

## ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук, доцента кафедры «Анатомия, хирургия и внутренние незаразные болезни» ФГБОУ ВО «Нижегородский государственный агротехнологический университет» Кляпнева Андрея Владимировича на диссертационную работу Онищенко Артема Романовича на тему «Оценка иммунологической реактивности в функциональной системе «мать-плод-новорожденный» в зависимости от степени сенсбилизации матерей антигенами плода», представленную в диссертационный совет 35.2.036.02 на базе ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.1 Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология.

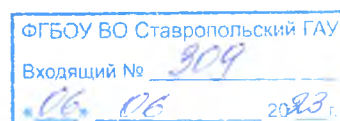
**Актуальность избранной темы.** Одной из важнейших задач животноводства является получение полноценного приплода и выращивание здорового молодняка сельскохозяйственных животных. Одним из резервов для решения этой задачи является своевременное и научно-обоснованное проведение ветеринарных мероприятий в биологическом комплексе «мать-плод-новорожденный», надежно обеспечивающих охрану животных от болезней и их продуктивного долголетия.

Материнский организм во многом определяет иммунобиологический статус новорожденных животных. Вопросы взаимосвязи между состоянием иммунной системы материнского организма и здоровьем новорожденного животного в настоящее время не нашли достаточного отражения в научных исследованиях. Мало изучены аспекты, связанные с характером иммунного реагирования материнского организма при многоплодной беременности на антигены плода и развитием иммунологической толерантности у потомства животных с различными типами плацентации.

Особый интерес в исследовании иммунологического статуса функциональной системы «мать-плацента-потомство» представляет роль принципов и механизмов, обеспечивающих, как правило бесконфликтное формирование плода в организме матери с объяснением принципов аллогенной стимуляции при беременности.

В связи с этим, диссертационная работа Онищенко Артема Романовича, посвященная изучению иммунологического статуса организма поросят в зависимости от изоантигенного состояния супоросных свиноматок во время беременности, оценке иммунологической реактивности состояния беременных свиноматок на формирование и развитие иммунной системы потомства и разработке критериев жизнеспособности аллоиммунизированного потомства является актуальной.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Научные положения, представленные к защите в диссертационном совете, выводы и рекомендации



сформулированы автором на основании проведенных экспериментальных исследований на свиноматках, полученных от них поросятах и самцах-производителях в условиях промышленных свиноводческих хозяйств Ставропольского края: ООО «СВК», КФХ Великородный. Методика исследований отрабатывалась в сертифицированных научно-испытательных лабораториях Ставропольского, Краснодарского края и Московской области – ФГБУ Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория, ГБУ Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория, лаборатория иммуногенетики и ДНК-технологий ВНИИОК – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ», лаборатория биохимического и гематологического анализа крови Научно-диагностического и лечебного ветеринарного центра ФГБОУ ВО Ставропольского ГАУ. Все международные и национальные руководящие принципы по уходу и использованию животных были соблюдены.

Экспериментальные данные получены с использованием клинических, иммунологических, гематологических, гистологических и статистических методов исследований. В рамках используемых методов проведено изучение иммунологической реактивности поросят в зависимости от степени сенсibilизации материнского организма, оценка динамики становления иммунобиологического статуса у потомства, исследование рецепторов/маркеров лимфоцитов, гистологическое исследование проб внутренних органов поросят, оценка иммунного и цитокинового профиля крови у новорожденных поросят. Цифровой материал сведен в таблицы и подвергнут статистической обработке. Заключение, выводы и практические рекомендации диссертационной работы, аргументировано отражающие ее основные научные положения, являются обоснованными и достоверными.

**Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций.** Концепция исследований, касающихся мониторинга фетоплацентарного комплекса в норме и при патологии у продуктивных животных разработана автором с учетом изменения физиологических показателей организма животного в виде алгоритма программы (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022611421 от 25.01.2022) и программного модуля прогнозирования жизнеспособности животных.

Впервые разработаны критерии для проведения оценки и мониторинга иммунологической реактивности функциональной системы «мать – плод – новорожденный» в зависимости от степени сенсibilизации матерей антигенами плода с учетом приобретения материнским организмом специфической повышенной чувствительности (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022611601 от 27.01.2022) и апробирована оценка внутриутробного инфицирования с предотвращением ранних репродуктивных потерь у животных.

Для определения и оценки иммунологической реактивности организма животных был разработан алгоритм программы по определению и оценке

иммунологической реактивности организма животных при аллогенной стимуляции эмбриональными антигенами (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022611873 от 02.02.2022).

Впервые апробирован способ тестирования иммунологической толерантности у животных (патент на изобретение РФ № 2743363 от 17.02.2021), который обеспечивает возможность повышения достоверности лабораторного исследования (неинвазивного пренатального скрининга изоиммунизационных эффектов у потомства) за счет выявления состояния реакции агглютинации между полученной иммунной сывороткой крови потомства и семенем биологического самца-производителя, что позволяет сформировать группу животных с высоким риском развития иммунологической толерантности.

Предложен способ диагностики изоиммунизации животных (патент на изобретение РФ № 2749026 от 03.06.2021, Евразийский патент № 042483 от 17.02.2023), направленный на более релевантное определение иммуногенности антигенов материнского организма в отношении аллоиммунизированных факторов у потомства, позволяющий в относительно короткие сроки определить уровень развития иммунологической толерантности.

Материалы диссертации вошли в разработку электронных учебных ресурсов для ветеринарных специалистов: «Оценка индексов формирования естественной резистентности организма под действием искусственного антигенного комплекса» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022612557 от 28.02.2022); «Цифровой модуль для выявления цитокинов методом проточной флуориметрии» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022612656 от 28.02.2022); «Цифровой модуль для определения фенотипа иммунокомпетентных клеток крови» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022612847 от 01.03.2022); «Цифровой модуль для определения иммунохимических свойств субклеточных фракций и антигенов» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022613185 от 01.03.2022); «Цифровой модуль для выявления цитокинов иммуноферментным методом» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022614232 от 17.03.2022); «Цифровой модуль для определения уровня эффекторной продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками» (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 202261435721 от 21.03.2022).

Полученные диссертантом научные результаты, репрезентативны и достоверны, статистически обработаны. Экспериментальные результаты получены с помощью современных методик и на сертифицированном оборудовании.

**Ценность для науки и практической деятельности, проведенной соискателем работы.** Полученные автором результаты позволили создать теоретические основы и методологические принципы оценки иммунологической реактивности новорожденных поросят на ранних сроках

постнатального развития в зависимости от степени сенсibilизации свиноматок антигенами плода.

Рассматривая разработанные критерии оценки иммунологической реактивности новорожденных поросят, установлено влияние плацентарных условий развития в фетальный период на морфофункциональное развитие организма, которое указывает на важную роль сенсibilизации в возникновении патологических процессов.

Разработан способ тестирования иммунологической толерантности у животных (патент на изобретение РФ № 2743363 от 17.02.2021, Евразийский патент № 042483 от 17.02.2023), который используется для выявления нарушений фетоплацентарного комплекса при массовом обследовании животных в условиях товарных хозяйств промышленного типа.

Разработан способ диагностики изоиммунизации животных (патент на изобретение РФ № 2749026 от 03.06.2021) с определением научно обоснованных методов оценки жизнеспособности новорожденных животных и мероприятий по повышению их сохранности.

Внедрены в работу научно-исследовательских учреждений и высших учебных заведений алгоритмы 12 свидетельств по программам для ЭВМ.

Ценность полученных данных, с точки зрения теоретической и практической значимости, заключается в возможности их использования для прогнозирования продуктивных и племенных качеств молодняка в процессе интенсивной технологии выращивания и использования, что составляет основу превентивной профилактики болезней новорожденных поросят и повышения сохранности их здоровья.

