

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Ульяновой Онеги Владимировны на тему:

«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 03.02.03 – микробиология.

Актуальность проблемы. В настоящее время специфическая профилактика таких зоонозов, как бруцеллез, туляремия и чума является актуальной, что обусловлено длительным существованием обширных природных очагов в РФ и сопредельных странах, наличием локальных эпизоотий, ростом заболеваемости в мире. Эти инфекции считаются социально значимыми, наносящими значительный экономический ущерб, который угрожает стабильности мирового сообщества (Олсуфьев, 1970; Руководство по профилактике чумы, 1992; Домарадский, 1993; Онищенко, 2001; Мещерякова и др. 2006, 2011; Скляр и др., 2008; Онищенко, Кутырев, 2009; Мировая статистика здравоохранения ВОЗ, 2010; Кутырев и др., 2011; Инфекционная заболеваемость в РФ, 2013; Лямкин и др., 2013; Попов и др., 2013; Levesque et al., 1995; Helvacı et al., 2000).

Кроме того, риск завоза и распространения инфекций связан с проведением массовых спортивных мероприятий, развитием культурных и экономических межгосударственных связей, миграционными процессами, нередко вызванными военными конфликтами. Следует учитывать также, что возбудителей бруцеллеза, туляремии и чумы рассматривают во всем мире как потенциальных агентов для создания биологического оружия. Однако не меньшую угрозу представляют антропогенная трансформация ландшафтов природных очагов; природные и техногенные катастрофы; изменение климата, разрушение скотомогильников и рост эпизоотий (Денисов, 1983; Дятлов, 2002; Домнин, 2004; Онищенко, 2010; Удовиков, 2010). Таким образом, для более широкого и массового проведения профилактических прививок населения и сельскохозяйственных животных необходимым считается повышение безопасности живых вакцин против бруцеллеза, туляремии и чумы (Руководство по профилактике чумы, 1992; Воробьев, 2002; Алексеев и др., 2003; Онищенко и др., 2007; Письмо ФС, 2007; Хайтов и др., 2007; Приказ ФС № 152, 2008; Удовиченко и др., 2013; Ales, Katial, 2004; Conlan, 2004; Gallagher-Smith et al., 2004; Corbel, Feodorova, 2011).

Степень разработанности проблемы. Для современных профилактических препаратов важна как иммуногенность, так и высокий уровень безопасности. Одним из современных способов влияния на микроорганизмы является метод фотодинамического воздействия (ФДВ). В литературе имеются данные об изменении популяционных характеристик и жизнеспособности бактерий после фотовоздействия (Кару и др., 1991; Страховская, 2010; Wilson et al., 1992; Ovchinnikov et al., 2000; Hablin, Hasan, 2004). Применение щадящей инактивации микроорганизмов *in vitro* методом ФДВ перспективно для обеспечения повышения безопасности разрабатываемых профилактических препаратов, особенно против таких инфекций, как бруцеллез, туляремия и чума.

Целью работы 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.

Девять задач в полной мере отражают все этапы работы и адекватны цели.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в использовании нового способа инактивации бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, повышающий безопасность бруцеллезной и туляреминой вакцин. Создана и запатентована лабораторная установка для инактивации микроорганизмов методом фотодинамического воздействия (патент Российской Федерации на полезную модель. - № 77278, 2008 г.).

Автором 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.

Онегой Владимировной 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.

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».

Апробация результатов исследований была проведена на форумах международного и российского уровня в период 2004-2013 гг., в частности, на Complex Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics II (USA, 2005); Optical Technologies in Biophysics and Medicine VI (Saratov, 2005); 7th International Conference on Correlation Optics, (Ukraine, 2006); Optical Technologies in Biophysics and Medicine VII, (Saratov, 2006); Complex Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics III (USA, 2006), 5th Annual Global Vaccine Congress (USA, 2011); 10th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting (USA, 2012); Saratov Fall Meeting 2012: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIV; and Laser Physics and Photonics XIV (Саратов, 2012); World Congress on Biotechnology, Leonia International Convention Centre (India, 2012); 5th congress of European microbiologists, FEMS (Germany, 2013); Harbor Asia Conference *Yersinia* 11: the 11th international /1 symposium on *Yersinia* (China, 2013); научных конференциях ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова» (Саратов, 2004–2013).

