

**ОТЗЫВ  
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертационную работу Стрельцовой Яны Борисовны «Патогенетическая характеристика и идентификация иммунокомпетентных клеток в органах свиней при спонтанном инфицировании цирковирусом второго типа», представленную к защите в диссертационном совете 24.1.249.01 на базе ФГБНУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных

**Актуальность темы.** Цирковирусная инфекция свиней распространена во многих странах мира, вызывает значительный экономический ущерб, который обусловлен высокой заболеваемостью, снижением продуктивности, репродуктивных качеств животных и смертностью.

Несмотря на наличие множества исследований, ориентированных на изучение цирковирусной болезни свиней (ЦВБС), особенности патогенеза и иммунного ответа, к данному моменту, не изучены полностью. Так, много споров вызывает внедрение вируса и диссеминация его в организме, а также регуляция апоптоза клеток иммунной системы вирусными белками и многое другое. Хотя и известно, что макрофаги и дендритные клетки (ДК) после интернализации цирковируса свиней 2 типа (ЦВС-2), могут сохранять его в себе без репликации и дезорганизации, способствуя его доставке в органы животного, остается не ясным, какой механизм помогает вирусу скрываться в данных клетках от иммунных атак организма.

Зарубежными учеными доказано, что иммуногистохимическое исследование, является золотым стандартом для подтверждения ЦВБС. Применение данного метода способствует решению проблем, связанных с дифференциальной диагностикой, а также определением связи ЦВС-2 с патологическими изменениями в организме инфицированных свиней. Кроме этого, для изучения вопросов иммунитета при ЦВБС и других инфекционных болезнях, в США, Европе и Азии активно развивается разработка и создание высокоспецифичных моноклональных антител (МАТ) к антигенным маркерам иммунокомпетентных клеток свиней, что позволяет повышать уровень фундаментальных иммунологических исследований в области ветеринарии. Более того, было проведено изучение перекрестной реактивности между антителами к CD маркерам лимфоцитов и макрофагов человека и свиньи, что позволило использовать гетерологичные реагенты для детального изучения иммунного ответа при ЦВБС. В нашей стране, практически отсутствуют данные об использовании иммуногистохимических исследований (ИГХИ) для диагностики цирковиральной инфекции. В единственной публикации отечественного исследователя описан опыт применения ИГХИ на срезах лимфатических узлов свиней с признаками синдрома послеотъемного мультисистемного истощения (СПМИ) для изучения распределения лимфоцитов в структурах органов, используя зарубежный протокол исследования.

Учитывая вышеизложенное, для РФ является актуальной разработка ИГХИ с целью выявления антигена ЦВС-2 в тканях свиней, в качестве метода диагностики ЦВБС, для выявления бессимптомных носителей, а также изучения патогенеза цирковиральной инфекции. Аналогичная ситуация обстоит с идентификацией лимфоцитов в органах свиней. Разработка отечественного метода ИГХИ, актуальна, поскольку позволит определить фенотип иммунокомпетентных клеток и их количество в гистологических срезах органов-мишеней, что способствует углубленному изучению иммунного ответа и расширению знаний о патогенезе ЦВБС.

Исходя из вышеизложенного, актуальным, при изучении ЦВБС, является выявление связи между патологическими изменениями, присутствием антигена ЦВС-2 и количеством основных популяций иммунокомпетентных клеток в органах мишенях инфицированных свиней, используя прямой и непрямой методы иммуногистохимического исследования, что и стало целью диссертационной работы Стрельцовой Яны Борисовны.

**Научная новизна диссертационной работы.** Впервые в РФ разработан прямой метод ИГХИ на основе отечественных МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2, который позволяет выявлять антиген вируса в органах инфицированных свиней. Впервые в РФ разработан непрямой метод ИГХИ на основе отечественных МАТ мыши к маркерам CD3, CD4, CD8, CD20, CD14 иммунокомпетентных клеток человека в срезах органов свиней. Выполнен сравнительный подсчет основных популяций лимфоцитов и макрофагов в бронхиальных лимфатических узлах и легких интактных и инфицированных ЦВС-2 поросят-отъемышей. Установлено, что органами-мишенями для ЦВС-2 являются бронхиальные, паховые лимфатические узлы и легкие инфицированных свиней, так как в макрофагах, Т- и В-лимфоцитах данных органов локализуется антиген вируса. Определено, что ЦВС-2 оказывает супрессивное действие на исследованные популяции клеток в бронхиальных лимфатических узлах поросят-отъемышей с признаками СПМИ. В легких от этих же поросят супрессии подверглись только макрофаги и В-лимфоциты, при этом численность Т-лимфоцитов была повышена, что указывает на стимуляцию локального Т-клеточного иммунного ответа. Установлено, что гибель и снижение количества иммунокомпетентных клеток в тканях опосредует развитие лимфоидного истощения, что является основной патогенетической характеристикой ЦВБС.

