

Отзыв

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Сизякиной Людмилы Петровны на диссертацию Костюченко Марины Владимировны «Разработка и применение клеточного антигенспецифического *in vitro* теста для диагностики бруцеллёза и оценки специфического иммунитета», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. – Иммунология (биологические науки).

Актуальность темы исследования

Актуальность темы диссертационного исследования обусловлена сохраняющимся эпизоотическим неблагополучием по бруцеллезу в Российской Федерации, ростом заболеваемости населения и клиническим полиморфизмом инфекции, затрудняющим своевременную верификацию диагноза. Широко применяемые серологические методы, основанные на детекции специфических антител, имеют известные ограничения: они не всегда позволяют дифференцировать активный инфекционный процесс от поствакцинальных реакций и недостаточно информативны при латентных формах заболевания.

С учётом определяющей роли клеточного иммунитета в формировании защиты против бруцеллеза, оценка функциональной активности Т-лимфоцитов в ответ на специфическую антигенную стимуляцию представляет собой наиболее объективный подход к диагностике инфекции и мониторингу поствакцинального иммунитета. Однако существующие нормативно-методические документы в недостаточной мере учитывают показатели клеточного звена, а адаптация современных антиген-стимулированных тестов *in vitro* с использованием проточной цитометрии для бруцеллеза остаётся фрагментарной. Ключевым методологическим барьером является отсутствие коммерчески доступного стандартизированного бруцеллезного антигена для клеточных тестов.

Таким образом, разработка антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки Т-клеточного ответа при бруцеллезе отвечает актуальным

задачам совершенствования лабораторной диагностики и иммунопрофилактики данной инфекции. Тема исследования является научно обоснованной, соответствует современным тенденциям развития иммунологии и обладает выраженной практической востребованностью.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформированных в диссертации

Работа Костюченко Марины Владимировны выполнена с использованием валидированных методик антигенстимулированных клеточных тестов *in vitro*, репрезентативной экспериментальной базы, корректной статистической обработкой данных, а также логической согласованностью выводов с полученными результатами. Исследование проведено с соблюдением этических норм и требований биобезопасности. Совокупность указанных факторов подтверждает научную обоснованность и достоверность результатов работы.

Научная новизна исследования

Научная новизна исследования заключается в том, что впервые получен и охарактеризован бруцеллезный полисахаридно-белковый антигенный комплекс, способный специфически активировать Т-лимфоциты *in vitro*, и экспериментально обосновано, что для эффективной активации Т-клеточных рецепторов необходим комплекс, содержащий везикулы и белки внешней мембраны с преобладанием фракции 25–33 кДа. На этой основе впервые разработан методологический подход к оценке антигенспецифической Т-клеточной реактивности, позволяющий выявлять диагностически значимые маркеры и оценивать интенсивность иммуновоспалительных реакций при бруцеллезе. Впервые установлено, что максимальная антиген-индуцированная активация Т-лимфоцитов (коэффициент стимуляции 45–60 %, повышение CD3⁺CD25⁺/CD69⁺/CD71⁺) характерна для острой формы и тяжёлых рецидивов хронического бруцеллеза, а также доказана высокая корреляционная взаимосвязь между интенсивностью активации Т-клеток *in vitro* и степенью поствакцинальной защиты. Показана возможность ранней (на

14-е сутки) оценки формирования Т-клеточного иммунитета у человека после вакцинации. Ключевые результаты защищены патентами РФ, что подтверждает научный приоритет и практическую значимость работы.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений об антигенспецифической реактивности Т-лимфоцитов при бруцеллёзе и научном обосновании применения *ex vivo*-методологии для оценки Т-клеточной иммунопревалентности. Разработана и стандартизирована методика клеточного антигенспецифического теста *in vitro*, обладающая высокой диагностической эффективностью (чувствительность 95,3 % для острой формы, специфичность 93,7 %, общая точность 93,8 %). Практическая значимость подтверждена разработкой алгоритма иммунологической диагностики бруцеллеза, прогностических критериев сформированности клеточного иммунитета и лабораторного маркера оценки защищённости организма от инфекции. Результаты внедрены в практику Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, отражены в методических рекомендациях МР 3.1.0207-20 и МУ 3.1/4.2.4145-25, а ключевые разработки защищены тремя патентами РФ, что свидетельствует о высокой прикладной ценности и готовности результатов к широкому применению в системе эпидемиологического надзора и лабораторной диагностики.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Содержание диссертационной работы и полученные научные результаты полностью соответствуют паспорту научной специальности 3.2.7 – Иммунология (биологические науки). Исследование, направленное на разработку антиген-специфических клеточных тестов *in vitro* для оценки Т-клеточного иммунитета при бруцеллёзе, укладывается в рамки пункта 6 и пункта 9 паспорта специальности.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Основные результаты диссертации полно отражены в 37 опубликованных работах соискателя, включая 4 статьи в журналах перечня ВАК, 3 патента РФ на изобретения, а также методические указания и рекомендации федерального и учрежденческого уровней внедрения, что обеспечивает достаточную репрезентацию научных положений работы в открытом научном обороте.

Структура и содержание диссертации

Работа выполнена в соответствии с общепринятой структурой диссертационного исследования и состоит из введения, обзора литературы, четырёх глав, посвящённых собственным исследованиям (включающих разделы по материалам и методам, а также по результатам), заключения, выводов, перспектив дальнейшей разработки темы и списка использованных источников. Библиографический список включает 295 наименований, из которых 94 — отечественные и 201 — зарубежные публикации. Текст диссертации изложен на 193 страницах машинописного текста и сопровождается 25 таблицами и 34 рисунками.

