

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Журавлевой Марии Спартаковны на тему «Количественная характеристика показателей иммунного ответа у кур на различные типы антигенов», представленную к защите в Диссертационный совет Д 006.033.01 при ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р.Коваленко» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Диссертационная работа М.С. Журавлевой посвящена оптимизации количественных и функциональных методов оценки иммунного статуса кур, изучению динамики и направленности иммунного ответа на модельные Т-зависимые (ТЗ), Т-независимые (ТН) антигены, а также на мукозальную живую вирусную вакцину против инфекционного бронхита кур (ИБК). Изучено влияние метаболитов патогенных бактерий и микроскопических грибов на функциональную активность иммунной системы кур.

Актуальность темы диссертационной работы состоит в исследовании иммунной системы кур, стоящих в эволюционном ряду несколько ниже млекопитающих, но обладающих во многом гомологичной иммунной системой. Это научное направление определяется не только интересом к фундаментальным законам эволюции иммунитета, но и задачами прикладной иммунобиотехнологии. С целью совершенствования иммунопрофилактических и иммунотерапевтических препаратов для птицеводства необходимы стандартизированные методы всестороннего контроля как гуморального, так и клеточного, как врожденного так и адаптивного иммунного ответа птиц. Кроме того, при конструировании вакцинных препаратов необходимо учитывать особенности иммунного ответа на ТЗ и ТН антигены, входящие в состав этих иммуномодулирующих препаратов и принадлежащие патогенам, их взаимное влияние на иммуногенность друг друга.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Основные положения и выводы диссертации получены в результате методически корректно организованных экспериментов по индукции иммунного ответа на различные типы антигенов при различных методах введения, по оценке

Вх. № 22
26 января 2015 г.

поствакцинального иммунитета птиц с применением хорошо зарекомендовавших себя классических и современных методов оценки лейкоцитарной формулы, фагоцитарной активности лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов, определения субпопуляций лимфоцитов в первичных и вторичных органах иммунной системы, метод количественной оценки иммуноглобулинов.

С целью характеристики гуморального адаптивного иммунитета птиц оптимизирован метод выделения и очистки из различных биологических источников уникального для кур IgY, изучены его биологические свойства, получена моноспецифическая анти-IgY-сыворотка. Для оценки влияния метаболитов микроорганизмов на функциональную активность иммунной системы использованы нагрузочные тесты. Все исследования проведены на общем количестве объектов 400 голов. Результаты диссертационной работы подвергнуты статистической обработке, обобщены, проанализированы, сформулированы объективные выводы, не вызывающие сомнения.

Достоверность и новизна научных исследований, выводов и рекомендаций. Достоверность полученных результатов диссертационной работы подтверждаются большим объемом работы, всесторонними методами исследования иммунной системы птиц и методически верно организованными экспериментами.

Научная новизна диссертационной работы состоит в детальном исследовании роли эффекторных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета птиц в процессе формирования иммунного ответа на модельные ТЗ, ТН антигены и антигены живой вирусной вакцины против ИБК.

Наряду с обнаружением гомологии закономерностей развития иммунного ответа у птиц по сравнению с млекопитающими на различные типы антигенов при различных способах их введения, автору работы удалось получить новые научные данные, касающиеся ТН антигенов.

Считается, что в настоящее время полностью не раскрыты молекулярные механизмы и закономерности развития иммунного ответа на ТН антигены, большинство которых составляют структуру бактериальных клеток.

Автор диссертационной работы установила, что тимус независимость ответа не является абсолютной. В пользу этого говорят несколько фактов. Считается, что при иммунном ответе на ТН антигены 2 типа (поливинилпирролидон) образуются только IgM-антитела, однако в работе

показано, что имеет место переключение изотипа антител на IgY. Возможно участие в механизме переключения дендритных клеток, натуральных киллеров, Т-рег или макрофагов, секретирующих различные цитокины: ИФ гамма, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-8. Активность последних, особенно при повторном введении антигена, убедительно показана в диссертации.

Отсутствие эффективного вторичногоантительного и клеточного иммунного ответов подтверждает известный для млекопитающих фактотсутствия формирования клеток памяти в результате ТН ответа.

Неспособность ТН антигенов презентироваться в составе иммунного комплекса с МНС-II обуславливает отсутствие Т-клеточной помощи. Однако, автор диссертации зафиксировала пролиферацию Т-л в первичных и вторичных органах иммунной системы, что косвенно говорит об участии их в иммуногенезе.

