

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 05.02.2016 г. №1

о присуждении Калмантаевой Ольге Валериевне, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Антибактериальное и иммуномодулирующее действие наночастиц серебра, углеродных нанотрубок на модели здоровых и инфицированных *Mycobacterium tuberculosis* мышей» по специальностям 03.02.03 – микробиология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 02.12.2015 г., протокол № 18 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 Калмантаева Ольга Валериевна 1986 года рождения. В 2008 г. окончила Воронежский государственный аграрный университет им. К.Д. Глинки по специальности «ветеринария», в 2010 г. окончила магистратуру Пущинского государственного университета по специальности «биология» с присвоением степени магистра биологии, в 2013 г. окончила аспирантуру 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, работает научным сотрудником сектора инфекционной иммунологии отдела иммунобиохимии

патогенных микроорганизмов Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Диссертация выполнена в секторе инфекционной иммунологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Научный руководитель – кандидат биологических наук Фирстова Виктория Валерьевна, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, сектор инфекционной иммунологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов, заведующая сектором.

Научный консультант – доктор биологических наук Потапов Василий Дмитриевич, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, отдел подготовки и усовершенствования специалистов, заведующий отделом.

Официальные оппоненты:

Афанасьев Станислав Степанович, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, заместитель директора по медицинской биотехнологии, и

Черноусова Лариса Николаевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Федеральное агентство

научных организаций, заведующая отделом микробиологии, дали положительные отзывы о диссертации.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург, в своем положительном заключении, подписанном Котомцевым Вячеславом Владимировичем, доктором биологических наук, профессором, старшим научным сотрудником лаборатории диагностических и экспериментальных методов исследования, указала, что диссертация является законченным научно-квалификационным исследованием, решающим актуальную научную задачу оценки антибактериального, иммуномодулирующего и токсического действия наночастиц серебра и углеродных нанотрубок, а также их противотуберкулезной активности на мышинной модели хронического туберкулеза. Эта задача в своих микробиологических и биотехнологических аспектах представляет существенный интерес для соответствующих разделов биологии. Результаты научного труда представляются достоверными, степень их исследовательской значимости соответствует уровню кандидатской диссертации. По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертация соответствует требованиям, установленным в п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., а ее автор – Калмантаева О.В. - заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – микробиология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Соискатель имеет 14 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 11 работ, в том числе опубликованных в рецензируемых научных изданиях - 3 статьи; 8 работ, опубликованные в материалах научных конференций и симпозиумов и 2 методические рекомендации. Авторский вклад Калмантаевой О.В. в написание научных работ составляет 75 %.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Фирстова, В.В. Влияние углеродных нанотрубок на жизнеспособность спленоцитов и субпопуляционный состав лимфоцитов мышей линии BALB/C в зависимости от пути их проникновения в организм / В.В. Фирстова, В.Д. Потапов, В.Н. Герасимов, **О.В. Полежаева**¹, Е.В. Зырина // **Здоровье населения и среда обитания.** – 2011. – № 5 (218). – С. 40-43.

2. **Калмантаева, О.В.** Особенности воздействия наночастиц серебра на иммунную систему мышей в зависимости от пути введения / **О.В. Калмантаева**, В.В. Фирстова, В.Д. Потапов, Е.В. Зырина, В.Н. Герасимов, Е.А. Ганина, В.А. Бурмистров, А.В. Борисов // **Российские нанотехнологии.** – 2014. – Т. 9, № 9-10. – С. 78-82.

3. Фирстова, В.В. Использование методов цитометрии для оценки специфического клеточного иммунитета / В.В. Фирстова, **О.В. Калмантаева**, П.Х. Копылов, А.А. Горбатов, В.М. Павлов, С.А. Иванов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // **Российский иммунологический журнал.** – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (2). – С. 120-122.

На диссертацию и автореферат поступили положительные отзывы от: (1) доктора медицинских наук, профессора **Куличенко Александра Николаевича**, директора Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора и кандидата биологических наук **Пономаренко Дмитрия Григорьевича**, и.о. заведующего лабораторией бруцеллеза того же учреждения, г. Ставрополь - без замечаний; (2) доктора медицинских наук **Бугорковой Светланы Александровны**, заведующей отделом иммунологии Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора и доктора медицинских наук, профессора **Щуковской Татьяны Николаевны**, главного научного сотрудника отдела иммунологии того же учреждения, г. Саратов - без замечаний; (3) кандидата биологических наук **Фрейлихман Ольги Александровны**, научного сотрудника лаборатории зооантропонозных инфекций Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора, г. Санкт-

¹ Фамилия Калмантаевой О.В. до 2011 года.

