

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 МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО
РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 25.09.2015 г. № 10

о присуждении Зыриной Екатерине Витальевне, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Анализ иммуномодулирующего действия экстракта слюнных желез клещей *Ixodes persulcatus*» по специальностям 03.02.03 – микробиология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 19.06.2015 г., протокол № 8 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 Зырина Екатерина Витальевна 1978 года рождения. В 2000 г. соискатель окончила Вятский государственный педагогический университет по специальности «Биология-химия», 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 отделе 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 Бикетов Сергей Федорович, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, отдел иммунобиохимии патогенных микроорганизмов, заведующий отделом.

Научный консультант – доктор биологических наук Игнатов Сергей Георгиевич, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, отдел иммунобиохимии патогенных микроорганизмов, заведующий лабораторией нанобиотехнологии.

Официальные оппоненты:

Алешкин Андрей Владимирович, доктор биологических наук, Федеральное государственное 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, лаборатория клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов, главный научный сотрудник и

Нафеев Александр Анатольевич, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ульяновский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, медицинский факультет, профессор кафедры инфекционных и кожно-венерических болезней, дали положительные отзывы о диссертации профессор кафедры.

Ведущая организация Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной

службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном Платоновым Александром Евгеньевичем, доктором биологических наук, профессором, заведующим лабораторией эпидемиологии природно-очаговых инфекций, указала, что диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, которая соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., поскольку в ней, на основании проведенных автором исследований, решается задача оценки иммуномодулирующего действия экстракта слюнных желез *Ixodes persulcatus* на резистентность организма мышей к боррелиозной инфекции; эта задача в своих микробиологических и биотехнологических аспектах представляет существенный интерес для соответствующих разделов биологии.

Соискатель имеет 31 опубликованную работу, в том числе по теме диссертации 12 работ, в том числе опубликованных в рецензируемых научных изданиях - 3 статьи; 8 работ, опубликованные в материалах научных конференций и симпозиумов и 1 методические рекомендации. Авторский вклад Зыриной Е.В. в написание научных работ составляет 85 %.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Зырина, Е.В.** Иммуномодулирующее действие экстракта слюнных желез иксодовых клещей *Ixodes persulcatus* (Ixodidae) на лимфоциты мышей линии BALB/c в системе *in vitro* / **Е.В. Зырина**, В.В. Фирстова, А.В. Штанников, Г.М. Титарева, В.П. Гутова, И.С. Васильева, С.Ф. Бикетов // **Медицинская паразитология и паразитарные болезни**. - 2012. - № 4. С. 33- 35.

2. **Зырина, Е.В.** Применение рекомбинантных антигенов *Borrelia afzelii* в клеточных тестах *in vitro* для оценки специфического иммунного ответа на мышинной модели клещевого боррелиоза / **Е.В. Зырина**, А.В. Штанников, Е.А. Панферцев, Г.М. Титарева, В.В. Мочалов, В.В. Фирстова, И.Ю. Щит,

С.Ф. Бикетов // **Эпидемиология и вакцинопрофилактика**. 2013. - № 4 (71). С. 34-39.

3. **Зырина, Е. В.** Исследование иммунного ответа у мышей линии BALB/c при многократном питании на них клещей *Ixodes persulcatus* / **Е.В. Зырина, А.В. Штанников, И.С. Васильева, В.П. Гутова, В.В. Фирстова, О.Н. Перовская, С.Ф. Бикетов** // **Эпидемиология и вакцинопрофилактика**. 2013. - № 5 (72). С. 36-40.

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» и доктора медицинских наук, профессора **Щуковской Татьяны Николаевны**, главного научного сотрудника того же учреждения, г. Саратов - без замечаний; (3) доктора биологических наук **Ганушкиной Людмилы Алимпьевны**, заведующей отделом энтомологии Научно исследовательского института медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского Первого московского государственного медицинского университета, г. Москва - без замечаний; (4) кандидата биологических наук **Деминой Галины Рудольфовны**, научного сотрудника Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва - без замечаний; (5) доктора биологических наук **Зякуна Анатолия Марковича**, заведующего лабораторией масс-спектрометрии Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, г. Пущино - без замечаний; (6) доктора биологических наук **Захарчука Леонида Михайловича**, доцента кафедры микробиологии биологического факультета Московского

государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва - без замечаний; (7) доктора биологических наук **Ванштейна Михаила Борисовича**, заместителя директора Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук и кандидата биологических наук **Сузиной Натальи Егоровны**, старшего научного сотрудника того же учреждения, г. Пущино – содержит замечание: «Замечания к микробиологической части работы имеют характер пожеланий. В основном они сводятся к рекомендации расширить разнообразие изучаемых и проверяемых штаммов-возбудителей боррелиоза. В настоящей работе изучены два штамма, что, возможно, уменьшает универсальность разработанной вакцины».

