

## ОТЗЫВ

официального оппонента

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

### Актуальность темы

Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция из-за высокой восприимчивости к ней людей представляет серьезную опасность для населения. Достигнутые успехи в борьбе с туляремией связаны с применением живой туляремийной вакцины, разработанной в начале 40-х годов прошлого столетия. Начиная с 60-х годов и по настоящее время, туляремийную вакцину изготавливают на основе штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ

Современные молекулярно-генетические методы позволяют изучать основы патогенности туляремийного микроба и целенаправленно снижать его вирулентность, при создании менее реактогенных штаммов, обеспечивающих полноценную защиту от инфекции. В настоящее время разрабатываются экспериментальные штаммы туляремийного микроба, кандидаты в вакцинные. При изучении новых штаммов, важным условием является использование объективных иммунологических методов и критериев оценки развития иммунитета. Известно, что ключевым звеном в формировании протективного иммунитета организма от внутриклеточных бактерий, к которым относится возбудитель туляремии, является развитие иммунологического ответа по Т-клеточному типу, определяющих основу длительного формирования протективного иммунитета.

Вместе с тем относительный вклад субпопуляций Т-клеток и уровень их функциональной активности, необходимый для создания полноценного иммунитета против туляремии, до конца не изучен. Не проводилось комплексные исследования по изучению показателей клеточного иммунного ответа, индуцированного штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, и оценки взаимосвязи между иммунологическими параметрами в отдаленные сроки развития поствакцинального иммунитета.

Учитывая вышеизложенное работа, направленная на изучение клеточных механизмов развития протективного иммунитета при моделировании экспериментальной туляремии, является актуальной.

**Научная новизна** диссертационной работы заключается в том, что использованные в работе модификации генома *F. tularensis* (в генах *iglC*, *recA* и *sodB*) снижают реактогенность рекомбинантных штаммов *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* $\Delta$ *recA* по сравнению со штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и не влияют на напряженность и длительность иммунитета, о чем свидетельствует выявление в сыворотке крови мышей более низкого уровня цитокина TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли) на 3-5 сут после иммунизации.

Научной новизне отвечают данные, подтверждающие зависимость длительности поствакцинального иммунитета от подвидовой принадлежности заражающих штаммов. Установлено, что иммунизация мышей линии BALB/c штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, производными рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* $\Delta$ *recA* подвида *holarctica* после введения им вирулентного штамма *F. tularensis* 503 подвида *holarctica*,

обеспечивала 100 %-ную защиту от гибели на протяжении 180 сут (срок наблюдения). При заражении штаммом *F. tularensis* Schu подвида *tularensis* уровень защиты снижался уже после 60 сут. При этом от гибели были защищены только 80 % животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, и 70 % мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* и 15/23-1/*sodB* $\Delta$ *recA*.

В первые показано, что в раннюю фазу иммунного ответа на поверхности лимфоцитов в крови и селезенки мышей линии BALB/c при иммунизации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* $\Delta$ *recA*, наблюдаются изменения уровней экспрессии 5 маркеров активации (CD69, CD25, CD30, CD28 и CD86).

Требованиям научной новизне отвечают исследования по изучению изменений динамики субпопуляционного состава Т-клеток памяти в зависимости от времени после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* $\Delta$ *recA*. Выявлено, что продолжительность специфичной защиты мышей во всех трех группах при заражении штаммом *F. tularensis* Schu *tularensis* находится в прямой зависимости от функциональной активности субпопуляции T<sub>ЕМ</sub> и T<sub>СМ</sub>.

**Практическая значимость** заключается в получении новых сведений о развитии противотуляремийного иммунитета на ранних этапах после иммунизации мышей линии BALB/c. Использование рекомбинантных штаммов с делецией генов *iglC* и *recA* и модификации гена *sodB*, имеющих более низкую реактогенность по сравнению с о штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, позволило установить механизм снижения их реактогенности, направленной по цитокиновому профилю сыворотки крови мышей линии BALB/c.

Полученные новые данные о роли различных субпопуляций Т-клеток памяти в формировании туляремийного иммунитета в отношении природных штаммов *F. tularensis* подвигов *tularensis* и *holarctica* расширяют представления о механизмах развития иммунного ответа у мышей после введения живых аттенуированных штаммов *F. tularensis*.

