

УТВЕРЖДАЮ:

Директор 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 академик РАН, д-р мед. наук, профессор



 И.А. Дятлов

«29» 09 2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И BIOTEХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Диссертация «Бактериальные тени *Yersinia pestis*» выполнена в лаборатории микробиологии чумы 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 Российской Федерации.

В период подготовки диссертации соискатель Вагайская Анастасия Сергеевна работала 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, в отделе особо опасных инфекций лаборатории микробиологии чумы в должности младшего научного сотрудника.

В 2017 г. Вагайская Анастасия Сергеевна окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по специальности «Микробиология». В 2017-2019 гг. проходила обучение в магистратуре Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пушкинский естественно-научный институт» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по профилю образовательной программы «Биологическая безопасность». В 2019-2023 гг. обучалась в аспирантуре Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (Направление подготовки: 06.06.01 – Биологические науки, специальность 1.5.11. – микробиология).

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2023 г. Федеральным бюджетным учреждением 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.

Научный руководитель: 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 отдела особо опасных инфекций, главный научный сотрудник.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

В настоящее время в целом ряде лабораторий продолжается разработка чумных вакцин-кандидатов, однако общепризнанная чумная вакцина до сих пор не лицензирована, так как ни одна из них не показала полного соответствия современным требованиям ВОЗ к "профилю целевого продукта против чумы".

В конце прошлого века группой австрийских ученых под руководством W. Lubitz была предложена новая технология конструирования полиантигенных вакцин на основе «бактериальных теней», которая была успешно использована на моделях *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* и *Yersinia enterocolitica* и др. но не была адаптирована к чумному микробу.

Конструирование бактериальных теней чумного микроба позволит оценить перспективность использования данной технологии для разработки прототипов инактивированной чумной вакцины, эффективно защищающих от гибели несколько видов лабораторных животных.

Диссертационная работа Вагайской А.С. является завершенной научно-квалификационной работой, в ходе которой сконструирован набор плазмид, несущих различные комбинации гена белка Е фага φX174 с кассетами литических генов систем «холин-эндолизин» фагов λ или чумного диагностического бактериофага Л-413С, получены бактериальные тени на основе аттенуированного штамма *Y. pestis* с пониженной реактогенностью, а также новые данные об иммунологической активности бактериальных теней *Y. pestis* в отношении двух видов лабораторных животных с целью создания прототипа чумной полигостальной вакцины.

Диссертационная работа Вагайской А.С. по своей актуальности, научной и практической значимости, новизне полученных результатов соответствует всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановлений Правительства РФ 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, с изм., внесенными Постановлением Правительства РФ от 26.05.2020 № 751), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертационная работа соответствует отрасли науки «Биологические науки» и паспорту специальности 1.5.11 – «Микробиология» в областях исследований по пунктам 4 – «Строение микробной клетки», 5 – «Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов», 7 – «Ферменты микроорганизмов», 12 – «Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности» и 1.5.6 – «Биотехнология» в областях исследований по пунктам 1 – «Молекулярная биотехнология, генетическая и метаболическая инженерия», 2 – «Генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии. Технологии культивирования микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных», 3 – «Микробная и клеточная биотехнология», 9 – «Медицинские биотехнологии. Создание лекарственных форм, комбинированных препаратов и биологически активных препаратов. Технологии производства вакцин. Средства диагностики вирусных, бактериальных и грибных болезней», 27 – «Создание генетически модифицированных организмов растительного, животного и микробного происхождения (ГМО и ГММ) на основе направленного редактирования геномов и синтетической биологии; биотехнологии клеточных культур. Конструирование ГМ-штаммов микроорганизмов. Трансгенные организмы. Системы оценки безопасности ГМО и ГММ растительного, животного и микробного происхождения», 29 – «Оценка безопасности, качества и функционального потенциала биотехнологических штаммов-продуцентов. Молекулярно-генетическое маркирование штаммов – продуцентов. Методы контроля подлинности биотехнологических продуктов».

Личное участие автора заключалось в анализе литературных данных, планировании экспериментов, в выполнении молекулярно-биологических,

микробиологических, биотехнологических и иммунобиологических экспериментов, анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с канд. биол. наук М.Е. Платоновым, д-ром мед. наук С.В. Дентовской, канд. биол. наук С.А. Ивановым, канд. биол. наук Комбаровою Т.И., д-ром биол. наук Герасимовым В.Н.

Достоверность полученных результатов обусловлена использованием современных микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, иммунохимических, биоинформационных методов, позволяющих документально регистрировать изучаемые объекты и явления, достаточным объемом фактического материала и наличием соответствующих контролей, а также проведением статистического анализа и математического моделирования, воспроизводимостью результатов в разных условиях эксперимента, использованием на всех этапах работы сравнения авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике; установлением качественного совпадения авторских результатов с результатами, представленными в независимых опубликованных источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение являлось обоснованным.

Научная новизна заключается в том, что сконструирован набор литических плазмид, несущих различные комбинации гена белка Е бактериофага ϕ X174 с кассетами литических генов систем «холин-эндолизин» бактериофага λ или чумного диагностического бактериофага Л-413С.

При сравнительной оценке эффективности фаговых литических ферментов плазмид на модели кишечной палочки и чумного микроба получены бактериальные тени с различной степенью редукции пептидогликана клеточной стенки. Установлена наименьшая литическая способность белка Е бактериофага ϕ X174 и максимальная степень деструкции пептидогликана после воздействия холина и эндолизина чумного

диагностического бактериофага Л-413С или комбинации белка Е, холина и эндолизина бактериофага Л-413С.

Установлено, что гидролиз пептидогликана в составе бактериальных теней чумного микроба сопровождается достоверным повышением протективной активности препарата в отношении морских свинок, коррелирующее с значительным повышением уровней IFN- γ в спленocyтaх этого вида животных, иммунизированных препаратом УК-БТ и особенно ЕУК-БТ.

Показано, что моделирование бубонной чумы у беспородных мышей в условиях УББ 2 лаборатории путем подкожного введения штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ и декстрана железа можно использовать для изучения протективности кандидатных вакцинных препаратов на ранних стадиях разработки.

Практическая значимость

Получены новые данные о хозяйской специфичности противочумного иммунитета, индуцированного введением препаратов бактериальных теней из штамма чумного микроба, не содержащего основные иммунодоминантные антигены: капсульный антиген F1 (Caf1) и/или V антиген (LcrV), а также влияние степени редуцированности пептидогликана клеточной стенки чумного микроба в составе БТ на напряженность формируемого иммунного ответа у морских свинок.

Предложен новый морфотип БТ – «бактериальные мешочки», характеризующийся отсутствием пептидогликанового каркаса, и выдвинута гипотеза механизмов его формирования.

Обоснован компонентный состав прототипа чумной полигостальной вакцины, включающей препарат БТ из бесплазмидного аттенуированного штамма *Y. pestis* КМ 260(12) Δ lpxM/pEYR-E-Y-K и иммунодоминантные антигены чумного микроба - капсульный антиген F1 (Caf1) и V антиген (LcrV).

Разработаны основные приемы наработки препарата бактериальных теней из аттенуированных штаммов чумного микроба *Y. pestis* с

использованием фаговых литических ферментов. Подготовлены методические рекомендации «Получение бактериальных теней из аттенуированных штаммов *Yersinia pestis*» (утверждены директором ФБУН ГНЦ ПМБ 31.05.2023 г., протокол № 3) (учрежденческий уровень внедрения).

Оптимизированы методические приемы моделирования бубонной чумы с использованием декстрана железа у лабораторных животных, зараженных аттенуированными Δpgm штаммами *Y. pestis*.

Депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (п. Оболенск Московской обл.) семь штаммов: *Y. pestis* subsp. *pestis* KM260(12) $\Delta lpxM/pEYR'$ -E-Y-K, несущий плазмиду $pEYR'$ -E-Y-K с геном белка E бактериофага $\phi X174$ и кассетой литических генов систем «холин-эндолизин» чумного диагностического бактериофага Л-413С, а также *Escherichia coli* DH5 $\alpha/pEYR'$, *E. coli* DH5 $\alpha/pEYR'$ -E, *E. coli* DH5 $\alpha/pEYR'$ -Y-K, *E. coli* DH5 $\alpha/pEYR'$ -E-Y-K, *E. coli* DH5 $\alpha/pEYR'$ -Sam7-R-Rz и *E. coli* DH5 $\alpha/pEYR'$ -E-Sam7-R-Rz – штаммы, несущие литические плазмиды $pEYR'$, $pEYR'$ -E, $pEYR'$ -Y-K, $pEYR'$ -E-Y-K, $pEYR'$ -Sam7-R-Rz и $pEYR'$ -E-Sam7-R-Rz, соответственно (федеральный уровень внедрения).

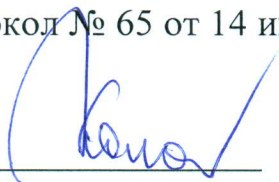
Материалы диссертационной работы используются при подготовке кадров высшей квалификации (аспирантуре) и для слушателей курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации ФБУН Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора при чтении лекций и проведении практических занятий в рамках основной профессиональной образовательной программы подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению 15.1. – Биологические науки, профиль 15.1.11. – микробиология и программы дополнительного профессионального образования «Микробиология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности».

Материалы диссертации полностью изложены в 13 опубликованных

соискателем научных работ по теме диссертации, включающих 5 статей в российских и зарубежных реферируемых научных журналах и 8 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций и конгрессов.

Диссертация «Бактериальные тени *Yersinia pestis*» Анастасии Сергеевны Вагайской рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11 – микробиология и 1.5.6 – биотехнология.

Заключение принято на заседании межлабораторного научного семинара 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. Присутствовало на заседании 35 чел. Результаты голосования: «за» - 35 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол № 65 от 14 июля 2023 г.



Коломбет Любовь Васильевна,
доктор биологических наук,

зав. научной частью, ученый секретарь
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