

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертацию Вагайской Анастасии Сергеевны на тему:
«Бактериальные тени *Yersinia pestis*», представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы диссертации

Поскольку реальность пандемических угроз бросает серьезный вызов человечеству, разработка и использование вакцинных препаратов остается одной из наиболее эффективных мер по охране общественного здоровья. Чума по-прежнему является эндемичной во многих регионах мира. Несмотря на чувствительность чумного микроба к целому ряду антибиотиков, ежегодный рост числа случаев инфекции во всем мире, обнаружение клинических изолятов с множественной лекарственной устойчивостью, потенциальная возможность перерастания локальных вспышек в пандемию ведут к глобальной необходимости эффективных вакцин против чумы. Разработка противочумных вакцин продолжается, часть из них находятся на фазе доклинических и клинических испытаний, однако общепризнанный вакцинный препарат до сих пор не лицензирован, так как ни один из вакцинных кандидатов не показал полного соответствия современным требованиям ВОЗ к «профилю целевого продукта против чумы». Поэтому актуальность диссертационной работы Вагайской Анастасии Сергеевны, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук, посвященной конструированию бактериальных теней чумного микроба и оценке перспективности использования данной технологии при создании вакцинного препарата для профилактики чумы, не вызывает сомнения.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертантом вынесено на защиту три положения, которые последовательно обоснованы в рецензируемой рукописи и публикациях по теме диссертации. Все 5 выводов основаны на продуманном плане работ, сочетании классических микробиологических, современных молекулярно-генетических и биотехнологических методов исследований, достаточном объеме фактического материала.

Достоверность и новизна положений, выводов и заключения

Достоверность полученных результатов опирается на статистическую обработку и не противоречит современным научным данным. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, вытекают из результатов проведенных исследований и подтверждены фактическим материалом. В разделе «Заключение» диссертант обобщает и анализирует полученные результаты.

В ходе выполнения диссертационного исследования сконструирован набор литических плазмид, несущих различные комбинации гена белка E бактериофага φX174 с

кассетами литических генов систем «холин-эндолизин» бактериофага λ или чумного диагностического бактериофага Л-413С, позволивший Анастасии Сергеевне получить на моделях кишечной палочки и чумного микроба бактериальные тени с различной степенью редукции пептидогликана. Новыми являются данные о наименьшей литической способности белка Е бактериофага ϕ X174 и максимальной степени деструкции пептидогликана после воздействия холина и эндолизина чумного диагностического бактериофага Л-413С или комбинации белка Е, холина и эндолизина бактериофага Л-413С на моделях кишечной палочки и чумного микроба.

Впервые установлено, что гидролиз пептидогликана в составе бактериальных теней чумного микроба сопровождается достоверным повышением протективной активности препарата в отношении морских свинок, коррелирующим с значительным повышением уровней IFN- γ в спленоцитах животных, иммунизированных препаратом УК-БТ и особенно ЕУК-БТ. Автором показано, что для изучения протективности кандидатных вакцинных препаратов на ранних стадиях разработки можно моделировать бубонную чуму у беспородных мышей в условиях лаборатории уровня биологической безопасности 2 (УББ 2) путем подкожного введения клеток штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ и декстрана железа вместо заражения вирулентным штаммом чумного микроба.

Практическая и теоретическая значимость

В теоретическом плане ценность представляет выдвинутая гипотеза влияния степени редуцированности пептидогликана клеточной стенки чумного микроба в составе БТ на напряженность формируемого иммунного ответа у морских свинок, а также феномен хозяйской специфичности противочумного иммунитета, индуцированного введением препаратов бактериальных теней из штамма чумного микроба, не содержащего основные иммунродоминантные антигены: капсульный антиген F1 (Ca1) и/или V антиген (LcrV). Полученные результаты важны для оптимизации компонентного состава прототипа чумной инактивированной вакцины.

Научная значимость диссертационной работы подтверждается публикациями полученных результатов в зарубежном и отечественных рецензируемых научных изданиях.

Разработанные приемы наработки препарата бактериальных теней из аттенуированных штаммов чумного микроба *Y. pestis* с использованием фаговых литических ферментов легли в основу подготовленных методических рекомендаций «Получение бактериальных теней из аттенуированных штаммов *Yersinia pestis*» (учрежденческий уровень внедрения).

Депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» (п. Оболensk, Московская обл.) семь штаммов: *Y. pestis* subsp. *pestis* KM260(12) Δ *lpxM*/pEYR'-E-Y-K, несущий плазмиду pEYR'-E-Y-K с геном белка Е бактериофага ϕ X174 и кассетой литических генов систем «холин-эндолизин» чумного диагностического бактериофага Л-413С, а также *Escherichia coli*

DH5 α /pEYR', DH5 α /pEYR'-E, DH5 α /pEYR'-Y-K, DH5 α /pEYR'-E-YK, DH5 α /pEYR'-Sam7-R-Rz и DH5 α /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 диссертации применяются при проведении лекций при подготовке кадров высшей квалификации (аспирантуре) и на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии». Разработанные методические приемы используют при проведении практических занятий программы дополнительного профессионального образования «Микробиология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Личный вклад автора заключается в поиске и анализе литературных данных по теме работы, определении цели и задач исследования, планировании и проведении экспериментальной работы, обработке полученных результатов, написании статей.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 126 страницах, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы, включающего 256 источников, в том числе 5 работ отечественных и 249 - иностранных авторов. Текст иллюстрирован 9 таблицами и 20 рисунками. Исследования проводили в рамках одного гранта РФФИ, двух плановых НИР отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность

Во введении диссертации четко обозначена актуальность выбранного направления, дана краткая характеристика существующего положения по получению и использованию бактериальных теней для профилактики инфекционных заболеваний; сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая ценность, положения, выносимые на защиту, данные об апробации работы, публикациях и структуре диссертации, свидетельствующие о соответствии требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по этим позициям.

В обзоре литературы (глава 1) представлен обширный материал, творчески осмысленный и обобщенный автором. Приведены сведения о генно-инженерном и химическом методе получения бактериальных теней грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Особое внимание уделено механизмам формирования иммунного ответа при взаимодействии бактериальных теней и антиген-презентирующих клеток. Обзор написан на основании достаточного объема научных данных, изложенных логично и грамотно. В целом, содержание «Обзора литературы»

полностью вводит читающего в курс решаемых диссертантом задач и свидетельствует об актуальности темы исследования.

Вторая глава посвящена материалам и методам исследования. В работе использованы классические микробиологические, молекулярно-генетические, биотехнологические подходы. Полученные в ходе исследования данные подвергали статистической обработке. В диссертационном исследовании Анастасия Сергеевна использовала штаммы кишечной палочки чумного и псевдотуберкулезного микроба, а также три бактериофага λ CE6, ϕ X174 и чумной диагностический бактериофаг Л-413 при конструировании литических плазмид. Формирование бактериальных теней кишечной палочки и чумного микроба подтверждено результатами просвечивающей электронной микроскопии. В экспериментах по определению протективной активности бактериальных теней чумного микроба диссертант опирался на методы оценки гуморального и клеточного иммунитета у иммунизированных лабораторных животных. Статистические методы в исследовании выполнены с применением современных компьютерных программ.

Описание методологии естественно перетекает в изложение результатов исследования, представленных в главах с третьей по пятую в порядке реализации четырех задач диссертации.

Третья глава посвящена созданию набора литических плазмид для продукции бактериальных теней. В диссертационной работе Анастасия Сергеевна сконструировала векторную плазмиду, способную к репликации в клетках представителей различных видов семейства Enterobacteriaceae, и клонировала в данном векторе под контролем промотора бактериофага λ pR (pR'), позволяющего экспрессировать гены при повышении температуры культивирования до 42 °С, гены холина (Y) и эндолизина (K) чумного диагностического бактериофага Л-413С, ген белка E бактериофага ϕ X174, гены холина (Sam7), эндолизина (R) и спанинов (Rz и Rz1) бактериофага λ (cI857Sam7). При анализе эффективности фаговых литических ферментов при образовании теней кишечной палочки диссертант продемонстрировала, что использование холина и эндолизина фага Л-413С в отдельности или в сочетании белком E бактериофага ϕ X174 обладает максимальной литической способностью.

Четвертая глава посвящена оценке протективности различающихся по степени деструкции пептидогликана вариантов БТ *Y. pestis* KM260(12) Δ lpxM для лабораторных животных (мышей и морских свинок), выбор наиболее протективного варианта, а также изучение иммунологической активности препарата БТ *Y. pestis* в комбинации с иммунодоминантными антигенами чумного микроба – капсульным антигеном F1 (Caf1) и V антигеном (LcrV). Анастасия Сергеевна получила лишенный маркера антибиотикоустойчивости штамм *Y. pestis* с делетированным геном *lpxM*, синтезирующий модифицированный ЛПС, состоящий из молекул со сниженной токсичностью в качестве основы для конструирования бактериальных теней. Показала, что препарат

