

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 350.002.01 от 10.09.2021 г. Протокол № 20
по защите диссертации Красильниковой Екатерины Александровны
по специальности 03.02.03 – микробиология

Присутствовали:

№	Фамилия И. О.	Ученая степень, шифр специальности в совете
1	Шемякин Игорь Георгиевич (заместитель председатель совета)	д.б.н., профессор 03.01.06 (биологические науки)
2	Анисимов Андрей Павлович (заместитель председателя совета)	д.м.н., профессор 03.02.03 (биологические науки)
3	Фурсова Надежда Константиновна (ученый секретарь совета)	к.б.н. 03.02.03 (биологические науки)
4	Бровко Федор Александрович	д.б.н. 03.01.06 (биологические науки)
5	Дентовская Светлана Владимировна	д.м.н. 03.02.03 (биологические науки)
6	Ипполитов Евгений Валерьевич	д.м.н., профессор 03.02.03 (биологические науки)
7	Коломбет Любовь Васильевна	д.б.н., 03.01.06 (биологические науки)
8	Марданлы Сейфаддин Гашим оглы	д.м.н., доцент 03.02.03 (биологические науки)
9	Меденцев Александр Григорьевич	д.б.н., 03.01.06 (биологические науки)
10	Мокриевич Александр Николаевич	д.м.н., 03.01.06 (биологические науки)
11	Павлов Виталий Михайлович	д.б.н., 03.02.03 (биологические науки)
12	Помазанов Владимир Васильевич	д.т.н., профессор 03.01.06 (биологические науки)
13	Потапов Василий Дмитриевич	д.б.н. 03.02.03 (биологические науки)
14	Похиленко Виктор Данилович	д.т.н., с.н.с. 03.01.06 (биологические науки)
15	Светоч Эдуард Арсеньевич	д.в.н., профессор 03.02.03 (биологические науки)
16	Филонов Андрей Евгеньевич	д.б.н., 03.01.06 (биологические науки)
17	Царёв Виктор Николаевич	д.м.н., профессор 03.02.03 (биологические науки)
18	Шепелин Анатолий Прокопьевич	д.б.н. 03.01.06 (биологические науки)

Открыл заседание Председатель диссертационного доктор биол. наук, профессор **Шемякин Игорь Георгиевич**, который объявил о защите диссертации «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоцых штаммов *Yersinia pestis*» Красильниковой Екатерины Александровны, младшего научного сотрудника 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, на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология. Работа выполнена в лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, принята к защите диссертационным советом Д 350.002.01 при ФБУН ГНЦ ПМБ 09.04.2021 г., протокол № 5.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук Дентовская Светлана Владимировна, 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 микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций, главный научный сотрудник;

Официальные оппоненты:

1. 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;

2. Каратаев Геннадий Иванович, доктор биологических наук (специальности 03.02.03 – микробиология и 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.

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Председатель проинформировал, что состав совета Д 350.002.01 утвержден в количестве 23 человек; на основании явочного листа присутствуют 18 человек - кворум имеется. Присутствует требуемое количество докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология - 8 чел. **Совет правомочен принимать решения.**

За повестку дня голосовали открытым голосованием: единогласно.

Слово предоставляется ученому секретарю совета – канд. биол. наук **Фурсовой Надежде Константиновне** для оглашения документов аттестационного дела соискателя:

Уважаемые коллеги, в совет поданы документы соискателя Красильниковой Екатерины Александровны, которая родилась 01.06.1993 г. в г. Уфа. Она окончила в 2016 г. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Микробиология». В период с 01 октября 2016 г. по 01 октября 2020 г. 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. Сдала кандидатские экзамены: «история и философия науки» «иностранный язык» и «микробиология». Все необходимые **документы имеются в личном деле соискателя** (заключение организации, где выполнялась работа; отзыв научного руководителя; список научных трудов и копии основных трудов; документ о проверке диссертации в системе «Антиплагиат» – оригинальность текста диссертационной работы – 85,32 %, оригинальность текста автореферата диссертации – 80 %; копия автореферата; выписка из протокола заседания диссертационного совета по принятию диссертации к защите (№ 5 от 09.04.2021 г.); письменные согласия официальных оппонентов и ведущей организации; список организаций, в которые был разослан автореферат 27.07.2021 г.; выписка о том, что диссертация сдана в библиотеку Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»; копия объявления о защите диссертации, размещенного на сайте ВАК 23.06.2021 г.; оригиналы отзывов ведущего учреждения, оппонентов, отзывов на автореферат; акты и справки о внедрении результатов научных исследований).

Председатель: Есть ли вопросы по личному делу соискателя? Вопросов нет. Спасибо. Тогда для оглашения основных результатов работы приглашается Красильникова Екатерина Александровна, предоставляется 20 минут.

Слушали: соискателя Красильникову Е.А., которая изложила содержание и основные положения диссертации:

Глубокоуважаемый председатель, глубокоуважаемые члены диссертационного совета! Многоуважаемые коллеги! Разрешите представить Вашему вниманию основное содержание диссертационной работы на вышеуказанную тему.

Yersinia pestis - этиологический агент чумы. Как вид *Y. pestis* отделился от *Y. pseudotuberculosis* приблизительно 20000 лет назад. Среди представителей вида *Y. pestis* различают два подвида, подвид *pestis* и подвид *microti*. Исторически сложилось, что для определения таксономической принадлежности внутри вида *Y. pestis* использовали способность штаммов к определенным ферментативным реакциям, таким как ферментация

сахаров, глицерина, восстановление нитратов и питательные потребности. Таким образом, полевочьи штаммы *Y. pestis* также называют рамнозопозитивными - по способности ферментировать рамнозу. Помимо очевидных биохимических различий существует не менее очевидное отличие в патогенности для разных групп млекопитающих. Так, штаммы неосновного подвида вирулентны для своих основных хозяев, таких как мыши и полевки, а классические штаммы универсально вирулентны для млекопитающих, в том числе для людей и морских свинок. Такое различие в вирулентности для штаммов неосновного подвида *Y. pestis* называют «избирательной» вирулентностью. В настоящее время феномен избирательной вирулентности представителей вида *Y. pestis* является малоизученным. Ряд исследователей опубликовали работы по анализу протеомов культур, культивированных *in vitro*, но до последнего времени не проводили изучения спектра белков, продуцируемых *in vivo*.