**Значимость для науки и производства полученных автором результатов.**

Разработанный диссертантом прямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2 для выявления локализации антигена вируса в органах свиней, может быть использован в ветеринарных

лабораториях при проведении диагностики ЦВБС и для дифференциальной диагностики схожих по клинической картине заболеваний. Данный метод позволяет обнаружить антиген цирковируса свиней 2 типа на мембране и в цитоплазме клеток, а также сопоставить патологические изменения и локализацию антигена вируса в органах инфицированных свиней, что необходимо для научной практики специалистов патоморфологов.

Разработаны, утверждены и опубликованы методические указания «Иммуногистохимическая диагностика цирковирусной болезни свиней 2 типа», которые утверждены секцией зоотехнии и ветеринарии отделения сельскохозяйственных наук РАН. Данные указания созданы для ветеринарных диагностических лабораторий.

Разработан непрямой метод ИГХИ на основе перекрестно-реагирующих МАТ мыши к CD маркерам иммунокомпетентных клеток человека, который позволяет идентифицировать и подсчитать лимфоциты и макрофаги в органах, а также может быть необходимым для исследования особенностей иммунного ответа при инфекционных болезнях свиней.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность.**

Представленные в диссертационной работе научные положения обоснованы и согласуются с общепринятыми в этой области знаниями, описанными в рецензируемых изданиях. Экспериментальные данные, выводы, рекомендации основаны на общепринятых теоретических закономерностях, не противоречат и согласуются с известными концепциями в данной области исследований.

Достоверность и обоснованность научных результатов и выводов, полученных диссертантом, основываются на согласованности данных эксперимента и научных выводов.

Достоверность экспериментальных данных обеспечивается применением современных патологоанатомических, гистологических, иммуногистохимических, серологических, молекулярно-генетических

методов исследования, выполненных на оборудовании с высоким классом точности, корректным применением статистических методов обработки экспериментальных данных. Научные положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации обоснованы, апробированы и одобрены широким обсуждением на международных научно-практических конференциях, поэтому их достоверность также не вызывает сомнений.

### **Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.**

Разработанный диссертантом прямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2 для выявления локализации АГ вируса в органах свиней, способствует расширению потенциального применения ИГХИ для мониторинга ЦВБС в свиноводческих хозяйствах РФ. Данным методом можно осуществлять контроль эффективности разрабатываемых вакцин, так как позволяет определить диссеминацию вируса в органах и тканях, а также элиминацию его из организма, что является важным критерием для оценки иммунобиологических препаратов. Разработанный диссертантом непрямой метод ИГХИ на основе перекрестно-реагирующих МАТ к CD маркерам иммунокомпетентных клеток человека для определения основных популяций лимфоцитов и макрофагов в органах свиней, может способствовать изучению особенностей иммунного ответа при других инфекционных болезнях свиней. Разработанный Стрельцовой Я.Б. метод идентификации лимфоцитов можно применять для изучения как пред-, так и поствакцинального иммунитета при разработке вакцин.

### **Степень завершения диссертационной работы и качество её оформления.**

Диссертационная работа Стрельцовой Яны Борисовны представляет собой полностью законченное исследование по указанной теме, выполненное на высоком методическом уровне с использованием современных методов анализа. Диссертация хорошо оформлена, грамотно написана, логично построена.

## **Общая оценка содержания диссертации.**

Во введении диссертант обосновывает выбор темы и её актуальность, определяет цель и задачи работы, формулирует её научную новизну и практическую значимость.

В разделе «Обзор литературы» дана таксономия, патогенез и характеристика цирковируса, представлены эпизоотологические данные, клинические признаки и патологоанатомические изменения при цирковиральной болезни свиней, обобщены особенности смешанных и вторичных инфекций с участием цирковируса свиней второго типа. В отдельных разделах подробно описаны особенности иммунного ответа при цирковиральной болезни свиней, её лабораторная диагностика и иммунопрофилактика.

Приведённый обзор отражает настоящее состояние вопроса, автор анализирует материал литературы и обосновывает необходимость проведения настоящей работы.

В разделе «Материалы и методы» представлены реактивы и растворы, питательные среды, оборудование, расходные материалы и методы работы.

В разделе «Результаты собственных исследований» представлены итоги исследований по лабораторной диагностике цирковиральной инфекции в исследуемых свиноводческих хозяйствах, характеристике патологоанатомических изменений в органах при спонтанной цирковиральной инфекции и гистологических изменений в органах при естественном инфицировании цирковирусом свиней второго типа.

В результате выполненной работы Стрельцовой Я.Б. были разработаны: прямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши 6h12 для выявления АГ ЦВС-2 в нативных гистологических срезах согласно оригинальному протоколу и непрямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши к CD маркерам иммунокомпетентных клеток человека для идентификации лимфоцитов и макрофагов в нативных гистологических срезах органов свиней.

В разделе «Заключение» соискатель обобщил основные результаты исследований по изучаемым вопросам.

В приложении представлены документы, утвержденные в установленном порядке.

Работа завершается 8 выводами, которые логически вытекают из результатов выполненной работы, и практическими предложениями.

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 1 патент № 2695330 от 23.06.2019 «Способ диагностики цирковирусной инфекции свиней второго типа прямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител», 1 методическое указание «Имуногистохимическая диагностика цирковирусной болезни свиней 2 типа», 6 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и 1 - в издании, индексируемом в Scopus.

#### **Замечания по диссертационной работе**

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы нет.

В процессе ознакомления с диссертационной работой к соискателю возникли следующие вопросы:

1. В выводе 2 вы связываете обнаруженные патологические и гистологические изменения с деятельностью ЦВС-2, при этом в литературном обзоре приведены сведения о том, что цирковирусная болезнь свиней зачастую протекает как смешанная инфекция в ассоциации с другими патогенами свиней. В диссертации отсутствуют данные об исследовании животных на наличие других патогенов, схожих по клинической картине инфекций, как вы определили, что данные изменения в организме вызваны именно ЦВС-2?
2. В выводе 7 указано, что в гистологических срезах легких от инфицированных ЦВС-2 поросят отъемышей выявлено повышение количества CD3 Т-лимфоцитов, включая CD4 Т-хелперы и CD8 цитотоксические Т-лимфоциты, по сравнению с показателями интактных

особей, что связано с локальной активацией Т-клеточного иммунного ответа. Какие причины могут вызвать такую реакцию в организме на фоне иммуносупрессии?

Вместе с тем, отмеченные в разделе замечаний вопросы к диссертанту не ставят под сомнения основные положения и выводы диссертационной работы Стрельцовой Я.Б., а потому не снижают общей положительной оценки и не умоляют её значимость.

### **Заключение.**

Следует подчеркнуть о сложившейся в процессе ознакомления общей положительной оценке диссертационной работы Стрельцовой Я. Б.

Диссертационная работа Стрельцовой Я. Б. «Патогенетическая характеристика и идентификация иммунокомпетентных клеток в органах свиней при спонтанном инфицировании цирковирусом второго типа», является законченной самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных исследований, с применением прямого и непрямого иммуногистохимического исследования обнаружено присутствие антигена ЦВС-2 на мембране и в цитоплазме Т-, В-лимфоцитов и макрофагов бронхиального лимфатического узла и в альвеолярных макрофагах инфицированных поросят, были установлены органы мишени (легкие, паховые и бронхиальные лимфатические узлы), в клетках которых локализовался антиген вируса, а также выявлена зависимость между развивающимися патологиями в органах-мишенях и количеством антигенпозитивных иммунокомпетентных клеток свиней, нагруженных антигеном ЦВС-2.

Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, обоснованные выводы, свидетельствует о личном вкладе автора диссертации в науку и характеризуется существенной практической значимостью.

По своей актуальности, методическому решению поставленных задач, объёму экспериментальных исследований, новизне, теоретической и



практической значимости полученных результатов, рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор Стрельцова Яна Борисовна заслуживает присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных.

Официальный оппонент,  
заведующая лабораторией  
молекулярной биологии и вирусологии,  
доктор биологических наук, профессор

Матвеева Ирина Николаевна

Подпись доктора биологических наук, профессора Матвеевой И.Н. заверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ ВНИТИБП,  
кандидат сельскохозяйственных наук  
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский  
и технологический институт биологической промышленности»  
ФГБНУ «ВНИТИБП» 141142, Московская область, городской округ  
Лосино-Петровский, поселок Биокомбината, строение № 17, корпус 1  
Тел./факс: 8(49656) 7-32-63 E-mail: vnitibp@mail.ru



Е.В. Маркова

09.01.2024 г.