



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В  
СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И  
БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Федеральное казенное учреждение  
здравоохранения «Иркутский ордена Трудового  
Красного Знамени научно-исследовательский  
противочумный институт Сибири и Дальнего  
Востока»

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора

664047 Иркутск, Трилиссера, 78

Тел. 22-01-35, факс 22-01-40

E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

<http://www.irkutsk.ru/chumin>

ОКПО 01898090, ОГРН 1023801543017

ИНН/КПП 3811015807/381101001

Г Отзыв ведущей организации на диссертацию Г

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального казенного учреждения  
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

доктор медицинских наук, профессор

С.В. Балахонов



«13» апреля 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального казенного учреждения 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 на диссертационную работу Карцевой Алены Сергеевны «**Механизмы иммунитета при экспериментальной туляремии на мышинной модели**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6. Биотехнология и 1.5.11. Микробиология в диссертационный совет 64.1.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Актуальность темы выполненной работы**

Существующие туляремийные вакцины формируют длительный иммунитет, но характеризуются неясным механизмом аттенуации, генетической нестабильностью и относительно высокой реактогенностью, поэтому необходимость в создании безопасной и эффективной вакцины очевидна. Для разработки новых вакцин на основе аттенуированных штаммов *Francisella tularensis* крайне важно понимание механизмов формирования противотуляремийного иммунитета. Для туляремийной инфекции, несмотря на большой объем



исследований, проведенных в данном направлении, вопрос иммунологических критериев оценки эффективности вакцинации остается открытым.

При изучении клеточного звена иммунитета, обеспечивающего формирование защиты от внутриклеточных инфекций, особое значение придается анализу влияния вакцинации на дифференцировку, функциональную активность и длительность циркулирования специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. На сегодняшний день вклад каждой субпопуляции лимфоцитов, в частности, центральных и эффекторных Т-клеток памяти, в формировании долгосрочного протективного иммунитета после вакцинации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ остается малоизученным.

Изучение механизмов протективного противотуляремийного иммунитета и выявление иммунологических критериев его оценки на мышинной модели являются важными этапами в исследованиях по созданию новых вакцинных штаммов и совершенствованию лабораторных методов для оценки Т-клеточного звена иммунитета. Исследования в данном направлении помимо научного интереса к раскрытию механизмов и особенностей иммуногенных и протективных свойств новых туляремийных вакцинных штаммов с улучшенными свойствами, будут способствовать пониманию и экспериментальному обоснованию факторов, обеспечивающих резистентность патогена к системам врожденного иммунитета хозяина.

В связи с этим актуальность работы Карцевой Алены Сергеевны, посвященной изучению клеточных механизмов иммунного ответа у мышей на иммунизацию аттенуированными штаммами *F. tularensis* и определению их роли в формировании протективного иммунитета против природных туляремийных штаммов, не вызывает сомнений.

#### **Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации**

Автором диссертационного исследования установлено, что модификации в генах *iglC*, *recA* и *sodB* *F. tularensis* не влияют на напряженность и длительность иммунитета, но при этом снижают реактогенность рекомбинантных штаммов по сравнению с *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Показано, что длительность поствакцинального иммунитета у мышей зависит от подвидовой принадлежности природного заражающего штамма: заражение штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503 того же подвида, что и вакцинный штамм, обеспечивает 100 % защиту в течение 180 суток после вакцинации, а штаммом *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu приводит к ослаблению защиты с увеличением поствакцинального периода.

Иммунизация рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* и *F. tularensis* 15/23-



1/*sodBΔrecA*, так же как и вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, индуцирует антительный иммунный ответ и формирование пулов антиген-специфичных В- и Т-клеток, которые проявляют свою функциональную активность посредством пролиферации, экспрессии маркеров активации и продукции цитокинов.

Описаны изменения уровней экспрессии 5 маркеров активации (CD69, CD25, CD30, CD28 и CD86) на поверхности лимфоцитов в крови и селезенке мышей линии BALB/c в раннюю фазу иммунного ответа при иммунизации рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* и живой туляремийной вакциной.

Показано, что эффективность вакцинации при экспериментальной туляремии на мышинной модели зависит от подвидовой принадлежности природного штамма, используемого при заражении, и коррелирует с функциональной активностью субпопуляций T<sub>CM</sub> и T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти. Так, продолжительность специфической защиты мышей от природного штамма *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu находится в прямой зависимости от функциональной активности T<sub>EM</sub> и T<sub>CM</sub> клеток.

#### **Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки**

Работа 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 в рамках плановых тем НИР: «Поиск специфических клеточных маркеров, отражающих напряженность иммунитета против особо опасных инфекций» 2015-2020 гг. (номер регистрации ЕГИСМ 116030310014); «Изучение механизмов иммунопатогенеза возбудителей инфекционных заболеваний» 2021-2025 гг. (номер регистрации ЕГИСМ 121022500226-1) и «Изучение геномной эволюции возбудителя туляремии с целью выявления влияния эволюционных изменений генома на экспрессию факторов патогенности *Francisella tularensis*» 2021-2025 гг. (номер регистрации ЕГИСМ 121021500051-2).

#### **Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации**

Практическая и научная ценность работы Карцевой Алены Сергеевны заключается, в первую очередь, в создании Базы данных «Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/c» (зарегистрирована ФИПС № 2020621186 от 10.07.2020 г.). Предложенные А.С. Карцевой иммунологические критерии оценки протективной эффективности существующей и разрабатываемых противотуляремийных вакцин на основе аттенуированных штаммов *F. tularensis* используются в лаборатории микробиологии туляремии



отдела особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (акт внедрения от 23.01.2023 г.).

Автором дополнены современные представления о ранних этапах формирования противотуляремийного иммунитета при иммунизации мышей живой вакциной. Использование рекомбинантных штаммов с делецией генов *iglC* и *recA* и модификации гена *sodB*, уменьшающих их вирулентность, позволило выявить механизм снижения реактогенности штаммов по цитокиновому профилю сыворотки крови мышей линии BALB/c.

Полученные новые данные о роли различных субпопуляций Т-клеток памяти в формировании длительного протективного иммунитета в отношении природных штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis* и *holarctica* могут быть использованы при разработке новых вакцинных препаратов против туляремии и изучении их иммунологической эффективности.

Кроме того, материалы диссертационной работы используются в учебной Программе дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» и при подготовке кадров высшей квалификации (аспирантуре) по направлению 1.5 – Биологические науки, профиль 1.5.11 – Микробиология при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

#### **Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений**

Диссертационное исследование А.С. Карцевой базируется на обширном анализе литературных данных. Достоверность полученных результатов подтверждена большим объемом проведенных исследований с применением современных методов, на поверенном оборудовании, в соответствии с международными рекомендациями. Для изучения клеточных механизмов иммунного ответа у мышей на вакцинацию штаммами *F. tularensis* были использованы микробиологические, биотехнологические, биологические, иммунологические, цитометрические и статистические методы исследований.

Представленные в диссертационной работе результаты и основные научные положения объективны, обоснованы и достоверны. Выводы вытекают из результатов исследований, соответствуют поставленным задачам и логически завершают диссертационную работу.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на научно-практических конференциях



различного уровня.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы в качестве научной основы при проведении дальнейших экспериментов по изучению функциональной активности субпопуляций Т-клеток памяти в отдаленные сроки после иммунизации при оценке долгосрочного поствакцинального протективного иммунитета при туляремии на мышинной модели. Разработанная автором База данных «Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/c» может быть использована в качестве современного программного обеспечения для изучения иммунного ответа мышей на вакцинацию аттенуированными штаммами *F. tularensis*. Предложенные критерии оценки протективного противотуляремийного иммунитета могут быть использованы для скрининга новых потенциальных вакцинных штаммов.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, четырех глав результатов и обсуждений, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы, списка работ, опубликованных по теме диссертации и приложения. Работа иллюстрирована 30 рисунками и 5 таблицами, включает одно Приложение. Библиографический указатель содержит 282 литературных источника, в том числе 32 публикации отечественных и 250 зарубежных авторов.