В диссертации получены новые данные в отношении иммунного ответа на живую вирусную вакцину против ИБК. Доказана активация системного иммунитета птиц с поляризацией в сторону клеточного иммунного ответа. Эффективность гуморального адаптивного ответа при вторичном введении не возрастала.

Новизна диссертации заключается и в оптимизации метода выделения и очистки IgYиз сыворотки крови кур и желтка куриного яйца, получение моноспецифической антисыворотки к нему и отработки метода количественного определения этого изотипа иммуноглобулина в сыворотке крови кур.

Впервые в результате применения нагрузочных тестов продемонстрировано иммуносупрессорное действие метаболитов патогенных грибов рода *Candida*, *Trichophyton*, *Microsporum*, а также бактерий рода *Salmonella* в отношении фагоцитов, Т-л и IgY. В процессе вторичного иммуногенеза фиксировалась стимуляция адгезивной активности Т-л под влиянием всех типов метаболитов.

Достоверность и научная новизна полученных результатов диссертационной работы, выполненной Журавлевой М.С., подтверждается большим объемом исследований с использованием биохимических, гематологических, иммунологических, бактериологических и статистических методов. Исследования проведены на современном уровне и соответствуют цели и поставленным задачам.

Диссертация и автореферат соответствуют критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней». Диссертационная работа соответствует формуле специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (ветеринарные науки).

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, репрезентативность эмпирического материала. Журавлева М.С. является основным исполнителем на всех этапах проведенных исследований. Участие соавторов отражено в совместно изданных научных статьях. Диссертантка провела всесторонний научный поиск и вникла в суть проблемы, обосновала актуальность темы диссертации, освоила необходимые методы исследования, получила новые результаты, обработала статистически, обобщила, проанализировала, сделала выводы и практические предложения, которые изложила в диссертации.

Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенность. Диссертационная работа изложена на 174 страницах компьютерного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы и практические предложения, список литературы и приложение. Материалы диссертации иллюстрированы 24 таблицами и 36 рисунками. Список литературы включает 228 источников, из них 67 зарубежных авторов.

В качестве объектов исследования диссертантка использовала цыплят яичного кросса «Хайсекс Браун» в количестве 400 голов. Методы исследования разнообразны, современны и адекватны поставленным задачам.

Раздел «Обзор литературы» содержит подробное сравнительное описание особенностей структуры и функций иммунной системы птиц и млекопитающих, которые необходимо учитывать при конструировании современных, научно обоснованных, обладающих высокими протективными свойствами вакцин. Задача автора осложнялась немногочисленными литературными данными по этому вопросу. Убедительно обосновывается ведущая роль IgY как основного иммуноглобулина сыворотки крови птиц. Он имеет сходство с IgG млекопитающих, продуцируется после IgM при первичном контакте с антигеном и является главным изотипом при вторичном иммунном ответе. Подчеркнуто его содержание в желтке куриного яйца, куда он передается из сыворотки крови матерей, затем из яичного желтка в кровотоки эмбриона и вылупившегося птенца. Таким

образом автор обосновывает цель, источники и способы выделения и очистки именно этого изотипа антител с целью оценки специфического иммунитета птиц.

Автором получены иммунохимически чистые препараты IgY из сыворотки крови и желтка куриных яиц при использовании 3-х кратного осаждения сульфатом аммония, гель-фильтрации на SephacrylS-500 и ионообменной хроматографии на DEAE-SepharoseCL-6B. Иммуноэлектрофорезом и электрофорезом в ПААГе с ДСН определена высокая степень чистоты препаратов. Получена моноспецифическая антисыворотка к сывороточному IgY, т.к. продемонстрирована идентичность очищенных препаратов из сыворотки крови и желтка.

С целью оценки поствакцинального антительного ответа кур была отработана реакция простой радиальной иммунодиффузии по Манчини. Установлена концентрация IgY в референтной сыворотке крови кур – 3,2 мг/мл, что вполне согласуется с литературными данными.

