



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии»
(ФГБНУ ФИЦВиМ)

601125, Россия, Владимирская область, Петушинский район, п. Вольгинский,
ул. Академика Бакулова, стр.1
Тел./факс: (4922) 37-92-51; 37-92-61,
e-mail: info@ficvim.ru; www.ficvim.ru

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Красильниковой Екатерины Александровны «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоцых штаммов *Yersinia pestis*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Диссертационная работа Красильниковой Екатерины Александровны посвящена изучению ключевых факторов избирательной вирулентности штаммов чумного микроба, относящихся к подвиду *Y. pestis* subsp. *microti*. Как известно, указанные патогены представляют собой уникальную группу микроорганизмов, высоковирулентных только для своих «основных» хозяев – различных видов полевок и лабораторных мышей, но не для других чувствительных к чуме млекопитающих – морских свинок и людей. Особое внимание автором сфокусировано на изучении пяти антигенов белковой природы (WP_050548832.1, EIR69411.1, WP_002209962.1, WP_038931127.1, WP_016599821.1) и особенностях их экспрессии в условиях, моделирующих экспериментальную чуму в условиях *in vitro*, с применением субкультур чумного микроба указанного подвида, различающихся по вирулентности.

Актуальность темы исследования определяется, в первую очередь, сохранением высоких рисков возникновения вспышек чумы как среди людей, так и животных, включая эндемичные территории сопредельных с Российской Федерацией государств. Согласно официальной позиции ВОЗ (<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/plague>), основной стратегией борьбы с чумой – высоко контагиозным заболеванием с коэффициентом летальности 30 – 100%, в настоящее время является предупреждение вспышек болезни, что, в свою очередь диктует необходимость совершенствование профилактических мероприятий, а также средств вакцинопрофилактики и иммунотерапии. Однако последнее невозможно без прояснения молекулярных механизмов патогенности *Y. pestis*, особенностей их реализации у штаммов различных подвидов возбудителя чумы, равно как и расширения спектра биомолекул, экспрессируемых чумным микробом в условиях *in vivo*. Несмотря на более, чем вековую историю изучения патогенетических основ чумной инфекции, до настоящего времени нет полного понимания роли конкретных антигенов белковой природы в реализации вирулентности штаммов возбудителя чумы

у млекопитающих, различающихся по чувствительности к данному патогену. Именно изучению вышеуказанных аспектов и посвящена диссертационная работа Красильниковой Е.А., что и предопределяет актуальность, необходимость и востребованность проведения настоящего научного исследования.

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

По результатам проведенного исследования автором вынесено на защиту три положения, суммированных в семи выводах.

Положение 1 и выводы 1-2 связаны с разработкой оригинального комплекса методических приемов для направленной селекции отдельных субкультур штаммов чумного микроба, различающихся по вирулентности. Это позволило автору выявить пять новых молекулярных мишеней, экспрессируемых в модельных экспериментах на чувствительных лабораторных животных (морских свинках) в условиях *in vivo*. Последующие комплексное исследование иммунобиологических свойств указанных полипептидов с применением современных методов молекулярной микробиологии – протеомного анализа, биоинформатики, а также генно-инженерных подходов – позволило Екатерине Александровне провести тонкие исследования по изучению основных характеристик индивидуальных белков и оценить потенциальный вклад каждого полипептида в реализацию вирулентности возбудителя чумы.

Положение 2 и выводы 3-4 основаны на экспериментальных данных, полученных автором, об отсутствии влияния продуктов, детерминируемых генами *htpG* и *glnA*, на вирулентные свойства штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* и *bv. ulegeica* для мышей и морских свинок. В результате Екатерине Александровне удалось представить убедительные доказательства отсутствия перспектив использования индивидуальных мутантов как молекулярных таргетов для конструирования на их основе эффективных средств вакцинопрофилактики и/или иммунотерапии чумной инфекции.

