

Отзыв

официального оппонента

на диссертацию Вагайской Анастасии Сергеевны «Бактериальные тени *Yersinia pestis*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. – Микробиология, 1.5.6. – Биотехнология

Актуальность темы диссертационной работы

Чума, самая известная и страшная бактериальная инфекция в истории человечества, имеющая зоонозную природу и вызываемая грамотрицательной бактерией *Yersinia pestis*, не ушла и не исчезла из нашего мира, а продолжает сохраняться в природных очагах, расположенных в разных частях света, в том числе, на территории Российской Федерации. Функционирование этих природных очагов зависит от тонкого баланса между сохранением возбудителя в почвах, в том числе, в виде, в виде некультивируемых форм, спектром населяющих регион видов млекопитающих, демонстрирующих разную степень восприимчивости к чуме, и связанными с ними блохами. И хотя продолжающаяся в настоящее время третья пандемия, в основном, затихла, и в наши дни регистрируются сотни случаев заболевания людей в разных регионах мира: так, с 2010 по 2015 годы в мире было зарегистрировано больше 3000 спорадических случаев чумы, а вспышка на острове Мадагаскар в 2017 году затронула почти 2000 человек. Диагностика на месте, раннее лечение антибиотиками и меры по локализации способствуют контролю вспышки, однако не могут полностью предотвратить смертность от развития заболевания, что делает по-прежнему актуальными работы по созданию вакцин, защищающих от инфекции *Y. pestis*. Разработки вакцин на основе аттенуированных штаммов, очень популярные одно время, продемонстрировали свою опасность в отношении людей с ослабленным иммунным ответом. Убитые бактерии, достаточно эффективно защищающие от бубонной формы чумы, оказались

мало эффективны для защиты от легочной формы. Кроме того, было показано, что основным иммуногенным компонентом вакцин, включающих убитых бактерий, являлся капсульный антиген F1, что привело к разработке субъединичных вакцин, основанных на F1 антигене, V антигене LcrV или основном соматическом антигене. Однако субъединичные вакцины демонстрировали заметную видоспецифичность, защищая одни виды лабораторных животных и будучи мало эффективными в отношении других. Эта ситуация привела к осознанию необходимости разработки комбинированных вакцин, включающих несколько компонентов.

Автором была предложена концепция использования в качестве базового компонента многокомпонентной вакцины клеточных теней возбудителя чумы *Y. pestis* – клеточных оболочек, полученных в результате лизиса бактериальных клеток, - которые могут быть дополнены другими компонентами (например, антигенами F1 и/или Lcr). Бактериальные тени содержат все поверхностные антигены, что существенно увеличивает потенциал полученных вакцинных препаратов. Эффективность бактериальных теней как вакцинных препаратов была продемонстрирована для ряда возбудителей, но для *Y. pestis* этот подход ранее не был использован.

Научная новизна

Авторами был сконструирован набор плазмид, несущих гены литических ферментов фагового происхождения, которые были введены в *Y. pestis*, что, с одной стороны, позволило ранжировать доступные для биотехнологии бактериальные гидролазы по степени их воздействия на пептидогликан *Y. pestis*; с другой стороны, использование разных гидролаз позволило авторам получить бактериальные тени с разной степенью редукции пептидогликана клеточной стенки. Используя данный подход, авторы продемонстрировали корреляцию между степенью гидролиза пептидогликана и уровнем протективного эффекта препаратов бактериальных теней в отношении морских свинок, что было

продемонстрировано как на уровне параметров иммунного ответа, так и на уровне определения LD50. Авторы показали, что вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, аттенуация которого связана с нарушениями в системе импорта железа, может развивать полноценную инфекцию в мышцах при условии подкожного введения параллельно с декстраном железа.

Теоретическая и практическая значимость

Комбинируя разработанный авторами препарат бактериальных тений с препаратами иммунодоминантных антигенов чумного микроба – капсульного антигена F1 (Caf1) и V антигена (LcrV), - авторам удалось добиться эффективной защиты как морских свинок, так и лабораторных мышей, что позволило им преодолеть проблему видоспецифичности субъединичных вакцин. Авторами получены данные о влиянии степени редуцированности пептидогликана клеточной стенки чумного микроба в составе бактериальных тений на напряженность формируемого иммунного ответа, что важно не только для использованной, но и для других моделей. Обоснован компонентный состав прототипа чумной полигостальной вакцины, включающей препарат бактериальных на основе бесплазмидного аттенуированного штамма *Y. pestis* KM 260(12)ΔprxM/pEYR-E-Y-K и иммунодоминантные антигены чумного микроба – капсульный антиген F1 (Caf1) и V антиген (LcrV).

Разработаны основные приемы наработки препарата бактериальных тений из аттенуированных штаммов чумного микроба *Y. pestis* с использованием фаговых литических ферментов, что отражено в методических рекомендациях «Получение бактериальных тений из аттенуированных штаммов *Yersinia pestis*» (утверждены директором ФБУН ГНЦ ПМБ 31.05.2023 г., протокол № 3 - чрезвычайный уровень внедрения).

Отработана лабораторная модель чумной инфекции, основанная на инфекции штаммом *Y. pestis* EV линии НИИЭГ в условиях параллельного введения декстрана железа. Преимуществом данной модели является ее

относительная безопасность, так как развитие чумной инфекции моделируется с использованием аттенуированного штамма.

Созданные авторами штаммы депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (п. Оболенск Московской обл.) 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».