Работа выполнялась на кафедре микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», в ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»; в научной бактериологической лаборатории научно-исследовательской части ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» (при поддержке грантов РФФИ: 01-04-49023-а), в ГНУ Саратовском научно-исследовательском ветеринарном институте Россельхозакадемии (при поддержке проектов: ВП/ISTC # 3853. Живые бактериальные вакцины: сравнительный анализ иммунного ответа человека и биомоделей, совместно с Техасским Университетом, США, Университетом Чикаго и Национальным институтом биологических стандартов и контроля, Великобритания, 2008–2011; НИИ/ВТЕР/ISTC #3846. HDTRA 1-11-1-0032. Понимание человеческого иммунитета к чуме, совместно с университетом Техаса, Медицинское Отделение в г. Галвестон,

субконтракт No. 11-082, США, 2011–2015); и в ведущей лаборатории биомедицинской фотоники университета науки и технологий Министерства образования Китая, г. Ухань, провинция Хуажонг (при поддержке грантов РФФИ: 03-04-39021-ГФЕН а. Использование оптических спекл-полей в диагностике, лечении и профилактике заболеваний, 2003–2005; 06-04-39016-ГФЕНа. Методы спекл-имиджинга и их использование в исследованиях головного мозга, 2007–2008).

Структура и объем диссертации. Работа построена по традиционному плану и состоит из введения; обзора литературы; 4 глав собственных исследований, включающих описание объектов, материалов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, а также заключения, выводов, списка литературы. Диссертация изложена на 289 страницах, содержит 15 таблиц, 111 рисунков. Список литературы включает 337 работ.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 69 работ, из них 25 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и 1 патент.

Девять достоверных выводов в полной мере отражают большой объем проделанной работы, из них наиболее существенными являются:

- создание компактной лабораторной установки для инактивации бактерий методом фотодинамического воздействия, позволяющая изменять условия инактивации: концентрацию бактериальной взвеси, количество фотосенсибилизатора, источники излучения, плотность мощности излучения; длительность проведения фотодинамического воздействия для конкретных вакцинных штаммов; получать за один сеанс облучения в стерильных условиях бокса биологической безопасности препаративное количество (38,4 мл) бактериальной взвеси для дальнейших микробиологических, серологических и биологических исследований.
- экспериментально показана возможность проведения 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 созданной лабораторной установке. Доказано, что эффективная инактивация происходит при обработке бактериальных взвесей в концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./мл излучением световых диодов с длиной волны $\lambda = 650 \pm 10$ нм, плотностью мощности излучения 1 мВт/см² и концентрацией фотосенсибилизатора метиленового синего 0,005 %. Доказана полная потеря жизнеспособности клеток *E. coli* B6, *E. coli* O1, *E. coli* K12 при фотодинамическом воздействии в течение 60 мин, вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА - 180 мин и *F. tularensis* 15 НИИЭГ - 360 мин; при сохранении морфологических и тинкториальных свойств бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ и комплекса их антигенов, определяемых коммерческими диагностическими препаратами.
- Впервые определен размер области эффективного воздействия синглетного кислорода на клеточную мембрану бактерий с использованием компьютерного моделирования на основе разработанной теоретико-вероятностной модели воздействия синглетного кислорода на бактериальные клетки.
- Разработаны математические модели взаимодействия бактериальных взвесей разных штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ с оптическим излучением, проведена идентификация параметров предложенных моделей. В результате оптимизации определены наиболее эффективные условия фотодинамической инактивации. Проведена верификация найденных условий в *in vitro* эксперименте.

Единственным замечанием является необходимость выделять курсивом родовое и видовое название микроорганизмов, что автор не всегда делает.

В итоге диссертационная работа **Ульяновой Онеги Владимировны** на тему: "Методология повышения безопасности бактериальных вакцин на модели вакцинных штаммов *Brucella abortus* 19ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ " представляет собой самостоятельное научно-квалификационное, законченное исследование, которое по актуальности, объему и уровню работы, новизне, научной и практической значимости полученных результатов соответствует требованиям п. 9, 10 раздела II "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор **Ульянова Онега Владимировна** заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Заведующий лабораторией коллекционных штаммов
Государственной коллекции патогенных бактерий
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»,
доктор медицинских наук, старший научный сотрудник

Плотников О.П.

Адрес: 410005, Саратов, Университетская,46, тел. (8452) 515-213
E-mail: gusrapi@microbe.ru,
Сайт в интернете: <http://www.microbe.rospotrebnadzor.ru>

23.05.2014 г.

Подпись Плотникова О.П. заверяю –
Начальник отдела кадров ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
23.05.2014 г.



Бычков К.В.