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук Алешкин А.В. является компетентным специалистом в сфере микробиологии и биотехнологии и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Зыриной Е.В. (Вестник Российской академии медицинских наук. - 2010. - № 7. - С. 10-15; International Journal on Immunorehabilitation. - 2010. - Т. 12. - № 2. - С. 137-138; Вестник Российской академии медицинских наук. - 2011. - № 7. - С. 16-21; Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2012. - № 1. - С. 27-36; Glycoconjugate Journal. - 2013. - Vol. 30. - P. 370; Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2014. - № 3. - С. 21-27), доктор медицинских наук, профессор Нафеев А.А. является специалистом в области микробиологии и эпидемиологии природноочаговых инфекций, в том числе Лайм-боррелиоза и имеет научные публикации в сфере исследований диссертации Зыриной Е.В. (Клиническая медицина. - 2011. - Т. 89. - № 1. - С. 59-60; Клиническая лабораторная диагностика. - 2011. - № 5.- С. 52-53; Терапевтический архив. - 2012. - № 11. - С. 64-65; Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2013. - № 1. - С. 54-56; Здоровье населения и среда обитания. - 2014. - № 6. - С. 36-37; Жизнь без опасностей. - 2014. - Т. IX. - № 3. - С. 28-30).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области диагностики различных клещевых инфекций, мониторинга и прогноза заболеваемости природно-очаговыми трансмиссивными инфекциями, исследований клинических форм клещевого боррелиоза, а также наличием публикаций (Emerging Infectious Diseases. - 2011. - Vol. 17. - № 10. - P. 1816 - 1823; Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2013. - № 4 (71). - С. 14-20; Biosecur Bioterror. - 2013. - Vol. 11. - № 3. - P. 185-195; Emerging Infectious Diseases. - 2014. - Vol. 20. - № 7. - P. 1183-1190; Инфекционные болезни. - 2014. - Т. 12. - № 3. - С. 91-94; Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2014. - № 6 (79). - С. 46-50; Инфекционные болезни. - 2015. - Т. 13.- № 2. - С. 25-29;).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана схема сенсibilизации мышей повторными кормлениями клещей, обеспечивающая развитие у животных антиклещевого иммунитета, который может оказывать значительную защиту от боррелиоза при заражении через укус клеща *I. persulcatus*;

предложены компоненты слюны клещей *I. persulcatus* в качестве перспективных кандидатов в качестве протективных антигенов;

доказано иммуномодулирующее действие экстрактов слюнных желез голодных и частично насыщенных клещей вида *I. persulcatus*, которое проявляется в снижении продукции макрофагами мышей цитокинов IL-12, TNF- α и IL-10 и окиси азота (NO); изменении доли активированных лимфоцитов, экспрессирующих CD69, TLR-2, TLR-4 рецепторы; сдвиге направленности иммунного ответа (Th-1/Th-2) через изменение количества Т-хелперов, синтезирующих цитокины IFN- γ и IL-4;

введены новые представления о том, что рекомбинантный белок Salp15 слюнных желез *I. persulcatus* имеет иммуногенные и протективные свойства: иммунизация им мышей линии BALB/c индуцирует у животных развитие как

клеточного, так и гуморального иммунитета, который приводит к частичной защите животных от инфицирования боррелиями через зараженных клещей.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Доказаны положения, вносящие вклад в понимание патогенеза клещевых инфекций на начальных этапах взаимодействия переносчик-хозяин, на которых происходит проникновение и диссеминация боррелий, результаты проведенной работы полезны при разработке вакцин, принцип действия которых основан на блокировании процесса передачи возбудителя из организма переносчика в организм хозяина;

применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, то есть с получением обладающих новизной результатов) использованы микробиологические методы (культивирование микроорганизмов, выделение и идентификация бактерий), биологические методы (определение на модели боррелиозной инфекции на мышцах протективных свойств рекомбинантного белка Salp15 как компонента антиборрелиозной вакцины, протективного эффекта сформированного антиклещевого иммунитета и специфической активации лимфоцитов мышей в клеточном тесте для ранней диагностики *in vitro*), методы препаративной биохимии (получение рекомбинантных антигенов боррелий и белка слюны клещей Salp15, определение концентрации белков и определение активности генов *salp* слюнных желез клещей), методы первичной культуры эукариотических клеток *in vitro*, иммунологические методы (определение продукции макрофагами цитокинов и NO, иммуноферментный анализ и цитометрические методы);

изложены результаты исследования иммуногенных и протективных свойств рекомбинантного белка Salp15, позволяющие обосновывать возможность создания эффективных противоклещевых вакцин и рассматривать его как перспективный компонент антиборрелиозной вакцины;

раскрыты существенные особенности антигенных свойств слюны клещей *I. persulcatus* в результате определения уровня индукции гуморального и

клеточного ответа на экстракт слюнных желез у мышей линии BALB/c, подвергшихся повторным напускам клещей;

изучены иммуномодулирующие свойства экстрактов слюнных желез голодных и частично насыщенных клещей вида *I. persulcatus*;

проведена модернизация методов обнаружения ранней стадии боррелиоза на основе специфической активации лимфоцитов рекомбинантными антигенами DbpA и ВВК32 *B. Afzelii* Н13 в качестве дополнительных исследований для подтверждения диагноза.