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Авторами вынесены на защиту три научных положения, касающихся применимости созданных авторами плазмид для получения бактериальных теней *Y. pestis* с разными уровнями деструкции пептидогликана; потенцирования иммунного ответа бактериальными тенями непосредственно или в комбинации с иммуннодоминантными антигенами F1 и Lcr; метода моделирования бубонной чумы в мышах с использованием аттенуированного штамма EV линии НИИЭГ и хелатированного железа. Справедливость всех положений полностью доказана с использованием адекватных экспериментальных подходов и количественных данных, которые были статистически обработаны с использованием значимых критериев достоверности. Объем проведенных исследований соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Выводы основаны на

полученных результатах, соответствуют задачам и положениям диссертации. Практические рекомендации сформулированы на основе полученных в работе результатов.

Полнота изложения результатов в научной печати

Материалы диссертации полно представлены в печати. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в научных журналах, в том числе, 1 статья в журнале 1 квартиля по базе данных WoS и 3 статьи 2ого квартиля по базе данных Scopus, а также 8 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций.

Структура и содержание диссертации

Диссертация Вагайской А.С. написана по классическому образцу и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, включающую в себя материалы и методы исследования, результаты исследования и обсуждения результатов, заключение и список использованных источников, содержащий 254 источника, среди которых 5 российских и 249 зарубежных. Объем диссертации составляет 126 страниц машинописного текста. Результаты представлены на 20 рисунках и 9 таблицах. Оформление работы сделано в соответствии с требованиями Высшей Аттестационной Комиссии при Министерстве науки и высшего образования РФ.

Во введении отражена актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и задачи исследования, отмечены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Сформулированы основные положения выносимые на защиту, отмечена степень достоверности результатов, отражен личный вклад автора.

В обзоре литературы проанализированы научные публикации по аспектам, касающимся темы диссертации, включая методы получения бактериальных теней, взаимодействие теней с клетками-мишенями и примеры получения и использования теней различных патогенных бактерий.

В экспериментальной части в отдельной главе представлены материалы и методы исследования, включая описание использованных штаммов, методы конструирования плазмид, получения бактериальных теней, моделирования чумы в лабораторных животных, оценки иммунного ответа, статистической обработки и т.д. Результаты и их обсуждение представлены в 3х главах, включая оценку эффективности фаговых литических ферментов при получении бактериальных теней, получение и характеристику теней *Y. pestis* и моделирование чумы в лабораторных животных в условиях УББ2 лаборатории.

В последней главе представлено Заключение, обобщающее и структурирующее сделанные экспериментальные наблюдения.

Сделанные выводы и основанные на них выносимые на защиту научные положения соответствуют полученным результатам, научно доказаны и соответствуют цели и задачам работы.

В целом, существенных замечаний к оформлению диссертации. В тексте замечены отдельные орфографические опечатки, которые не меняют смысла выражений.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает основные результаты и содержание диссертации.

Рекомендации по использованию выводов и результатов диссертации

Результаты диссертации Вагайкиной А.С. могут быть использованы в биотехнологической промышленности для создания промышленной версии вакцины против чумного микроба, а также научными учреждениями при разработке вакцин, защищающих от грамотрицательных патогенных бактерий.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

Работа очень интересная и прекрасно написанная. Основной вопрос, который возник, связан с выявленной корреляцией между уровнем гидролиза пептидогликана и уровнем иммунного ответа. Обсуждая этот результат, авторы справедливо указывают, что фрагменты пептидогликана, но не сам полимер, являются молекулами молекулярных паттернов (PAMPs), распознаваемых TLR-рецепторами врожденной иммунной системы. Соответственно, концентрация фрагментов пептидогликана в образце может быть существенным фактором, влияющим на врожденный иммунный ответ. Если фрагменты пептидогликана в значительной степени присутствуют в образцах бактериальных теней (БТ), используемых для иммунизации, то такое присутствие может быть связано со степенью отмывки БТ. Вопрос: проводился ли как-то контроль количества и состава фрагментов пептидогликана в образцах БТ? И правильно ли будет утверждение, что, что если отмывать БТ сильнее, то фрагменты пептидогликана будут тоже отмыты и уровень иммуногенности препарата упадет? Этот вопрос относится скорее к области научной дискуссии, и ни в коей мере не умаляет значимости и качества полученных результатов.

Заключение

Диссертационная работа Вагайской Анастасии Сергеевны «Бактериальные тени *Yersinia pestis*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. – Микробиология, 1.5.6. – Биотехнология, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи по разработке методологии получения бактериальных теней возбудителя чумы *Yersinia pestis*, получению доказательств его иммуногенности и синэргетического влияния на иммуногенность ранее охарактеризованных компонентов субъединичных вакцин против чумы, имеющей существенное значение для медицинской микробиологии. Таким образом, диссертационная работа Вагайской А.А. «Бактериальные тени *Yersinia pestis*» по своей актуальности,

новизне и практической значимости соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 и последующих редакций Постановлений Правительства РФ (№335 от 21.04.2016; №748 от 02.08.2016; №1024 от 28.08.2016; 1168 от 01.10.2018; №426 от 20.03.2021; 1539 от 11.09.2021; №1690 от 26.09.2022), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Вагайская Анастасия Сергеевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. – Микробиология, 1.5.6. – Биотехнология.

Заведующая лабораторией экологии возбудителей инфекций Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор биологическая наук

Ермолаева Светлана Александровна

27 ноября 2023

Подпись заведующей лабораторией экологии Ермолаевой Светлана Александровны заверяю Ученый секретарь ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России кандидат биологических наук Сысолятина Елена Владимировна



Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России)

Россия, г. Москва, 123098, ул. Гамалеи 18. Тел. +7-499-193-3001

. Факс +7-499-193-6183, Email: info@gamaleya.org