



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗА-
ЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕ-
ЛОВЕКА

Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного
Знамени научно-исследовательский
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

**ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора**

664047 Иркутск, Трилисера, 78

Тел. 22-01-35, факс 22-01-40

E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

<http://www.irkutsk.ru/chumin>

ОКПО 01898090, ОГРН 10223801543017

ИНН/КПП 3811015807/381101001

УТВЕРЖДАЮ

директор ФКУЗ Иркутский
научно-исследовательский
противочумный институт
Роспотребнадзора
докт. мед. наук, профессор
Балахонов С.В.

«05» августа 2021 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертационной работы Красильниковой Екатерины Александровны «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоочных штаммов *Yersinia pestis*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Благодаря постоянному совершенствованию молекулярных и протеомных технологий последних десятилетий и применению комплексного подхода в исследованиях такого особо опасного патогена как *Yersinia pestis*, стали известны многие особенности, связанные с его биологическими и патогенетическими свойствами. Штаммы *Y. pestis*, с высокой вирулентностью, подразделяют на три классических биовара (*antiqua*, *mediaevalis* и *orientalis*). Четвертый биовар (*microtus*) был предложен на основании его низкой степени вирулентности. Метаболически все четыре биовара *Y. pestis* характеризуются различиями в их способности ферментировать глицерин, арабинозу и восстанавливать нитраты: *antiqua* (положительный по глицерину, арабинозе и нитрату), *mediaevalis* (положительный по глицерину и арабинозе и отрицательный по нитрату), *orientalis* (отрицательный по глицерину, положительный по арабинозе и нитрату) и *microtus* (положительный по глицерину, отрицательный по арабинозе и по нитрату). Данные метаболические особенности связаны с наличием точечных мутаций в ряде генов, характерных для определенных биоваров. Хорошо известно, что ос-

новой особенностью «классических» штаммов чумного микроба *Y. pestis* subsp. *pestis* является их «универсальная» вирулентность, с характерной летальной инфекцией для многих видов млекопитающих, включая человека, при этом штаммы *Y. pestis* subsp. *microti*, выделенные от полевок различных видов, высоковирулентны для своих основных хозяев и лабораторных мышей, но авирулентны для более крупных млекопитающих, таких как морская свинка, кролик, макака-резус и человек. Достаточно глубоко изученными являются факторы патогенности «классических», штаммов *Y. pestis*, при этом о причинах существования феномена избирательной вирулентности у полевочьих штаммов чумного микроба, к настоящему времени, не сформировалось единого мнения. Известные отличия патогенных («классических») и условно-патогенных для человека («полевочьих») штаммов биовара *microtus* по структуре липополисахаридов и ряда таких факторов патогенности как: LcrV, Ail, CafI, Pla, OmpF не взаимосвязаны с избирательной вирулентности. Вероятнее всего, наличие избирательной вирулентности у штаммов *Y. pestis* биовара *microtus* связано с уникальностью его геномного профиля, характеризующегося потерей ряда генов и накоплению множества уникальных мутаций, приводящих к инактивации функциональных генов, что позволяет рассматривать такие штаммы также в качестве потенциальных кандидатов для создания вакцин. На сегодняшний день известен ряд работ, рассматривающих некоторые белки, предположительно, связанные с феноменом избирательной вирулентности у штаммов *Y. pestis*, выращенных *in vitro* в различных условиях, но без учета их вирулентности, при этом до настоящего времени отсутствуют подробные сведения о спектре и структурно-функциональных особенностях продуцируемых *in vivo* белков, потенциальных факторов избирательной вирулентности у субкультур одного и того же штамма *Y. pestis*, отличающихся по степени вирулентности для разных видов чувствительных к ним животных, в связи с чем, работа Красильниковой Екатерины Александровны, посвященная поиску факторов избирательной вирулентности полевочьих штаммов *Y. pestis*, несомненно, является актуальной.