Целью настоящей работы являлся поиск факторов избирательной вирулентности полевочьих штаммов *Y. pestis* и оценка перспективности их использования в качестве молекулярных мишеней для профилактики и терапии чумы.

Основные задачи работы:

1. Провести селекцию одной-двух пар культур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, отличающихся по вирулентности при подкожном заражении морских свинок.
2. Выполнить сравнительный протеомный анализ изучаемых пар культур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, культивированных *in vitro* и *in vivo*.
3. Выполнить нокаутный мутагенез и комплементацию генов, обнаруженных предполагаемых факторов патогенности, отвечающих за избирательную вирулентность, и изучить свойства мутантных штаммов.
4. Оценить вклад продуктов выбранных генов в иммуногенез чумы.

Научная новизна:

1. Выявлены пять белков, экспрессия которых увеличивалась у высоковирулентных для морских свинок субкультур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, выращенных *in vivo* – в диализных камерах, имплантированных в полость брюшины морских свинок. Кроме того, у вирулентных для морских свинок культур, выращенных *in vivo*, отметили увеличение в 5-7 раз продукции капсульного антигена CafI и прекращение продукции пестицина Pst.
2. Впервые показано, что мутация по гену *htpG* не влияет на вирулентность штаммов *Y. pestis* основного подвида и bv. *ulegeica* для мышей и морских свинок.
3. Впервые получены экспериментальные доказательства отсутствия влияния одиночной нокаутной мутации по гену *glnA* на вирулентность штаммов *Y. pestis* основного подвида для мышей и морских свинок. Для аттенуации требуется генетический нокаут всего оперона *glnALG*.

4. Впервые установлено, что *ΔglnALG* штамм *Y. pestis* не вызывал гибели мышей и морских свинок при подкожном введении и обеспечивал 100 %-ную защиту животных при последующем заражении вирулентным штаммом.

5. Впервые доказано, что делеция гена *metQ* ведет к аттенуации штамма *Y. pestis* основного подвида и для мышей, и для морских свинок.

6. Приоритет предложенного способа сенсibilизации планшета для иммуноферментного анализа нерастворимыми белковыми антигенами защищен патентом на изобретение № RU 2 732 013 C1, МПК G01N 33/569. Заявка 2019140904 11.12.2019 г. Опубликовано: 10.09.2020 г. Бюл. № 25.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

- Полученные в рамках диссертационного исследования данные о молекулярных отличиях «полевых» штаммов *Y. pestis* с различной степенью избирательной вирулентности расширяют представления о механизмах патогенеза инфекций бактериальной этиологии и микроэволюции их возбудителей.

- Использованный методический подход, заключающийся в анимализации путем последовательных тестикулярных пассажей, может быть применен для дифференциации бактериальных культур по степени их избирательной вирулентности.

- Разработаны приемы культивирования вирулентных штаммов чумного микроба в перитонеальной полости морских свинок с использованием камер из диализной мембраны.

- Определено инактивирующее действие химических реагентов для получения безопасных препаратов белков из вирулентных штаммов *Y. pestis*, пригодных после разделения путем двумерного электрофореза для дальнейшего масс-спектрометрического анализа.

- Депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* EV НИИЭГ, дефектные по синтезу глутаминсинтетазы и продуктов двухкомпонентной системы регуляции глутаминсинтетазы, белка теплового шока и субстрат-связывающей единицы ABC-транспортера метионина, и штаммы-продуценты рекомбинантных белков Fba, HtpG, MetQ и GlnA (федеральный уровень внедрения)

- Материалы диссертационной работы используются при подготовке кадров высшей квалификации и для слушателей курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации ФБУН ГНЦПМБ при чтении лекций и проведении практических занятий.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный комплекс методических приемов позволяет проводить селекцию субкультур штаммов *Y. pestis*, принципиально отличающихся по вирулентности при подкожном заражении морских свинок.

2. Избирательное "выключение" генов *htpG* или *glnA* не приводит к снижению вирулентности мутантных штаммов *Y. pestis* при подкожном заражении белых мышей и морских свинок.

3. Оперон *glnALG* и индивидуальный ген *metQ* – потенциальные «молекулярные мишени» для создания аттенуированных вакцинных штаммов и лечения чумы.

