

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01,
СОЗДАННОГО 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 26.05.2023 г. № 10

о присуждении Карцевой Алене Сергеевне, гражданину РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Механизмы иммунитета при экспериментальной туляремии на мышинной модели» по специальностям 1.5.6. Биотехнология и 1.5.11. Микробиология принята к защите 23.03.2023 г. (протокол заседания № 5) диссертационным советом 64.1.002.01, созданным 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., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Карцева Алена Сергеевна, 1992 г. рождения, в 2015 году окончила Биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Челябинский государственный университет». В 2020 г. окончила очную аспирантуру в Федеральном бюджетном учреждении 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 лаборатории молекулярной биологии в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярной биологии 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.

Научный руководитель – доктор биологических наук (3.2.7. Аллергология и иммунология) Фирстова Виктория Валерьевна, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория молекулярной биологии, главный научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Павлович Наталья Владимировна, доктор медицинских наук (1.5.11. Микробиология), Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ростов-на-Дону, лаборатория туляремии, ведущий научный сотрудник,

Саяпина Лидия Васильевна, доктор медицинских наук (1.5.11. Микробиология) Федеральное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, управление экспертизы противобактериальных иммунобиологических препаратов, главный эксперт,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, г. Иркутск, в своем положительном отзыве, подписанном Дубровиной Валентиной Ивановной, доктором биологических наук, заведующей лабораторией патофизиологии, указала, что работа Карцевой Алены Сергеевны на тему «Механизмы

иммунитета при экспериментальной туляремии на мышинной модели», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6. Биотехнология и 1.5.11. Микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, связанной с определением клеточных механизмов иммунитета при экспериментальной туляремии на мышинной модели. Представленные на защиту положения диссертации можно квалифицировать как научное достижение в современной биотехнологии и микробиологии. По актуальности, методическому уровню, научной новизне полученных результатов, их практической значимости диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Карцева Алена Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6. Биотехнология и 1.5.1. Микробиология.

Соискатель имеет **68** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **17** работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **3** работы, **1** База данных, **1** работа в других изданиях и **12** тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций. Общий объем работ – 33,6 п. л. Недостоверных сведений в опубликованных работах не содержится. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Карцева, А.С.** Характеристика иммуногенных и протективных свойств модифицированных вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ / **А.С. Карцева**, О.В. Калмантаева, М.В. Силкина, Т.И. Комбарова, В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2020. – №3. – С. 62-69. Scopus, SJR = 0,216, Цит. 2.

2. **Карцева, А.С.** Выбор критериев оценки протективного иммунитета в разные сроки экспериментальной туляремии на мышинной модели /

А.С. Карцева, Г.М. Титарева, А.Н. Мокриевич, Т.И. Комбарова, Г.М. Вахрамеева, Р.И. Миронова, Т.Б. Кравченко, М.В. Силкина, В.М. Павлов, В.В. Фирстова // Биотехнология. – 2021. – Т. 37 – № 4. – С. 65-77. Scopus, SJR = 0,139, Цит. 1.

3. **Карцева, А.С.** Влияние вакцинации штаммами *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и его производными на генерацию и функциональную активность Т-клеток памяти у мышей / **А.С. Карцева**, М.В. Силкина, Г.М. Титарева, Г.М. Вахрамеева, Т.И. Комбарова, Р.И. Миронова, В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова // Биотехнология. – 2022. – Т. 38 – № 3. – С. 49-61. Scopus, SJR = 0,139, Цит. 0.

4. **Карцева, А.С.** Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/c / **А.С. Карцева**, М.В. Силкина, И.Г. Говорунов, В.В. Фирстова, О.В. Калмантаева // База данных № 2020621186 от 10.07.2020 г.