Новизна полученных результатов и выводов диссертации. Новизна полученных результатов очевидна и не вызывает сомнения. Автором обнаружены пять белков (WP_050548832.1, EIR69411.1, WP_002209962.1, WP_038931127.1, WP_016599821.1), экспрессия которых повышалась у высоковирулентных для морских свинок субкультур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, выращенных *in vivo* в диализных камерах. Автором впервые показано: 1) что мутация по гену *htpG*, кодирующему синтез белка теплового шока HtpG не влияет на вирулентность штаммов *Y. pes-*

tis основного подвида и *bv. ulegeica* для мышей и морских свинок; 2) что получены экспериментальные доказательства отсутствия влияния одиночной нокаутной мутации по гену *glnA*, кодирующему синтез глутаминсинтетазы, на вирулентность штаммов *Y. pestis* основного подвида для мышей и морских свинок; 3) что $\Delta glnALG$ штамм *Y. pestis* не вызывает гибели мышей и морских свинок при подкожном введении и обеспечивает 100 %-ную защиту животных при последующем заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* 231; 4) что делеция гена *metQ*, кодирующего синтез субстрат-связывающей единицы ABC-транспортера метионина, приводит к аттенуации штамма *Y. pestis* основного подвида для мышей и морских свинок, а его комплементация восстанавливала вирулентность для двух видов лабораторных животных. Защищен приоритет предложенного способа сенсibilизации планшета для иммуноферментного анализа нерастворимыми белковыми антигенами Патентом на изобретение № RU 2 732 013 C1 (10.09.2020 г.).

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов. Научная значимость исследования заключается в получении новых данных о молекулярных отличиях «полевочьих» штаммов *Y. pestis* с различной степенью избирательной вирулентности, что значительно расширяет представления о механизмах патогенеза инфекций бактериальной этиологии и микроэволюции их возбудителей. Практическая значимость работы заключается в обосновании возможности использования для дифференциации по степени вирулентности штаммов чумного микроба методического подхода, заключающегося в анимализации бактериальных культур путем последовательных тестикулярных пассажей; разработке модельной системы для исследования физиологических изменений, ассоциированных с адаптацией возбудителя чумы к организму морских свинок; адаптации методики получения безопасных препаратов белков из вирулентных штаммов *Y. pestis*, пригодных после разделения методом двумерного электрофореза для последующего масс-спектрометрического анализа; депонировании в «ГКПМ-Оболенск» четырех штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis*, дефектных по синтезу генов *glnA*, *glnALG*, *htpG*, *metQ*, и четырех штаммов-продуцентов рекомбинантных белков FbaA, HtpG, MetQ и GlnA чумного микроба; использовании материалов диссертационной работы при подготовке на базе ФБУН ГНЦПМБ кадров высшей квалификации (аспирантуре) по направлению 06.06.01 - Биологические науки, профиль 03.02.03 - микробиология и для слушателей курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации в рамках программы ДПО «Микробиология. Основы биологической безопасности и практика ра-

бот с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при чтении лекций и проведении практических занятий.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений. Положения, выносимые на защиту, выводы и заключение диссертации обоснованы и логичны, отражают результаты работы и соответствуют поставленной цели и задачам исследования. О достоверности результатов свидетельствует суммарный объем публикаций по теме исследования, а также последовательное планирование эксперимента каждой новой главы диссертационной работы на базе результатов предыдущей.

Оценка содержания диссертации и её завершённости. Диссертация Е. А. Красильниковой представляет собой завершённое научное исследование, изложенное на 159 страницах машинописного текста, иллюстрированное 10 таблицами и 26 рисунками. Список использованных источников литературы включает 310 работ, из них 11 отечественных и 299 зарубежных.

Во «Введении» автором обосновывается актуальность работы, формулируется цель и задачи исследования, указывается научная новизна, теоретическая и практическая значимость выполненной работы, приводятся данные об её апробации и личном вкладе автора.

