

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 208.046.02 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМ. Г.Н. ГАБРИЧЕВСКОГО» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 15 октября 2015 г. протокол № 3.

О присуждении Фирстовой Виктории Валерьевне, гражданке Российской Федерации ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Экспериментально-иммунологическое обоснование выбора стратегии оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии», по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» принята к защите 18.06.2015г., протокол № 3 диссертационным советом Д 208.046.02 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10). Диссертационный совет утвержден Приказом Министерства образования и науки РФ №714/нк «О совете по защите докторских и кандидатских диссертаций» от 2 ноября 2012 года, приказ № 219/нк от 5.03.2015г., част.изм.

Соискатель – Фирстова Виктория Валерьевна, 1968 года рождения. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Влияние чумного микроба и его антигенов на функционально-метаболическую активность электрокинетически гетерогенных субпопуляций фагоцитов» по специальностям: «03.00.07- микробиология» и «14.00.36 - аллергология и иммунология» защитила в 1998 году в диссертационном совете Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб». Работает в должности заведующей сектором инфекционной иммунологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертация выполнена в секторе инфекционной иммунологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный консультант: член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор Караулов Александр Викторович, Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии.

Официальные оппоненты: Пронин Александр Васильевич - доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Апарин Петр Геннадьевич - доктор медицинских наук, заведующий лабораторией полисахаридных вакцин Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства; Рубальский Олег Васильевич - доктор медицинских наук, профессор, проректор по научной и инновационной работе Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» – в своем положительном заключении, подписанном Костиновым Михаилом Петровичем, доктором медицинских наук, профессором, заведующим лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний, указала, что диссертация является целостным, законченным научно-квалификационным трудом, результатом которого явилось решение актуальной народно-хозяйственной проблемы – повышение эффективности оценки коллективного поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии, позволяющее усилить мероприятия по обеспечению биобезопасности населения.

Соискатель имеет 80 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 35 работ, из которых 14 статей опубликованы в рецензируемых научных изданиях, 7 статей цитируемых PubMed, 1 монография, 1 руководство и 19 тезисов – в материалах международных и всероссийских конгрессов и конференций, общим объемом 383 страницы с авторским вкладом 47 страниц. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации: 1. Фирстова, В.В. Определение экспрессии маркера ранней активации CD69 На лимфоцитах иммунных мышей после стимуляции их антигенами чумного микроба / В.В. Фирстова, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Е.В. Зырина, С.А. Иванов, Н.В. Киселева, П.Х. Копылов, А.П. Анисимов, И.А. Дятлов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – № 1 (103). – С. 56-59. 2. Firstova, V.V. The in vitro evaluation of anti-plague cellular immunity by quantitative analysis of IFN- γ synthesis and the appearance of activation molecules on the surface of T-helper cells/ *Advances in Yersinia Research* / V.V. Firstova, E. A. Tyurin, T.B. Kravchenko, E.V. Zyrina, S.F. Biketov, I.A. Dyatlov edited by Alzira Maria Paiva de Almedia, Nilma Cintra Leal // *Advances in experimental medicine and biology.* – Springer Science. Business Media New York, 2012. – Vol. 954, Part 4. – P. 173-177. 3. Фирстова, В.В. Изменение эффекторной активности Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных против туляремии, при стимуляции *in vitro* тулярином / В.В. Фирстова, В.М. Павлов, Т.Б. Кравченко, Е.В. Зырина, А.И. Борзилов, А.И. Дятлов //

Проблемы особо опасных инфекций – 2012. – № 4 (14). – С.73-76. 4. Firstova, V.V. Immunological Markers that Correlate with Protection Immunity Against Tularemia Infection / V.V. Firstova, A.N. Mokrievich, V.M. Pavlov, A.A. Gorbатов, S.F. Biketov, I.A. Dyatlov // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2014, N 808. – P. 15-23. 5. Фирстова, В.В. Влияние степени воспаления у мышей линии balb/c, индуцированного разными дозами *F.tularensis* 15 НИИЭГ, на формирование антитуляремийного клеточного и гуморального иммунного ответа / В.В. Фирстова, В.М. Павлов, А.А. Горбатов, Т.И. Комбарова, А.В. Караулов, И.А. Дятлов // Иммунология. – 2014, № 35 (3). – С. 147-150.