На первом этапе мы провели селекцию субкультур штаммов, *Y. pestis* subsp. *microti*, вирулентность которых при подкожном заражении морских свинок соответствовала или приближалась к таковой у штаммов основного подвида. После анимализации путем подкожных пассажей из 52 штаммов удалось отобрать 17, высоковирулентных для мышей. Затем провели 4 последовательных тестикулярных пассажа микробных культур через организм морских свинок. Гемато-тестикулярный барьер, защищая бактерии от иммунной системы хозяина, позволил именно вирулентным бактериям размножиться с опережением, накапливаться и вызывать генерализованную инфекцию. В ходе выполнения этой части исследования отобрали 2 штамма *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica* И-3189 и И-2239 вирулентность которых при подкожном заражении морских свинок была близка к таковой для штаммов основного подвида чумного микроба. Полногеномное секвенирование сравниваемых субкультур *Y. pestis* subsp. *microti* И-3189 и И-2239, отличающихся по вирулентности при подкожном заражении морских свинок, показало отсутствие отличий на уровне нуклеотидных последовательностей, что свидетельствует о наличии у чумного микроба механизмов регуляции вирулентности на уровне экспрессии отдельных или групп генов. Учитывая, что степень экспрессии отдельных генов *in vitro* и *in vivo* может отличаться, на следующем этапе нашего исследования была предпринята попытка адаптировать предложенный ранее Akins'ом и Grassmann'ом технический подход, заключающийся в культивировании боррелий и лептоспир в перитонеальной полости крыс с использованием камер из диализной мембраны. Две субкультуры (исходную авирулентную для морских свинок и культуру после тестикулярных пассажей) каждого из штаммов *Y. pestis* bv. *ulegeica* выращивали в течение двух дней в жидкой питательной среде в диализных камерах, имплантированных в брюшную полость морских свинок. Малый размер пор диализной мембраны позволял питательным веществам из организма хозяина проникать внутрь камеры, ограничивая давление иммунной системы на культивируемые клетки чумного микроба. Затем диализный мешок извлекали, а его содержимое отбирали путем аспирации с помощью стерильного шприца и использовали для выделения белков. При проведении двумерного гелевого электрофореза белковых экстрактов в неравновесном градиенте рН выявили изменения в области нескольких белковых пятен у вирулентных для морских свинок субкультур штаммов subsp. *Microti*, по сравнению с авирулентными. Данные белки идентифицировали далее с помощью масс-спектрометрии. У вирулентных культур обнаружили увеличение в 5-7 раз

продукции капсульного антигена Caf1 и в 20 раз глутаминсинтетазы, а также появление белковых пятен, соответствующих субстрат-связывающему белку ABC-транспортера метионина MetQ, белку теплового шока HtpG, двум фруктозо-бисфосфат альдозаз, и гипотетическому белку *Y. pestis*.

Следующий этап нашего исследования был посвящен получению делеционных мутантов и комплементации генов обнаруженных белков для изучения их вклада в патогенез чумы. HtpG – высококонсервативный молекулярный шаперон, бактериальный гомолог молекулярного шаперона эукариот, обнаруживаемый у всех бактерий и участвующий в фолдинге белков в условиях стресса. Белок необходим для продукции ряда факторов патогенности *E. coli*, способствует персистенции *Salmonella Typhimurium* в кишечнике свиней, а также играет важную роль в патогенезе инфекций, вызываемых *Francisella tularensis*. Проведенный биоинформатический анализ показал высокую консервативность белка HtpG внутри вида *Y. pestis*, а также *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Для изучения функциональной важности белка HtpG в патогенезе чумы с помощью сайт-направленного мутагенеза получили делеционные мутанты по кодирующему гену на основе аттенуированных и вирулентных штаммов *Y. pestis*. Штаммы *Y. pestis* с делецией *htpG* проявляли чувствительность к температурному и оксидативному стрессу, однако мутанты не были чувствительны к осмотическому стрессу и комплементу сыворотки крови человека. Утрата чумным микробом способности к синтезу *htpG* не оказывала влияния на вирулентность и средние сроки жизни мышей и морских свинок при подкожном способе заражения, что свидетельствует о неперспективности его использования в качестве молекулярной мишени для терапии или вакцинопрофилактики чумы.

Одной из центральных молекул в обмене азота в клетке прокариот является глутамин, который синтезируется с помощью фермента глутаминсинтетазы. Известно, что приспособительная реакция к изменениям внеклеточного содержания азота у бактерий координируется двухкомпонентной системой GlnLG. В состав генетического локуса *glnALG* входят три гена кодирующие глутаминсинтетазу, гистидинкиназу и регуляторный белок. Проведенный биоинформатический анализ показал высокую консервативность белков внутри вида *Y. pestis*, рода *Yersinia* и с другими представителями *Enterobacteriaceae*. Сайт-направленный мутагенез одиночного гена *glnA* и трех генов *glnALG* провели в вакцинном, а также в вирулентном штаммах *Y. pestis* основного подвида. Мутанты с делецией гена *glnA* росли сравнимо со штаммом «дикого» типа при добавлении 20 мМ-ного глутамина в бульон и агар Хоттингера. В среде без глутамина рост отсутствовал. Утрата чумным микробом способности к синтезу GlnA не оказывала влияния на вирулентность и средние сроки жизни мышей и морских свинок при подкожном способе введения. Штамм с делецией генов *glnALG* при подкожном способе введения был авирулентен для мышей и морских свинок в максимальных дозах, использованных для заражения. Мы оценили иммуногенность

сконструированного штамма *ΔglnALG* для мышей и морских свинок. Установлено, что штамм основного подвида с данной мутацией не вызывал гибели мышей и морских свинок при подкожном введении и обеспечивал 100 %-ную защиту животных при последующем заражении вирулентным штаммом. Такой аттенуированный штамм может рассматриваться как перспективный кандидатный вакцинный штамм.

Большинство микроорганизмов способны синтезировать метионин *de novo* из аспарагина в ходе ряда реакций, включающих ассимиляцию неорганических сульфатов и синтез цистеина или гомоцистеина. Штаммы основного подвида чумного микроба неспособны к самостоятельному синтезу метионина вследствие делеции одного нуклеотида в гене *metB*, кодирующем цистетионин-гамма-синтазу и проявляют ауксотрофность по данной аминокислоте. Основными системами поглощения метионина у бактерий являются ABC-транспортеры. В состав локуса входят три гена: *metN* (кодирующий АТФ-азу), *metI* (кодирующий пермиазу) и *metQ* (кодирующий синтез субстрат-связывающего белка). В структуре белка первые 22 аминокислоты относятся к сигнальному пептиду. MetQ аннотирован как гипотетический липопроtein и входит в TIGRFAM семейство липопроteинов. Сайт-направленный мутагенез гена *metQ* в вакцинном штамме, а также в вирулентном штамме основного подвида позволили получить делеционные мутанты. Для комплементации мутации сконструировали вектор pACYC-*metQ*. В бульоне Хоттингера мутантный штамм уступал по скорости роста штамму «дикого» типа. Отличие проявилось спустя 6 ч после инокуляции и сохранялось на протяжении всего времени наблюдения (24 ч).

Известно, что большинство субстрат-связывающих белков ABC-транспортеров расположены в периплазме грамотрицательных бактерий, однако существуют свидетельства поверхностной локализации для некоторых из них. Наличие сигнального пептида у белка MetQ чумного микроба, свидетельствует о возможной его локализации в периплазматическом пространстве или наружной мембране. При проведении иммуноблота с полученными поликлональными мышинными антителами к рекомбинантному показано, что MetQ белок присутствовал в клеточном лизате штамма *Y. pestis*, отсутствовал в штамме *Y. pestis ΔmetQ* и обнаруживался в наружной мембране чумного микроба. Делеция гена *metQ* приводила к аттенуации штамма основного подвида как для мышей, так и для морских свинок, а комплементация восстанавливала вирулентность. До настоящего момента в развитии инфекционного процесса при чуме была установлена только роль ABC-транспортеров, отвечающих за транспорт ионов металлов, таких как железо, цинк и марганец. В настоящем исследовании впервые показано влияние делеции субстрат-связывающего белка MetQ ABC-транспортера метионина на вирулентность штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* при подкожном заражении двух видов лабораторных животных.

Т.к. поиск дополнительных протективных антигенов чумного микроба продолжает сохранять свою актуальность, мы оценили вклад обнаруженных при протеомном анализе

белков в иммуногенез чумы. Гены *htpG*, *glnA*, *fbaA* и *metQ* из штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* EV клонировали в составе векторной плазмиды pET32b(+) в клетках протеазодефицитного штамма *E. coli* BL21(DE3). Рекомбинантные белки GlnA, Fba, MetQ и HtpG, из сконструированных штаммов продуцентов выделяли методом аффинной Ni²⁺-хелатной хроматографии. Для трех белков - Fba, MetQ и HtpG - показана способность стимулировать продукцию специфических антител после двукратной подкожной иммунизации беспородных мышей. Установлено отсутствие выраженной протективной активности для всех белков (Fba, GlnA, MetQ и HtpG).

Позвольте перейти к **выводам**:

1. На основе тестикулярной анимализации разработан оригинальный комплекс методических приемов, позволяющий проводить селекцию субкультур некоторых слабовирулентных штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, величины LD₅₀ которых при подкожном заражении морских свинок составляют единичные клетки, как и у штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis*.

2. Выявлены пять белков (WP_050548832.1, молекулярный шаперон - белок теплового шока HtpG; EIR69411.1, глутаминсинтетаза GlnA; WP_002209962.1, фруктозо-бисфосфат альдолаза Fba; WP_038931127.1, субстрат-связывающий белок ABC-транспортера метионина MetQ и WP_016599821.1, гипотетический белок), экспрессия которых увеличивалась у высоковирулентных для морских свинок субкультур штаммов, выращенных *in vivo* – в диализных камерах, имплантированных в полость брюшины морских свинок.

3. Впервые показано, что мутация по гену *htpG* не влияет на вирулентность штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* и bv. *ulegeica* для мышей и морских свинок.

4. Впервые получены экспериментальные доказательства отсутствия влияния одиночной мутации по гену *glnA* на вирулентность штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* для мышей и морских свинок. Показано, что для аттенуации требуется генетический нокаут всего *glnALG* оперона.

5. Установлено, что Δ *glnALG* штамм *Y. pestis* subsp. *pestis* не вызывал гибели мышей и морских свинок при подкожном введении и обеспечивал 100 %-ную защиту животных при последующем заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 200 DCL.

6. Впервые доказано, что делеция гена *metQ* ведет к аттенуации штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* для мышей и морских свинок, что наряду с поверхностной локализацией метионин-связывающего белка MetQ и отсутствием гомологичных белков в клетках

млекопитающих, делает его потенциальной молекулярной мишенью при разработке новых препаратов для лечения чумы.

7. Показана способность рекомбинантных белков Fba, MetQ и HtpG стимулировать продукцию специфических антител при отсутствии протективной активности.

Спасибо за предоставленное внимание!

Председатель: Спасибо, Екатерина Александровна. Уважаемые коллеги, кто хотел бы задать вопросы соискателю?

Соискателю заданы следующие **вопросы в устной форме:**

Вопрос 1 (Помазанов Владимир Васильевич, д-р техн. наук, профессор, профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин Государственного гуманитарно-технического университета, Орехово-Зуево, Московская область): Екатерина Александровна, скажите пожалуйста, слово «полевочки» применяется к названию подвида как официальный термин, или же это сленговое название?

Ответ: Глубокоуважаемый Владимир Васильевич, спасибо за Ваш вопрос. Данное слово является переводом названия подвида чумного микроба – *microti*, также это слово употребляется в русскоязычных научных работах.

Дополнительный вопрос: На слайде 3 показано, что после проведения 2D-электрофореза была выполнена масс-спектрометрия, данные электрофореза впоследствии Вы представили, а вот данные масс-спектров у Вас в докладе не были отображены, почему?

Ответ: Масс-спектрометрическую идентификацию белков проводили совместно с сотрудниками ЗАО «Постгеномные и нанотехнологические инновации», поэтому эти результаты не представлены на слайде.

Вопрос 2 (Светоч Эдуард Арсеньевич, д-р ветеринар. наук, профессор, глав. науч. сотр. лаборатории антимикробных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск): Екатерина Александровна, скажите пожалуйста, имея данные, полученные в ходе вашей работы, приблизились ли Вы к пониманию, чем обусловлена избирательная вирулентность полевочьих штаммов? Почему они проявляют избирательную вирулентность, в отличие от классических штаммов чумного микроба?

