

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 10.09.2021 г. № 20
о присуждении Красильниковой Екатерине Александровне, гражданину РФ,
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоочьих штаммов *Yersinia pestis*» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 10.09.2021 г., протокол № 12 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., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Красильникова Екатерина Александровна, 1993 г. рождения, в 2016 г. Красильникова Е.А. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Микробиология». В 2016-2020 гг. проходила обучение в аспирантуре 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 по специальности 03.02.03 - микробиология, в 2020 г. получен диплом об окончании аспирантуры.

Диссертация выполнена в лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций 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 – Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук (специальность: 03.02.03 – микробиология), Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций, главный научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Федорова Валентина Анатольевна, доктор медицинских наук (специальность 03.02.03 – микробиология), профессор, Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» Федерального агентства научных организаций, директор, г. Саратов.

Каратаев Геннадий Иванович, доктор биологических наук (специальности: 03.02.03 – микробиология, 03.02.07 - генетика) Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория генетики бактерий, ведущий научный сотрудник, г. Москва.

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация 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, г. Иркутск, в своем положительном заключении, подписанном Шестопаловым Михаилом Юрьевичем, кандидатом медицинских наук, старшим научным сотрудником отдела микробиологии чумы, указала, что диссертация Красильниковой Екатерины Александровны «Поиск факторов

избирательной вирулентности полевочьих штаммов *Yersinia pestis*» является завершенной, выполненной на высоком методическом уровне научно-квалификационной работой. Полученные данные вносят несомненный вклад в установление и изучение факторов избирательной вирулентности полевочьих штаммов возбудителя чумы, а также оценки перспективности их использования в качестве молекулярных мишеней для профилактики и терапии чумы. По актуальности, новизне, объему исследований, научно-практическому значению полученных результатов диссертация Красильниковой Е.А. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, №1168 от 01.10.2018). предъявляемым к кандидатским диссертациям, отрасли науки «Биологические науки», а также паспорту специальности 03.02.03 – «микробиология» по пунктам 3 – «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов», 4 – «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне», 5 – «Обмен веществ микроорганизмов», а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук 03.02.03 – микробиология.

Соискатель имеет **14** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **12** работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **3** работы. Общий объем работ – 4,25 п. л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Красильникова, Е.А.** Вирулентность HtpG⁺ и HtpG⁻ штаммов *Yersinia pestis* для мышей и морских свинок / **Е.А. Красильникова**, Р.З. Шайхутдинова, Т.Э. Светоч, М.Е. Платонов, Т.И. Комбарова, С.А. Иванов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // **Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2020. – № 2. – С. 86-90. **Scopus** (ИФ РИНЦ – 0,863)

2. **Красильникова, Е.А.** Подбор новых молекулярных мишеней для оптимизации вакцинопрофилактики и терапии чумы / **Е.А. Красильникова**, А.С. Трунякова, А.С. Вагайская, Т.Э. Светоч, Р.З. Шайхутдинова, С.В.

Дентовская // **Инф. Иммуно.** – 2021. – Т. 11, № 2. – С. 265-282. **Scopus** (ИФ РИНЦ – 0,755)

3. Kislichkina, A.A. Whole-Genome Assembly of *Yersinia pestis* 231, the Russian Reference Strain for Testing Plague Vaccine Protection / A.A. Kislichkina, **E.A. Krasil'nikova**, M.E. Platonov, Y.P. Skryabin, A.A. Sizova, V.I. Solomentsev, T.V. Gapel'chenkova, S.V. Dentovskaya, A.G. Bogun, A.P. Anisimov // **Microbiol. Resour. Announc.** – 2021. – Vol. 10. – No. 5. – P. e01373-20. **Scopus** (ИФ Scopus – 0,785).

