

УТВЕРЖДАЮ

И.о. первого проректора -
проректора по научной работе
РУДН

Ромашенко



ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» на диссертационную работу Костюченко Марины Владимировны на тему: «Разработка и применение клеточного антигенспецифического *in vitro* теста для диагностики бруцеллеза и оценки специфического иммунитета», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. – Иммунология (биологические науки).

Актуальность темы диссертационной работы

Выбор направления работы обусловлен текущими эпидемиологическими вызовами в Российской Федерации: активной циркуляцией возбудителя в популяциях сельскохозяйственных животных и сопутствующим увеличением числа случаев бруцеллеза среди людей на 30–35 % по отношению к среднемноголетним значениям. Формирование новых эпидемических очагов в ранее благополучных регионах, выраженный клинический полиморфизм инфекции и ограничения традиционных методов диагностики, не позволяющих надежно дифференцировать активный инфекционный процесс от поствакцинальных или перенесенных в анамнезе реакций, создают объективную потребность в модернизации лабораторно-диагностических алгоритмов. Ключевая роль клеточного звена иммунитета в защите от внутриклеточного возбудителя определяет необходимость перехода к антигенспецифическим клеточным тестам *in vitro*, как наиболее информативному инструменту оценки напряженности противобруцеллезного иммунитета и эффективности иммунопрофилактики. Несмотря на активное внедрение цитометрических технологий в диагностику других инфекционных заболеваний, их адаптация для бруцеллеза остается фрагментарной, что

во многом связано с отсутствием стандартизированного стимулирующего антигена и верифицированных протоколов исследования. В этой связи, разработка, научно-экспериментальное обоснование и клиническая апробация нового подхода к оценке Т-клеточного иммунного ответа с использованием современного аналитического оборудования представляется исключительно своевременной и востребованной как для совершенствования системы эпидемиологического надзора, так и для оптимизации стратегии специфической профилактики бруцеллеза. Таким образом, диссертационное исследование Костюченко М.В., направленное на решение вышеуказанных задач, обладает безусловной научной и практической актуальностью.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертации Костюченко М. В. получены принципиально новые данные, формирующие инновационную методическую платформу для иммунодиагностики бруцеллеза, на основе анализа антигенреактивности Т-клеток. Ключевым результатом стало получение полисахаридно-белкового антигенного препарата, способного избирательно индуцировать активацию Т-лимфоцитов в модельных системах *in vitro* (патент RU 2708561). По результатам изучения комплексного антигена было установлено, что иммуностимулирующая активность комплекса обусловлена наличием мембранных везикул и белков наружной оболочки (OMP/OMV), где доминирующую роль играет субфракция с молекулярной массой 25–33 кДа. Именно такой состав обеспечивает эффективную стимуляцию Т-клеточных рецепторов *ex vivo*, что регистрируется по экспрессии маркеров ранней и поздней активации (CD69, CD25, CD95, MHC-II) на поверхности сенсibilизированных субпопуляций лимфоцитов CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺.

С применением полученного комплексного антигена впервые реализован алгоритм оценки антигенспецифической реактивности Т-клеток, позволяющий выявлять иммунологические маркеры, значимые для лабораторной верификации инфекционного процесса. Экспериментально доказано, что динамика антигенреактивных лимфоцитов объективно отражает интенсивность иммуновоспалительных реакций: пиковые значения коэффициента стимуляции (45–60 %) и повышенная доля клеток с фенотипами CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD71⁺ регистрируются при острой форме бруцеллеза и тяжелых рецидивах хронического течения. Установлена статистически значимая корреляционная взаимосвязь между параметрами Т-клеточной активации, функциональным состоянием лейкоцитов и

цитокиновым профилем, что подтверждает информативность разработанного подхода для комплексной оценки иммунного статуса.

Особую научную ценность представляет экспериментальное обоснование прогностического потенциала теста для контроля поствакцинального иммунитета. Впервые количественно охарактеризована зависимость между уровнем *in vitro* активации CD3⁺ Т-лимфоцитов и напряженностью иммунного ответа после иммунизации вакциной на основе штамма *B. abortus* 19ВА. Доказано, что достижение коэффициента стимуляции ≥ 50 % (по экспрессии CD25⁺ *ex vivo*) гарантирует 100 % протективную защиту экспериментальных моделей от заражения вирулентным штаммом *B. melitensis* 16М (патент RU 2806161). Кроме того, впервые обоснована возможность ранней (на 14-е сутки) оценки формирования специфического Т-клеточного ответа у вакцинированных лиц (патент RU 2714136). Итоги исследования закладывают новую научно-прикладную базу, позволяющую повысить точность диагностики бруцеллеза и достоверно оценивать напряженность специфического иммунитета.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Исследование вносит существенный вклад в развитие теоретических основ инфекционной иммунологии, формируя новое понимание закономерностей Т-клеточного ответа при бруцеллезной инфекции. Научно обоснована возможность использования подходов для количественной характеристики антигензависимой активации лимфоцитов *ex vivo*, что открывает перспективы для создания объективных критериев для оценки клеточной иммунопревалентности.