Положение 3 и выводы 5-7 сформулированы на основе собственных наблюдений соискателя и обоснованы достаточно большим экспериментальным материалом всего диссертационного исследования. В рамках настоящей работы убедительно показано, что только генетический нокаут всего *glnALG* оперона, или делеция гена *metQ* приводят к аттенуации штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* на модели аутбредных мышей и морских свинок. Более того, автором приведены убедительные доказательства способности указанного делеционного варианта чумного микроба защищать 100% лабораторных животных от экспериментальной чумы.

Вывод 7 и Практические рекомендации сформулированы на основании обобщения всех данных, полученных Екатериной Александровной в рамках настоящей работы, подводя тем самым итог проведенного исследования в целом. Рекомендации ориентированы на специалистов в области медицинской и молекулярной микробиологии, вакцинопрофилактики и иммунотерапии чумы и представляют исключительно важную научно-практическую значимость для отечественной и зарубежной научной общественности.

В целом, достаточно большой объем экспериментальных исследований, проведенных в рамках настоящей диссертации, позволил Екатерине Александровне аргументировано обосновать научные положения и выводы, выносимые на защиту, а также рекомендации по использованию результатов ее диссертационного исследования. Судя по материалам диссертации и автореферата, выводы, сформулированные в диссертационной работе, полностью соответствуют положениям, выносимым на защиту, а также отражают ключевые результаты, полученные в диссертации. Не вызывает сомнений и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Достоверность результатов, полученных Красильниковой Е.А., обусловлена продуманным дизайном исследования, достаточным объемом экспериментального материала, высоким методическим уровнем экспериментальных работ с применением современных и адекватных методов молекулярной микробиологии, а также корректных способах статистической обработки полученных автором оригинальных научных данных.

Екатерине Александровне удалось получить ряд новых научных данных, позволивших ей сформулировать основные научные положения и выводы настоящей диссертации. Впервые проведено комплексное исследование парных изогенных производных штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* (52 штаммов отдельных вариантов: bv. caucasica, bv. ulegeica, bv. xilingolensis, bv. altaica, bv. talassica и bv. hissarica). Отобраны модельные субкультуры двух штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* bv. ulegeica, различающихся по вирулентности для морских свинок. Проведены исследования по изучению экспрессии спектра антигенов белковой природы чумным микробом в организме теплокровного хозяина. Разработан и успешно апробирован метод культивирования бактерий в перитонеальной полости морских свинок в камерах из диализной мембраны. С помощью протеомного анализа и масс-спектропии идентифицированы 5 полипептидов, продукция которых оказалась значительно выше у бактерий вирулентных субкультур по сравнению с авирулентными вариантами чумного микроба. На модели вирулентных донорных штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 и *Y. pestis* bv. ulegeica И-3189 сконструированы нокаутные мутанты по генам: *htpG* (кодирует гомолог белка теплового шока 90 эукариот), *glnA* (обеспечивает синтез глутаминсинтетазы) и *metQ* (у чумного микроба предположительно кодирует ABC-транспортер метионина), а также генетическому локусу *glnALG*, включающего три гена: *glnA*, *glnL* (отвечает за биосинтез сенсорной гистидинкиназы) и *glnG* (экспрессирует синтез регуляторного белка). Изучены пролиферативные и вирулентные свойства полученных мутантов для лабораторных животных (аутбредные мыши и морские свинки), иммунореактивность индивидуальных рекомбинантных белков современными методами иммуноанализа (вестерн-блоттинг) с гомологичными мышинными антителами, выявлены новые потенциальные молекулярные мишени для иммунотерапии чумы. Научную новизну

представляют данные, полученные автором, об условной летальности для чумного микроба мутации по гену *fba*, кодирующему белок фруктозо-1,6-бисфосфата альдолазу класса II.

