



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://irknipchi.ru/>

ОКПО 01898090, ОГРН 1023801543017

ИНН/КПП 3811015807/381101001

28.11.2023 № 38-30-02/01-1643/2-2023

На № _____ от _____ г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального казенного
учреждения здравоохранения «Иркут-
ский ордена Трудового Красного Знаме-
ни научно-исследовательский проти-
вочумный институт Сибири и Дальнего
Востока» Федеральной службы по надзо-
ру в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

доктор медицинских наук, профессор

С. В. Балахонов

28.11.2023 2023 г.

О т з ы в

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 Вагайской Анастасии Сергеевны «Бактериальные тени *Yersinia pestis*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология 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 определяется возросшим в последние годы интересом к получению теней бактериальных клеток с целью использования их для конструирования инактивированных вакцин против широкого круга заболеваний, вызываемых бактериальными патогенами. Кроме того, благодаря микрокорпускулярным свойствам и встроенной адьювантостью бактериальные тени (БТ) находят применение в качестве таргетных систем доставки чужеродных антигенов и нуклеиновых кислот в биотехнологии. В настоящее время платформы, основанные на использо-

вании бактериальных теней, признаны перспективными для создания бесклеточных вакцин против целого ряда заболеваний, вызываемых грамотрицательными микроорганизмами. Все это говорит о необходимости детального изучения возможности применения прототипа вакцин на основе БТ *Yersinia pestis*. В связи с этим, актуальность диссертационной работы А. С. Вагайской, направленной на получение и комплексное изучение теней микробных клеток *Y. pestis*, не вызывает сомнения.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа Анастасии Сергеевны Вагайской выполнена во ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора в рамках выполнения проекта НИР «Протективная активность «бактериальных теней» *Yersinia pestis*» (годы выполнения 2019–2021), поддержанного Российским Научным Фондом (№ 19-15-00072), и двух тем НИР в рамках отраслевых научно-исследовательских программ Роспотребнадзора «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (2016–2020 гг.), «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации» (2021–2025 гг.), а также в рамках работы Центра геномных технологий мирового уровня по обеспечению биобезопасности и технологической независимости.

Достоверность и научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Научные положения, выводы, заключение, сформулированные автором, логичны, теоретически обоснованы и основаны на достаточном фактическом материале, полученном в экспериментальных исследованиях с использованием современных бактериологических, физико-химических, биохимических, молекулярно-генетических, биотехнологических и иммунологических методов, адекватных поставленным цели и задачам, наличием соответствующих контролей. Результаты исследований обработаны с помощью методов статистического анализа.

Впервые с использованием фаговых литических ферментов разработаны основные приемы получения препарата бактериальных теней из аттенуированных штаммов чумного микроба.

На основании анализа результатов электронно-микроскопического исследования установлен факт образования при экспрессии гена белка Е с генами, кодирующими холин-эндолизинную систему фага Л-413С, лишенных пептидогликанового слоя нового морфотипа бактериальных клеток чумного микроба.

Получены новые данные о специфичности и напряженности иммунного ответа, формируемого у лабораторных животных при введении им препаратов БТ из штаммов *Y. pestis*, в том числе, с различной степенью редуцированности муреинового слоя.

Важным результатом диссертационной работы является оптимизация методического приема моделирования бубонной чумы у лабораторных животных после подкожного введения аттенуированного $\Delta rpgM$ штамма *Y. pestis* с использованием декстрана железа, что может быть рекомендовано для использования в ходе оценки эффективности кандидатных противочумных вакцин на ранних стадиях разработки в условиях лаборатории второго уровня биобезопасности (УББ 2).

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации

Создан набор плазмид, предназначенный для экспрессии кассет генов литических белков бактериофагов фХ174, λ и чумного диагностического бактериофага Л-413С.

Разработана биотехнология получения препаратов бактериальных теней из аттенуированных штаммов чумного микроба *Y. pestis* с использованием фаговых литических ферментов.

Наиболее значимым научно-практическим результатом выполненной диссертационной работы А. С. Вагайской является обоснование перспективности использования комплекса БТ из бесплазмидного генно-инженерного штамма *Y. pestis* КМ 260(12) $\Delta lpxM$ /pEYR-E-Y-K и рекомбинантных протективных антигенов фракции 1 и V-антигена чумного микроба в качестве экспериментальной противочумной вакцины.