Основные положения диссертации были представлены автором на российских и международных конференциях, съездах и симпозиумах (г. Ростов-на-Дону 2020 год; г. Ставрополь 2020, 2021 гг). Результаты исследований поддержаны Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Фондом содействия инновациям) по программам «УМНИК-17». Апробация работы проведена на Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых вузов Министерства сельского хозяйства Российской Федерации в номинации «Ветеринарные науки». Материалы проведенных исследований представлены в научно-практических методических рекомендациях. Научные результаты исследований широко апробированы в условиях ветеринарных лабораторий и свиноводческих комплексов.

**Соответствие диссертации и автореферата критериям «Положения о присуждении ученых степеней», формуле и паспорту специальностей.** Автореферат отражает основные разделы диссертации, содержит заключение, выводы и практические рекомендации, раскрывает ее научные положения. Диссертация и автореферат в полной мере соответствуют критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней».

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 4.2.1 Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология, а именно пунктам: 4. Закономерности и механизмы поддержания постоянства внутренней среды организма, физиологических процессов и функции систем организма и отдельных органов животных, физиологические механизмы их адаптации к различным факторам, поведение и реакции организма на их действие в норме, при патологических состояниях и эксперименте; 7. Общепатологические процессы у животных, патогенетические механизмы и патоморфологические изменения при болезнях различной этиологии. Методы установления основного заболевания, его осложнений при сопутствующих патологических процессах и их роль в танатогенезе; 12. Закономерности, связанные с беременностью и развитием плода в норме и под воздействием экзогенных и эндогенных факторов, роды. Методы диагностики беременности и ее коррекция у животных.

**Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, репрезентативность эмпирического материала.** Диссертация является результатом самостоятельных научных исследований автора в период 2020–2023 гг. Представленные в диссертации современные и классические гематологические, иммунологические, гистологические, морфометрические методики исследования проведены диссертантом самостоятельно. По теме диссертационной работы выявлена проблема, выполнены задачи исследований и проведена статистическая обработка полученных результатов. Доля участия соискателя при выполнении работы составляет 85 %.

Грамотное толкование полученных результатов придает исследованиям завершённый характер, свидетельствует об их полноте и научной обоснованности, профессиональной зрелости соискателя. Материалы диссертационной работы рекомендуется использовать и внедрять в сельскохозяйственных предприятиях, при преподавании дисциплин биологического профиля, а также при проведении научных исследований.

**Оценка оформления, содержания и завершенности работы.** Диссертационная работа Онищенко Артема Романовича изложена на 151 странице компьютерного текста и состоит из введения (11 с.), обзора литературы (35 с.), собственных исследований (40 с.), заключения (4 с.), выводов (3 с.), практических предложений (2 с.), рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы (1 с.); списка сокращений и условных обозначений (3 с.), списка литературы (28 с.) и приложений (20 с.). Диссертация иллюстрирована 10 таблицами, 28 рисунками. Список литературы содержит 241 источник, в том числе 119 зарубежных авторов.

Во «Введении» (С. 4–14), которое повторяется на С.3–8 автореферата, даны сведения об актуальности темы; цели и задачах исследований; научной новизне; теоретической и практической значимости работы; методологии и методах исследования; положениях, выносимых на защиту; степени

достоверности и апробации результатов; структуре и объеме диссертации. Цель и вытекающие из неё задачи четко сформулированы, полностью реализованы в работе и нашли своё отражение в положениях, выносимых на защиту, а также в заключении диссертации.

Обзор литературы (С. 15–50) содержит данные отечественных и зарубежных исследователей по теме диссертации, в частности о специфике адаптивного потенциала новорожденных животных в ранний постнатальный период; морфофункциональной характеристике фетоплацентарного комплекса у сельскохозяйственных животных; роли факторов, влияющих на формирование иммунологической реактивности в функциональной системе «мать-плод-новорожденный». Представленный материал раскрывает широкую научную эрудицию автора, вводит читателя в курс изучаемой проблемы и определяет актуальность темы.