Разработанные критерии оценки иммунологических показателей туляремийного иммунитета у животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и кандидатами в вакцинные штаммами *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* $\Delta$ *recA* используются в лаборатории микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ПМБ для научно-исследовательской работы (акт внедрения от 23.01.2023 г., учрежденческий уровень).

Созданная База данных «Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/c» зарегистрирована ФИПС № 2020621186 от 10.07.2020 г. (федеральный уровень внедрения).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 32 работы отечественных и 250 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 30 рисунками и 5 таблицами, включает 1 Приложение.

#### **Содержание диссертации, ее завершенность**

Во введении диссертации четко обоснованы актуальность исследований; научная новизна; практическая значимость; положения, выносимые на защиту;

сведения об апробации и публикациях. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах, отвечающих цели и задачам исследования.

В автореферате диссертационной работы Карцевой А.С. представлены положения, выносимые на защиту, выводы, личный вклад автора в проводимое исследование, степень достоверности и апробация работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимости, а также перспективы дальнейшей разработки темы.

Литературный обзор (Глава 1) состоит из 7 подглав и посвящен анализу исторических и современных представлений о возбудителе туляремии и создании туляреминых вакцин. Приведен анализ литературных источников, начиная с создания инактивированных туляреминых вакцин, а также разработки живой, субъединичных вакцин, на основе различных антигенов, с использованием адъювандов, на основе рекомбинантных штаммов.

В последующих подглавах освещены вопросы, касающиеся изучения механизмов специфической защиты от внутриклеточных патогенов, имеющих решающее значение для успешной разработки новых вакцин. Автором, исходя из цели работы, проанализированы современные представления о корреляции между защитой организма от *F. tularensis* и специфическими иммунологическими показателями, в том числе влияние иммунизации туляреминой вакциной на дифференцировку Т-клеток памяти на  $T_{CM}$  и  $T_{EM}$ .

В результате проведенного анализа сделан обоснованный вывод о том, что такие исследования немногочисленны и основным направлением работы явилось изучение клеточных механизмов, с помощью которых реализуется защита против возбудителя туляремии, а также развитие Т-клеточной иммунологической памяти и установления их роли в формировании специфического противотуляреминого иммунитета.

В главе 2 «Материалы и методы» изложены методические приемы, с помощью которых решены поставленные задачи. Работа выполнена на представительном материале с описанием основных материалов и условий проведения экспериментальных исследований. Используемые методические приемы (иммунологические, биотехнологические, биологические, молекулярно-генетические, микробиологические, статистические) соответствуют современному уровню, являются широко апробированными, легко воспроизводимыми и надежными. Объем наблюдений, планирование и проведение экспериментов адекватны поставленным задачам, достаточны для доказательного статистического анализа.

Результаты исследований обобщены в 4 главах. В главе 3 были изучены механизмы формирования иммунного ответа, в том числе функциональная активность субпопуляций В-клеток CD69, CD19, CD28, CD80, CD86, Т-клеток с фенотипами CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> и цитокиновый профиль (G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, MIP-1 $\beta$ , MIP-2) в экспериментах *in vivo* в ранние сроки (3 сут) после введения лабораторным животным штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и рекомбинантных штаммов *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ recA и *F. tularensis* 15/23-1/sodB $\Delta$ recA с ослабленной реактогенностью.

В результате проведенного комплексного исследования Аленой Сергеевной показано, что иммунизация штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными индуцирует иммунный ответ гуморального типа и обеспечивает формирование пулов антиген-специфичных В- и Т-клеток, которые проявляют свою

функциональную активность посредством пролиферации, экспрессии маркеров активации и продукции цитокинов. На основании полученных данных об экспрессии маркеров активации (CD69, CD25 и CD30) и костимулирующих молекул (CD28 и CD86) на поверхности лимфоцитов охарактеризованы механизмы формирования иммунных реакций в ответ на иммунизацию штаммами *F. tularensis*, в частности, пролиферативной активности, эффекторных функций и межклеточных взаимодействий между субпопуляциями Т- и В-клеток, а также цитокиновый профиль сывороток крови иммунных и интактных животных.