На диссертацию и автореферат поступило **4** положительных отзыва без замечаний от: **(1)** д-ра биол. наук, старшего науч. сотр. **Дыкмана Льва Абрамовича**, ведущего науч. сотрудника ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук», г. Саратов; **(2)** д-ра мед. наук **Краевой Людмилы Александровны**, заведующей лабораторией медицинской бактериологии ФББУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, г. Санкт-Петербург; **(3)** д-ра мед. наук, профессора **Харсеевой Галины Георгиевны**, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии №2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», г. Ростов-на-Дону; **(3)** д-ра мед. наук, профессора, Заслуженного деятеля науки Республики Башкортостан **Мавзютова Айрата Радиковича**, зав. кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии Башкирского государственного медицинского университета, г. Уфа.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор мед. наук, профессор **Федорова Валентина Анатольевна** является признанным специалистом в сфере микробиологии и вакцинопрофилактики чумы, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Красильниковой Е.А. (**Prevent. Diagn. Treatm.** – **2017.** – Vol. 17 – No. 3 – P. 180-186; **PLoS Neglect. Tropic. Dis.** – **2018.** – Vol. 12 – No. 6 – P. e0006511; **2021.** – Vol. 16 – No. 1 – P. e0245657; **Vaccines.** – **2019.** – Vol. 7 – No. 2 – P. 36; **2020.** – Vol. 8 – No 4 – P. 698; **Front. Biosci. (Landmark ed.).** – **2019** – Vol. 24 – P. 700-711; **Laser Phys. Lett.** – **2020.** – Vol. 17 – No. 6 – P. 65603);

доктор биол. наук **Каратаев Геннадий Иванович** является специалистом в области микробиологии и генетики патогенных микроорганизмов и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской

диссертации Красильниковой Е.А. (**Мед. Вестн. Сев. Кавказ.** – 2016. – Т. 11 – № 4 – С. 612-616; **Инф. Иммуно.** – 2017. – Т. 7 – № 2 – С. 203-208; **Мол. Генет. Микробиол. Вирусол.** – 2017. – Т. 35 – № 4 – С. 140-144; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2017. – № 1 – С. 35-41; **Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2018. – № 1 – С. 50-55; **Инф. Бол.: Новости Мнения Обучение.** – 2018. – Т. 7 – № 3 (26). – С. 57-61; **ВМС Microbiol.** – 2019. – Vol. 19 – No. 1 – P. 165; **Эпидемиол. Вакцинопрофилактик.** – 2019. – Т. 18 – № 1 – С. 50-54).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области микробиологии, лабораторной диагностики и вакцинопрофилактики чумы, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Красильниковой Е.А. (**Бюлл. Экспериментал. Биол. Мед.** – 2021. – Т. 171 – №. 5 – С. 628-632; **Генетика.** – 2020. – Т. 56 – №. 7 – С. 783- 791; **Дальневосточ. Журн. Инф. Патол.** – 2020. – Т. 39 – № 39 – С. 106-110; **Эпидемиол. Вакцинопрофилактик.** – 2019. – Т. 18 – №. 2; **Мед. Труда Экол. Чел.** – 2019. – Т. 4 – №. 20 – С. 33-37; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2018. – №. 2 – С. 76-83; **Инф. Бол.** – 2017. – Т. 15 – С. 90), а также наличием ученых, являющихся безусловными специалистами по теме диссертации Красильниковой Е.А.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана схема анимализации штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* в организме морских свинок путем четырехкратных последовательных тестикулярных пассажей;

предложена методика культивирования вирулентных штаммов чумного микроба в перитонеальной полости морских свинок с использованием камер из диализной мембраны для изучения взаимодействия патоген-хозяин;

доказано изменение протеома вирулентных для морских свинок субкультур *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, выращенных *in vivo* – в диализных камерах, имплантированных в полость брюшины морских свинок: увеличение продукции пяти белков (WP_050548832.1; EIR69411.1, WP_002209962.1, WP_038931127.1, WP_016599821.1), а также капсульного антигена Caf1 и прекращение продукции пестицина Pst;

введены основы дальнейшего изучения факторов «нутриционной» вирулентности чумного микроба с целью совершенствования лабораторной диагностики, специфической профилактики и лечения чумы.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказана значимость выявленных путем протеомного анализа молекулярных особенностей субпопуляций «полевочьих» штаммов *Y. pestis*, принципиально отличающихся по степени патогенности для морских свинок, что способствует расширению научных знаний о механизмах патогенеза чумы и микроэволюции ее возбудителя;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: микробиологических (культивирование микроорганизмов, определение питательных потребностей делеционных мутантов, определение чувствительности к осмотическому стрессу и комплементу сыворотки крови человека и выживания в присутствии H_2O_2), молекулярно-генетических (выделение нуклеиновых кислот, амплификация, электропорация, криотрансформация, RedGam мутагенез, сайт-направленный мутагенез с использованием суицидных векторов), биохимических (электрофорез нуклеиновых кислот, двумерный электрофорез в неравновесном градиенте pH, металл-хелатная аффинная хроматография), иммунологических (иммуноферментный анализ, иммуноблот), биологических (иммунизация животных, заражение животных вирулентными штаммами) и биоинформатических (анализ белковой последовательности с использованием программы BLAST), а также методов протеомного анализа (определение молекулярной массы и теоретической изоэлектрической точки с использованием блока Edit Seq программного обеспечения DNASTAR) и методов статистической обработки данных (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA);