На диссертацию и автореферат поступило 7 положительных отзывов без замечаний от: (1) канд. биол. наук **Андреевой Светланы Владимировны**, доцента кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета, г. Челябинск; (2) д-ра биол. наук **Кравцова Александра Леонидовича**, ведущего научного сотрудника отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», г. Саратов; (3) канд. биол. наук **Тихонова Сергея Николаевича**, директора Противочумной станции Республики Крым, г. Симферополь; (4) Заслуженного деятеля науки России, члена-корреспондента РАН, профессора, д-ра мед. наук **Костинова Михаила Петровича**, заведующего лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, г. Москва; (5) канд. биол. наук **Хромовой Елены Борисовны**, биолога клинической диагностической лаборатории Областной клинической больницы №2, г. Челябинск; (6) канд. мед. наук **Басова Артема Александровича**, руководителя лаборатории эпиднадзора за дифтерией и коклюшем Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского, г. Москва; (7) академика РАН, д-ра мед. наук, профессора **Куличенко Александра Николаевича**, директора Ставропольского научно-исследовательского противочумного института и канд. биол. наук **Пономаренко Дмитрия Григорьевича**, заведующего лабораторией бруцеллёза с сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний того же учреждения, г. Ставрополь.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор медицинских наук, **Павлович Наталья Владимировна** является признанным специалистом в области микробиологии и лабораторной диагностики особо опасных инфекций, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Карцевой А.С. (**Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2021. – № 3. – С. 134-140; 2021. – № 4. – С. 6-15; **Антибиот. Химиотер.** – 2019. – Т. 64. – № 7-8. – С. 8-12; **Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. Овчинн.** – 2019. – Т. 15. – № 1. – С. 42-46; **Инф. Иммуно.** – 2019. – Т. 9. – № 2. – С. 262-272; **Наука Юга Рос.** – 2020. – Т. 16. – № 1. – С. 77-87; **Здор. Насел. Среда Обитан.** – 2021. – Т. 29. – № 12. – С. 64-71; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2022. – Т. 99, № 2. – С. 103-202);

доктор медицинских наук **Саяпина Лидия Васильевна** является признанным специалистом в сфере микробиологии и вакцинопрофилактики особо опасных инфекций, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Карцевой А.С. (**Биопреп. Проф. Диагн. Леч.** – 2021. – Т. 21. – № 4. – С. 234-243; **Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2018. – № 1. – С. 98-102; 2018. – № 3. – С. 40-45; 2020. – № 1. – С. 69-75; 2020. – № 2. – С. 91-97; **Vaccines.** – 2019. – Т. 7. – № 2. – С. 36; **Иммунология** – 2018. – Т. 39. – № 5-6. – С. 299-304; **Биопреп. Проф. Диагн. Леч.** – 2018. – Т. 18. – № 1. – С. 42-49; **PLoS Negl. Trop. Dis.** – 2018. – Т. 12. – № 6. – С. e0006511).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области изучения природно-очаговых инфекций, разработки специфических средств их профилактики, диагностики и лечения, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Карцевой А.С. (**Бюл. эксп. биол. и мед.** – 2022. – Т. 173. – № 1. – С. 66-70; **Пед. Журн. им. Г.Н. Сперанского.** – 2022. – Т. 101. – № 3. – С. 85-97; **Эпидемиол. Вакцинопроф.** – 2021. – Т. 20. – № 2. – С. 12-17; 2022. – Т. 21. – № 5. – С. 49-57; **Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2022. – № 1. – С. 6-14; 2022. – № 3. – С. 145-150; **Бюл. эксп. биол. и мед.** – 2020. – Т. 169. – № 4. – С. 468-471; 2021. – Т. 171. – № 5. – С. 628-632; **Сан. врач.** – 2021. – № 8. – С. 69-74; **Acta Biomed. Scient.** – 2019. – Т. 4, № 5. – С. 31-37; 2021. – Т. 6, № 2. – С. 41-46; 2021. – Т. 6, № 3. – С. 60-69; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2019. – № 4. – С. 25-31), а также наличием ученых, являющихся авторитетными специалистами по теме диссертации Карцевой А.С.