В опытах на морских свинках установлен факт достоверного повышения протективной активности препаратов бактериальных теней *Y. pestis* при снижении содержания в них пептидогликана.

По результатам диссертационного исследования оформлены методические рекомендации учрежденческого уровня «Получение бактериальных теней из аттенуированных штаммов *Yersinia pestis*». Депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (п. Оболенск Мос-

ковской обл.) семь рекомбинантных штаммов *Y. pestis* и *Escherichia coli*, несущих литические плазмиды (федеральный уровень внедрения).

Результаты диссертационного исследования А. С. Вагайской могут быть рекомендованы к использованию в практической деятельности научно-исследовательских лабораторий и организаций, осуществляющих разработку вакцин для специфической профилактики чумы и занимающихся изучением противочумного иммунитета. Полученные результаты планируется применить для разработки и проведения доклинических испытаний прототипа трехкомпонентной чумной вакцины.

Материалы диссертации следует включать в лекционный материал курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации по особо опасным инфекциям, подготовки кадров высшей квалификации.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Методология и цель исследования соответствует заявленной теме диссертации, а поставленные задачи позволили раскрыть ее суть. Результаты исследования получены с использованием современного поверенного и сертифицированного оборудования, позволяющего документально регистрировать изучаемые объекты и явления. Достаточный объем фактического материала, наличие соответствующих контролей, статистический анализ полученных результатов определяют степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, представленных в диссертации.

Структура и содержание диссертации, её завершенность

Диссертация А. С. Вагайской является законченным, логически выстроенным научным трудом, имеет традиционную структуру и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Собственные исследования», включающие «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Перечень сокращений, условных обозначений, символов, единиц и терминов», «Список использованных источников», который включает 254 научные работы отечественных и зарубежных авторов, «Список работ, опубликованных по теме диссертации». Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста, иллюстрирована 20 рисунками и 9 таблицами.

В главе «Обзор литературы», состоящей из трех подразделов, достаточно детально изложены современные представления о методах получения бактериальных теней различных патогенов, их взаимодействия с иммунной системой, доступные сведения о бактериальных тенях различных патогенов. Здесь же приводится логичное заключение

по обзору литературы. Диссертант продемонстрировал свою эрудицию в изучаемой проблеме. Проведенный анализ литературы позволил отчетливо сформулировать актуальность, цель и задачи диссертационной работы.

Собственные исследования автора выполнены на высокотехнологичном оборудовании и с использованием адекватных поставленным задачам современных микробиологических, физико-химических, молекулярно-генетических, электронно-микроскопических и иммунологических методов, описанных в главе 2 «Материалы и методы».

Раздел «Результаты и обсуждение» включает три главы.

Глава 3 разбита на три подраздела и заключение по главе. В ней описываются результаты создания набора литических плазмид, их использования для получения теней бактериальных клеток штамма *E. coli* DH5 α и изучения их морфологических свойств с применением просвечивающей электронной микроскопии.

Глава 4, разбитая на девять подразделов, посвящена описанию результатов конструирования рекомбинантного штамма *Y. pestis* KM260(12) Δ lpxM продуцента бактериальных теней чумного микроба. Приведены результаты электронно-микроскопического и комплексного иммунологического исследования полученных теней бактериальных клеток, в том числе в опытах на лабораторных животных изучена протективная активность препаратов бактериальных теней *Y. pestis* KM260(12) Δ lpxM, различающихся по степени деструкции пептидогликана. Осуществлены компоновка и характеристика комплексного микрорпускулярного вакцинного препарата с включением в его состав двух протективных антигенов *Y. pestis* (F1- и V-антигенов).

В целом, в ходе выполнения данного раздела диссертационной работы определен состав комплексного иммуногенного препарата, пригодного для разработки безопасной и эффективной вакцины против чумы.