Прикладная ценность работы определяется созданием унифицированного диагностического инструмента с подтвержденными методологическими характеристиками: показатели специфичности, чувствительности и общей точности находятся в диапазоне 91,7–95,3 %, что соответствует требованиям к методам лабораторной верификации инфекционных заболеваний. Разработанный алгоритм позволяет не только дифференцировать активный инфекционный процесс, но и прогнозировать уровень протективной защиты, что особенно значимо для мониторинга поствакцинальных реакций.

Результаты исследования получили нормативно-методическое утверждение и практическое применение. Материалы диссертации легли в основу двух федеральных методических документов (МР 3.1.0207–20 и МУ 3.1/4.2.4145-25), регламентирующих цитометрический анализ

антигенреактивности лейкоцитов, и лабораторную диагностику бруцеллеза. Три охраняемых результата интеллектуальной деятельности (патенты РФ № 2708561, № 2714136, № 2806161) подтверждают инновационный характер диссертационной работы. Внедрение методических подходов в деятельность Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (акты от 13.01.2020, 01.06.2020, 01.02.2024) свидетельствует о востребованности результатов в системе санитарно-эпидемиологического обеспечения населения.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя является определяющим: самостоятельно выполнены планирование, проведение экспериментов, статистическая обработка и интерпретация результатов. Оптимизация клеточного теста, анализ Т-клеточной реактивности и оценка поствакцинального иммунитета проведены автором лично. Отдельные методические этапы реализованы в сотрудничестве со специалистами ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные Костюченко М. В. результаты и сформулированные выводы обогащают научные представления об антигенспецифической реактивности Т-лимфоцитов при бруцеллезе и могут быть рекомендованы для совершенствования лабораторной диагностики инфекции в практике специализированных лабораторий, а также для объективного мониторинга поствакцинального иммунитета у лиц из групп риска. Разработанный клеточный антигенспецифический тест включен в нормативно-методические документы федерального уровня. Перспективным направлением дальнейших исследований представляется адаптация предложенной методологии для оценки Т-клеточного ответа при других внутриклеточных инфекционных заболеваниях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа Костюченко М. В. полностью соответствует пунктам паспорта специальности 3.2.7 — «Иммунология» (биологические науки): пунктам 6 (разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов) и 9 (разработка и усовершенствование

методов оценки качества постинфекционного и поствакцинального иммунитета, эффективности и безопасности новых вакцинных препаратов).

Достоверность и апробация результатов исследования

Достоверность научных результатов обеспечивается применением современного аттестованного и сертифицированного лабораторного оборудования, использованием стандартизированных методических подходов и корректной статистической обработкой данных общепринятыми математическими методами. Диссертационное исследование выполнено в рамках плановых НИР ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Основные положения работы прошли многократную научную апробацию. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на всероссийских и международных научно-практических конференциях, а основные выводы опубликованы в 37 печатных работах, среди которых 4 статьи размещены в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Результаты исследования регламентированы методическими документами: разработаны и внедрены 1 методические указания и 2 методические рекомендации, включая документы федерального и учрежденческого уровней, что свидетельствует о готовности результатов к практическому применению в системе эпидемиологического надзора.

Содержание и оформление диссертационной работы

Диссертация Костюченко М.В. оформлена в соответствии с требованиями ВАК и имеет логически выстроенную структуру: введение, аналитический обзор литературы, разделы, посвященные материалам и методам, изложение собственных исследований, заключение, выводы, перспективы дальнейших разработок и библиографический список. Объем работы — 193 страницы машинописного текста, иллюстрированные 25 таблицами и 34 рисунками. Библиографический аппарат включает 295 источников (94 отечественных и 201 зарубежный).