Петербург - без замечаний; (4) доктора биологических наук, профессора **Шульгиной М.В.**, заместителя директора научно-исследовательского института медицинской микологии имени П.Н. Кашкина Северо-западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург - без замечаний; (5) доктора биологических наук **Фахруллина Равиля Фаридовича**, старшего научного сотрудника междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» Казанского (Приволжского) федерального университета Минобрнауки, г. Казань - содержит **замечания**: «В разделе Выводы первый пункт является констатацией общеизвестных фактов, не являющейся оригинальным результатом О.В. Калмантаевой. Фактически, О.В. Калмантаева воспроизвела ранее опубликованные исследования, что является важным этапом подготовительной части работы (характеристика свойств использованных в работе наноматериалов), но никак не является Выводом собственных исследований О.В. Калмантаевой»; «В работе используется понятная для специалистов «жаргонная» формулировка – «наночастицы без покрытия». Однако эта формулировка неточна, так как в работе были использованы наночастицы серебра, стабилизированные (покрытые) цитрат-ионами»; «Автору следовало бы указать на микрофотографиях (рис. 5 автореферата) шкалу размера. Кроме того, указанное увеличение на рис. 5 (40x) не соответствует действительности, скорее всего увеличение на данной микрофотографии – 400x»; а также **вопросы**: «Каков механизм проникновения наночастиц из легких в селезенку и как Вы оцениваете эффективность этого процесса (скорее всего, существенная часть наночастиц при транспорте будет потеряна)?»; «Как Вы оцениваете клинические перспективы применения неорганических наночастиц для лечения туберкулеза?»; (6) доктора биологических наук **Ромашова Бориса Витальевича**, зав. кафедрой паразитологии и эпизоотологии факультета ветеринарной медицины и технологии животноводства Воронежского государственного аграрного университета им. Императора Петра I, кандидата ветеринарных наук Скогорева Анны Михайловны, доцента той же кафедры; кандидата ветеринарных наук

Манжуриной Ольги Алексеевны, доцента той же кафедры, г. Воронеж – без замечаний.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор Афанасьев С.С. является компетентным специалистом в сфере микробиологии, биотехнологии и иммунологии и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Калмантаевой О.В. (Росс. Иммунол. Журн. – 2011. – Т.5. – №2 (14). – С. 145-149; Иммунол. – 2012. – Т.33. – №. 5 – С. 255-259; Иммунопатол. Аллергол. Инфектол. – 2012. – № 1. – С. 27-36; Эффективная фармакотерапия. – 2013. – №27. – С. 6-11; Практ. Фитотер. – 2013. – №4. – С. 4; Физиол. Патол. Иммунол. Сист. – 2013. – Т.17. – №4. – С. 3-10; Клин. Лаб. Диагност. – 2013. – №9. – С.75; Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 2013. – № 5. – С. 53-60; Журн. научных статей Здоровье и образование в XXI веке. – 2014. – Т.16. – № 4. – С.40-42; Инфекция и иммунитет. – 2014. – С. 44), доктор биологических наук, профессор Черноусова Л.Н. является специалистом в области иммунологии и микробиологии туберкулеза и имеет научные публикации в сфере исследований диссертации Калмантаевой О.В. (Туб. Бол. Легк. – 2011. – Т. 88. – № 10. – С. 063-067; № 5. – С. 60-61; Биофармац. Журн. – 2011. – Т. 3. – № 2. – С. 19-27; Inf. Genet. Evol. – 2012. – Т. 12. – № 4. – С. 838-845; Росс. Иммунол. Журн. – 2012. – Т. 6. – № 2 (15). – С. 184-193; Вестн. Росс. Акад. Мед. Наук. – 2012. – № 11. – С. 9-14; Тонк. Хим. Технол. – 2013. – Т. 8. – № 5. – С. 72-76; Фтизиатр. Пульмонол. – 2013. – № 2 (7). – С. 34-35; Tuberculosis. - 2015. - Т. 95. - № 5. - С. 608-612).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области диагностики и лечения туберкулеза, организации противотуберкулёзной службы и мониторинга эпидемиологической ситуации на территории курации, изучения различных клинических форм туберкулёза, применения и разработки новых лекарственных препаратов и лечебно-диагностических технологий, изучения биологических свойств микобактерий туберкулёза и их влияния на макроорганизм, а также наличием публикаций (Фтиз. Пульмонол. – 2011.– № 2. – С. 156; Туб. Бол. Легк. – 2011. – Т. 88. – № 4. – С. 137-138; Фтизиатр. Пульмонол. – 2011. – № 2. – С. 157-158; Туб. Бол. Легк. –