На диссертацию и автореферат поступило 8 положительных отзывов от: 1) д.м.н. Топоркова А.В., директора и д.м.н., профессора Н.П. Храповой, зав. отделом диагностики инфекционных болезней и лабораторией иммунодиагностики, ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора; 2) д.м.н. Тутельяна А.Б., зав. лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора; 3) д.м.н. Павлович Н.В., зав. лабораторией туляремии, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора; 4) член-корреспондента РАН, д.м.н., профессора А.А.Тотоляна, ВРИО директора ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»; 5) д.м.н., профессора Т.Н.Щуковской, главного научного сотрудника отдела иммунологии и д.м.н. Бугорковой С.А, зав. отделом иммунологии, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»; 6) д.б.н., с.н.с. Дубровиной В.И., зав. лабораторией патофизиологии, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора; 7) д.м.н. Ухановой О.П., доцента кафедры иммунологии Ставропольского медицинского университета; 8) д.м.н., проф. Куличенко А.Н., директора и к.б.н. Пономаренко Д.Г., и.о. зав. лабораторией бруцеллеза, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора. В отзыве Ухановой О.П. сделано замечание о кратком описании методики мечения клеток для проточной цитометрии и высказано пожелание проанализировать все классы общих иммуноглобулинов под влиянием специфических антигенов *Y.pestis* и *F.tularensis*. Павлович Н.В. сделала ряд принципиальных замечаний по методическому изложению экспериментов, а также высказала пожелание о подтверждении приоритетности результатов в виде патентов на изобретение. В отзывах отмечено, что автором получены новые данные, расширяющие представления об особенностях механизмов активации Т- и В-лимфоцитов под влиянием антигенов *Y. pestis* и *F. tularensis* у иммунного и неиммунного организма, позволившие предложить комплекс иммунологических показателей для выявления клеточного противочумного и противотуляремийного иммунитета у вакцинированного контингента.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тематикой научных исследований, компетентностью в вопросах, рассмотренных в диссертации, и большим опытом работы в области иммунологии.

Диссертационный совет отмечает, на основании выполненных соискателем исследований разработана научно обоснованная концепция о наличии значимой связи параметров активации лимфоцитов под влиянием антигенов *Y. pestis* и *F. tularensis* с протективным иммунитетом против чумы и туляремии, соответственно. Благодаря моделированию чумной и туляремийной инфекций на мышах предложены и научно обоснованы маркеры клеточной активации лимфоцитов, коррелирующие с напряженным противоинфекционным иммунитетом. Доказана перспективность оценки противотуляремийного иммунитета у мышей, характеризующихся разным уровнем защиты против возбудителей туляремийной инфекции, с учетом способности клеточного звена иммунитета к реактивации под влиянием специфических антигенов: по способности Т-хелперов усиливать экспрессию CD69 рецептора, по увеличению синтеза ИФН- γ и ИЛ-17 спленоцитами под влиянием антигенов *F. tularensis*. Моделирование чумной инфекции на мышах позволило установить, что усиление экспрессии CD69 и CD154 рецепторов на поверхности Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов и CD86 рецептора на поверхности CD22⁺ лимфоцитов под влиянием F1 *Y. pestis in vitro* коррелировали с поствакцинальной защитой от чумной инфекции. Использование мышинной биологической модели позволило экстраполировать и обосновать целесообразность применения методов оценки клеточного поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии у людей.