Во введении обоснована актуальность темы, четко сформулированы цель, задачи и методологическая основа исследования, определены положения выносимые на защиту, новизна и практическая значимость, приведены данные об апробации и внедрении. Последующее изложение выстроено в строгой логической последовательности.

В первой главе проведен обзор отечественных и зарубежных данных по проблеме противоинфекционной защиты при бруцеллезе. Детально

рассмотрены пути становления специфического иммунитета, сопоставлены возможности гуморального и клеточного звеньев резистентности, а также проанализированы ограничения традиционных диагностических алгоритмов. На основе выявленных методических пробелов автор обосновывает необходимость внедрения клеточных иммунологических тестов для повышения надежности лабораторного подтверждения инфекции.

Во второй главе регламентированы условия проведения экспериментов, описаны штаммы, биологические модели и реагенты, использованные для экспериментов, а также приведен полный перечень иммунологических, микробиологических и статистических методик.

Третья глава представляет результаты собственных исследований. В данном разделе систематизированы итоги разработки и экспериментальной проверки клеточного теста *in vitro*, основанного на цитометрическом анализе лимфоцитов, активированных *ex vivo*. Выполнен комплексный анализ разработанного полисахаридно-белкового препарата: определены его качественные показатели, антигенная специфичность, иммунобиологическая активность и оптимальные рабочие концентрации. Сопоставление нового реагента с классическим бруцеллином продемонстрировало его методические преимущества. В работе детально прослежена кинетика Т-клеточного ответа и выраженность иммуновоспалительных процессов при остром течении инфекции, в моделях реинфекции и при различных клинических формах бруцеллеза. Выявлена устойчивая взаимозависимость между интенсивностью клеточной реактивности и маркерами системного воспаления. Экспериментально подтверждена ключевая роль Т-лимфоцитов в противобруцеллезной защите и обоснована возможность объективного контроля поствакцинального статуса у человека уже на 14-е сутки после иммунизации.

В четвертой главе («Обсуждение результатов») проведен всесторонний анализ экспериментальных и клинико-лабораторных данных, выполненный с опорой на современные концепции инфекционной иммунологии. Сформулированные итоговые заключения детально раскрывают изначально сформулированные задачи и обобщают ключевые научные итоги исследования. Перспективы последующих разработок обоснованно смещены в сторону выявления новых биомаркеров клеточного ответа и адаптации предложенной методологии к диагностике иных внутриклеточных патогенов. Графические и табличные материалы структурированы и служат надежным подтверждением выдвинутых научных положений. Техническое оформление рукописи полностью отвечает действующим нормативным требованиям.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

В автореферате системно и последовательно изложены ключевые результаты диссертационного исследования, приведен перечень публикаций автора. Все структурные элементы автореферата адекватно отражают содержание основной работы.

Замечания

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет.

Вопрос:

Вами дана оценка иммунологической эффективности вакцинации против бруцеллеза на ранних сроках заболевания. Вопрос: получены ли данные по продолжительности адаптивного Т-клеточного иммунитета у вакцинированных?

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Костюченко Марины Владимировны на тему: «Разработка и применение клеточного антигенспецифического *in vitro* теста для диагностики бруцеллеза и оценки специфического иммунитета», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. – «Иммунология» (биологические науки), является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне. В работе успешно решена значимая научно-прикладная задача: разработана, экспериментально подтверждена и клинически апробирована оригинальная методика клеточного антигенспецифического теста *in vitro*, позволяющая осуществлять лабораторную верификацию бруцеллеза и объективно оценивать напряженность специфического Т-клеточного иммунитета.

Диссертационная работа Костюченко Марины Владимировны «Разработка и применение клеточного антигенспецифического *in vitro* теста для диагностики бруцеллеза и оценки специфического иммунитета» по своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям

на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Костюченко М.В., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. «Иммунология» (биологические науки).

Отзыв о диссертационной работе Костюченко М. В. обсужден и одобрен на заседании кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», протокол № 0300-БУП-5 от 22.04. 2026 года.

Отзыв составили:

Профессор кафедры инфекционных болезней
с курсами эпидемиологии и фтизиатрии и
медицинского института РУДН,
доктор медицинских наук,
профессор

Бургасова Ольга Александровна

Директор медицинского института
РУДН, доктор медицинских наук, профессор

А.Ю. Абрамов

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет дружбы народов имени
Патриса Лумумбы»

117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Тел. (495) 787-38-03, (495) 434-42-12, (495) 434-66-82

e-mail: rector@rudn.ru; rudn@rudn.ru