Ответ: Глубокоуважаемый Эдуард Арсеньевич, позвольте подчеркнуть, что, как уже было отмечено в докладе, мы выявили пять белков, продукция которых была достоверно выше только у вариантов штаммов, вирулентных для морских свинок, на уровне штаммов основного подвида. Более того, нокаутные мутации этих генов в штаммах основного подвида снижали вирулентность для морских свинок и мышей более чем на 7 порядков.

Вопрос 3 (Шепелин Анатолий Прокопьевич, д-р биол. наук, зам. директора по научной и производственной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск): Екатерина Александровна,

на странице 21 автореферата, в Заключение, у Вас сказано, что данные мишени могут быть использованы для лечения чумы. Приведите, пожалуйста, пример, каким образом Вы это подразумеваете?

Ответ: Глубокоуважаемый Анатолий Прокопьевич, обнаруженный нами в ходе проведения эксперимента субстрат-связывающий белок ABC-транспортёра метионина может быть использован в качестве мишени для создания ингибиторов вирулентности, что позволит усовершенствовать терапию чумы.

Вопрос 3 (Павлов Виталий Михайлович, д-р биол. наук, глав. науч. сотр. лаборатории микробиологии туляремии ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск): Екатерина Александровна, Вы в своей работе используете камеры из диализной мембраны, но существуют данные о том, что для имитации условий *in vivo* используются различные питательные среды. Что Вы можете сказать по этому поводу из собственных исследований или из литературных источников?

Ответ: Глубокоуважаемый Виталий Михайлович, спасибо за Ваш вопрос. Многие исследователи в своих работах пытаются манипулировать условиями выращивания микроорганизмов *in vitro*, воспроизводя условия попадания бактерий в организм млекопитающего, например, повышая температуру культивирования, изменяя осмолярность, ограничивая доступность железа, добавляя сыворотку крови. Однако выращивание чумного микроба на питательных средах *in vitro*, даже с искусственным воспроизведением условий *in vivo*, не может полностью отразить изменений, происходящих при попадании бактерий в организм теплокровного хозяина. Поэтому для характеристики изменений, проходящих с чумным микробом при адаптации к организму теплокровного хозяина, мы использовали диализные камеры, имплантированные в перитонеальные полости морских свинок. Такие камеры способны максимально приблизить условия выращивания к таковым *in vivo*, но, конечно же, не полностью воспроизвести их.

Председатель: Если больше нет вопросов к соискателю, **слово предоставляется научному руководителю соискателя** главному научному сотруднику лаборатории микробиологи чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ПМБ доктору медицинских наук Дентовской С.В.:

Дентовская С.В. охарактеризовал Красильникову Е.А. как научного сотрудника, обладающего высоким уровнем способностей, упорством, целеустремленностью и волевыми качествами, что помогло ей успешно справиться с поставленной целью и решить все задачи при выполнении диссертационной работы. Екатерина Александровна проявила способность планировать исследования, выполнять экспериментальную работу с помощью широкого спектра освоенных методов, представлять отчетный материал и готовить научные публикации. Во время выполнения диссертационного исследования она дополнительно участвовала еще в нескольких проектах лаборатории микробиологии чумы в сотрудничестве с другими отделами ФБУН ГНЦ ПМБ. В заключение Дентовская С.В. охарактеризовала

соискателя как полностью сформировавшегося ученого, который достоин присвоения степени кандидата биологических наук.

Слово для оглашения **Заключения организации, где выполнялась диссертационная работа, Отзыва ведущей (оппонирующей) организации и Отзывов на автореферат** предоставляется ученому секретарю диссертационного совета Фурсовой Н.К.:

Заключение организации, где выполнялась диссертационная работа – 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 от 24.05.2021 г. подписано зав. научной частью, ученым секретарем 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 Коломбет Любовью Васильевной, утверждено директором академиком РАН, д-ром мед. наук, профессором Дятловым Иваном Алексеевичем. В Заключении отражена актуальность исследования, научная новизна и практическая значимость диссертационной работы, соответствие диссертационной работы Красильниковой Е.А. отрасли науки «Биологические науки» и паспорту специальности 03.02.03 – «Микробиология» в областях исследований по пунктам 3 – «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов», 4 – «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне», 5 – «Обмен веществ микроорганизмов». Заключение принято на заседании межлабораторного научного семинара, присутствовало на заседании 28 чел. Результаты голосования: «за» - 28 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол № 57 от 29.04.2021 г.

Отзыв ведущей организации Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации от 05.08.2021 г. подписан старшим научным сотрудником лаборатории микробиологии чумы канд. мед. наук Шестопаловым Михаилом Юрьевичем, утвержден директором доктором медицинских наук, профессором Балахоновым Сергеем Владимировичем. Отзыв положительный (полный текст отзыва прилагается). Принципиальных замечаний по существу работы нет. В Заключении отзыва отмечено, что диссертационная работа Красильниковой Екатерины Александровны «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоочьих штаммов *Yersinia pestis*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершённой, выполненной на высоком методическом уровне научно-квалификационной работой, полученные диссертантом новые 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, объему проведенных исследований, научно-практической значимости работа соответствует всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции постановлений Правительство РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г.), в части требований, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 — микробиология. Отзыв на диссертацию Красильниковой Е.А. «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоочьих штаммов *Yersinia pestis*» обсуждён и одобрен на ученом совете ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, протокол № 4 от 05.08.2021 г.

Поступило 4 положительных отзыва на автореферат без замечаний от: (1) д-ра биол. наук, ст. науч. сотрудника, Дыкмана Льва Абрамовича, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук, г. Саратов; (2) д-ра мед. наук Краевой Людмилы Александровны, заведующей лабораторией Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации; (3) д-ра мед. наук, профессора Харсеевой Галины Георгиевны, заведующей кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону; (4) д-ра мед. наук, профессора, заслуженного деятеля науки РБ Мавзютова Айрата Радиковича, заведующего кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Уфа.