Глава 1 посвящена анализу литературы по теме диссертации и содержит исчерпывающие сведения об известных на сегодняшний день «классических» и «неклассических» факторах патогенности чумного микроба, которые сейчас рассматриваются в качестве определяющих факторов его патогенности, в частности, это: 1) полифункциональные белки наружной мембраны (липопротеин Брауна (Lpp), липопротеин наружной мембраны чумного микроба NlpD, белок наружной мембраны A OmpA); 2) факторы адгезии и колонизации (белок наружной мембраны Ail/OmpX, ряд автотранспортных белков UapC, UapE, UapJ и UapK, олигомерные адгезины YadB и YadC); факторы инвазии (интимин/инвазин-подобный белок Iip), эффекторные Yop белки (YopR, YpkA); факторы, обеспечивающие репликацию в макрофагах (белки RipA, RipB и RipC); регуляторный белок Cpr; ингибиторы лизоцима (периплазматический ингибитор лизоцима Iyu и мембрано-связанный ингибитор MliC); белки, участвующие в формировании биопленок (мембранные белки RcsD, RcsC, RcsB и RcsA); факторы нутриционной вирулентности чумного микроба (транспортера Fe - Ybt, Yfe и Feo, транспортер цинка ZnuABC, белок внутренней мембраны YbtX). Также здесь

автор подробно рассматривает протеомный подход для выявления факторов патогенности чумного микроба.

В главе 2 представлена характеристика использованных в исследовании штаммов, плазмид, праймеров, лабораторных животных, питательных сред. Детально показано многообразие применяемых в ходе исследования методик: бактериологических, биологических, молекулярно-генетических, биохимических, иммунологических, статистических, протеомный и биоинформатический анализ.

Глава 3 отражает результаты собственных исследований Красильниковой Е. А. целью которой являлся отбор штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* или субкультур одного штамма, значительно отличающихся по вирулентности для морских свинок, для дальнейшего сравнения их протеомов, направленного на поиск факторов избирательной вирулентности. Автору удалось отобрать по две субкультуры двух штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica* (И-3189 и И-2239), которые резко отличались по вирулентности для морских свинок при подкожном заражении. Для воспроизведения изменений, происходящих при попадании возбудителя чумы в организм теплокровного хозяина, автором предложена методика культивирования двух субкультур (исходной и после тестикулярных пассажей) каждого из штаммов *Y. pestis* bv. *ulegeica* (И-3189 и И-2239) в перитонеальной полости морских свинок в камерах из диализной мембраны. После чего с помощью сравнительного анализа протеомов субкультур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, принципиально отличающихся по вирулентности для морских свинок, методом высокоразрешающего двумерного электрофореза удалось выявить пять новых белковых пятен у вирулентных для морских свинок субкультур штаммов subsp. *microti* по сравнению с авирулентными, которые затем идентифицированы методом масс-спектрометрии как: белок теплового шока HtpG (WP_050548832.1), глутаминсинтетазу GlnA (EIR69411.1), две изоформы фруктозобисфосфат альдолазы (WP_002209962.1), субстрат-связывающий белок ABC транспортера метионина MetQ (WP_038931127.1) и гипотетический белок (WP_016599821.1). По результатам выполнения данной главы автор приходит к логичному выводу, что необходимо применение нокаутного мутагенеза генов, кодирующий синтез данных белков, с последующей комплементацией, что может прояснить вклад данных молекул в патогенез и иммуногенез чумы.

Глава 4 посвящена получению, фенотипической характеристике делеционных мутантов полёвочих штаммов *Y. pestis* и комплементации генов обнаруженных белков – HtpG, GlnA, GlnALG и MetQ. Автором проведён биоинформатический анализ ре-

гионов, кодирующих синтез выбранных белков. Определена высокая консервативность аминокислотных последовательностей белков HtpG, GlnA, MetQ и Fba чумного микроба, различных представителей вида *Y. pestis* и энтеропатогенных бактерий рода *Yersinia*. Затем получены штаммы *Y. pestis*, дефектные по генам *htpG*, *glnA* и *metQ*. Установлено, что утрата способности продуцировать HtpG не влияет на вирулентность Δ *htpG* мутантов *Y. pestis* для мышей и морских свинок, что свидетельствует о неперспективности его использования в качестве молекулярной мишени для терапии и/или вакцинопрофилактики чумы. Показано, что одиночный *glnA* мутант чумного микроба не был аттенуирован при подкожном заражении белых мышей и морских свинок, однако мутантный штамм с делецией гена глутаминсинтетазы (*glnA*) и генов двухкомпонентной регуляторной системы азота (*glnLG*) критически снижал вирулентность при подкожном заражении мышей и морских свинок. При оценке иммуногенности установлено, что аттенуированный штамм *Y. pestis* 231 Δ *glnALG* может рассматриваться как перспективный кандидатный вакцинный штамм, поскольку при однократной подкожной иммунизации мышей и морских свинок он обеспечивал защиту животных при последующем подкожном введении значительных доз вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Показано, что делеция гена *metQ* приводит к аттенуации ауксотрофного по метионину штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 и для мышей и для морских свинок, а проведенная транс-комплементация восстанавливает его вирулентность. При определении локализации MetQ в клетке чумного микроба обнаружено его присутствие на наружной мембране. Установлено, что метионин-связывающий транспортер MetQ можно рассматривать в качестве потенциальной мишени для создания новых препаратов для лечения и иммунопрофилактики чумы в связи с вирулентностью чумного микроба и выживанием патогена в организме хозяина, локализацией в клеточной стенке бактерии и отсутствием гомологичных белков в клетках млекопитающих.

Глава 5 отражает результаты экспериментальной работы автора по оценке вклада продуктов генов *Y. pestis*: *htpG*, *glnA*, *fba* и *metQ* в иммуногенез чумы. Выполнено клонирование генов *htpG*, *glnA*, *fba* и *metQ* в составе векторной плазмиды pET32b(+) в клетках протеазодефицитного штамма *E. coli* BL21(DE3). Затем с помощью метода аффинной Ni⁺⁺-хелатной хроматографии выделены и очищены в препаративных количествах полученные рекомбинантные белки GlnA, Fba, MetQ и HtpG. Три белка Fba, MetQ и HtpG обеспечили способность стимулировать продукцию специфических антител после двукратной подкожной иммунизации беспородных мышей. Установле-

но отсутствие протективной активности для всех белков при последующем подкожном заражении вирулентным штаммом чумного микроба.

В заключении автор кратко, но очень содержательно излагает концепцию всего проведенного исследования, обобщает результаты и проводит обсуждение полученных данных.

Выводы являются логическим завершением работы, согласуются с поставленными задачами и выносимыми на защиту положениями, четко формулируют основные результаты работы.

Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования содержат обобщенные указания автора к выполнению методических подходов: при дифференциации бактериальных культур чумного микроба по степени их избирательной вирулентности; при исследовании физиологических изменений, ассоциированных с адаптацией возбудителя чумы или других патогенных микроорганизмов к организму млекопитающих; по обеззараживанию препаратов при подготовке белков из штаммов чумного микроба для анализа методом двумерного гель-электрофореза. Также отмечается необходимость продолжения изучения сконструированного в ходе диссертационной работы штамма 231ΔglnALG на предмет его соответствия критериям отбора вакцинных штаммов чумного микроба.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Автореферат в краткой форме отображает основные результаты диссертации, иллюстрирован необходимым количеством рисунков и таблиц, всё это позволяет получить должное представление о выполненной работе, её значении и выводах.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати. По теме диссертации опубликовано двенадцать научных работ, в том числе три – в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, а также один патент. Материалы работы неоднократно представлены на российских и международных конференциях по инфекционным болезням.

Заключение. Диссертация Красильниковой Екатерины Александровны «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоочьих штаммов *Yersinia pestis*» является завершённой, выполненной на высоком методическом уровне научно-квалификационной работой. Полученные данные вносят несомненный вклад в установление и изучение факторов избирательной вирулентности полевоочьих штаммов возбудителя чумы, а также оценки перспективности их использования в качестве молекулярных мишеней для профилактики и терапии чумы. По актуальности, новизне, объёму исследований, научно-практическому значению полученных результатов дис-

сертация 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 её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв обсужден на заседании Ученого совета ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, протокол № 4 от 05 августа 2021 г.

Старший научный сотрудник отдела микробиологии чумы
Федерального казенного учреждения здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного
Знамени научно-исследовательский
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора,
кандидат медицинских наук

03.02.03 - микробиология

Шестопалов Михаил Юрьевич

Подпись М.Ю. Шестопалова заверяю,
начальник отдела кадров и спецчасти того же института



Шангареева Наталья Ильинична

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 (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) 664047 г. Иркутск, Трилиссера, 78 Тел. (3952)22-01-35, факс (3952)22-01-40 E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru).