

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 350.002.01 НА БАЗЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ  
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО  
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ  
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА  
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от 25.09.2020 г. № 9  
о присуждении Алиевой Анне Александровне, гражданину РФ, ученой степени  
кандидата биологических наук.

**Диссертация** «Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль в патологии и  
способы подавления» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к  
защите 20.07.2020 г., протокол № 6 диссертационным советом Д 350.002.01 на базе  
Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр  
прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в  
сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации,  
142279, Московская обл., Серпуховский р-н, Оболенск, приказ о создании № 714/нк  
от 02.11.2012 г.

**Соискатель** Алиева Анна Александровна, 1976 г. рождения, в 2006 г.  
окончила Биологический факультет Государственного образовательного  
учреждения высшего профессионального образования «Ростовский  
государственный университет» (ныне Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный  
университет» Министерство науки и высшего образования Российской Федерации)  
по специальности «Биология». С 2015 по 2019 гг. А.А. Алиева обучалась в заочной  
аспирантуре Федерального государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по  
специальности 30.06.01 Фундаментальная медицина (микробиология); с 2007 г. по  
настоящее время работает врачом-паразитологом бактериологической лаборатории  
Федерального казенного учреждения здравоохранения «Северо-Кавказская

противочумная станция» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации и старшим лаборантом кафедры микробиологии и вирусологии № 2 Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Диссертация** выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии № 2 Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель** – Харсеева Галина Георгиевна, доктор медицинских наук (03.02.03 - микробиология), профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии № 2, заведующая.

**Официальные оппоненты:**

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук (03.02.03 - микробиология), Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Санкт-Петербург, лаборатория медицинской бактериологии, заведующая;

Червинец Вячеслав Михайлович, доктор медицинских наук (03.02.03 - микробиология), профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Тверь, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий,

дали положительные отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и

микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном Костюковой Натальей Николаевной, Заслуженным деятелем науки РФ, доктором медицинских наук, профессором, ведущим научным сотрудником, указала, что диссертационная работа является научно-квалификационной работой, в которой решена научная задача – выявлены и определены особенности адгезии (прикрепления) дифтерийных бактерий к эпителию респираторного тракта на начальных этапах инфекционного процесса, определяющие формирование бактерионосительства, существенно препятствующего эрадикации дифтерийной инфекции, а также предложен способ прерывания адгезии и последующей колонизации. Диссертация полностью соответствует критериям, установленным п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а автор представленной диссертации Алиева А.А. заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «микробиология».

Соискатель имеет **25** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **19** работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **4** работы, и один патент РФ. Общий объем работ – 3,82 п. л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Харсеева Г.Г. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль поверхностных структур и механизм формирования / Г.Г. Харсеева, **А.А. Алиева** // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. - 2014. - №4. - С. 109-117.

2. **Алиева А.А.** Факторы патогенности недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Э.О. Мангутов, С.Н. Головин // Клиническая лабораторная диагностика. - 2018. - Том 63. - № 6. – С. 375- 378.

3. Харсеева Г.Г. Цитопатическое действие возбудителя дифтерии в составе биопленки / Г.Г Харсеева, **А.А. Алиева**, Л.П. Алексеева, Э.О. Мангутов, Л.А. Шовкун // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Том 64. - № 11. – С. 681-685.

4. Харсеева Г.Г. Подавление бактериальной адгезии: Современные подходы, проблемы и перспективы / Г.Г. Харсеева, А.Ю. Миронов, **А.А. Алиева** // Успехи современной биологии. – 2019. – Том 139. - № 5. – С. 506-515.

5. Патент на изобретение РФ № 2672862, от 20.11.2018. Способ отбора пациентов в группу риска по развитию фолликулярной ангины / Харсеева Г.Г., Алиева А.А., Воронина Н.А., Мангутов Э.О. - Заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава РФ. - Бюл. № 32. – 15 с.

На диссертацию и автореферат поступило **5** положительных отзыва без замечаний от: **(1)** доктора медицинский наук, профессора **Миронова Андрея Юрьевича**, руководителя отдела микробиологии Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт микробиологии и эпидемиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучия человека, г. Москва; **(2)** доктора медицинских наук, профессора **Евстропова Александра Николаевича**, заведующего кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новосибирск; **(3)** Заслуженного деятеля науки Республики Башкортостан, доктора медицинских наук, профессора, **Мавзютова Айрата Радиковича**, заведующего кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии, профессора кафедры лабораторной диагностики ИДПО Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Уфа; **(4)** доктора медицинских наук, профессора, **Митрохина Сергея Дмитриевича**, руководителя отдела клинической фармакологии и центра клинических исследований Городской клинической больницы № 67 им. Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы; **(5)** доктора медицинских наук, профессора, **Чеботаря Игоря Викторовича**, заведующего лабораторией молекулярной микробиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава Российской Федерации, г. Москва.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор медицинских наук **Краева Людмила Александровна** является признанным специалистом в сфере микробиологии и эпидемиологии дифтерии, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации

Алиевой А.А. (**Eur. J. Med. Chem.** – 2018. – Vol. 157. – P. 1115-1126; **New J. of Chem.** – 2019. – Vol. 43. - № 44. – P. 17358-17366; **Eur. J. Med. Chem.** – 2019. – Vol. 166. – P. 125-135; **Клин. лаб. диагностика.** - 2015. - Т. 60. - № 11. - С. 58-61; **Усп. совр. биол.** – 2016. – Т. 136. - № 1. – С. 53-67; **Дезинф. дело.** – 2017. - № 4(102). – С. 52-52а; **Усп. мед. микол.** – 2018. – Т. 19. – С. 83-86; **Инф. иммун.** – 2018. – Т. 8. - № 1. – С. 61-70; **Проф. и клин. мед.** - 2019. - № 4(73). - С. 16-21; **Инф. и иммун.** – 2020. – Т. 10. - № 1. – С. 121-128);

доктор медицинских наук, профессор **Червинец Вячеслав Михайлович** является специалистом в области микробиологии и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Алиевой А.А. (**Стомат.** – 2015. – Т. 94. - № 1. – С. 50-53; **Клин. лаб. диагностика.** – 2016. – Т. 60. - № 6. – С. 57-60; 2016. – Т. 61. - № 10. – С. 719-722; 2018. – Т.63. - № 9. – С. 579-583; 2019. – Т. 64. - № 8. – С. 507-512; 2020. - Т. 65. - № 1. – С. 42-49; **Совр. Пробл. Науки Образ.** – 2016. - № 6. – С. 570; **Экспер. Клин. Гастроэнтерол.** – 2016. - № 2(126). – С. 79-86; 2016. -№ 2(126). – С. 108; **Иммунопатол. Аллергол. Инфектол.** – 2019. – № 2. – С. 21-24).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области эпидемиологии, медицинской и молекулярной микробиологии, инфекционной иммунологии; изучения структуры и динамики инфекционной патологии населения; возникновения, функционирования и эпидемического проявления природных очагов болезней человека; исследования в области генетики, молекулярной биологии, экологии и персистенции патогенных микроорганизмов; изучении проблем общей и инфекционной иммунологии, включая иммунорегуляцию и иммунокоррекцию, пути и средства диагностики и профилактики инфекционных болезней, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Алиевой А.А. (**Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2015. - № 5. – С. 7-12; 2015. - № 4. – С. 55-62; 2018. - № 4. – С. 119-124; **Лаб. служба.** – 2015. – Т. 4. - № 1. – С. 30-34; **Эпид. Вакцинопроф.** – 2016. – Т. 15. - № 4(89). – С. 64-73; 2017. – Т. 16. - № 5(96). – С. 87-97; 2018. – Т. 17. - № 5(102). – С. 60-70; **Эпидемиол. Инф. Бол. Акт. Вопр.** – 2019. – Т. 9. - № 2. – С. 81-89; **Клин. Микробиол. Антимикр. Химиотер.** – 2019. – Т. 21. - № 4. – С. 261-273; 2019. – Т. 21. - № 4. – С. 261-273; **Биохимия.** – 2020. – Т. 85. - №

1. – С. 3-14), а также наличием ученых, являющихся безусловными специалистами по теме диссертации Алиевой А.А.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

**разработана** новая научная концепция о роли адгезивно-инвазивного потенциала планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в формировании патологического процесса при дифтерии: на ранних стадиях *C. diphtheriae*, обладая высокой адгезивной и инвазивной активностью, прикрепляется к эпителиальным клеткам, проникает в них, а на более поздних, при сохранении выраженной способности к адгезии и постепенном снижении инвазивности, выходит из клеток и формирует биопленку.

**предложена** оригинальная гипотеза о том, что под воздействием факторов врожденного и адаптивного иммунитета у больных с манифестированными формами дифтерии адгезивная активность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* понижается, что не приводит к формированию биопленки и не препятствует выделению токсина. У бактерионосителей на фоне низкого содержания антибактериальных антител, высокого уровня антитоксических антител и лактоферрина, а также более широкого спектра сывороточных белков, обладающих способностью ингибировать апоптоз и связывать тяжелые металлы, в том числе и железо, адгезивность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* повышается (в 1,5-2 раза), что предрасполагает к формированию биопленки, понижению выделения токсина за ее пределы и, как следствие, длительной персистенции в организме;

**доказано** наличие закономерностей, характеризующих цитопатический эффект планктонных и биопленочных культур штаммов возбудителя дифтерии. Так, уровень цитопатического действия более выражен у планктонных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, чем биопленочных, что указывает на снижение интенсивности выделения дифтерийного экзотоксина в составе биопленки. Это может быть связано с формированием межклеточного матрикса, препятствующего выделению токсина за его пределы, и снижением интенсивности процессов метаболизма и синтеза факторов патогенности бактериями в составе биопленки.