Слово для ответа на вопросы и замечания, содержащиеся в отзывах ведущей организации и авторефератах, предоставлено соискателю Красильниковой Е.А.:

Глубокоуважаемый председатель, глубокоуважаемые члены диссертационного совета! Разрешите выразить глубокую благодарность за положительные отзывы на диссертацию. Прежде всего, хочу выразить огромную благодарность ведущей организации - ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», в лице канд. мед. наук Шестопалова Михаила Юрьевича и д-ра медицинских наук,

профессора Балахонова Сергея Владимировича. Позвольте мне также выразить искреннюю благодарность всем приславшим отзывы на диссертацию и автореферат, за глубокий анализ и высокую оценку нашей работы.

Слово предоставляется **официальному оппоненту д-ру мед. наук, профессору Федоровой Валентине Анатольевне**, Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» Федерального агентства научных организаций, директор. Отзыв положительный (полный текст отзыва прилагается), содержит три вопроса:

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 М.Н. (Куляш Г.Ю., Головки Е.М., Ляпин М.Н. 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).

Ответ Красильниковой Е.А. официальному оппоненту Федоровой В.А.: Глубокоуважаемая Валентина Анатольевна! Разрешите поблагодарить Вас за глубокий и тщательный анализ нашей работы и ее высокую оценку. Разрешите ответить на Ваши вопросы:

По поводу принципиальных отличий полученных нами результатов от данных, полученных ранее другими учеными, в частности, группой Ляпина М.Н. (Куляш Г.Ю., Головки Е.М., Ляпин М.Н. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1991, №8, с. 16-20), хотим отметить, что коллеги из РосНИПЧИ «Микроб» выполняли свои исследования еще в прошлом веке, в то время для них были недоступны высокоразрешающие методы проведения протеомного анализа. При сравнении двух культур штамма *Y. pestis* EV, выращенных на плотной питательной среде и в имплантированной в полость брюшины морской свинке камере, авторы смогли проанализировать только проявление основных фенотипических характеристик чумного микроба: характер роста на питательных средах, ферментацию углеводов, чувствительность к чумным диагностическим бактериофагам, экспрессию капсульного антигена в РА и РПГА и продуктов, кодируемых плазмидой пестициногенности в РА. Кроме того, авторы пытались найти различия в протеомах двух культур, разделённых методом одномерного вертикального электрофореза в

полиакриламидном геле, и, действительно, обнаружили исчезающие и появляющиеся белковые полосы, идентифицировать которые, в силу объективных причин, не смогли.

Что касается оригинальности моделирования условий культивирования чумных бактерий в диализных мешках, в наших экспериментах, по сравнению с полимерными камерами, которые были предложены в 80-х гг. прошлого века группой зарубежных ученых, необходимо уточнить, что указанные авторы использовали обрезки наконечников для автоматических пипеток длиной около 10 мм и диаметром 6 мм, два конца которых закрывали микропоровыми фильтрами «Millipore» с размером пор 0,22 мкм. В наших экспериментах использовали камеры, полностью состоящие из диализной мембраны (Sigma-Aldrich D9652-100FT размером 33 мм, тем самым увеличивая площадь соприкосновения бактериальной культуры с организмом хозяина. Малый размер пор диализной мембраны позволял проникать внутрь камеры питательным веществам из организма хозяина и препятствовал непосредственному контакту бактерий с антителами и эффекторными клетками иммунной системы.

Действительно, на рисунке 4 панель А обозначение гена устойчивости к канамицину указано ошибочно. В будущем постараемся более внимательно подходить к подписям рисунков.

Председатель: Валентина Анатольевна, Вы удовлетворены ответами на Ваши вопросы?

В.А. Федорова: Да, удовлетворена.

Слово предоставляется секретарю Диссертационного совета Фурсовой Надежде Константиновне для оглашения отзыва отсутствующего по уважительной причине **официального оппонента Каратаева Геннадия Ивановича, д-ра биологических наук** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория генетики бактерий, ведущего научного сотрудника. Отзыв положительный (полный текст отзыва прилагается). При анализе диссертации у оппонента возникло три вопроса:

1) Почему Вы пишете только о двух подвидах чумного микроба, а в публикации сотрудников РосНИПЧИ «Микроб» вместо одного неосновного подвида *microti* фигурируют сразу несколько подвидов?

2) Почему мутагенез бактерий вакцинного и вирулентного штаммов проводили разными методами?

3) Каким основным требованием, с Вашей точки зрения, должна удовлетворять «идеальная» чумная вакцина?

Ответ Красильниковой Е.А. на отзыв официального оппонента Каратаева Г.И.:

Разрешите поблагодарить высокоуважаемого Геннадия Ивановича за тщательную экспертизу диссертации и положительную оценку работы и ответить на вопросы, имеющиеся в отзыве.

1) Для стандартизации системы классификации штаммов *Y. pestis* совещание специалистов противочумных учреждений СССР (Саратов, 1985 г.), на основе анализа 60 фенотипических признаков, рекомендовало классифицировать все варианты возбудителя чумы, которые были выделены на территории СССР и в Монголии, на «подвиды»: *pestis* (основной подвид), *altaica*, *caucasica*, *hissarica* и *ulegeica*. В 1998 г. А.А. Слудский предложил еще одну внутривидовую группу - подвид *talassica*. Последние пять подвидов были названы «неосновными». Данную классификацию, подразделяющую штаммы *Y. pestis* на подвиды, в настоящее время используют в работе противочумных учреждений бывшего СССР. Однако в данном виде внутривидовая таксономия чумного микроба не соответствует правилам Международного кодекса номенклатуры бактерий (МКНБ). В используемом нами варианте внутривидовой классификации, соответствующем правилам МКНБ, вид *Y. pestis* делится на два подвида: основной *pestis*, к которому относятся 4 биовара: *antiqua*, *medievalis*, *orientalis* и *intermedium*, и неосновной *microti* с биоварами *altaica*, *angola*, *caucasica*, *hissarica*, *qinghaiensis*, *talassica*, *ulegeica* и *xilingolensis* и геногруппой 0.РЕ7. Данная классификация также используется в работах исследователей из Германии, Монголии и Франции.