В главе 5 описываются результаты моделирования экспериментальной чумы в условиях лаборатории второго уровня биобезопасности (УББ 2). Показано, что использование декстрана железа при моделировании бубонной чумы позволяет повысить для беспородных мышей остаточную вирулентность вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. В результате проведенных экспериментов делается заключение о том, что при внутрибрюшинном введении декстрана железа штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ может быть использован для воспроизведения бубонной чумы с выраженными патологоана-

томическими изменениями и гибелью мышей в условиях УББ 2. И предложенная модель бубонной чумы может быть рекомендована для быстрой и безопасной оценки кандидатных вакцинирующих препаратов с выбором наиболее перспективных для дальнейшего тестирования в условиях третьего уровня биобезопасности (УББ 3).

Заключение подводит итог проделанной работе, в нем обобщены и проанализированы полученные данные. Выводы, представленные автором, полностью отражают полученные результаты диссертационного исследования и соответствуют поставленным задачам. Текст диссертации достаточно иллюстрирован, что облегчает его восприятие.

Диссертационная работа А. С. Вагайской соответствует отрасли науки «Естественные науки» и паспорту научных специальностей:

– 1.5.11. Микробиология и в областях исследований по пунктам: 4. Строение микробной клетки; 12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности.

– 1.5.6. Биотехнология в областях исследований по пунктам: 1. Молекулярная биотехнология, генетическая и метаболическая инженерия; 9. Медицинские биотехнологии.

Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, выполнении микробиологических, физико-химических, биохимических, биотехнологических, молекулярно-генетических, электронно-микроскопических, иммунохимических, биологических исследований, анализе полученных результатов, в подготовке публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены диссертантом совместно с канд. биол. наук М. Е. Платоновым, д-ром мед. наук С. В. Дентовской, канд. биол. наук С. А. Ивановым, канд. биол. наук Т. И. Комбарово́й, д-ром биол. наук В. Н. Герасимовым.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты диссертации опубликованы в 13 научных работах, из них 1 статья в зарубежном журнале и 4 в рецензируемых отечественных научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных работ. Материалы диссертации доложены и представлены на российских и международных научных конференциях.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

В автореферате изложены основные идеи и выводы диссертации, показаны актуальность, новизна и практическая значимость результатов исследования, приведен список публикаций, в которых отражены основные научные результаты диссертации. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационной работы.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы

К достоинствам диссертационной работы можно отнести умелое изложение современных данных по исследуемой теме, корректно сформулированные цель и задачи исследования, использование адекватных методов изучения, логически грамотное построение всей работы, включая рекомендации по использованию полученных результатов на практике.

По существу изложенных в диссертационной работе А. С. Вагайской материалов принципиальных замечаний нет. Однако, в процессе ознакомления с диссертацией возникли вопросы для обсуждения:

1. В диссертационной работе дозу препарата бактериальных тений измеряли в количестве исходных бактериальных клеток (колониобразующих единицах). На сколько это корректно? Может быть следовало подсчитать количество частиц в образце, либо выразить дозу в микрограммах сухого веса?

2. Как освобождали получаемые суспензии бактериальных тений от возможного присутствия в них неживых неразрушенных клеток?

Отмеченные замечания и вопросы не изменяют общей положительной оценки диссертационной работы и не снижают ее научной и практической ценности.

Заключение

В целом, диссертация Вагайской Анастасии Сергеевны «Бактериальные тени *Yersinia pestis*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершенной самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, связанной с разработкой метода получения и характеристикой свойств тений бактериальных клеток чумного микроба, что важно для современной микробиологии и биотехнологии. По актуальности, методическому уровню, научной новизне полученных результатов, их практической значимости диссертация соответствует требованиям п. 9 Постановления

Правительства РФ 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.

Отзыв ведущей организации обсужден и одобрен на заседании ученого совета ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, протокол № 8 от 24.11.2023 г.

Заведующий биохимическим отделом
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 биологических наук



Евгений Юрьевич Марков

Заведующая отделом микробиологии чумы
того же института
кандидат медицинских наук



Светлана Александровна Витязева

Подписи Е. Ю. Маркова и С. А. Витязевой заверяю
Начальник отдела кадров и спец. части



Н. И. Шангарева

Сведения о ведущей организации

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, Иркутская область, г. Иркутск, ул. Трилиссера, д. 78; Телефон: +7(3952) 22-01-39; Факс: +7(3952) 22-01-40; <http://irknipchi.ru/>; E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru