



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
«ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ»  
(ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора)

400131, г.Волгоград, ул. Голубинская, 7. Тел.: (8442) 37-37-74. Факс: (8442) 39-33-36. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.  
<http://www.vnipchi.rosпотребнадзор.ru>. ОКПО 01898084, ОГРН 1023403458594, ИНН/КПП 3444051034/344401001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (г. Волгоград), доктор медицинских наук



А. В. Топорков

«          » марта 2016 г.

## ОТЗЫВ

ведущей организации ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (г. Волгоград) на диссертацию Коршенко Виктории Александровны «Антилактоферриновая активность холерных вибрионов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

**Актуальность темы.** Феномен выживания бактерий в макроорганизме (персистенции) рассматривается как одно из важных звеньев в патогенезе инфекционного процесса.

К настоящему времени оценена важная роль антилизосомной, антикомплементарной, антиинтерфероновой, антииммуноглобулиновой и некоторых других активностей в персистенции микроорганизмов.

Железосвязывающий белок лактоферрин является одним из факторов естественной резистентности организма млекопитающих, оказывая как бактериостатическое, так и бактерицидное действие на микроорганизмы (грамположительные и грамотрицательные бактерии, спирохеты, грибы, простейшие, вирусы). Описаны механизмы антимикробного действия

лактоферрина: способность конкурировать с микроорганизмами за ионы железа в среде (Masson P. L., Heremans J. F., 1966); взаимодействие с клеточной стенкой микроорганизмов, которое приводит к нарушению транспортной функции мембраны (Visca P. et al., 1990; Ellass-Rochard E. et al., 1995); протеолитическое расщепление факторов патогенности микроорганизмов (Qiu J. et al., 1998; Plaut A. G. et al., 2000; Hendrixson D. R. et al., 2003); образование активных производных - лактоферрицинов и лактоферрампина (Bellamy W. et al., 1992; van der Kraan M. I. et al., 2004); стимуляция фагоцитоза (Broxmeyer H. E. et al., 1990). В работах Вальшевой И.В., Вахитова Э.М. было показано возрастание уровня антилактоферриновой активности (АЛФА) у ряда патогенных и условно-патогенных микроорганизмов при хронической форме гнойно-воспалительных заболеваний и бактерионосительстве, по сравнению с острым течением, что позволяет рассматривать АЛФА как один из факторов персистенции.

Способность холерного вибриона связывать и гидролизовать лактоферрин установлена довольно давно (Finkelstein R. et al., 1983, Ascencio F. et al., 1992). Однако, роль антилактоферриновой активности в патогенезе холеры и персистенции холерных вибрионов в организме человека остается до настоящего времени малоизученной. Актуальность настоящей диссертации, касающейся вопросов изучения антилактоферриновой активности у холерных вибрионов эпидемически значимых серогрупп и оценки роли этого фактора в патогенезе холеры и персистенции холерных вибрионов, не вызывает сомнения.

**Характеристика диссертационной работы.** Диссертационная работа Коршенко В.А. построена по традиционному плану и состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, трех глав результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, а также списка литературы. Диссертационная работа изложена на 145 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 17 рисунками и 22 таблицами.

Библиография включает 273 источника, из которых 132 работы отечественных и 141 – зарубежных авторов.

В разделе «Введение» автор рассматривает актуальность проблемы и обосновывает цель диссертационной работы, которая заключалась в изучении антилактоферриновой активности холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, оценке роли этого фактора в патогенезе холеры и персистенции холерных вибрионов, формирования представления о механизме антилактоферриновой активности у возбудителя холеры.

Четко сформулированы задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, определена теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

Обзор литературы состоит из двух разделов, содержание которых соответствует теме диссертационной работы. В первом из них автор приводит данные литературы о роли лактоферрина в защитной системе макроорганизма: описаны механизмы антибактериального действия лактоферрина, зависящие и не зависящие от способности белка связывать ионы железа. Во втором – дана общая характеристика известных механизмов адаптации микроорганизмов к защитным факторам хозяина. Более детально рассмотрены данные, касающиеся антилактоферриновой активности как фактора персистенции бактерий. Хотелось бы отметить несколько непоследовательное представление автора о приоритете открытия антилактоферриновой активности. На стр. 28 автор ссылается по этому поводу на работу И.В. Сычевой и А.В. Вальшева 2001 года, а в следующем абзаце приводятся более ранние данные зарубежных авторов о проявлении антилактоферриновой активности у бактерий.

