

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 22.12.2023 г. № 33
о присуждении Вагайской Анастасии Сергеевне, гражданину Российской
Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Бактериальные тени *Yersinia pestis*» по специальностям
1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология принята к защите 18.10.2023 г.
(протокол заседания № 28) 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 Вагайская Анастасия Сергеевна, 1994 г. рождения, в 2017 г.
окончила Биологический факультет Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Челябинский
государственный университет». В 2017-2019 гг. проходила обучение в
магистратуре Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Пущинский естественно-научный институт»
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по профилю
образовательной программы «Биологическая безопасность». В 2023 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
младшим научным сотрудником лаборатории микробиологии чумы 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 микробиологии чумы 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 медицинских наук (специальности 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия) Дентовская Светлана Владимировна, 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 микробиологии чумы, главный научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Федорова Валентина Анатольевна – доктор медицинских наук (специальность 1.5.11. Микробиология), профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, г. Саратов, кафедра «Микробиология и биотехнология», профессор кафедры,

Ермолаева Светлана Александровна, доктор биологических наук (специальность 1.5.11. Микробиология), Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, лаборатория экологии возбудителей инфекций, руководитель лаборатории.

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 Марковым Евгением Юрьевичем, доктором биологических наук, заведующим биохимическим отделом, указала, что работа Вагайской Анастасии Сергеевны на тему «Бактериальные тени *Yersinia pestis*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология является завершенной самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, связанной с разработкой метода получения и характеристикой свойств теней бактериальных клеток чумного микроба, что важно для современных микробиологии и биотехнологии. По актуальности, методическому уровню, научной новизне полученных результатов, их практической значимости диссертация соответствует требованиям п. 9 Постановления Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» 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, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786 в части требований, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Анастасия Сергеевна Вагайская заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология.

Соискатель имеет **28** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **13** работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **5** работ и **8** тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций. Общий объем работ – 6,69 п.л. Недостоверных сведений в опубликованных работах не содержится.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Вагайская, А.С.** Моделирование экспериментальной чумы в условиях лаборатории уровня биобезопасности 2 / **А.С. Вагайская,** А.С.

Трунякова, Т.И. Комбарова, С.В. Дентовская // Пробл Особо Опасн Инф. – 2021. – № 4. – С. 46–53. **Scopus, K2**;

2. Dentovskaya, S.V. Peptidoglycan-free bacterial ghosts confer enhanced protection against *Yersinia pestis* infection / S.V. Dentovskaya, **A.S. Vagaïskaya**, M.E. Platonov, A.S. Trunyakova, S.A. Kotov, E.A. Krasil'nikova, G.M. Titareva, E.M. Mazurina, T.V. Gapel'chenkova, R.Z. Shaikhutdinova, S.A. Ivanov, T.I. Kombarova, V.N. Gerasimov, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // Vaccines. – 2021. – Vol. 10, N 1. – P. 51. DOI: 10.3390/vaccines10010051. **WoS Q1**;

3. Дентовская, С.В. К вопросу о критериях перевода аттенуированных штаммов *Yersinia pestis* из I в III группу патогенности (опасности) / С.В. Дентовская, А.С. Трунякова, **А.С. Вагаïская**, М.Е. Платонов, Е.А. Тюрин, А.П. Анисимов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022 г. - № 2. – С. 20-26. **Scopus K2**;

4. Платонов, М.Е. Эффективность фаговых литических ферментов при получении бактериальных теней / М.Е. Платонов, **А.С. Вагаïская**, А.С. Трунякова, Д.В. Гриненко, В.Н. Герасимов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Мол Генет Микробиол Вирусол. – 2022. – Т 40, № 3. – С. 26-31 **WoS Q4**;

5. **Вагаïская, А.С.** Бактериальные тени возбудителей особо опасных инфекций / **А.С. Вагаïская**, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Пробл Особо Опасн Инф. – 2023. – № 1. – С. 17-26. **Scopus, K2**.