Диссертационный совет отмечает, что, на основании выполненных соискателем исследований:

разработан методический подход к оценке поствакцинального иммунитета доказывающий, что использованные в работе новые штаммы с модификациями генома *Francisella tularensis* (в генах *iglC*, *recA* и *sodB*) обеспечивают напряженность и длительность иммунитета у мышей линии BALB/c на уровне, сравнимом с исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ;

предложено рассматривать снижение уровня TNF- α в сыворотке крови мышей как один из критериев оценки реактогенности новых штаммов *F. tularensis* с модификацией генома, по сравнению с исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ;

доказано, что продолжительность 100 % защиты мышей линии BALB/c, иммунизированных аттенуированными штаммами *Francisella tularensis*, от заражения природными штаммами *F. tularensis*, различается в зависимости от подвидовой принадлежности последних: 30 суток для подвида *tularensis* и 180 суток – для подвида *holarctica*;

введены новые представления о ранних этапах формирования противотуляремийного иммунитета у мышей линии BALB/c; использование туляремийных штаммов с модификацией генома позволило выявить механизм снижения реактогенности по цитокиновому профилю сыворотки и изменению уровней экспрессий 5 маркеров активации на поверхности лимфоцитов (CD69, CD25, CD30, CD28 и CD86).

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказана значимость делеций генов *iglC* и *recA* и модификации гена *sodB* в снижении реактогенности штаммов *F. tularensis*, выявленная по изменению цитокинового профиля сыворотки крови мышей линии BALB/c после иммунизации аттенуированными штаммами, установлена роль различных субпопуляций Т-клеток памяти в формировании длительного протективного иммунитета в отношении природных штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis* и *holarctica*.

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: микробиологических (получение единичных колоний культур штаммов *F. tularensis* на плотной питательной среде, определение обсемененности

селезенки иммунизированных и интактных мышей после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu), биотехнологических (получение антигенов *F. tularensis*), биологических (иммунизация и моделирование туляремийной инфекции на мышах линии BALB/c, взятие органов и цельной крови у мышей, оценка вирулентности аттенуированных штаммов на модели мышей), иммунологических (иммуноферментный анализ, иммунохимический мультиплексный анализ профиля цитокинов с использованием системы «Bio-plex»), методов проточной цитометрии (анализ субпопуляционного состава и функциональной активности лимфоцитов), статистических (анализ экспериментальных данных с помощью программы GraphPad Prism версии 6.00);

изложена идея применения клеточных тестов при изучении иммунопротективных свойств потенциальных туляремийных вакцинных штаммов, основанных на выявлении антиген-индуцированной функциональной активности эффекторных и центральных Т-клеток памяти по уровню экспрессии маркера активации CD69 и синтеза IFN- γ и TNF- α , что позволяет рассматривать повышение данных иммунологических параметров в качестве маркеров протективной эффективности иммунизации у мышей;

раскрыты механизмы формирования протективного иммунитета при экспериментальной туляремии у мышей, обусловленные длительностью сохранения и функциональной активностью центральных и эффекторных Т-клеток памяти;

изучено влияние иммунизации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными вариантами *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA на индукцию синтеза 32 цитокинов (Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, RANTES, TNF- α и VEGF) у мышей линии BALB/c в раннюю фазу иммунного ответа;

проведена модернизация комплексного подхода в изучении Т-клеточного иммунного ответа у мышей, включая определение длительности сохранения центральных и эффекторных Т-клеток памяти после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis*, позволяющая раскрыть механизм

формирования протективного иммунитета в отношении природных штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis* и *holarctica*.