2012. – Т. 89. – № 6. – С. 014-020; Урал. Мед. Журн. – 2013. – № 2 (107). – С. 155-160; Мед. альянс. – 2013. – № 4. – С. 41-52; Туб. Бол. Легк. – 2013. – Т. 90. – № 9. – С. 054-063; Фундамент. Исслед. – 2014. – № 9-11. – С. 2452-2455; Мед. альянс. – 2014. – № 3. – С. 39-58; Туб. Бол. Легк. – 2015. – № 2. – С. 12-19).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана схема комплексной оценки антибактериальных и иммунотоксических свойств наночастиц с использованием различных биологических моделей (клеточные культуры, животные модели, в том числе модель хронического туберкулеза);

предложено ингаляционное использование препарата наночастиц серебра с поливинилпирролидоном в профилактических и терапевтических противотуберкулезных мероприятиях;

доказана зависимость иммуномодулирующего действия наночастиц серебра с поливинилпирролидоном от способа их введения: ингаляционное и внутрижелудочное введение данных наночастиц не вызывает изменения иммунологических показателей и патоморфологических нарушений в органах животных, а подкожное введение данных наночастиц снижает процентное содержание лимфоцитов в селезенке, увеличивает в 3,6 раза относительное количество ИФН- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке и в 1,7 раза содержание ИФН- γ в сыворотке крови мышей;

введены новые представления о том, что наночастицы серебра сополивинилпирролидоном имеют антимикобактериальные и иммуномодулирующие свойства: ингаляционное введение данных наночастиц мышам, больным туберкулезом, обеспечивает снижение обсемененности органов животных *M. tuberculosis* на два порядка, и наблюдается снижение количества белка в жидкости бронхо-легочного лаважа в два раза, восстановление баланса цитокинов и соотношение популяций лимфоцитов в селезенке, а также усиление бактерицидного потенциала нейтрофилов;

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения об особенностях антибактериальной активности и иммуномодулирующего действия наночастиц серебра и углеродных нанотрубок в зависимости от способа их поступления в организм, что вносит вклад в расширение представлений о свойствах наночастиц;

применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, то есть с получением обладающих новизной результатов) использованы микробиологические методы (культивирование микроорганизмов, определение количества колониеобразующих единиц (КОЕ), выделение и идентификация бактерий), биологические методы (определение на мышинной модели туберкулезной инфекции противотуберкулезного эффекта наночастиц серебра, определение на мышинной модели иммунотоксических свойств наночастиц в зависимости от способа их введения в организм), методы первичной культуры эукариотических клеток *in vitro*, иммунологические методы (цитометрические методы, иммуноферментный анализ, хемилюминесцентный метод, МТТ-тест); гистологические методы (исследование органов мышей); микроскопические методы (электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия);

изложены результаты исследования цитотоксического действия наночастиц серебра и углеродных нанотрубок на иммунокомпетентные клетки мышей *in vitro*; показано, что наночастицы серебра с поливинилпирролидоном, в концентрациях от 0,05 до 50 мг/л не оказывают цитотоксического действия на иммунокомпетентные клетки мышей, а наночастицы серебра без полимера и углеродные нанотрубки снижают жизнеспособность и функциональную активность иммунных клеток;

раскрыты новые свойства наночастиц серебра с поливинилпирролидоном (коммерческий препарат «Арговит»): бактерицидная активность против *M. tuberculosis* и иммуномодулирующее действие препарата на лимфоцитарное и фагоцитарное звенья иммунитета мышей;

изучен и установлен дозозависимый характер бактерицидного действия наночастиц серебра в отношении штаммов *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Salmonella* Enteritidis 4412;

проведена модернизация методов обработки животных наночастицами, а также методов определения иммунотоксичности препаратов.