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

разработана и внедрена методология оценки формирования антиклещевого иммунитета по критериям, которые основаны на изменении субпопуляционного состава лимфоцитов и гуморальном ответе на антигены слюны клещей (Методические рекомендации «Использование клеточных тестов для обнаружения ранней стадии боррелиоза», Оболенск, 2015) - учрежденческий уровень внедрения;

определены перспективы использования материалов диссертации, доложенные на четырех всероссийских и четырех международных конференциях;

созданы методические рекомендации, используемые в учебной Программе дополнительного профессионального образования «Лабораторная диагностика боррелиозов» при ФБУН ГНЦ ПМБ, утвержденной Ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ 26.09.2012 г., протокол № 8 – федеральный уровень внедрения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты исследования получены в репрезентативных экспериментах, с использованием сертифицированного оборудования и программного обеспечения; при этом применены современные методы микробиологии, препаративной биохимии, биологические и иммунологические методы, а также методы статистической обработки данных;

идея диссертационного исследования базируется на анализе имеющихся в литературе данных об иммуномодулирующем действии слюны иксодовых клещей на начальных этапах взаимодействия переносчик-хозяин, на которых происходит проникновение и диссеминация боррелий; результатах исследований патогенеза заболевания; разработке вакцин, принцип действия которых основан на блокировании процесса передачи возбудителя из организма переносчика в организм хозяина;

использовано сравнение авторских данных с опубликованными ранее в научной литературе, относительно иммуномодулирующего действия экстракта слюны клещей; антигенных свойств слюны клещей других видов, иммуногенных и протективных характеристик различных белков слюны клещей, перспективности использования клеточного теста, построенного на основе специфической активации лимфоцитов рекомбинантными антигенами боррелий в качестве дополнительных исследований для подтверждения диагноза ИКБ на ранней стадии болезни;

установлено совпадение полученных автором результатов (по иммуномодулирующему действию слюнных желез *I. persulcatus*; развитию у мышей, подвергшимся повторным напускам клещей, антиклещевого иммунитета, который может в значительной степени защищать от боррелиоза при заражении через укус клеща; иммуногенному и протективному эффекту рекомбинантного белка слюны в виде частичной защиты мышей от заражения боррелиозом, показанному для клещей других видов и некоторых белков их слюны) с опубликованными ранее в научной литературе данными других авторов;

использованы современные методы получения и обработки информации.

Личный вклад соискателя состоит в:

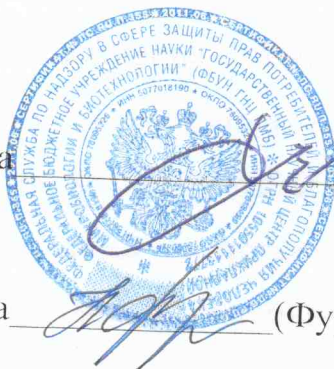
планировании и выполнении экспериментов *in vitro* по получению и культивированию лимфоцитов, цитометрических исследований, определению уровня специфических антител, спектрофотометрических измерений, статистической обработке, анализе и интерпретации результатов, а также в

подготовке научных публикаций по результатам исследований. Автор принимала участие в планировании и проведении экспериментов совместно с сотрудниками НИИ МПиТМ им. Е.И. Марциновского (с.н.с., к.б.н. Васильевой И.С. и лаборантом Гальченко С.С.) по сенсibilизации мышей путем кормления на них клещей, определении критериев формирования антиклещевого иммунитета. Рекомбинантные белки Salp15 *I. persulcatus*, DbpA и ВВК32 *B. afzelii* H13 получены и охарактеризованы совместно с сотрудниками отдела иммунобиохимии н.с. Решетняк Т.В., н.с. Реполовской Т.В., н.с. Мочаловым В.В., с.н.с., к.б.н. Панферцевым Е.А. Эксперименты по моделированию боррелиозной инфекции на мышцах (иммунизация животных, ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с целью определения концентраций ДНК боррелий в тканях инфицированных мышцей) проводили совместно с сотрудниками отдела иммунобиохимии с.н.с., к.б.н. Щит И.Ю. и зав.сектором, к.б.н. Штанниковым А.В.

На заседании 25.09.2015 г. диссертационный совет принял решение присудить Зыриной Е.В. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 10 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология и 7 докторов наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 18, против нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель
диссертационного совета



(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета

(Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 25.09.2015 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.