изложены доказательства отсутствия влияния избирательного "выключения" генов *htpG* или *glnA* на вирулентность штаммов чумного микроба;

раскрыты механизмы формирования ауксотрофности по глутамину и аттенуации для мышей и морских свинок штаммов возбудителя чумы при генетическом нокауте локуса *glnALG*;

изучены протективные свойства штамма *Y. pestis* 231ΔglnALG, обеспечивающего после однократной подкожной иммунизации 100 %-ную защиту животных при последующем заражении вирулентным штаммом *Y. pestis*;

проведено исследование влияния способности чумного микроба к высокоаффинному транспорту метионина на вирулентность штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* для мышей и морских свинок.

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

разработаны и внедрены материалы для учебной программы аспирантуры и курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации 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 (Акты внедрения ФБУН ГНЦ ПМБ № 1 и № 2 от 15.04.2019 г.) – учрежденческий уровень внедрения;

определены иммуногенные свойства рекомбинантных белков Fba, MetQ и HtpG чумного микроба и показано отсутствие протективной активности при экспериментальной чуме;

создана коллекция штаммов чумного микроба, дефектных по синтезу глутаминсинтетазы и продуктов двухкомпонентной системы регуляции глутаминина GlnALG, одиночной глутаминсинтетазы GlnA, белка теплового шока HtpG и субстрат-связывающей единицы ABC-транспортера метионина MetQ, и штаммов-продуцентов рекомбинантных белков Fba, HtpG, MetQ и GlnA, 8 штаммов депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» - федеральный уровень внедрения);

представлены практические рекомендации по оптимизации способов дифференциации бактериальных культур чумного микроба по степени избирательной вирулентности; исследования физиологических изменений, ассоциированных с адаптацией возбудителя чумы или других патогенных микроорганизмов к организму млекопитающих; подготовке белков из штаммов чумного микроба для анализа методом двумерного гель-электрофореза в

неравновесном градиенте рН и перспективности дальнейшего изучения сконструированного в ходе диссертационной работы штамма *Y. pestis subsp. microti* 231 Δ *glnALG*.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты получены на сертифицированном оборудовании, воспроизводимость результатов проверена в различных условиях с необходимым количеством повторов;

идея диссертационного исследования о поиске факторов избирательной вирулентности «полевочьих» штаммов чумного микроба с помощью сравнения протеомов субкультур, отличающихся по вирулентности для морских свинок, опирается на анализ имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, обобщении опыта ведущих исследовательских групп по изучению патогенеза и иммуногенеза чумы;

установлена частичная корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными независимых зарубежных авторов, касающихся свойств Δ *glnA*, Δ *glnALG* Δ *metQ* штаммов сальмонелл, микобактерий, кишечной палочки и стрептококков;

использованы современные методы получения и обработки информации в рамках систем сбора, обработки и визуализации данных: программ GelAnalyzer2010a, Mascot Software, Graph Pad Prism 6 и Excel 2010.

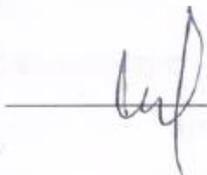
Личный вклад соискателя состоит в:

проведении автором лично следующих этапов работы: анализ научной литературы, планирование экспериментов, отбора пар субкультур штаммов *Y. pestis subsp. microti*, отличающихся по вирулентности для морских свинок, культивирование бактерий в диализных камерах в перитонеальной полости морских свинок, выделение белковых препаратов, проведение двумерного гелевого электрофореза в неравновесном градиенте рН, сайт-направленный мутагенез и комплементация, а также изучение свойств сконструированных мутантных штаммов, создание штаммов-продуцентов, выделение и очистка рекомбинантных белков чумного микроба, определение их иммуногенной и протективной активности, при личном участии в апробации результатов исследования, обработке, оформлении и публикации результатов.

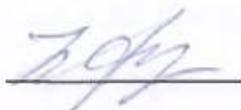
На заседании 10.09.2021 г. диссертационный совет принял решение присудить Красильниковой Е.А. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **18** человек, из них **8** докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология, участвовавших в заседании, из **23** человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **18**, против **0**, недействительных бюллетеней **нет**.

Председатель
диссертационного совета
д.б.н., профессор


(Шемякин Игорь Георгиевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н.


(Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 10.09.2021 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.