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

разработаны и внедрены: иммунологические критерии оценки протективной эффективности противотуляремийных вакцин на основе аттенуированных штаммов *F. tularensis* (Акт внедрения лаборатории микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ПМБ от 23.01.2023 г.) – учрежденческий уровень внедрения;

материалы для учебной программы дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при ФБУН ГНЦ ПМБ (справка от 10.01.2023 г.) – учрежденческий уровень внедрения;

материалы для подготовки кадров высшей квалификации (аспирантуры) по направлению 1.5 - Биологические науки, профиль 1.5.11 - Микробиология (справка №82 от 12.01.2023 г.) – учрежденческий уровень внедрения;

определены перспективы использования результатов диссертационного исследования: для оценки долгосрочного поствакцинального протективного иммунитета при туляремии на мышинной модели рекомендуется проводить анализ функциональной активности эффекторных и центральных Т-клеток памяти в отдаленные сроки после иммунизации; предложенные иммунологические критерии оценки протективного противотуляремийного иммунитета могут быть использованы для скрининга новых потенциальных вакцинных штаммов.

создана база данных «Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/с» (свидетельство №2020621186 от 10.07.2020 г.) – федеральный уровень внедрения;

представлены сведения о протективных свойствах рекомбинантных штаммов *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA, обеспечивающих защиту мышей линии BALB/с от заражения природными штаммами *F. tularensis* подвидов *tularensis* и *holarctica*, а также о способности мутантных штаммов индуцировать функциональную активность Т-клеток

памяти в разные сроки после иммунизации на мышинной модели, что показало перспективность дальнейших клинических испытаний аттенуированных штаммов в качестве потенциальных вакцинных препаратов для профилактики туляремии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты получены на сертифицированном и прошедшем проверку оборудовании, воспроизводимость результатов подтверждена проведением серии независимых экспериментов и их статистической обработкой;

идея диссертационного исследования о клеточных механизмах, обуславливающих формирование протективного иммунитета после вакцинации мышей аттенуированными штаммами *F. tularensis* базируется на анализе имеющихся в научной литературе данных отечественных и зарубежных исследователей о конструировании штаммов с генетически направленными мутациями, обобщении знаний специалистов в области изучения иммунного ответа против *F. tularensis*, а также корреляции между защитой организма от *F. tularensis* и функциональной активностью центральных и эффекторных Т-клеток памяти, заключающейся в экспрессии маркера активации CD69 и синтезе IFN- γ и TNF- α .

установлено, что использованные в работе модификации генома *F. tularensis* (в генах *iglC*, *recA* и *sodB*) не влияют на напряженность и длительность иммунитета у мышей линии BALB/c, но при этом снижают реактогенность рекомбинантных штаммов *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ *recA*, по сравнению с исходным вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, о чем свидетельствует снижение уровня TNF- α в сыворотке крови мышей на 3-5 сутки после иммунизации примерно в ~ 4 -5 раз;

использованы современные методы обработки информации: систематизация исходной информации, визуализация полученных результатов и статистическая обработка результатов при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 6.00.

Личный вклад соискателя состоит в анализе литературных данных, разработке дизайна научного исследования, выполнении микробиологических, биологических, иммунологических, цитометрических исследований, в

статистическом анализе полученных результатов и подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и постерных докладов на конференциях.

Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной цели и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследования, непротиворечивой методологической платформы, концептуальности и взаимосвязи выводов.

На заседании 26.05.2023 г. диссертационный совет пришел к выводу о том, что диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, которая соответствует критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539), и принял решение присудить Карцевой Алене Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук за решение актуальной научно-практической задачи, связанной с определением клеточных механизмов иммунитета при экспериментальной туляремии на мышинной модели, которое может быть квалифицировано как научное достижение в современной биотехнологии и микробиологии.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **16** человек, из них **8** докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология и **7** докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология, участвовавших в заседании, из **23** человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **16**, против **0**, недействительных бюллетеней **нет**.

Председатель

диссертационного совета

академик РАН, д.м.н., профессор



(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь

диссертационного совета

к.б.н.

(Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 26.05.2023 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.