Во «Введении» автор раскрывает актуальность проблемы, описывает степень разработанности темы исследования, четко формулирует цель и задачи, отражает научную новизну работы, теоретическую и практическую значимость, кратко описывает методологию и методы исследования, формулирует основные положения, выносимые на защиту, описывает степень достоверности и апробации результатов, личное участие в получении результатов.

В обзоре литературы (глава 1) отражены общие сведения о туляремии, истории создания живой туляремийной вакцины и стратегиях создания новых противотуляремийных вакцинных препаратов, современные данные об иммунном ответе на *F. tularensis* и корреляции между защитой организма от природных туляремийных штаммов и специфическими иммунологическими показателями.

В описании материалов и методов исследования (глава 2) дана подробная информация об



объектах исследования. В достаточной степени описаны стандартные и модифицированные методики исследования со ссылками на первоисточники. В тексте представлены сведения о нормативно-методических документах, согласно которым проводились исследования. Приведена информация об использованных наборах реагентов и программного обеспечения.

В главе 3 «Изучение механизмов иммунного ответа у мышей в ранние сроки после вакцинации штаммами *F. tularensis*» описаны изменения субпопуляционного состава лимфоцитов крови и селезенки, изучен цитокиновый профиль сыворотки крови у мышей в ранние сроки иммуногенеза после вакцинации штаммами *F. tularensis*.

В главе 4 «Изучение эффекторной фазы иммунного ответа у мышей после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis*» представлены данные о протективных свойствах вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производных, уровне титров специфических IgG антител в сыворотке крови мышей, анализе субпопуляционного состава В- и Т-клеток, уровне цитокинов в клеточном супернатанте лимфоцитов и влиянии иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* на генерацию, дифференцировку и функциональную активность Т-клеток памяти у мышей линии BALB/c в эффекторную фазу поствакцинального иммунного ответа.

Показано, что иммунизация штаммами *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* и 15/23-1/*sodB* $\Delta$ *recA* и исходным вакцинным штаммом эффективно защищает мышей от заражения гомологичным природным штаммом *F. tularensis* 503 подвида *holartica* и штаммом *F. tularensis* Schu гетерологичного подвида *tularensis* через 30 суток после иммунизации.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что механизм формирования противотуляремийного протективного иммунитета, вероятно, связан с Т-клетками памяти как эффекторными, так и центральными субпопуляциями CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> и их эффекторными функциями, опосредованными экспрессией CD69 молекулы и синтеза ими IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ . Показано, что В-клетки принимают активное участие в индукции и регуляции адаптивного иммунного ответа против *F. tularensis*. Помимо синтеза специфических к ЛПС *F. tularensis* антител В-клетки инициируют иммунные реакции посредством секреции цитокина IFN- $\gamma$ , а также выступают в роли антигенпрезентирующих клеток, о чем свидетельствует экспрессия CD69 молекулы. Таким образом, полученные данные о влиянии иммунизации живой туляремийной вакциной на генерацию и функциональную активность специфических Т- и В-клеток у мышей позволяют рассматривать их как еще один шаг в понимании механизмов формирования иммунитета при туляремии.



В главе 5 «Изучение иммунного ответа мышей линии BALB/c в отдаленные сроки после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis*» представлены данные о протективных свойствах вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производных, а также определении иммунологических параметров, характеризующих эффективность защиты от экспериментальной туляремии в отдаленные сроки после иммунизации.

Результаты, полученные в ходе исследования механизмов адаптивного иммунитета и протективной активности *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA*, *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* $\Delta$ *recA* в отношении штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu, могут служить критериями оценки напряженности специфического противотуляремийного иммунитета по уровню экспрессии CD69 молекулы на поверхности Т- и В-клеток и продукции IFN- $\gamma$ .

Проведен сравнительный анализ динамики изменения субпопуляционного состава и функциональной активности CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти в отдаленные сроки после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* $\Delta$ *recA*. Выявлено, что для поддержания длительного протективного иммунитета, инициированного иммунизацией аттенуированными штаммами *F. tularensis*, требуется наличие антиген-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти, продуцирующих IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  и экспрессирующих маркер активации CD69. Снижение количества и угасание функциональной активности субпопуляций CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти в отдаленные сроки после вакцинации приводит к ослаблению защиты при заражении природным штаммом *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu.