Все полученные в рамках настоящей диссертации научные данные представляют большой научный интерес, их достоверность не вызывает сомнений.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Научные результаты, представленные Красильниковой Е.А. в настоящем диссертационном исследовании, вносят важный вклад в прояснение молекулярных механизмов патогенеза чумной инфекции, вызываемой «полевочьими» штаммами *Y. pestis* с различной степенью избирательной вирулентности. Особую теоретическую и практическую значимость имеют полученные автором данные о новых молекулярных мишенях чумного микроба как основы конструирования эффективных профилактических и терапевтических препаратов против чумы нового поколения. Не менее важными являются методические разработки автора по тестикулярной анимализации штаммов возбудителя чумы для исследования субкультур отдельных подвидов *Y. pestis*, различающихся по вирулентности. Указанный подход может быть использован при изучении других патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Екатериной Александровной впервые создана и депонирована в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (п. Оболенск Московской обл.) коллекция нокаутных мутантов и продуцентов рекомбинантных белков Fba, HtpG, MetQ и GlnA, соответственно (федеральный уровень внедрения), перспективная для дальнейших теоретико-экспериментальных исследований чумного микроба, а также других патогенных микроорганизмов. Автором также разработан оригинальный способ моделирования в условиях *in vivo* пролиферации чумного микроба в организме чувствительного млекопитающего, подобраны условия имплантации экспериментальным животным (морские свинки) камер из диализной мембраны. Это нашло отражение в соответствующих методических рекомендациях «Модельная система для исследования изменений, ассоциированных с адаптацией возбудителя чумы к организму млекопитающего», применение которых позволит специалистам в области микробиологии проводить детальные исследования продукции таргентных биомолекул, включая антигены белковой природы, в различных био- и экосистемах, указывая тем самым на высокую значимость методических разработок Красильниковой Е.А. для отечественной и зарубежной науки.

Соответствие диссертации и автореферата критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней».

Диссертация Красильниковой Е.А. представляет собой завершённое исследование, обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выносимые на защиту. Автором сформулированы конкретные практические рекомендации по использованию полученных результатов.

Выводы обоснованы, корректны, логически вытекают из полученных автором результатов и полностью соответствуют целям, задачам и основным положениям, выносимым на защиту.

Автореферат диссертации полностью соответствует её содержанию.

Выводы и практические предложения, изложенные в автореферате и диссертации, идентичны.

Диссертация и автореферат соответствуют критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней».

Полнота опубликованных результатов.

Основные результаты диссертации опубликованы в 12 научных работах, в том числе, 3-х научных статьях в изданиях, рекомендуемых ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, и 7 – в материалах профильных научных отечественных и зарубежных конференций.

Оценка содержания работы, ее завершенности и оформления.

Материалы диссертации Красильниковой Е.А. изложены на 159 страницах компьютерного текста и включают 26 рисунков и 10 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования с их обсуждением, заключения, выводов и библиографического списка из 310 источников отечественных и зарубежных авторов.

Раздел «Введение» содержит описание актуальности работы, степени разработанности темы исследования, цели, задач исследования, научной новизны, теоретической и практической значимости исследования, методологии и методов исследования, степени достоверности и апробации результатов, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, приведены сведения о личном вкладе соискателя в получении результатов и публикациях по теме диссертации. Указанный раздел диссертации четко соотносится с выводами, представленными в конце работы, сделанными автором на основании анализа собственных исследований.

В Главе 1 «ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ» Екатериной Александровной тщательно проанализированы литературные источники и представлены современные научные сведения о классических и неклассических факторах патогенности возбудителя чумы, а также научных подходах их выявления и изучения. Отдельное внимание уделено анализу протеомного подхода как инструмента молекулярного анализа бактериальных антигенов.

В Главе 2 «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ» автор приводит подробное и исчерпывающее описание всех использованных ею в работе методов и подходов, протоколов исследования, штаммов микроорганизмов, сред и условий их культивирования, плазмид, праймеров, лабораторных животных, генно-инженерных манипуляциях, выделении и очистке рекомбинантных белков, биоинформатическом анализе, конструировании мутантных штаммов и плазмид для комплементации, проведении тестикулярных пассажей, культивирование штаммов *Y. pestis* в диализных камерах в организме морских свинок, протеомном анализе, ELISA, заражения лабораторных животных и определения вирулентности штаммов чумного микроба в

экспериментах *in vivo*, реактивов, лабораторного оборудования, а также методах статистической обработки полученных результатов.

В Главе 3 «СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ» диссертант проводит целенаправленный отбор модельных штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* с различным уровнем вирулентности для морских свинок. Отдельное внимание Екатерина Александровна уделяет разработке и моделированию системы, симулирующей адаптацию возбудителя чумы к организму чувствительного млекопитающего. Автором выполнен большой объем исследований по сравнительному протеомному анализу модельных штаммов чумного микроба после их выращивания *in vitro*. Это позволило Екатерине Александровне выявить и идентифицировать антигены белковой природы, продукция которых наблюдалась только у высоковирулентных субкультур «полевочьих» штаммов *Y. pestis* в случае их культивирования в диализных камерах, имплантированных в полость брюшины морских свинок.

В Главе 4 «СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ» Екатерина Александровна представляет собственные данные о получении и фенотипических характеристиках нокаутных мутантов *Y. pestis* по генам *htpG*, *glnA*, *glnALG* и *metQ*, биоинформатическом анализе соответствующих нуклеотидных последовательностей, влиянию мутаций на пролиферативную активность и вирулентность чумного микроба для аутбредных мышей и морских свинок. Отдельный блок исследований содержит оригинальные данные автора о биоинформатическом анализе гена *fba* попытках получения штаммов *Y. pestis*, дефектных по продукции белка Fba.

Глава 5 «СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ» посвящена молекулярному клонированию генов чумного микроба *htpG*, *glnA*, *fba* и *metQ* в *Escherichia coli*, изучению продукции рекомбинантных белков, их выделению, очистке и оценке иммуногенной активности.

Диссертация завершается общим «ЗАКЛЮЧЕНИЕМ», в котором диссертант подводит итоги выполненной диссертационной работы.

Выводы обоснованы, корректны, логически вытекают из полученных автором результатов и полностью соответствуют целям, задачам и основным положениям, выносимым на защиту.

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. В рамках диссертационной работы Вы изучали продукцию антигенов белковой природы, синтезируемых чумным микробом в диализных камерах, имплантированных в полость брюшины морских свинок. Чем принципиально отличаются полученные Вами результаты от полученных ранее другими учеными, в частности, группой Ляпина МН (Куляш ГЮ, Головкин ЕМ, Ляпин МН. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1991, № 8, с. 16-20)?

2. В чем оригинальность моделирования условий культивирования чумных бактерий в диализных мешках в Ваших экспериментах по сравнению с полимерными камерами, которые были предложены в 80-х годах прошлого века группой зарубежных ученых?

3. На рисунке 4, панель А показано, что замещение гена *htpG* было проведено геном *kan* (устойчивости к канамицину), в то же самое время в подписи к этому рисунку указано, что замещение сделано геном *cat* (устойчивости к хлорамфениколу).

Заключение

Диссертация Красильниковой Екатерины Александровны на тему: «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоочьих штаммов *Yersinia pestis*» является завершенной научно-квалификационной работой, которая по актуальности, содержанию, новизне, практической значимости и количеству публикаций по ней отвечает паспорту специальности 03.02.03 – микробиология и соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней ВАК РФ», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г.).

В диссертационном исследовании решена задача поиска и характеристики новых, отличных от «классических», факторов патогенности чумного микроба, расширяющая научные знания о молекулярных механизмах патогенеза чумы, значимая для дальнейшего развития специфической профилактики и терапии данного особо опасного заболевания. Автор диссертации Красильникова Екатерина Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:

руководитель лаборатории
молекулярной биологии и
нанобиотехнологий

Саратовского научно-исследовательского
ветеринарного института - филиала Федерального
государственного бюджетного научного учреждения

«Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии»,

директор филиала

доктор медицинских наук
профессор



Федорова Валентина Анатольевна

20.08.2021 г.

Подпись Федоровой В.А. заверяю,
ученый секретарь ФГБНУ ФИЦВиМ,
к.б.н.




Е.А. Балашова

Адрес: 410028, г. Саратов, ул. 53-й Стрелковой Дивизии, 6
Саратовский научно-исследовательский
ветеринарный институт - филиал Федерального
государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии»
e-mail: feodorovav@mail.ru
тел: 8(8452)20-08-25