Коршенко В.А. провела достаточно глубокий анализ современных отечественных и зарубежных источников по исследуемой проблеме и, завершая обзор литературы, автор приходит к обоснованному заключению относительно актуальности и перспективности изучения роли АЛФА как маркера персистенции холерного вибриона.

Методы, использованные в работе, адекватны поставленным задачам. Глава «Материалы и методы» дает полное представление о широком диапазоне использованных методик и создает целостность в восприятии методической основы работы. Однако, на наш взгляд, излишне подробно перечислены использованное оборудование и расходные материалы.

В главах, отражающих результаты собственных исследований, отражен большой объем работы, выполненный Коршенко В.А., и продемонстрировано владение автором широким набором современных методов исследования. Автор активно обсуждает полученные ею результаты, сопоставляя с данными других исследователей, и формулирует гипотезы, позволяющие объяснить описанные эффекты.

Выводы обоснованы, полностью соответствуют поставленным задачам и отражают содержание проведенного исследования.

**Новизна исследования и полученных результатов.** В представленной диссертационной работе автором впервые показано наличие отличающихся уровней антилактоферриновой активности у холерных вибрионов различных биоваров и серогрупп. Выявлены достоверные различия в уровнях АЛФА у *Vibrio cholerae* El Tor, *Vibrio cholerae* O139 и *Vibrio cholerae* classical.

Впервые установлено наличие прямой корреляционной связи АЛФА с такими признаками персистенции, как антикомплементарная активность и билирезистентность, и отсутствие таковой с антилизоцимной и РНК-азной активностями.

Доказано участие в механизме АЛФА углеводных лектиновых рецепторов как связующего звена между лактоферрином и клетками холерного вибриона.

Разработан метод оценки уровня адгезии холерных вибрионов на модели культур клеток аденакарциномы двенадцатиперстной кишки человека NuTu 80, с применением которого дана количественная оценка адгезивной активности холерных вибрионов и доказана ее прямая коррелятивная связь с АЛФА.

Достоверность научных положений и обоснованность выводов диссертации обеспечивается правильностью постановки цели, задач исследования путей их реализации, выбором методологии и методов исследования, достаточным объемом выполненной работы, ее комплексным характером, адекватным использованием статистических методов обработки и интерпретации результатов.

**Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.** В Государственной коллекции патогенных бактерий (ГКПБ) ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора» депонирован авторский штамм *Vibrio cholerae* P-18775, обладающий высокой антикомплементарной и антилактоферриновой активностью (присвоен номер ГКПБ КМ275). Подана заявка на изобретение №2014149782, приоритет 09.12.2014 г.

По результатам исследований разработаны разделы в методических рекомендациях «Методики создания условий стресса для холерных вибрионов при изучении персистентного потенциала возбудителя холеры» и «Изучение свойств, обуславливающих персистенцию холерных вибрионов» (утверждены директором института 04.12.2014г. протокол №12 и 20.11.2009 г., протокол №10)

Результаты исследований по определению уровня адгезии микроорганизмов используются в Ростовском Государственном Медицинском Университете на кафедре микробиологии при чтении лекций, проведении практических занятий (акт о внедрении от 07.10.2015 г.).

Модифицирована методика определения антилактоферриновой активности холерных вибрионов, которая согласована с комиссией по контролю соблюдения требований биологической безопасности (протокол №13 от 10 декабря 2014г.).

**Замечания к диссертационной работе.**

1. В разделе «Введение» на с. 4 автор, описывая особенности седьмой пандемии холеры, дает некорректную ссылку [107] - Самохина Л.С. Противодисбактериозное действие композиции гидролизатов  $\alpha$ -лактальбумина и лактоферрина.

2. В представленном на отзыв переплетенном варианте диссертации отсутствует страница 14.

3. На наш взгляд, в научной работе следует избегать профессионального слэнга: «взвесь микроорганизмов густотой 1 млрд. м.к./мл» - стр. 41 и в других местах, «оставляли на контакт 18-24 часа» - стр.42 и т.п.

4. Вольность формулировок, допускаемых автором в тексте, в ряде случаев приводит к искажению смысла текста: «Так, по сравнению с другими энтеробактериями, у возбудителя холеры Эль Тор наблюдается также более высокая антилизоцимная и супероксиддисмутазная активности» (стр.65) – *V. cholerae* не относится к энтеробактериям! «При определении уровня антилактоферриновой активности в том же опыте с заражением кроликов-сосунков были получены интересные результаты, свидетельствующие, с одной стороны, о возможном участии этого фактора в развитии заболевания, с другой – о его роли в персистенции возбудителя в макроорганизме. Как и при других кишечных инфекциях у людей [40] при экспериментальной холере в острой фазе заболевания показания АЛФА у эпидемически опасного (ctxAB+tcpA+) штамма снизились (с 75 до 40 нг/мл).» - стр.67 (выделено нами).

5. Рисунок 9 (стр. 78) - подпись под рисунком «Снижение показателей АЛФА после контакта с углеводами (в %))» соответствует результатам, изложенным в тексте, а на самом рисунке заголовок «Уровень АЛФА у штаммов холерных вибрионов в процентном соотношении» кардинально меняет смысл представленной диаграммы.

6. В разделе «4.2 Роль гемагглютинин/протеазы в антилактоферриновой активности» не совсем корректно интерпретированы

данные, представленные на рис. 10: на линиях «б» и «в» присутствуют остатки нативной формы белка, а два крупных фрагмента, образовавшихся в результате протеолиза, о которых говорит автор, имеют меньшие размеры и, по-видимому, находятся в нижней (отсутствующей на рисунке) части электрофореграммы. Далее, в описании эксперимента по изучению АЛФА у *E.coli*, на наш взгляд, целесообразно было дать более подробную характеристику использованных штаммов: по контексту можно предположить, что один из исследованных штаммов содержит векторную плазмиду pQE30, а второй – рекомбинантную рНР61, с клонированным в составе вектора pQE30 геном *hapA* (холерного вибриона?). Однако, в тексте такой информации нет, что делает непонятным принцип выбора *E.coli* (pQE30) в качестве штамма сравнения.

7. Название раздела 4.3. «Исследование генов протеаз холерных вибрионов для установления их роли в АЛФА», на наш взгляд неудачное, т.к. фактически был проведен скрининг изучаемых штаммов на наличие последовательностей генов ряда протеаз, что соответствует поставленной задаче 8, а собственно исследование указанных генов и не входило в задачи данной работы.

8. В автореферате и диссертации указано разное количество статей, опубликованных автором в журналах, входящих в перечень ВАК.

Отмеченные в ходе рецензирования отдельные недостатки и замечания не являются принципиальными и носят, в основном, редакторский характер.

Автореферат Коршенко В.А. соответствует основным положениям диссертации и адекватно отражает ее содержание. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденного ВАК. Результаты, полученные в работе, были представлены на ряде научных и научно-практических конференций.

Таким образом, диссертация Коршенко Виктории Александровны «Антилактоферриновая активность холерных вибрионов» является

завершенной научно-квалификационной работой, в которой изучена роль антилактоферриновой активности в персистенции штаммов *V. cholerae*, относящихся к разным биоварам и серогруппам с разной степенью эпидемической значимости. По глубине содержания, новизне и научно-практической значимости работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней и присвоения ученых званий» (Постановление Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв обсужден на межлабораторной научной конференции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, протокол № 1 от 03.03.2016 г.

Заместитель директора ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора по научно-экспериментальной работе, доктор биологических наук, доцент  
400131, г.Волгоград, ул. Голубинская, 7. Тел 8(8442)373774, факс 8(8442)393336 E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

  
Дмитрий  
Викторович  
Викторов

Заведующий лабораторией геномики и протеомики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, кандидат биологических наук, доцент  
400131, г.Волгоград, ул. Голубинская, 7. Тел 8(8442)373774, факс 8(8442)393336 E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

  
Ирина Борисовна  
Захарова

Подписи Викторова Д.В и Захаровой И. Б.  
заверяю

Ученый секретарь ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора



  
Ирина Игоревна  
Корсакова