Полученные данные раскрывают механизмы формирования долгосрочной защиты у мышей, индуцированной вакцинацией *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* $\Delta$ *recA*. Выявленные особенности и предложенные автором критерии оценки действия туляремийных вакцинных штаммов могут служить основой для создания новых вакцин с более долгосрочным эффектом защиты от природных штаммов *F. tularensis* subsp. *tularensis*.

Глава 6 «Выявление иммунологических показателей оценки протективной эффективности экспериментальных вакцин на основе аттенуированных штаммов *F. tularensis*» содержит информацию о результатах корреляционного анализа между уровнем защиты иммунизированных мышей при заражении природным штаммом *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu и функциональной активностью антиген-специфических лимфоцитов с целью выбора



иммунологических критериев оценки протективной эффективности иммунизации. Установлено, что информативными показателями гетерологичной защиты мышей от заражения природным штаммом *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu можно считать IFN- $\gamma$ , IL-10 и CD69, рассматривая антиген-индуцированное повышение продукции этих цитокинов и экспрессии маркера активации в качестве иммунологических критериев протективной эффективности иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis*. Таким образом, выявленный факт корреляции между повышением доли антиген-специфических Т-клеток памяти, продуцирующих IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  и экспрессирующих маркер активации CD69, и выживаемостью иммунизированных мышей при заражении *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu позволяет сделать вывод о перспективности использования данных иммунологических показателей при оценке протективности поствакцинального иммунитета у мышей.

В разделе «Заключение» подведен итог значительной по объему проделанной работы, обобщены и проанализированы полученные данные. Выводы обоснованы, соответствуют задачам исследования и сформулированы на основе анализа фактического материала и логично вытекают из содержания работы. Интерпретация полученных результатов не вызывает возражений. Текст диссертации в достаточной мере иллюстрирован. Наличие заключений в конце глав облегчает восприятие материала. Общее впечатление о работе положительное.

Тема диссертационной работы А.С. Карцевой, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют отрасли науки «Биологические науки», паспортам специальностей 1.5.6. Биотехнология по пункту 1 «Генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии» и 1.5.11. Микробиология по пункту 10 «Использование микроорганизмов в народном хозяйстве, ветеринарии и медицине».

По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них 3 статьи – в журналах из списка изданий, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, База данных, одна статья в прочих изданиях и 12 тезисов, опубликованных в материалах Всероссийских и международных научных конференций.

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы Карцевой Алены Сергеевны нет. Однако, в процессе ознакомления с диссертацией возникли вопросы для обсуждения:

1. В соответствии с МУ 3.3.1.2161-07 «Основные требования к вакцинным штаммам туляремиального микроба» изучение протективных свойств новых вакцинных штаммов проводят



на морских свинках. Чем обоснован выбор в качестве модели для исследования мышей линии BALB/c?

2. В диссертационной работе при изучении протективной активности вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производных *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ recA, *F. tularensis* 15/23-1/sodB $\Delta$ recA в качестве заражающих штаммов были использованы *F. tularensis* подвидов *holarctica* и *tularensis*. Выявлено снижение эффективности защиты от штамма *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu. Почему в экспериментальных исследованиях не были использованы штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*?

Отмеченные замечания и вопросы не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

**Соответствие автореферата основным положениям диссертации.** Автореферат оформлен в соответствии с требованиями стандарта, а его содержание соответствует основным положениям диссертации и дает полное представление о проделанной работе.

### Заключение

Диссертационная 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 1.5.11 – Микробиология.



Отзыв на диссертационную работу А.С. Карцевой обсужден и одобрен на заседании Ученого совета Федерального казенного учреждения 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 (протокол № 4 от 13.04.2023 г.).

Заведующая лабораторией патофизиологии Федерального казенного учреждения 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  
д.б.н.



Дубровина В.И.

Подпись Дубровиной Валентины Ивановны заверяю

Начальник отдела кадров и спец. части института

Шангареева Н.И.

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  
(ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора)  
664047 Иркутск, Трилиссера, 78; Тел. 8(3952) 22-01-35; факс 22-01-40; e-mail:  
adm@chumin.irkutsk.ru

