Ульяновой О.В. На мой взгляд, необходимо было представить действие других фотосенсибилизаторов на бактерии во время фотодинамического воздейст-

вия. Почему для проведения модельных экспериментов были выбраны именно штаммы *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp.?

Однако указанные недостатки не умаляют основные достоинства диссертационной работы Ульяновой О.В.

В целом, необходимо отметить высокий научно-методический уровень проведенных исследований, наглядность представленных в диссертации и автореферате таблиц и рисунков. Материалы диссертации отражены в 69 опубликованных работах, из которых 25 – в изданиях рекомендованных ВАК РФ и 1 патент.

Таким образом, по актуальности, научной новизне, практической значимости, объему и методическому уровню проведенных исследований, диссертация Ульяновой О.В. «Методология повышения безопасности бактериальных 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:
заведующая курсом микробиологии
кафедры общей и клинической фармакологии
с курсом микробиологии ФГБОУ ВПО
«Ульяновский государственный университет»

Доктор мед. наук, профессор



Н.И. Потатуркина-Нестерова

адрес: 432700, г. Ульяновск, ул. Н.Толстого, 42
тел.: 8 (8422) 32-70-71
e-mail: microprofi@gmail.com



вия. Почему для проведения модельных экспериментов были выбраны именно штаммы *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp.?

Однако указанные недостатки не умаляют основные достоинства диссертационной работы Ульяновой О.В.

В целом, необходимо отметить высокий научно-методический уровень проведенных исследований, наглядность представленных в диссертации и автореферате таблиц и рисунков. Материалы диссертации отражены в 69 опубликованных работах, из которых 25 – в изданиях рекомендованных ВАК РФ и 1 патент.

Таким образом, по актуальности, научной новизне, практической значимости, объему и методическому уровню проведенных исследований, диссертация Ульяновой О.В. «Методология повышения безопасности бактериальных 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:
заведующая курсом микробиологии
кафедры общей и клинической фармакологии
с курсом микробиологии ФГБОУ ВПО
«Ульяновский государственный университет»

Доктор мед. наук, профессор



Н.И. Потатуркина-Нестерова

адрес: 432700, г. Ульяновск, ул. Н.Толстого, 42
тел.: 8 (8422) 32-70-71
e-mail: microprofi@gmail.com