**Глава 4** посвящена изучению в сравнительном анализе иммунологических параметров эффекторной фазы иммунного ответа у мышей линии BALB/c, иммунизированных подкожно штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными дозой 100 КОЕ/мл. Протективные свойства исследуемых штаммов оценивали через 30 сут после иммунизации и последующего (через 21 день) подкожного инфицирования тест-штаммами *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* и *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*.

В результате проведенных исследований автором установлено, что используемые штаммы обеспечивала защиту мышей в 100 % случаев при подкожном заражении вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica* и другого подвида *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis*.

Сравнительный анализ динамики веса показал, что не смотря на отсутствие погибших животных во всех иммунных группах, при заражении штаммом *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*, мыши незначительно теряли в весе, а наибольшее снижение веса (до 1,6 %) наблюдалось на 5 сут в группе животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Напротив, в группе мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA, после инфицирования штаммом *F. tularensis* 503 у животных регистрировалось нарастание веса в течение всего периода наблюдения.

Основываясь на полученных результатах Алена Сергеевна сделала вывод о том, что механизм формирования противотуляремийного иммунитета, вероятно, связан с клетками памяти как Т<sub>ЕМ</sub>, так и Т<sub>СМ</sub> субпопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> и их эффекторными функциями, опосредованными экспрессией CD69 молекулы и синтеза ими IFN-γ и TNF-α. При этом В-клетки принимают активное участие в индукции и регуляции адаптивного иммунного ответа против возбудителя туляремии. Помимо синтеза специфических к ЛПС *F. tularensis* антител, В-клетки инициируют иммунные реакции посредством секреции цитокина IFN-γ, а также выступают в роли АПК, о чем свидетельствует экспрессия CD69 молекулы.

Полученные данные о влиянии вакцинации 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.

Следует подчеркнуть целенаправленный подход соискателя при выполнении поставленных задач. В главе 5 представлены результаты изучения иммунного ответа у мышей линии BALB/c в отдаленные сроки (60 сут, 90 сут и 180 сут) после их иммунизации исследуемыми штаммами *F. tularensis*, а также иммунологических показателей специфического гуморального и клеточного противотуляремийного иммунитета методом проточной цитофлуориметрии. Продукцию цитокинов и титров специфических IgG антител к ЛПС *F. tularensis* в сыворотке крови животных определяли методом иммуноферментного анализа. Напряженность иммунитета исследовали после подкожного инфицирования

вирулентными тест-штаммами *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* и *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica* дозой 1000 DCL через 60, 90 и 180 дней после иммунизации.

Установлено, что для поддержания длительного протективного иммунитета, инициированного иммунизацией штаммами *F. tularensis*, требуется наличие антиген-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти, продуцирующих IFN-γ и TNF-α и экспрессирующих маркер активации CD69. При этом показано, что снижение количества и угасание функциональной активности субпопуляций CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти в отдаленные сроки после иммунизации приводило к ослаблению защиты при инфицировании штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis*.

Полученные данные позволили установить возможные механизмы формирования долгосрочной защиты у мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB*Δ*recA* и инфицированных тест-штаммами *F. tularensis* разных подвидов. Алена Сергеевна сделала обоснованный экспериментальными данными вывод о том, что результаты изучения иммунологических механизмов при введении экспериментальным животным штаммов, кандидатов в вакцинные, могут использоваться при разработке новых вакцин с более долгосрочным эффектом защиты от природных штаммов *F. tularensis* subsp. *tularensis*.

**В главе 6** на основании выявленной корреляции между повышением доли антиген-специфических Т-клеток памяти, продуцирующих IFN-γ и TNF-α и экспрессирующих маркер активации CD69, а также выживаемостью иммунизированных мышей при инфицировании штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis*, автор сделала вывод о возможном их использовании для оценки протективности поствакцинального иммунитета у мышей при разработке новых штаммов, кандидатов в вакцинные.

**В Заключение** диссертационной работы обобщены собственные данные, отражена новизна, теоретическая и практическая значимости полученных результатов; последовательно и аргументированно сформулированы итоги исследований.

Методология диссертационной работы заключалась в комплексном подходе к изучению клеточных механизмов протективного иммунитета у мышей линии BALB/с, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными, а также в определении иммунологических критериев для его оценки на мышинной модели экспериментальной туляремии.

