

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 350.002.01 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 21.12.2018 г. № 19
о присуждении Соловьевой Екатерине Владимировне, гражданину РФ, ученой
степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Капсулоспецифичные бактериофаги и их полисахарид-
деградирующие ферменты, активные в отношении гипермукоидных штаммов
Klebsiella pneumoniae» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к
защите 03.10.2018 г., протокол № 13 диссертационным советом Д 350.002.01
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., Серпуховский р-н,
Оболенск, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Соловьева Екатерина Владимировна 1991 г. рождения, в
2014 г. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Челябинский государственный
университет» по специальности 020209 – «Микробиология». В октябре 2014 г.
была прикреплена к ФБУН ГНЦ ПМБ в качестве соискателя для подготовки
диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук без
освоения программ подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре.
С 2015 г. работает младшим научным сотрудником 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 молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов 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 – кандидат биологических наук Воложанцев Николай Валентинович, 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 молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Летаров Андрей Викторович, доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, лаборатория вирусов микроорганизмов, заведующий;

Зимин Андрей Антонович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина» Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», лаборатория молекулярной микробиологии, старший научный сотрудник,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Москва, в своем

положительном Заключении, подписанном Митрохиным Сергеем Дмитриевичем, доктором медицинских наук, профессором, лаборатория биологии бифидобактерий, главным научным сотрудником, указала, что диссертационная работа Соловьевой Е.В. является законченной, самостоятельно выполненной квалифицированной научной работой. На основании выполненных автором исследований сформулированы научные положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение важной и актуальной задачи, имеющей существенное значение для развития одного из приоритетных направлений клинической микробиологии - разработки новых подходов к борьбе с резистентными формами бактериальных патогенов. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов исследования. По глубине проведенных исследований новизне и научно-практической значимости диссертационная работа соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства № 335 от 21 апреля 2016 г., № 748 от 02 августа 2016 г., № 650 от 29 мая 2017 г., № 1024 от 28 августа 2017 г. «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Соловьева Екатерина Владимировна, заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Соискатель имеет **20** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации - **18** работ, из которых опубликованных в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК - **5** статей, и 13 тезисов в материалах конференций. Объем опубликованных статей составляет 2,4 п.л., авторский вклад соискателя составляет 75 %.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Volozhantsev, N.V. Complete genome sequence of novel T7-like virus vB_KpnP_KpV289 with lytic activity against *Klebsiella pneumoniae* / N.V. Volozhantsev, V.P. Myakinina, A.V. Popova, A.A. Kislichkina, **E.V. Komisarova***, A.I. Knyazeva, V.M. Krasilnikova, N.K. Fursova, E.A. Svetoch // *Archives of Virology*. - 2016. – Vol. 161. – P. 499-501.

2. Kislichkina, A.A. Genome sequencing and comparative analysis of three hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Russia / A.A. Kislichkina, A.I. Lev, **E.V. Komisarova***, N.K. Fursova, V.P. Myakinina, T.N. Mukhina, A.A. Bogun, N.V. Volozhantsev // *Pathogens and Disease*. – 2017. – Vol. 75. – No. 4. – P. ftx024.

3. **Komisarova*, E.V.** Complete Nucleotide Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Bacteriophage vB_KpnM_KpV477 / E.V. Komisarova, A.A. Kislichkina, V.M. Krasilnikova, A.G. Bogun, N.K. Fursova, N.V. Volozhantsev // *Genome Announcements*. - 2017. – Vol. 5. – No.37. – P. e00694-17.

4. **Solovieva, E.V.** Comparative genome analysis of novel Podoviruses lytic for hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* of K1, K2, and K57 capsular types / E.V. Solovieva, V.P. Myakinina, A.A. Kislichkina, V.M. Krasilnikova, V.V. Verevkin, V.V. Mochalov, A.I. Lev, N.K. Fursova, N.V. Volozhantsev // *Virus Research*. – 2018. – Vol. 243. – P. 10-18.

5. Lev, A.I. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012-2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles / A. I. Lev, E. I. Astashkin, A. A. Kislichkina, **E. V. Solovieva**, T. I. Kombarova, O. V. Korobova, O. N. Ershova, I. A. Alexandrova, V. E. Malikov, A. G. Bogun, A. I. Borzilov, N. V. Volozhantsev, E. A. Svetoch, N. K. Fursova // *Pathogens and Global Health*. – 2018. – Vol. 30. – P. 1-10.

Примечание: * Комисарова – фамилия Соловьевой Е.В. до 02.08.2017 г.