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

разработан и внедрен аэрозольный метод применения суспензии наночастиц серебра для снижения концентрации *M. tuberculosis* в легких больных хроническим туберкулезом животных (Методические рекомендации «Порядок работы с аэрозолями наночастиц и микроорганизмов (с использованием установки Глас-Кол модели 099С А4224» одобрены Ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ и утверждены директором ФБУН ГНЦ ПМБ 20.09.2012 г., протокол № 7) - учрежденческий уровень внедрения; Акт внедрения результатов диссертационного исследования ФБУН ГНЦ ПМБ №5 от 25.09.2015 г.);

определен алгоритм оценки воздействия наноматериалов на функцию иммунитета (Методические рекомендации «1.2.0052-11. Оценка воздействия наноматериалов на функцию иммунитета» – М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011 г. – 42 с., утвержденные и введенные в действие Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 29.12.2011 г.) - федеральный уровень внедрения;

создан цикл лекций «Основы общей токсикологии наноматериалов», который используется в магистерской образовательной программе «Нанобиобезопасность» Пущинского государственного естественно-научного института (ПущГЕНИ) (Акт о практическом применении результатов диссертационного исследования Пущинского государственного естественно-научного института №05-01-10/65 от 29.09.2015 г.) – межведомственный уровень внедрения;

представлены материалы для использования в образовательной программе Института физико-технической информатики на кафедре физико-технической информатики, г. Протвино Московской области (Акт об использовании

результатов диссертационной работы №1201/01-к от 13.01.2016 г.) - межведомственный уровень внедрения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты исследования получены в экспериментах с использованием сертифицированного оборудования и программного обеспечения; при этом применены современные микробиологические, биологические, иммунологические, гистологические, микроскопические методы, а также методы статистической обработки данных;

идея диссертационного исследования базируется на анализе имеющихся в литературе данных об антибактериальном действии наночастиц серебра и углеродных нанотрубок; результатах исследований патогенеза туберкулеза и актуальности поиска альтернативных противотуберкулезных препаратов; токсикологической оценке наночастиц и ограниченности знаний о воздействии наночастиц на иммунную систему;

использовано сравнение авторских данных с опубликованными ранее в научной литературе относительно антимикробного действия наночастиц серебра и углеродных нанотрубок на бактерии рода *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*; токсического действия на клеточные культуры в экспериментах *in vitro* и лабораторных животных, в зависимости от размера, строения, дозы и способа введения;

установлено совпадение полученных автором результатов (по более высокой чувствительности грамотрицательных бактерий к наночастицам серебра; токсическому действию наночастиц серебра в результате окислительного стресса фагоцитов *in vitro*; токсическому действию углеродных нанотрубок) с опубликованными ранее в научной литературе данными других авторов;

использованы современные методы получения и обработки информации.

Личный вклад соискателя состоит в:

планировании и выполнении экспериментов *in vitro* по получению и культивированию фагоцитов и лимфоцитов, цитометрических исследований,

спектрофотометрических измерений, иммуноферментного анализа, атомно-силовой микроскопии, хемилюминесценции, статистической обработке, анализе и интерпретации результатов, а также в подготовке научных публикаций по результатам исследований. Автор принимала участие в планировании и проведении экспериментов совместно с сотрудниками лаборатории аэроббиологических испытаний: зав. лабораторией Потаповым В.Д., н.с. Грищенко Н.С., н.с. Рудницкой Т.И. по формированию хронического туберкулеза у мышей и определению антимикобактериальной активности наночастиц. Электронные микрофотографии наночастиц получены и охарактеризованы совместно с сотрудниками отдела электронной микроскопии зав. лабораторией д.б.н. Герасимовым В.Н. Гистологические исследования органов проводили совместно с сотрудником отдела иммунобиохимии н.с. Ганиной Е.А.

На заседании 05.02.2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Калмантаевой О.В. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 8 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология и 8 докторов наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 17, против нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель
диссертационного совета _____ (Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета _____ (Фурсова Надежда Константиновна)



Дата оформления Заключения – 05.02.2016 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.