Диссертация имеет логичную и методически обоснованную структуру, полностью соответствующую поставленным целям и задачам исследования.

Во введении чётко сформулированы актуальность, цель, задачи, методология, положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость работы, а также представлены данные об апробации и внедрении результатов.

Первая глава содержит систематизированный обзор научной литературы, в котором проанализированы особенности формирования противобруцеллезного иммунитета, роль гуморального и клеточного звеньев, современные методы диагностики и оценки напряжённости иммунитета, а также научно обоснована необходимость перехода к клеточно-ориентированным подходам верификации инфекции.

Во второй главе детально описаны материалы, методы и методики, использованные для решения поставленных задач.

В третьей главе представлены результаты экспериментальных и клинико-лабораторных исследований, направленных на разработку и валидацию антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки Т-клеточного иммунитета при бруцеллезе. На начальном этапе обоснована методологическая перспективность применения проточной цитофлуориметрии и *ex vivo*-активации лимфоцитов для лабораторной диагностики инфекции. Проведена комплексная характеристика разработанного бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса: изучены качественные показатели экспериментальных серий, определена их специфичность и биологическая активность, оптимизирована концентрация антигена для специфической стимуляции клеток, а также выполнено сравнительное тестирование с традиционным бруцеллином, подтвердившее диагностические преимущества нового препарата. На основе полученных данных оценена клинико-лабораторная точность клеточного антигенспецифического теста. Далее исследованы закономерности *ex vivo* активации Т-лимфоцитов и динамика иммуновоспалительных реакций при острой форме бруцеллеза, включая модели повторного инфицирования и различные клинические варианты течения заболевания. Установлена статистически значимая взаимосвязь между интенсивностью иммуновоспалительного ответа и показателями антигенреактивности Т-клеток. В завершающем разделе главы проанализированы механизмы формирования специфического иммунитета: экспериментально изучена протективная активность Т-клеточного ответа и доказана возможность ранней оценки эффективности вакцинации человека против бруцеллеза по динамике антигенреактивности лимфоцитов на начальных сроках после иммунизации.

В разделе «Обсуждение» проведен всесторонний подробный анализ полученных данных.

Выводы работы полностью соответствуют задачам и отражают основные научные результаты. Перспективы дальнейших исследований логично сформулированы как поиск новых иммунологических маркеров и расширение апробации подхода для оценки Т-клеточного иммунитета при других инфекционных заболеваниях.

Изложение материала последовательно, стиль и терминология соответствуют требованиям к научным публикациям, иллюстративный и табличный материал наглядно подтверждает достоверность выводов.

Оценивая диссертацию в целом, можно заключить, что она представляет собой завершённое самостоятельное научное исследование, вносящее существенный вклад в разработку новых клеточных антигенспецифических тестов *in vitro* для диагностики бруцеллёза и оценки специфического Т-клеточного иммунитета. Сформулированные научные положения и выводы полностью обоснованы, опираются на современные методы иммунологического, бактериологического и статистического анализа и соответствуют принятым методологическим стандартам. Поставленные задачи логически вытекают из цели исследования.

Основные результаты диссертационного исследования полно и достоверно отражены в публикационной активности соискателя: материалы работы опубликованы в статьях, включая издания из перечня ВАК, защищены тремя патентами Российской Федерации на изобретения, а также внедрены в практику через методические рекомендации и указания федерального и учрежденческого уровней.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы полностью соответствует содержанию, структуре и основным положениям диссертации. В нём точно и систематизированно изложены актуальность исследования, цель, задачи, методология, научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, а также сформулированы выводы и перспективы дальнейших разработок. Представленные в автореферате данные, включая

результаты апробации, сведения о публикационной активности и патентах, полностью согласуются с материалами диссертации и соответствуют требованиям Положения о присуждении учёных степеней. Структура и объём автореферата соответствуют установленным нормативам, изложение материала последовательно, научно обосновано и доступно для специалистов в области иммунологии и инфекционной патологии. Замечаний к содержанию и оформлению автореферата не имеется.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

В порядке дискуссии хотелось бы уточнить:

1. Какую роль играет антигенспецифическая активация Т-лимфоцитов в формировании протективного иммунитета?
2. Почему Вы делаете выводы об усилении цитотоксических свойств Т-лимфоцитов только на основании анализа их активационных потенциалов?

Заключение

На основании вышесказанного можно заключить, что диссертационное исследование Костюченко Марины Владимировны «Разработка и применение клеточного антигенспецифического *in vitro* теста для диагностики бруцеллёза и оценки специфического иммунитета» по своей актуальности, научной и практической значимости, новизне полученных результатов является законченной научно-квалификационной работой, выполненное на высоком методическом уровне. В работе решена важная научная задача, заключающаяся в разработке, валидации и экспериментально-клинической апробации нового клеточного антигенспецифического теста *in vitro* для лабораторной верификации бруцеллёза и объективной оценки напряжённости специфического Т-клеточного иммунитета.

Таким образом, диссертационная работа Костюченко Марины Владимировны «Разработка и применение клеточного антигенспецифического *in vitro* теста для диагностики бруцеллёза и оценки специфического иммунитета», соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, установленным

Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (действующая редакция), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. – «Иммунология» (биологические науки).

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Ростовский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор

Сизякина Людмила Петровна

"12" мая 2026 г.

Подпись Л.П. Сизякиной заверяю:
Ученый секретарь ученого совета
ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор

Н.Г. Сапронова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ростовский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России). 344022, Российская Федерация, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, переулок Нахичеванский, зд. 29. Тел.: +7 (863) 250-42-00. Факс: +7 (863) 201-43-90. E-mail: okt@rostgmu.ru. Оф. сайт: <https://rostgmu.ru>