На диссертацию и автореферат поступили положительные отзывы от: (1) д-ра биол. наук, профессора **Васильева Дмитрия Аркадьевича**, директора ООО «Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии», г. Ульяновск; (2) д-ра хим. наук, профессора **Книреля Юрия Александровича**, заведующего лабораторией химии углеводов ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского» Российской академии наук, и канд. хим. наук **Шпирт Анны Михайловны**, научного сотрудника того же учреждения, г. Москва (в качестве недостатка в отзыве отмечено

несколько преувеличенное внимание Соловьевой Е.В. к различию между степенью выраженности специфичности рекомбинантных полисахарид-деполимераз и нативных бактериофагов, также в отзыве отмечено наличие неудачных оборотов и канцеляритов); (3) канд. биол. наук **Корниенко Марии Андреевны**, научного сотрудника Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА России, г. Москва (в отзыве отмечено в качестве недочета отсутствие электронных микрофотографий исследуемых бактериофагов, отсутствие указания количества мышей в экспериментах по определению степени вирулентности гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae*, отсутствие ссылки на источник литературы; а также предлагается для более точной оценки воздействия бактериофагов на *K. pneumoniae* оценивать ингибирование роста бактерий посредством высева и подсчета колониеобразующих единиц); (4) канд. биол. наук **Феоктистовой Натальи Александровны**, доцента кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», г. Ульяновск (в отзыве отмечено наличие в автореферате небольшого количества ошибок).

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что:

доктор биол. наук Летаров А.В. является признанным специалистом в области фундаментальных исследований экологии и молекулярной биологии бактериофагов и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Соловьевой Е.В. (**Genome Announ.** – 2018. – Т 6. – №3. – С. e01370-17; **Meth. Mol. Biol.** – 2018. – №1693. – С. 75-84; **Mol. Microbiol.** – 2017. – Т. 105. – №3. – С. 385-398; **Viruses.** – 2016. – Т. 8 – №1. – С. E26; **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** – 2016. – Т. 113. - №11. – С. E1452-9; **Arch. Virol.** – 2015. – Т. 160. – №12. – С. 3133-3137);

кандидат биол. наук Зимин А.А. является высококвалифицированным специалистом в сфере изучения генетических основ биоразнообразия кишечных бактериофагов и имеет научные публикации в сфере исследований,

соответствующей кандидатской диссертации Соловьевой Е.В. (**J. Gener. Virol.** – 2018. - doi: 10.1099/jgv.0.001014; **Политем. сетевой электрон. науч. журн. КубГАУ.** – 2017. – №134. – С. 404-426; **J. Appl. Microbiol.** – 2016. – Т. 121. – №5. – С. 1282-1290; **Изв. Горского гос. аграр. универ.** – 2017. – Т. 54. – Ч. 4. – С. 52-57).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области разработки научных основ и методологических подходов к решению теоретических и прикладных вопросов эпидемиологии, микробиологии и иммунологии инфекционных заболеваний человека, использования бактериофагов в качестве профилактических и терапевтических препаратов, а также наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Соловьевой Е.В. (**Фунд. клин. мед.** – 2018. – Т. 3. – №2. – С. 66-74; **Инф. бол.** – 2017. – Т. 15. – №1. – С. 35-40; **Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.** – 2017. – №4. – С. 42-48; **Журн. МедиАль.** – 2016. – №18. – С. 29; **Астрах. мед. журн.** 2016. – Т. 11. – №3. – С. 8-17).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана методология исследования бактерий *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом и лизирующих из бактериофагов;

предложены комплексный подход исследования капсулоспецифичных бактериофагов, специфически лизирующих бактерии *K. pneumoniae*, в т.ч. обладающих гипермукоидным фенотипом; нетрадиционный метод использования полисахарид-деполимеризующих ферментов бактериофагов в качестве терапевтических средств;

доказана перспективность использования бактериофагов для лечения *K. pneumoniae*-инфекций;

введены новые представления о фаговых полисахарид-деполимеразах, как «анти-вирулентных» агентах.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны распространение в стационарах г. Москвы высоковирулентных штаммов *K. pneumoniae*, устойчивых к антибактериальным препаратам, что указывает на то, что исследуемые штаммы являются потенциально опасными, а вызываемые ими инфекции затруднительными для лечения; механизм ферментативного действия двух полисахарид-деполимераз Der_kpv74 и Der_kpv79 бактериофагов, активных против *K. pneumoniae* капсульных типов K2 и K57, соответственно;

применительно к проблематике диссертации результативно, с получением обладающих новизной результатов использован широкий спектр микробиологических (культивирование штаммов бактерий и бактериофагов, выявление признака гипермукоидности штаммов *K. pneumoniae*, определение литического спектра и показателя эффективности бляшкообразования фагов), биологических (оценка степени вирулентности штаммов *K. pneumoniae*, изучение лечебно-профилактического действия бактериофагов и рекомбинантных полисахарид-деполимераз на модели клебсиеллезной инфекции мышей), молекулярно-генетических (определение капсульного типа штаммов *K. pneumoniae* методом полимеразной цепной реакции, клонирование генов, кодирующих фаговые полисахарид-деполимеразы), биохимических (выделение фаговой ДНК, выделение и очистка капсульных полисахаридов *K. pneumoniae*, SDS-электрофорез рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз в полиакриламидном геле, их очистка с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии) и биоинформационных (компьютерный анализ и аннотация последовательностей ДНК бактериофагов) методов;

изложены предложения по использованию рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз для капсулотипирования штаммов *K. pneumoniae*, а также для разработки средств лечения инфекций, вызванных высоковирулентными штаммами *K. pneumoniae*, в том числе устойчивыми к антибактериальным препаратам;

раскрыты проблемы распространения в популяции госпитальных штаммов *K. pneumoniae* гипервирулентных (гипермукоидных) вариантов, в т.ч. устойчивых к антибиотикам;

изучены бактериофаги, лизирующие гипермукоидные штаммы *K. pneumoniae* капсульных типов K1, K2 и K57, в том числе впервые описаны и охарактеризованы бактериофаги, специфичные для *K. pneumoniae* капсульного типа K57;

проведена модернизация известных методов поиска бактериофагов, специфичных для конкретных капсульных типов *K. pneumoniae*.