**Выводы** соответствуют поставленным задачам и отражают сущность работы.

**Список научных работ, опубликованных по теме диссертации**, соответствует таковому в автореферате диссертации.

**В приложении** приведено Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2020621186 «Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/с.

**Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность** обеспечивается значительным объемом полученных экспериментальных данных, их соответствием теоретическим положениям, статистической обработкой данных экспериментов. Выводы из проведенных исследований теоретически и экспериментально обоснованы и отражают цель и задачи диссертации.

**Автореферат диссертации**, изложенный на 25 страницах, соответствует содержанию и основным итогам диссертации.

**Содержание диссертации** в достаточной степени отражено в публикациях автора, в том числе 3 статьях в журналах из списка изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации, одной статьи в прочих изданиях, одной Базы данных и 12 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций, а ее основные положения обстоятельно изложены в автореферате.

Диссертационная работа производит положительное впечатление, написана литературным языком, хорошо читается. Принципиальных замечаний нет. Имеющиеся погрешности, касающиеся неточности некоторых выражений, например, «вакцинные штаммы» вместо «кандидаты в вакцинные»; по тексту работы встречаются технические опечатки, не влияют на высокую положительную оценку работы.

По содержанию диссертации к Алене Сергеевне имеются следующие **вопросы:**

1. По каким критериям определялась реактогенность рекомбинантных штаммов *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ recA и *F. tularensis* 15/23-1/sodB $\Delta$ recA?
2. Чему равнялась остаточная вирулентность (LD<sub>50</sub>) у используемых в работе штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ recA и *F. tularensis* 15/23-1/sodB $\Delta$ recA.
3. Какой механизм снижения реактогенности рекомбинантных штаммов *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ recA и *F. tularensis* 15/23-1/sodB $\Delta$ recA?
4. На Ваш взгляд, чем обусловлена длительность специфического иммунитета и защита мышей линии BALB/c в зависимости от подвидовой принадлежности вирулентных штаммов *F. tularensis* 503 подвида *holarctica*, и *F. tularensis* Schu подвида.
5. Поясните вывод о том, что заражение природным штаммом *F. tularensis* Schu подвида *tularensis* приводит к ослаблению защиты с увеличением поствакцинального периода у иммунизированных животных.
6. Отмечалась корреляция иммунологических показателей между собой при изучении протективного иммунитета при иммунизации животных рекомбинантными штаммами или были различия?
5. Планируется внедрение полученных Вами результатов при очередном пересмотре регламентирующих документов для отбора туляремиальных штаммов, кандидатов в вакцинные?

### **Заключение**

Диссертационная работа Карцевой А. С. на тему «Механизмы иммунитета при экспериментальной туляремии на мышинной модели» является законченной научно-квалификационной работой, в которой получены новые данные о роли Т<sub>ЕМ</sub> и Т<sub>СМ</sub> субпопуляций Т-клеток памяти в формировании туляремиального иммунитета в отношении природных штаммов *F. tularensis* подвида *tularensis* и *holarctica*, расширяющие представления о механизмах развития иммунного ответа у мышей линии BALB/c при введении им штаммов *F. tularensis* (кандидатов в вакцинные), имеющие существенное значение в практике лечебно-профилактических учреждений здравоохранения Российской Федерации для обеспечения национальной безопасности в сфере здравоохранения и здоровья нации.

По актуальности, объему, новизне и практической значимости полученных данных диссертационная работа отвечает критериям п. 9, 10, 11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением

Правительства РФ № 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 кандидатским диссертациям, а ее автор Карцева Алина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6 - Биотехнология и 1.5.11 – Микробиология.

Официальный оппонент

Главный эксперт  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения «Научный центр экспертизы средств  
медицинского применения» Минздрава России,  
доктор медицинских наук

*Саяпина*

Саяпина Лидия Васильевна

Адрес организации

Юридический адрес:

127051, г. Москва,

Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Тел: +7 495-190-18-1118, доб. 6592

E-mail: Sayapina@expmed.ru

Подпись Саяпиной Л.В. удостоверяю

Главный специалист по кадрам  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

«10» 05 2023 г.



*Курышева*

Курышева М.А.