В разделе диссертации «Материалы и методы исследований» (С. 50 – 58) описаны условия, место проведения опытов, объекты исследований, дана схема проведения научно-хозяйственного опыта, подробно описаны лабораторные методы исследования образцов крови и внутренних органов животных. Автор четко и конкретно описывает применяемые методы исследований и способы статистической обработки результатов. Этот раздел свидетельствует о достаточном количестве экспериментального материала, адекватности выбранных методик для решения поставленных задач исследования.

Раздел Результаты исследований (С. 59 – 93) автор начинает с оценки иммунологической ареактивности поросят в зависимости от степени сенсibilизации свиноматок (С. 60 – 64). По результатам исследований все поросята опытной группы были отнесены к животным с признаками изоиммунизации в фетальный период. В сыворотке крови особей контрольной группы изоантитела в диагностических титрах на протяжении всего периода наблюдения практически не обнаружены.

После этого в диссертационной работе рассматриваются морфофункциональные изменения фетоплацентарного комплекса при сенсibilизации в период беременности (С. 65 – 73). У полученного потомства от свиноматок, подверженных сенсibilизации, наблюдались дистрофические изменения в органах дыхательной, пищеварительной, мочевыделительной систем и органах иммуногенеза.

В наибольшей части плаценты наблюдается уменьшение диаметра кровеносных сосудов. Поврежденные стенки сосудов провоцируют процесс тромбообразования на данных участках. Выявлены существенные лимфоидно-лимфоцитарные инфильтраты. Это указывает на прямую связь в нарушении морфофункционального строения плаценты свиноматок с признаками изоиммунизации в фетоплацентарной системе и ведет к серьезным изменениям функционального строения в функциональной системе «мать-плод-новорожденный».

Клеточный иммунный ответ после аллоиммунизации и контрольного введения изоантигенов характеризовался высоким процентом IFN- $\gamma$  до 2400 пг/мл по супернатанту TLR7/8 в различных субпопуляциях Т-клеток (Th, Tm, Tcyto) и NK-клеток, повторно стимулированных *in vitro*.

Процентное содержание (относительный уровень) различных популяций и субпопуляций Т-клеток (Tm и Tcyto), NK-клеток и В-клеток в нестимулированных антигенами через 7 дней после введения изоантигенов, процент клеток Tm значительно увеличился между 14 и 21 днями после введения изоантигена в группах животных, отражая их ареактивное состояние.

Процент положительных IFN- $\gamma$  клеток в различных субпопуляциях Т-клеток (CD4 + (Th), CD4 + CD8 + (Tm), CD4 – CD8 + (Tcyto)) и NK-клеток (CD3– CD8+) были проанализированы за 21 день, с установлением иммунологического сдвига CD4+ и CD8+ Tcyto до значения  $1,42 \pm 0,13$  пг/мл.

У 33,5% поросят, рожденных свиноматками, сенсibilизированными эмбриональными антигенами, выявлены изоантитела в преколостральной сыворотке. Стадия ареактивности у поросят обусловлена взаимодействием сенсibilизированных Т-лимфоцитов с изоантигеном при которой наблюдается прямая зависимость между индексом иммунологической реактивности и степенью клеточно-опосредованной трансформации.

Поросята, в преколостральной сыворотке которых установлены изоантитела, существенно отличались сниженным уровнем от своих сверстников показателей морфологического состава крови (количество эритроцитов – на 33,6 %, гематокрита – на 61,9 %, гемоглобина – на 31,9 %) и уровня естественной резистентности (БАСК-бактерицидная активность сыворотки крови на 43,1%).

При изучении напряженности иммунитета у поросят, полученных от свиноматок различной степени сенсibilизации антигенами плода, отмечено, что средние показатели титров антител по группам значительно отличались:  $4,05 \pm 0,36 \log^2$  в контроле и  $5,97 \pm 0,29 \log^2$  опытных особей, а индивидуальные показатели колебались от  $1,36 \pm 0,19$  до  $6,15 \pm 0,41 \log^2$  среди животных контрольной группы и от  $3,07 \pm 0,49$  до  $8,25 \pm 0,21 \log^2$  у животных опытной группы.

Автором разработан способ тестирования иммунологической толерантности у животных для выявления нарушений фетоплацентарного комплекса при массовом обследовании животных в условиях товарных свиноводческих хозяйств.

Разработан способ диагностики изоммунизации животных при массовом обследовании поголовья свиней, включающий инкубирование проб крови животного с тестирующей биологической жидкостью в капиллярах, а результаты реакции учитывают по степени цитолиза клеток.

Заключение (С. 94–96) диссертации вытекает из данных собственных исследований, 9 выводов и практические предложения являются логичными ответами на поставленные задачи.

Практические предложения научно обоснованы и являются логическим завершением работы. Диссертация написана хорошим литературным языком, почти не содержит стилистических и иных ошибок. Автореферат диссертации (объемом 1 усл. печ. л.) достаточно полно отражает основное содержание диссертационной работы.

**Публикации по теме работы.** Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в 28 работах, из них 4 статьи в российских журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации («Вестник КрасГАУ», «Ветеринарная патология», «Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии»). и 1 статья, индексируемая в международной базе научного цитирования Scopus («E3S Web of Conferences»). Опубликованы методические рекомендации, получено 3 патента на изобретение и 12 свидетельств о государственной регистрации программ для ЭВМ.

Оценивая диссертационную работу Онищенко Артема Романовича положительно, хотелось бы получить ответы на вопросы, возникшие в ходе ознакомления с диссертацией и авторефератом:

1. Дайте определение понятию преколостральная сыворотка.
2. При изучении напряженности иммунитета у поросят от свиноматок различной степени сенсбилизации антигенами плода, в каком возрасте проводилась вакцинация подопытных поросят против циркувирусной инфекции свиней?
3. Какими именно антигенами фетального происхождения может иммунизироваться организм самки при нарушении функции плацентарного барьера?
4. С помощью какого программного обеспечения написаны предложенные в диссертации программы и программные модули?

Приведенные вопросы не снижают научной и, особенно, практической ценности диссертационной работы, которая написана хорошим литературно-профессиональным языком, аккуратно оформлена и удачно завершена по замыслу и результатам.

**Заключение:**

Диссертационная работа Онищенко Артема Романовича на тему «Оценка иммунологической реактивности в функциональной системе «мать – плод – новорожденный» в зависимости от степени сенсбилизации матерей антигенами плода» является целостным, завершенным научным исследованием, выполненным автором самостоятельно, на высоком методическом уровне, с применением современных методов исследований. Она является важной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных исследований содержится решение актуальной для биологии и ветеринарной медицины научной задачи.

По своей актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, достоверности и обоснованности научных положений.



выводов и рекомендаций, публикациям, в которых изложены основные научные результаты, теоретической и практической значимости работы диссертация Онищенко Артема Романовича на тему «Оценка иммунологической реактивности в функциональной системе «мать – плод – новорожденный» в зависимости от степени сенсибилизации матерей антигенами плода» отвечает критериям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.1 Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология.

Официальный оппонент,  
кандидат биологических наук, доцент  
кафедры «Анатомия, хирургия и  
внутренние незаразные болезни»  
Федерального государственного  
бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования  
«Нижегородский государственный  
агротехнологический университет»

30.05.2023 г.



Кляпнев Андрей Владимирович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Нижегородский государственный агротехнологический университет» (ФГБОУ ВО Нижегородский ГАТУ): 603107, Россия, Нижегородская область, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина. 97; Тел. 8 (831) 214-33-49; E-mail: a\_klyapnev@mail.ru

Подпись Кляпнева А.В. заверяю:

*Заведующий Ю.П. Сушица, зав. кафедрой*

