

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Гончаровой Юлии Олеговны на тему:
«Аллельный полиморфизм факторов патогенности сибиреязвенного микроба»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.11. Микробиология

Диссертационная работа Гончаровой Ю. О. посвящена сравнительному анализу аллельного полиморфизма генов факторов патогенности *Bacillus anthracis* и корреляции последовательностей этих генов с другими генетическими и фенотипическими признаками. *Bacillus anthracis* – спорообразующая грамположительная бактерия, относящаяся ко II группе патогенности, которая является этиологическим агентом сибирской язвы – особо опасной карантинной зоонозной инфекцией. Это - часто смертельное заболевание распространяется среди травоядных животных и приматов. Возбудитель этого заболевания, *Bacillus anthracis*, входит в группу *Bacillus cereus sensu lato*. Несмотря на то, что микроорганизмы этой группы при сравнении ДНК их хромосом очень близки, их фенотипические отличия исторически позволили дать им различные видовые названия. Основные отличия между отдельными представителями этой группы определяются мобильными генетическими элементами, включая различные плазмиды. Возбудитель сибирской язвы отличается от близкородственных видов наличием двух плазмид вирулентности: рХО1 и рХО2, обуславливающих патогенность данного организма. Основными факторами патогенности сибиреязвенного микроба являются трехкомпонентный токсин и капсула. На плазмиде рХО1 локализованы гены *pagA*, *lef* и *capA*, кодирующие субъединицы сибиреязвенного токсина, и ген *atxA*, кодирующий главный регулятор транскрипции *B. anthracis*. На плазмиде рХО2 локализован оперон *capBCADE*, кодирующий ферменты синтеза поли-γ-D-глутаминовой капсулы *B. anthracis*, и гены регуляторных белков *acpA* и *acpB*.

Гончарова Ю. О. в представленной диссертационной работе кропотливо исследует аллельный полиморфизм факторов патогенности у сибиреязвенного микроба, который до недавнего времени считающегося мономорфным. Благодаря удачно выбранным для анализа генов вирулентных факторов и сравнению их с

генами «домашнего хозяйства», автору удалось провести анализ аллельного полиморфизма факторов патогенности этого микроорганизма. Кроме того анализ генов, кодирующих патогенные факторы, расположенных на плазмидах этого микроорганизма позволил автору получить интересные результаты при одновременном анализе MVLST- и canSNP-профиля штамма и его географического происхождения. В данной работе автор демонстрирует, что предложенный им подход позволяет не только получить данные, дополняющие представления о внутривидовой структуре *B. anthracis*, эволюции и закономерностях распространения этого патогена, но и выявить ряд генетических маркеров, указывающих на географическое происхождение штамма. Эти данные могут быть использованы при проведении эпидемических расследований. Представленные в диссертационной работе Гончаровой Ю.О. данные имеют общебиологическое значение и направлены на получение новых сведений о факторах патогенности *B. anthracis*, их аллельном полиморфизме и перспективности их использования в качестве молекулярных мишеней для генотипирования сибиреязвенного микроба. Полученные результаты позволяют судить о структуре глобальной популяции *B. anthracis* и основных тенденциях ее эволюции и распространения по земному шару. Научная новизна исследования, а также теоретическая и практическая значимость исследования не вызывает сомнения.

В работе были исследованы 60 штаммов *B. anthracis* и 1 штамм *B. cereus* bv *anthracoid* из рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ПМБ и «ГКПМ-Оболенск», имеющие различное географическое происхождение, выделенные на территории СССР, РФ и сопредельных государств в период с 1940 по 2018 годы. В качестве основной группы сравнения в выборку включены 58 штаммов *B. anthracis*, 1 штамм *B. cereus* biovar *anthracis* и 3 штамма *B. cereus*, геномы которых депонированы в базе данных GenBank. Также для дополнительных сравнительных исследований в выборку включены последовательности геномов 84 штаммов *B. anthracis*. Исследование автором аллельного полиморфизма вирулентных факторов не только их лабораторной коллекции штаммов, но проведение сравнительного анализа с данными, полученных ранее, позволило автору собрать обширный материал и

сформулировать выводы об полиморфности мономорфного сибироязвенного микроба.

Построение диссертационной работы Гончаровой отличается от часто используемой традиционной схемы и состоит из «Введения», «Обзора литературы», раздела «Собственные исследования», включающего «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Списка цитированной литературы». Работа изложена на 184 страницах машинописного текста, содержит 13 рисунков, 21 таблицы, список цитируемой литературы насчитывает 194 наименования. Автор ввел разделы «Заключение», в конце каждой главы, и в завершении описания собственных исследований, что значительно упростило общее понимание завершенности работы. Однако раздел «Заключение» не попал в автореферат и, возможно с этим связано необходимость написания расширенного раздела «Выводы». Автор включил раздел «Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования», который является очень уместным в данной работе. В работе Гончаровой Ю.О. представлено три приложения, включающих 32 таблицы, которые подчеркивают большой пласт материала, исследованный автором, и детализируют результаты исследования.

В разделе «Введение» сформулирована цель работы и в соответствии с ней поставлены задачи исследования. В «Обзоре литературы» достаточно подробно описаны современные представления о *B. antracis*. Основное внимание в обзоре литературы уделено вирулентным факторам этого микроорганизма об их функциональной значимости и локализации. Однако, было бы неплохо даже в очень краткой форме ввести в этот раздел описание некоторых вирулентных факторов, характерных для всей группы *B. cereus sensu lato*. Тем не менее «Обзор» написан с использованием большого количества литературы, включая самые последние на сегодняшний день данные в этой области, и не вызывает никаких возражений. Обзор написан грамотно, отражает хорошее владение диссертанта материалом и дает четкое представление о состоянии изучаемой проблемы, что свидетельствует об отличном знании и глубокой проработке автором данных литературы и его научной эрудиции. "Обзор" полностью соответствует выбранной теме диссертации, предваряет экспериментальную часть работы и в сжатой, но

информативной форме дает представление о современном состоянии изучаемой проблемы, подводя читателя к обоснованию собственных исследований.