бактериальных теней, полученный при воздействии холина, эндолизина чумного диагностического бактериофага Л-413С и белка Е бактериофага фХ174, с полностью гидролизированным пептидогликаном вызывает значительно большую защиту от гибели при инфицировании вирулентным штаммом *Y. pestis* у морских свинок по сравнению с классическими БТ и может использоваться в качестве эффективного компонента при разработке безопасной вакцины против чумы для нескольких хозяев (человек, мышь и обезьяны). Диссертант установила, что двукратное с интервалом в две недели подкожное введение беспородным мышам и морским свинкам композиции данного варианта бактериальных теней с иммунодоминантными антигенами чумного микроба – капсульным антигеном F1 (Caf1) и V антигеном (LcrV), вело к индукции синтеза специфических анти-F1 и антиV антител, а также антител к компонентам клеточной стенки бактериальных теней чумного микроба, формированию напряженного иммунного ответа и защищало животных от гибели при подкожном заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* дикого типа (ИИ > 10⁵ для морских свинок и ИИ > 10⁴ для мышей).

В пятой главе диссертационного исследования Анастасия Сергеевна оптимизировала методический прием моделирования бубонной чумы у лабораторных животных после подкожного введения аттенуированного Δpgm штамма *Y. pestis* с использованием коллоидного железа с целью оценки протективности кандидатных вакцин на ранних стадиях разработки, и показала, что использование декстрана железа однократно или ежедневно при моделировании бубонной чумы позволило повысить остаточную вирулентность аттенуированного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для беспородных мышей. Анастасия Сергеевна удалось продемонстрировать, что при ежедневном ведении препарата железа ЛД50 штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для животных приблизилась к аналогичному показателю штамма «дикого» типа *Y. pestis*.

В главе «Заключение» автор подводит итоги работы, обобщает полученные данные и определяет перспективы использования полученных результатов и направления дальнейших исследований.

Пять выводов, соответствующих поставленным задачам, основаны на представленном экспериментальном материале, являются логическим итогом проделанной работы и не вызывают сомнений в достоверности. Диссертация имеет законченный характер.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации, подтверждения опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Автореферат диссертации позволяет получить полное представление о проведенном исследовании. Основные результаты работы отражены в 13 научных работах, в том числе 5 – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации. Материалы, изложенные в диссертации, представлены и обсуждены на международных и всероссийских научных конференциях.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом

Представленная на отзыв диссертация Вагайской Анастасии Сергеевны «Бактериальные тени *Yersinia pestis*» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология имеет несомненную практическую ценность, а автор показала себя способным и профессионально состоявшимся исследователем.

В целом, подробное ознакомление с содержанием диссертации позволяет заключить, что работа отлично структурирована, текст изложен классическим научным стилем, полученные автором данные удачно иллюстрированы достаточным количеством графического материала с применением современного программного обеспечения, анализ выполнен с использованием соответствующих методов медицинской статистики.

Принципиальных замечаний к работе нет. Вместе с тем, к диссертанту возникли следующие вопросы, требующие разъяснения:

1. Почему для выполнения настоящего исследования была выбрана именно технология на основе «бактериальных теней», а не какая-либо другая современная платформа, технология или методология? Проводились ли другими учеными/научными группами аналогичные разработки на модели чумного микроба и, если да, то насколько эффективными они оказались?

2. Использовали ли для оценки протективной активности сконструированных штаммов инбредных животных?

Заключение

Диссертация Анастасии Сергеевны Вагайской выполнена на высоком методическом уровне, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи – конструирование и оценка протективной активности бактериальных теней чумного микроба в качестве компонента чумной инактивированной вакцины, имеющей значение для дальнейшего совершенствования специфической профилактики чумы. В целом, по значимости и актуальности поставленной проблемы, уровню методического подхода к её решению, теоретическому и научно-практическому значению результатов представленная работа соответствует критериям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановлений Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. № 1786), предъявляемым к кандидатским

диссертациям, а автор – Вагайская Анастасия Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

профессор кафедры «Микробиология и биотехнология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» (ФГБОУ ВО Вавиловский университет),
доктор медицинских наук,
профессор

Адрес: 410005, г. Саратов,
ул. Соколова, 335
E-mail: feodorovav@mail.ru
тел.: 8(905)- 385-01-20

Федорова Валентина Анатольевна

Подпись Федоровой В.А. заверяю.
Ученый секретарь
ФГБОУ ВО Вавиловский университет
Министерство сельского хозяйства
Российской Федерации
кандидат технических наук



Марадудин А.М.