В разделе по изучению ТЗ иммунного ответа при внутрибрюшинной иммунизации эритроцитами барана зафиксирована активация в 1 сутки иммуногенеза клеточных факторов врожденного иммунитета – псевдоэозинофилов, моноцитов и перитонеальных макрофагов, как профессиональных АПК. Несколько позже, начиная с 3 суток, обнаружена активация адаптивного иммунитета, а именно увеличение СД4 Т-л во вторичных органах иммунной системы, СД8 Т-л в тимусе, В-л достоверно увеличивались во всех исследованных органах птиц. Как следствие – достоверное повышение содержания IgY в сыворотке крови на 3 сутки исследования.

Зафиксированная динамика иммунного ответа соответствует индуцибельной, регуляторной и эффекторной стадиям развития иммунного ответа, свойственные млекопитающим.

Эффективность вторичного ответа заключалась в функционировании активированных фагоцитов и более раннем появлении IgY в сыворотке крови.

При рассмотрении динамики количественных показателей ТН первичного иммунного ответа на поливинилпирролидон установлена активация фагоцитов крови и в меньшей степени перитонеальных макрофагов уже в первые сутки ответа. В это же время активируется СД8Т- и В-лимфоцитарный иммунитет во всех органах иммунной системы. Несмотря

образом автор обосновывает цель, источники и способы выделения и очистки именно этого изотипа антител с целью оценки специфического иммунитета птиц.

Автором получены иммунохимически чистые препараты IgY из сыворотки крови и желтка куриных яиц при использовании 3-х кратного осаждения сульфатом аммония, гель-фильтрации на SephacrylS-500 и ионообменной хроматографии на DEAE-SepharoseCL-6B. Иммуноэлектрофорезом и электрофорезом в ПААГе с ДСН определена высокая степень чистоты препаратов. Получена моноспецифическая антисыворотка к сывороточному IgY, т.к. продемонстрирована идентичность очищенных препаратов из сыворотки крови и желтка.

С целью оценки поствакцинального антительного ответа кур была отработана реакция простой радиальной иммунодиффузии по Манчини. Установлена концентрация IgY в референтной сыворотке крови кур – 3,2 мг/мл, что вполне согласуется с литературными данными.

В разделе по изучению ТЗ иммунного ответа при внутрибрюшинной иммунизации эритроцитами барана зафиксирована активация в 1 сутки иммуногенеза клеточных факторов врожденного иммунитета – псевдоэозинофилов, моноцитов и перитонеальных макрофагов, как профессиональных АПК. Несколько позже, начиная с 3 суток, обнаружена активация адаптивного иммунитета, а именно увеличение CD4 Т-л во вторичных органах иммунной системы, CD8 Т-л в тимусе, В-л достоверно увеличивались во всех исследованных органах птиц. Как следствие – достоверное повышение содержания IgY в сыворотке крови на 3 сутки исследования.

Зафиксированная динамика иммунного ответа соответствует индуцибельной, регуляторной и эффекторной стадиям развития иммунного ответа, свойственные млекопитающим.

Эффективность вторичного ответа заключалась в функционировании активированных фагоцитов и более раннем появлении IgY в сыворотке крови.

При рассмотрении динамики количественных показателей ТН первичного иммунного ответа на поливинилпирролидон установлена активация фагоцитов крови и в меньшей степени перитонеальных макрофагов уже в первые сутки ответа. В это же время активируется CD8Т- и В-лимфоцитарный иммунитет во всех органах иммунной системы. Несмотря

Диссертационную работу Журавлевой М.С. оцениваю положительно, вместе с тем при рассмотрении работы возникли некоторые вопросы.

1. В чем состоит оптимизация методов выделения и очистки IgY из сыворотки крови кур и желтка куриного яйца? Какие методы брали за основу?

2. Были ли адаптированы известные методы количественной оценки Т-ли В-л млекопитающих в реакциях розеткообразования для птиц, если была, то в чем состоит эта адаптация?

3. Чем обосновывается выбор методов введения антигенов?

Однако данные вопросы и замечания не снижают высокой ценности работы.

Заключение.

Диссертационная работа Журавлевой М.С. «Количественная характеристика показателей иммунного ответа у кур на различные типы антигенов» является самостоятельно выполненной работой, имеющей существенное научное и практическое значение.

По актуальности избранной темы, объему выполненных работ, научной и практической значимости диссертация отвечает требованиям «Положения ВАК Минобрнауки РФ», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Журавлева Мария Спартаковна заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02-ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент, профессор кафедры иммунологии и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина», кандидат ветеринарных наук, доцент

В.Е.Брылина