На диссертацию и автореферат поступило **6** положительных отзывов без замечаний от: **(1)** д-ра мед. наук **Бугорковой Светланы Александровны**, главного науч. сотрудника отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», г. Саратов; **(2)** канд. биол. наук **Абзаевой Натальи Вячеславовны**, заведующей научно-производственной лабораторией чумных вакцин Ставропольского научно-исследовательского института, г. Ставрополь; **(3)** канд. биол. наук **Тихонова Сергея Николаевича**, директора Противочумной станции Республики Крым, г. Симферополь; **(4)** канд. мед. наук **Базаровой Галины Хамроевны**, заведующей бактериологической лабораторией Алтайской противочумной станции, г. Горно-Алтайск; **(5)** 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; (6) доктора мед. наук **Краевой Людмилы Александровны**, заведующей лабораторией медицинской бактериологии Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, г. Санкт-Петербург.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор мед. наук, профессор Федорова Валентина Анатольевна является признанным специалистом в сфере микробиологии, биотехнологии и вакцинопрофилактики чумы, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Вагайской А.С. (**PLoS Neglect Tropic. Dis.** – 2018. – V. 12, N 6. – P. e0006511; 2021. – Vol. 16, N 1 – P. e0245657; **Vaccines.** – 2019. – Vol. 7, N 2. – P. 36; 2020. – Vol. 8 – No 4 – P. 698; **Front Biosci (Landmark ed.).** – 2019 – V. 24 – P. 700-711; **Laser Phys. Lett.** – 2020. – V. 17, N 6. – P. 65603; **Pathogens.** - 2021. - V. 10, N 6. – P. 716; **Microorganisms.** – 2021. – V. 9, N 6. – P. 1289; 2022. – V. 10, N 2. – P. 478);

доктор биол. наук **Ермолаева Светлана Александровна** является признанным специалистом в сфере микробиологии патогенных микроорганизмов, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Вагайской А.С. (**Biomedicines.** – 2019. – V. 7, N 2. – P. 29; **J Med Microbiol.** – 2019. – V. 68, N 12. – P. 1747-1758; **Pathogens.** – 2019. – V. 8, N 4. – P. 184; 2020. – V. 9, N 11. – P. 867; **Appl Environm Microbiol.** – 2020. – V. 86, N 18. – P. e01074-20; **Antibiotics.** – 2021. – V. 10, – N 10. – P. 1206; **Int J Mol Sci.** – 2022. – V. 23, N 3. – P. 1837; 2022. – V. 23, N 1. – P. 524; **Sci Rep.** – 2023. – V. 13, N 1. – P. 4315).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области микробиологии, лабораторной диагностики и вакцинопрофилактики чумы, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Вагайской А.С. (**Mol Phylogen Evolut.** – 2021. – V. 159. – P. 107116; **Клин Лаб Диагн.** – 2021. – Т. 66, № 4. – С. 237-241; **Генетика.** – 2020. – Т. 56, № 7. – С. 783-791; **Мед Паразитол Паразитар Бол.** – 2021. – № 3. – С. 12-20; **Пробл Особо Опасн Инф.** 2021. – № 2. – С. 138-147; 2021. – № 2. – С. 79-86; 2021. – № 3. – С. 89-97; 2020. – № 1. – С. 115-123; **Анал Риск Здор.** – 2021. – № 2. – С. 94-104; **Генетика.** – 2020. – Т. 56,

№ 7. – С. 783-791; Бюл Экспериментал Биол Мед. - 2020. – Т. 169, № 4. – С. 468-471), а также наличием ученых, являющихся безусловными специалистами по теме диссертации Вагайской А.С.

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

разработана новая методика получения бактериальных теней энтеробактерий с различной степенью деструкции пептидогликана клеточной стенки - с помощью набора плазмид, несущих ген белка E бактериофага φX174, кассеты литических генов систем «холин-эндолизин» бактериофага λ или чумного диагностического бактериофага Л-413С;

предложено рассматривать холин и эндолизин чумного диагностического бактериофага фага Л-413С или комбинацию гена белка E бактериофага φX174 с холином и эндолизином чумного диагностического бактериофага фага Л-413С в качестве наиболее перспективных литических фаговых белков при конструировании бактериальных теней энтеробактерий с использованием генно-инженерных подходов;

доказана зависимость иммунологической активности препарата бактериальных теней чумного микроба от степени гидролиза пептидогликана, вызванного воздействием фаговых литических ферментов, и продемонстрировано, что максимальная степень гидролиза сопровождается достоверным повышением протективной активности препаратов бактериальных теней *Yersinia pestis* в отношении морских свинок, что коррелирует со значительным повышением уровней IFN-γ в спленоцитах иммунизированных животных;

введен новый морфотип бактериальных теней – «бактериальные мешочки», характеризующийся полным отсутствием пептидогликанового каркаса;

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказана хозяйская специфичность противочумного иммунитета, индуцированного введением препаратов бактериальных теней из штамма чумного микроба, не содержащего основных иммунодоминантных антигенов: капсульного антигена F1 (Caf1) и/или V антигена (LcrV), а также влияние

степени редуцированности пептидогликана клеточной стенки чумного микроба в составе бактериальных теней на напряженность формируемого иммунного ответа у морских свинок, вносящее вклад в расширение представлений об иммуногенезе чумы.

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: микробиологических (культивирование штаммов *Escherichia coli* и *Y. pestis* на плотных и в жидких питательных средах, определение обсемененности селезенок иммунизированных и интактных лабораторных животных после заражения), генно-инженерных (амплификация, электропорация, криотрансформация, конструирование литических плазмид, сайт-направленный мутагенез с использованием суицидных векторов), микроскопических (просвечивающая электронная микроскопия), биотехнологических (препаративное получение бактериальных теней, капсульного (Caf1) и V (LcrV) антигенов чумного микроба), биохимических (анионообменная хроматография, гидрофобная хроматография, фракционирование сульфатом аммония с последующей хроматографической очисткой), биологических (иммунизация животных, заражение животных вирулентным штаммом, взятие органов и цельной крови у лабораторных животных), иммунологических (иммуноферментный анализ), статистических (анализ экспериментальных данных с помощью программы GraphPad Prism версии 8.0.0) методов исследования.

изложена гипотеза механизма увеличения защитной активности препарата бактериальных теней чумного микроба для морских свинок, предполагающая связь между образованием при гидролизе пептидогликана, под воздействием фаговых литических ферментов, молекул мурамил-дипептида, обладающих доказанной адъювантной активностью и, соответственно, повышающих иммунный ответ;

раскрыты основные этапы (получение штамма *Y. pestis* с низкой эндотоксичностью, трансформация литических плазмид в штамм чумного микроба, выращивание штамма продуцента, индукция образования бактериальных теней, отмывка и лиофильная сушка препарата бактериальных

теней) и используемые приемы (контроль тенеобразования по оптической плотности суспензии и жизнеспособности культуры методом прямого посева на плотную питательную среду, контроль специфической стерильности и безопасности, тестирование иммунологической активности) получения препарата бактериальных теней на основе аттенуированных штаммов чумного микроба *Y. pestis* с применением фаговых литических ферментов;

изучено влияние двукратной подкожной иммунизации препаратом бактериальных теней чумного микроба, полученным при воздействии комбинации гена белка E бактериофага фХ174 с холином и эндолизинном чумного диагностического бактериофага фага Л-413С, на индукцию и степень напряженности иммунного ответа для двух видов мелких лабораторных животных и показана защита от гибели морских свинок при заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* дикого типа (индекс иммунитета ИИ= $4,9 \times 10^4$), но отсутствие протективности для беспородных мышей (ИИ= 3×10^0).

проведена модернизация методических приемов моделирования бубонной чумы у лабораторных животных после введения аттенуированных штаммов *Y. pestis* Δpgm с использованием декстрана железа, пригодных для изучения протективности кандидатных вакцинных препаратов на ранних стадиях разработки.

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

разработаны и внедрены методические рекомендации «Получение бактериальных теней из аттенуированных штаммов *Yersinia pestis*» (утверждены директором Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии 31.05.2023 г., протокол Ученого Совета № 3) - учрежденческий уровень внедрения;

материалы для учебной программы дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (справка от 31.08.2023 г.) – учрежденческий уровень внедрения;

материалы для подготовки кадров высшей квалификации (аспирантуры) при Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии по направлению 1.5 - Биологические науки, профиль 1.5.11. Микробиология (справка № 83А от 21.08.2023 г.) – учрежденческий уровень внедрения;

определены перспективы практического использования результатов диссертационного исследования и обоснован состав субъединичной вакцины чумной трехкомпонентной, включающей в себя препарат бактериальных теней штамма *Y. pestis* KM 260(12) Δ *lpxM*/pEYR-E-Y-K и иммунодоминантные антигены чумного микроба – капсульного антигена F1 (Caf1) и V антигена (LcrV);

создан набор штаммов *E. coli*, несущих вектор для клонирования литических фаговых генов и пять литических плазмид, содержащих ген белка E бактериофага ϕ X174 и кассеты литических генов систем «холин-эндолизин» бактериофага λ или чумного диагностического бактериофага Л-413С, а также штамм *Y. pestis* subsp. *pestis* KM260(12) Δ *lpxM*/pEYR'-E-Y-K – продуцент бактериальных теней чумного микроба. Семь штаммов депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (справки о депонировании № 299 от 14.11.2021 г. и №№ 317-322 от 03.06.2022 г.) - федеральный уровень внедрения;

представлены сведения о высокой иммунологической активности предлагаемого препарата вакцины чумной трехкомпонентной для морских свинок и мышей, двукратная подкожная иммунизация которым вела к формированию напряженного иммунного ответа и защищала животных от гибели при подкожном заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* дикого типа (Индекс иммунитета ИИ > 10⁵ для морских свинок и ИИ > 10⁴ для мышей), что свидетельствует о перспективности проведения дальнейших доклинических и клинических испытаний препарата в качестве потенциальной вакцины для профилактики чумы.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

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

идея диссертационного исследования об использовании технологии конструирования полиантигенных вакцин на основе «бактериальных теней» чумного микроба базируется на анализе имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, обобщении опыта ведущих исследовательских групп по получению и изучению бактериальных теней на моделях *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* и *Yersinia enterocolitica*;

установлена корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными независимых отечественных и зарубежных авторов, касающихся безопасности и высокой протективной активности препаратов бактериальных теней холерного микроба, сальмонелл, кишечной палочки, бордетелл, пастерелл, возбудителя кишечного иерсиниоза и др.;

использованы современные методы обработки информации: систематизация, визуализация полученных результатов и статистическая обработка результатов при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.0.

Личный вклад соискателя заключался в анализе литературных данных, планировании экспериментов, выполнении молекулярно-биологических, микробиологических, биотехнологических и иммунобиологических экспериментов, анализе полученных результатов, подготовке материалов для публикаций, представлении устных и стендовых 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 22.12.2023 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 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101), и принял решение присудить Вагайской Анастасии Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук за решение актуальной научно-практической задачи, связанной с конструированием и оценкой протективной активности бактериальных теней чумного микроба в качестве компонента чумной инактивированной вакцины, имеющее значение для дальнейшего совершенствования специфической профилактики чумы, и может быть квалифицировано как научное достижение в современной микробиологии и биотехнологии.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **16** человек, из них **7** докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология и **8** докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, 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 – 22.12.2023 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.