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

разработаны и внедрены раздел учебной Программы дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при ФБУН ГНЦ ПМБ (Справка №78 от 26 июля 2018 г.) – учрежденческий уровень внедрения;

предложения по использованию молекулярно-генетических методов типирования клинических штаммов *K. pneumoniae* на основании ПЦР-детекции генов капсулообразования, использования капсулоспецифических бактериофагов и рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз в отделении реанимации и интенсивной терапии Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава Российской Федерации, г. Москва, (Акт внедрения результатов диссертационной работы от 23.07.2018) – региональный уровень внедрения;

определены и депонированы в международную базу данных DDBJ/EMBL/GenBank полные нуклеотидные последовательности геномов 13 бактериофагов *K. pneumoniae* – международный уровень внедрения;

создана коллекция бактериофагов, лизирующих бактериальные штаммы *K. pneumoniae*; 17 охарактеризованных бактериофагов депонированы в

Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» - федеральный уровень внедрения;

представлены убедительные экспериментальные данные, указывающие на то, что бактериофаги, изученные в данном исследовании, являются основой для создания комплексного препарата для борьбы с инфекциями, вызванными гипермукоидными штаммами *K. pneumoniae* с высоким уровнем устойчивости к антибактериальным препаратам.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты экспериментальной работы были получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов в разных условиях, задействованы современные методы исследований, работы проводились согласно существующим Российским и международным протоколам;

теория исследования согласуется с опубликованными экспериментальными данными исследователей в других регионах мира;

идея диссертационного исследования базируется на анализе большого объема данных литературы, касающихся вопросов клинической значимости, вирулентности, антибиотикорезистентности бактерий вида *K. pneumoniae*, а также перспективе использования литических бактериофагов и рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз в качестве средства альтернативной или дополняющей терапии и профилактики инфекций, вызванных гипермукоидными штаммами *K. pneumoniae*;

использованы литические бактериофаги и рекомбинантные фаговые полисахарид-деполимеразы в качестве средства типирования штаммов *K. pneumoniae* для определения их принадлежности к наиболее распространенным для гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* капсульным типам K1, K2 и K57;

установлена корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными других авторов: доля гипермукоидных высоковирулентных штаммов среди общего количества

госпитальных изолятов *K. pneumoniae* в рамках погрешности соответствует показателям, опубликованным другими исследователями; высокий уровень вирулентности гипермукоидных *K. pneumoniae* капсульных типов K1 и K2 для лабораторных животных; лечебно-профилактическая эффективность литических бактериофагов и рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз при лечении *K. pneumoniae*-инфекций мышей; принадлежность фаговых ферментов к классу гидролаз;

использованы современные методы получения и обработки информации.

Личный вклад соискателя состоит в:

скрининге коллекции клинических штаммов для выявления признака гипермукоидности, а также ПЦР-типировании клинических штаммов для определения капсульного типа; выделении литических бактериофагов, представленных в диссертационном исследовании, а также изучении их литических свойств (показатель эффективности бляшкообразования, параметры инфекционного процесса в системе «бактериофаг-бактериальная клетка»), биоинформационном анализе и аннотации полных нуклеотидных последовательностей фаговых геномов, позволившем получить данные о наличии генов, предположительно кодирующих фаговые полисахарид-деполимеразы; получении рекомбинантных генетических конструкций, обеспечивающих экспрессию генов, кодирующих фаговые полисахарид-деполимеразы, изучении активности и специфичности рекомбинантных полисахарид-деполимераз. Кроме того, автор принимала участие в выделении капсульных полисахаридов гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae*, выделении и очистке рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз и определении спектра активности бактериофагов и рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз, а также в изучении степени вирулентности клинических штаммов для лабораторных животных и экспериментальном определении эффективности лечебно-профилактического действия бактериофагов и рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз на моделях клебсиеллезных инфекций мышей. Следует также отметить вклад

автора в подготовку материалов к публикации в научных журналах и представлении полученных в процессе исследования данных на всероссийских и международных конференциях.

На заседании 21.12.2018 г. диссертационный совет принял решение присудить Соловьевой Екатерине Владимировне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 15 человек, из них 7 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология, участвовавших в заседании, из 21 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 15 против нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель
диссертационного совета _____ (Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета _____ (Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 21.12.2018 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.