**введено** представление о том, что цитопатическое действие токсигенных

штаммов *C. diphtheriae* на клетки СНО-К1 зависит от формы, в которой находится бактериальная культура: под воздействием планктонных культур происходит истончение и удлинение клеток, обусловленное действием токсина, в то время, как под воздействием *C. diphtheriae* в виде биопленки наблюдается округление клеток, что связано с не только с токсином, но и иными факторами патогенности в том числе, и адгезинами.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

**доказано**, что на ранних стадиях *C. diphtheriae*, обладая высокой адгезивной и инвазивной активностью, прикрепляется к эпителиальным клеткам, проникает в них, а на более поздних, при сохранении выраженной способности к адгезии и постепенном снижении инвазивности, выходит из клеток и формирует биопленку; высокий адгезивно-инвазивный потенциал не продуцирующих токсин штаммов коринебактерий способствует развитию острого воспалительного процесса в респираторном тракте; уровень и характер цитопатического действия планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на культуре клеток СНО-К1 различен: у планктонных культур цитопатическое действие более выражено и проявляется истончением и удлинением клеток, у биопленочных – менее выражено и характеризуется округлением клеток; под воздействием факторов врожденного и адаптивного иммунитета у больных с манифестированными формами дифтерии адгезивная активность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* понижается, тогда как у бактерионосителей, напротив, повышается (в 1,5-2 раза), что предрасполагает к формированию биопленки и уменьшению выделения токсина за ее пределы; установлен подавляющий (в десятки и сотни раз) дозозависимый эффект азоксимера бромиды на адгезивные и инвазивные свойства планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

**применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования:** бактериологических (изучены морфологические, культуральные, ферментативные, токсигенные и др. свойства планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*), физико-химических (электрофорез белков в полиакриламидном геле и масс-спектрометрический метод с идентификацией

белков по наборам значений масс пептидов), молекулярно-биологических (ПЦР), культуральных (адгезивные и инвазивные свойства планктонных и биопленочных культур штаммов коринебактерий определяли на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2, цитопатического действия - на клеточной линии СНО-К1), микроскопических (световая, люминесцентная и электронная микроскопии) иммунологических (иммуноферментный анализ для определения противодифтерийных антибактериальных и антитоксических антител, лактоферрина и антител к лактоферрину, определение количества С3- и С4-компонентов системы комплемента);

**изложен** факт выраженной антиадгезивной активности азоксимера бромиды в отношении не только планктонных, но и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на клетках карциномы фарингеального эпителия Нер-2, который позволяет рассматривать его как препарат для неспецифической профилактики и терапии дифтерии на ранних стадиях патологического процесса;

**раскрыта** характеристика роли адгезивно-инвазивного потенциала нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* и недифтерийных коринебактерий для установления их этиологической значимости в развитии патологического процесса;

**изучена** роль адгезивно-инвазивного потенциала токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в развитии патологического процесса при дифтерии.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

**разработаны и внедрены** сведения о факторах патогенности коринебактерий (адгезивность, инвазивность, цитопатическое действие) для характеристики патогенных свойств коринебактерий в лабораторию клинической микробиологии МБУЗ «Городская больница № 20 города Ростова-на-Дону» (Акт внедрения от 18.06.2020 г.) – Межведомственный уровень внедрения;

в бактериологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» используются данные, характеризующие адгезивно-инвазивный потенциал нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* и недифтерийных коринебактерий для установления их этиологической значимости в развитии патологического процесса (Акт внедрения ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» от 15.06.2020 г.) – Межведомственный уровень внедрения;

**определены** перспективы для практического использования сведений о факторах патогенности коринебактерий (адгезивность, инвазивность, цитопатическое действие) для характеристики патогенных свойств коринебактерий, а также возможность использования характеристики адгезивно-инвазивного потенциала нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* и недифтерийных коринебактерий для установления их этиологической значимости в развитии патологического процесса;

**создан** «Способ отбора пациентов в группу риска по развитию фолликулярной ангины» (патент на изобретение РФ «Способ отбора пациентов в группу риска по развитию фолликулярной ангины» № 2672862 от 20.11.2018 г.);

**представлено** предложение по использованию азоксимера бромида# как препарата для неспецифической профилактики и терапии дифтерии на ранних стадиях патологического процесса;

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

**результаты** получены на сертифицированном оборудовании, воспроизводимость результатов проверена в различных условиях с необходимым количеством повторов;

**идея** диссертационного исследования об определении роли адгезии токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в патологическом процессе при дифтерии и способов ее подавления опирается на анализ имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, обобщении опыта ведущих исследовательских групп по изучению адгезивных и инвазивных свойств штаммов *C. diphtheriae*;

**использовано** сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по проблеме адгезии токсигенных штаммов *C. diphtheriae*;

**установлена** частичная корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными независимых зарубежных авторов, в части - адгезивно-инвазивного потенциала токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и его роли в формировании патологического процесса;

**использованы** современные методы получения и обработки информации, анализ полученных результатов проводили с использованием программы Statistica #