Введены новые понятия о механизмах формирования иммунного ответа в организме людей, иммунизированных живой туляремийной вакциной и неиммунных доноров, расширившие современные представления о формировании иммунологической памяти на основе анализа реакции лимфоцитов на антигены *F. tularensis*.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что автором результативно доказана способность иммунных лимфоцитов специфически активироваться под влиянием F1 *Y. pestis*, тулярина и КНК *F. tularensis*. Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс показателей, характеризующих вовлеченность реакций клеточного звена в формирование иммунитета против чумы и туляремии. Изложена гипотеза о необходимости участия цитотоксических лимфоцитов в формировании протективного иммунитета против заражения *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis*, но не против заражения *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*. Раскрыты особенности активации иммунных и неиммунных Т лимфоцитов: лимфоциты неиммунных доноров активировались без участия CD154 молекулы, что снижало уровень активации Th1 иммунного ответа. Активация клеток иммунного организма происходила по CD28-независимому пути за счет взаимодействия рецепторов В лимфоцитов CD40L с индуцибельной мембранной молекулой CD154, способствующей развитию иммунного ответа по Th1 пути. Изучены механизмы активации Т и В лимфоцитов иммунного и неиммунного организма под влиянием специфических антигенов *Y. pestis* и *F. tularensis*. Проведена модернизация метода выявления специфического противочумного и противотуляремийного иммунитета по способности лимфоцитов изменять экспрессию поверхностных

маркеров и активность синтеза цитокинов под влиянием антигенов *Y. pestis* и *F. tularensis in vitro*, что отражает наличие специфического клеточного иммунитета, достаточного для защиты от заражения туляремией и чумой. Расширены представления об иммунологических механизмах обеспечения протективного иммунитета против бактерий *F. tularensis* разной вирулентности.

Значение полученных соискателем результатов исследований для практики подтверждается тем, что были разработаны и внедрены новые методы для оценки специфического клеточного иммунного ответа у людей на основе выявления CD69 на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов и HLA-DR на поверхности Т-лимфоцитов памяти под влиянием антигенов *F. tularensis* и *Y. pestis*. Определены перспективы практического применения разработанных методов для выявления эффективности вакцинации и изучения иммуногенных свойств антигенов туляремии и чумы.

Создана система практических рекомендаций для отбора и предварительной оценки иммунобиологических свойств потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis* и *Y. pestis*. Представлены методические указания и методические рекомендации. Разработанные документы используются для отбора и предварительной оценки иммунобиологических свойств потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis*, изучения свойств потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы против туляремии и чумы, повышения эффективности оценки противочумного и противотуляремийного поствакцинального иммунитета у людей.

Оценка достоверности результатов работы выявила, что в процессе работы использовались современные автоматизированные методы исследования, поддерживающихся программным обеспечением для анализа и статистической обработки результатов. Результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов на большом количестве экспериментальных животных и биологическом материале доноров. Теория была построена на известных проверяемых данных и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации. Основная идея базируется на анализе результатов серологического анализа, функциональной активации лимфоцитов для выявления эффективности вакцинации и на обобщении мирового научно-исследовательского опыта исследования иммунных процессов. Используются общепринятые и авторские методические подходы. Установлено согласование полученных данных с результатами других авторов, представленных в независимых источниках по данной тематике. Размер исследованных выборочных совокупностей достаточен и обоснован подбор объектов наблюдения, были использованы современные корректные методы статистической обработки материала.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии соискателя на всех этапах исследования, планировании и проведении экспериментальных работ: проведение фенотипирования лимфоцитов, анализ активности синтеза внутриклеточных цитокинов, выявление клеточного цикла ДНК; культивирование лимфоцитов с митогенами и антигенами *Y. pestis* и *F. tularensis*, оценка

пролиферативной активности лимфоцитов. Самостоятельно автором были проведена обработка и интерпретация экспериментальных данных, а также подготовка публикаций по теме диссертации. Апробация результатов исследования проводилась лично автором. Полученные данные были представлены автором на ряде конференций.

На заседании 15.10.2015 г. диссертационный совет принял решение присудить Фирстовой Виктории Валерьевне ученую степень доктора биологических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 13 человек, из них 12 докторов наук по специальности 14.03.09 – «клиническая иммунология, аллергология», участвовавших в заседании, из 19 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени - 13, против нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор
Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук
15.10.2015



Тихонова Нина Тимофеевна

Новикова Лидия Ивановна