Полученные в диссертационной работе результаты полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Диссертационное исследование выполнено на современном экспериментальном уровне, полученные результаты не вызывают сомнения. Подраздел «Материалы и методы», входящий в раздел «Собственные исследования» содержит подробное описание использованных экспериментальных подходов и объектов. Методы исследований описаны подробно, отражают высокий экспериментальный уровень исследований и их адекватность поставленным задачам. В работе Ю.О. Гончаровой подкупает четкость использованных методических приемов. В исследованиях применялись новые подходы, и все полученные результаты являются новыми. Методики, использованные при выполнении диссертации, содержат все необходимые сведения, которые могут быть полезными для исследователей, желающих использовать их в своих работах. Разделы диссертации, которые можно обозначить как «Результаты и обсуждение» наглядно проиллюстрированы и позволяет сделать заключение о достоверности полученных данных. Автор провел не только генетическое сравнение распространения маркеров филогенетических групп *B. anthracis* аллельной полиморфности генов вирулентности, но и исследовал фенотипические отклонения, связанные с аллельным полиморфизмом вирулентных факторов. Гончарова Ю.О. использовала для этих экспериментов в качестве модельных животных грызунов, хотя сибирская язва в природе поражает преимущественно крупных копытных млекопитающих. В результате этих экспериментов было выявлено, что причинами значительного снижения вирулентности для мышей штаммов *B. anthracis* из рабочей коллекции являются: утеря плазмид вирулентности всеми клетками штамма или его частью – к потере капсулы, в этом случае способность к синтезу капсулы восстанавливается путем анимализации штамма; загрязнение культуры *B. anthracis* бесплазмидными штаммами, такими, как вакцинный и слабовирулентный для лабораторных животных штамм STI-1, лишенный плазмиды pXO2; снижение жизнеспособности спор культуры штамма *B. anthracis* при хранении – анимализация таких штаммов приводит к восстановлению вирулентности. На двух биологических моделях

показано, что различия последовательности основных факторов патогенности *B. anthracis* могут влиять на его вирулентные свойства. На модели беспородных белых мышей выявлены отличия штаммов по вирулентности, обладающих разным MVLST-генотипам и относящихся к разным *can*SNP-группам. На модели морских свинок, предварительно иммунизированных препаратом рекомбинантного протективного антигена РА63, продемонстрировано, что иммунизация защищала морских свинок больше от заражения штаммом LP51/4YA и меньше – от LP53/5YA. Автор делает справедливый вывод, что, возможно, последовательность РА63 вакцинного препарата и заражающего штамма оказывают влияние на протективность для морских свинок. Таким образом, штаммы *B. anthracis* разных MVLSTpXO1-генотипов статистически достоверно отличаются по вирулентности для мышей и морских свинок.

Выводы диссертации и выносимые на защиту положения полностью соответствуют целям, задачам работы и полученным результатам и логически вытекают из экспериментальных данных, вполне обоснованы, четко сформулированы, хотя в некоторых случаях слишком детализированы. Содержание автореферата дает полное представление о диссертационной работе, а список из 4 статей, включающий как отечественные, так и зарубежные публикации свидетельствует о роли исследований Гончаровой Ю. О. в понимании аллельного полиморфизма вирулентных генов сибиреязвенного микроба и выявлении ряда генетических маркеров указывающих на географическое происхождение отдельных штаммов этого микроорганизма. В частности, было продемонстрировано, что штаммы *B. anthracis* подгруппы A.Br.008/011 *pagA* 981A→T преобладают на территории бывшего СССР, ареал их распространения подтверждает гипотезу об антропогенном переносе *B. anthracis* через Евразию при монгольских завоеваниях в XIII–XVII вв.

Диссертация Гончаровой Юлии Олеговны представляет собой работу, выполненную на высоком уровне, отвечающую всем требованиям ВАК. По новизне полученных результатов, объему выполненной экспериментальной работы, а также своей практической и фундаментальной значимости рассматриваемая диссертационная работа Гончаровой Юлии Олеговны на тему: «Аллельный полиморфизм факторов патогенности сибиреязвенного микроба», соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением

Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 28 августа 2017 г. № 1024), предъявляемым на соискание степени кандидата биологических наук, а ее автор, Гончарова Юлия Олеговна, безусловно, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – «Микробиология».

Солонин Александр Сергеевич



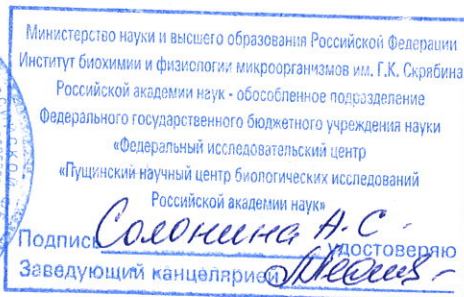
доктор биологических наук, и.о. заведующего лабораторией молекулярной микробиологии, гл. н.с. Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

142290, Пущино, пр. Науки, д.5

solonin@yandex.ru

телефон: +7(903)1155270

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) по диссертационной работе Гончаровой Юлии Олеговны на тему: «Аллельный полиморфизм факторов патогенности сибиреязвенного микроба», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология



11.01.2023г