2) Что касается мутагенеза, то данную схему мы используем из соображений безопасности работы. Сначала в условиях BSL-2 получаем делеционный мутант на авирулентном штамме чумного микроба методом RedGam-мутагенеза, затем клонируем мутантную аллель в суицидном векторе pCVD442 и переходим в BSL-3 с вирулентным штаммом. Получать мутант методом RedGam-мутагенеза сразу на вирулентном штамме опасно, этап отмывки клеток перед электропорацией включает неоднократное центрифугирование и создает риск аэрозолирования культуры.

3) По поводу основных требований, предъявляемых к вакцинным препаратам, необходимо отметить, что на современном этапе они включают: безупречный уровень безопасности для всех слоев населения, в том числе лиц с измененной иммунной реактивностью (младенцы, беременные, пожилые, лица с нарушениями иммунного статуса); создание напряженного и долгосрочного уровня защиты, развивающегося не позднее чем через 2-3 недели после однократного введения вакцинного препарата; безинъекционный способ введения в организм (через рот, нос, кожу, слизистые); возможность комбинирования с другими вакцинами; устойчивость к внешним воздействиям и отсутствие специальных требований для хранения; и, наконец, экономичность и простоту изготовления. Однако до сих пор не существует «идеальной вакцины» против чумы, полностью соответствующей всем перечисленным требованиям. Что касается подходов к разработке новых безопасных и эффективных вакцин, обеспечивающих развитие более продолжительного противочумного

иммунитета, в настоящее время уже не оспаривается тот факт, что живые аттенуированные штаммы патогенных микроорганизмов, по сравнению с химическими и субъединичными вакцинами, способны стимулировать гораздо более эффективный иммунитет, по напряженности приближающийся к постинфекционному и защищающий от заражения различными по антигенному составу вариантами патогена. Наибольшие усилия при разработке субъединичных вакцин против чумы сконцентрированы на создании формул препаратов, содержащих два основных иммунодоминантных антигена *Y. pestis* – F1 и LcrV. Однако сосредотачиваться исключительно на F1 и LcrV, как на единственных протективных белках, подходящих для создания кандидатных вакцин, было бы недальновидным, вследствие обнаружения структурного полиморфизма LcrV *Y. pestis* и существования высоковирулентных природных штаммов возбудителя чумы, лишенных способности продуцировать F1 антиген. Поиски оптимального способа аттенуации при конструировании вакцинного штамма или определение антигенного/эпитопного и адъювантного составов молекулярной вакцины, а также способов ее презентации, должны продолжаться.

Председатель: Уважаемые коллеги, кто хотел бы принять участие в дискуссии, выступить в качестве неофициального оппонента?

Объявлена дискуссия, в которой приняли участие присутствующие на защите.

Коломбет Любовь Васильевна, д-р биол. наук, зав. научной частью ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск:

Уважаемые коллеги, в 2016 г. в Башкирском государственном медицинском университете я, в качестве члена комиссии, присутствовала на защите дипломных работ выпускников, где впервые встретила Екатерину Александровну. Сегодня мы можем видеть, как в умелых руках научного руководителя она из неогранённого камня превратилась в бриллиант. О том, какая работа была проделана, мы знаем давно, поскольку Екатерина закончила аспирантуру в ФБУН ГНЦ ПМБ. Мы наблюдали, как за это время она становилась специалистом в той области, на которую люди редко обращают внимание, в связи с ее сложностью – это область исследования возбудителей особо опасных инфекций. Соискатель сама приняла решение посвятить себя этой области науки. Мы испытываем огромную радость, что у нас вырос квалифицированный специалист, и я призываю членов диссертационного совета поддержать эту работу и соискателя.

Светоч Эдуард Арсеньевич, д-р ветеринар. наук, профессор, глав. науч. сотр. лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск:

Настоящая диссертация выполнена в лаборатории, где работают известные чумологи Анисимов Андрей Павлович и Дентовская Светлана Владимировна, научные труды которых признаны во всем мире. Также они являются авторами монографий на русском и английском языках. Мы всегда с удовольствием слушаем учеников из лаборатории микробиологии чумы.

Что касается представленной работы, то официальные оппоненты охарактеризовали ее во всей полноте. От себя хочу добавить, что на мой взгляд ценным является то, что во всем многообразии чумного микроба, в различных подвидах и биоварах, в исследовании их особенностей и отличий по степени вирулентности можно найти возможность определить необходимые мишени, которые позволят создать более совершенные вакцины. Я считаю, что работа замечательная, Светлана Владимировна охарактеризовала Екатерину Александровну как прилежного и заинтересованного сотрудника, самостоятельно работающего в условиях BSL-3. Я буду голосовать «за».

Председатель, Шемякин Игорь Георгиевич, д-р биол. наук, профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск:

В ходе выполнения данного диссертационного исследования показано, что обнаруженные у чумного микроба молекулярные мишени гомологичны в 99 % случаев внутри вида *Y. pestis* и внутри рода *Yersinia*, до 95 % со всеми *Enterobacteriaceae* и только на 36 % с человеческими, т.е. они являются практически идеальными мишенями. Эти мишени предназначены для разработки терапевтических средств, которые связываются с активными центрами данных ферментов. Для меня, как молекулярного биолога, выбор и нахождение идеальной мишени - это основная ценность данной работы. Поэтому я бы предложил в дальнейшем продемонстрировать третичную структуру данных белков с двухангстремным разрешением, где показать, насколько различаются их активные центры у человека и бактерий. Мне данная диссертационная работа понравилась, потому что, на мой взгляд, это явная наука, и я буду голосовать «за».

Председатель: Слово предоставляется **Красильниковой Е.А.** для заключительного слова:

Глубокоуважаемый председатель! Глубокоуважаемые члены Ученого совета! Глубокоуважаемые присутствующие!

Позвольте поблагодарить директора ФБУН ГНЦ ПМБ академика РАН, доктора медицинских наук, профессора Дятлова Ивана Алексеевича за предоставленную возможность защиты диссертационной работы, а ученого секретаря диссертационного совета кандидата биологических наук Фурсову Надежду Константиновну - за организацию ее проведения. Еще раз позвольте поблагодарить официальных оппонентов - доктора медицинских наук, профессора Федорову Валентину Анатольевну и доктора биологических наук Каратаева Геннадия Ивановича за большой труд по рецензированию диссертации и ее положительную оценку. Позвольте высказать искреннюю признательность выступившим неофициальным оппонентам - за критический анализ и положительную оценку диссертации. Приношу искреннюю благодарность ведущей организации - Федеральному казенному учреждению здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и

благополучия человека за проявленный интерес к нашей работе и ее высокую оценку. Приношу глубокую благодарность моему научному руководителю - доктору медицинских наук Дентовской Светлане Владимировне за постоянное внимание и интерес к проводимой работе, помощь в логических обобщениях результатов по ее отдельным этапам. Считаю своим приятным долгом выразить искреннюю благодарность всем моим коллегам, сотрудникам ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии: доктору медицинских наук, профессору А.П. Анисимову, к.б.н. П.Х. Копылову, к.б.н. М.Е. Платонову, к.б.н. Комбаров Т.И., к.б.н. Иванову С.А., к.б.н. Шайхутдиновой Р.З., принимавшим участие в планировании и проведении экспериментов, обсуждении их результатов и оказывавшим помощь в оформлении диссертации. Спасибо всем присутствующим за внимание и доброжелательность.

Председатель: предлагаю перейти к **тайному голосованию**. Для этого необходимо избрать счетную комиссию. Есть предложение избрать **счетную комиссию** в следующем составе: д-р техн. наук Похиленко Виктор Данилович, д-р биол. наук Павлов Виталий Михайлович и д-р биол. наук Коломбет Любовь Васильевна.

Будут ли возражения? Нет? Кто за данный состав счетной комиссии - прошу проголосовать. **Единогласно.**

Членам совета с правом решающего голоса предлагаю получить бюллетени для голосования под роспись.

Объявляется перерыв для проведения тайного голосования.

Счетная комиссия выдала под расписку заготовленные заранее бюллетени по соответствующей форме. Голосующие члены диссертационного совета вычеркнули ненужное из графы «Результаты голосования» и опустили бюллетени в опечатанную урну. Члены счетной комиссии вскрыли урну, подсчитали бюллетени и составили по итогам голосования протокол счетной комиссии по соответствующей форме. После оформления протокола счетной комиссии по результатам голосования счетная комиссия опечатала все бюллетени и приложила их к своему протоколу.

Председатель: Для оглашения результатов тайного голосования слово предоставляется председателю счетной комиссии д-ру биол. наук Коломбет Любове Васильевне:

Протокол № 1 заседания счетной комиссии диссертационного совета Д 350.002.01 от 10.09.2021 г. Состав комиссии: д-р биол. наук Коломбет Любовь Васильевна, д-р биол. наук Павлов Виталий Михайлович и д-р техн. наук Похиленко Виктор Данилович. Комиссия избрана для подсчета голосов при тайном голосовании о присуждении Красильниковой Е.А. ученой степени кандидата биологических наук. Состав диссертационного совета утвержден в количестве **23** человек на период действия номенклатуры специальности научных сотрудников, утвержденной приказом Минобрнауки России от 25.02.2009 №59. В составе диссертационного совета нет дополнительно введенных членов совета. Присутствовало на заседании **18** членов совета, в том числе докторов наук по профилю рассматриваемой

диссертации – **8**. Роздано бюллетеней – **18**. Оказалось в урне бюллетеней – **18**. Результаты голосования по вопросу о присуждении ученой степени кандидата биологических наук Шишкиной Л.А. за – **18** против – **нет**, недействительных - **нет**.

Диссертационный совет утвердил протокол счетной комиссии.

Голосовали открытым голосованием: единогласно.

Слово для оглашения Заключения диссертационного совета по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук предоставляется ученому секретарю диссертационного совета к-ту биол. наук Фурсовой Н.К.:

**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 присуждении
Красильниковой Екатерине Александровне, гражданке РФ,
ученой степени кандидата биологических наук.**

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 H₂O₂), 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 рН, металл-хелатная аффинная хроматография), иммунологических (иммуоферментный анализ, иммуоблот), 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* 231Δ*glnALG*, 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 глутамина 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 геле-электрофореза в неравновесном градиенте рН и перспективности дальнейшего изучения сконструированного в ходе диссертационной работы штамма *Y. pestis* subsp. *microti* 231Δ*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 геле-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.

Председатель предложил голосовать за принятие Заключения.

Голосовали открытым голосованием: единогласно.

Председатель диссертационного совета д-р биол. наук, профессор **Шемякин И.Г.** объявил соискателю Красильниковой Екатерине Александровне **результат защиты:**

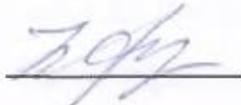
Разрешите от имени членов совета и присутствующих поздравить Красильникову Екатерину Александровну с успешной защитой диссертации, присвоением ей ученой степени кандидата биологических наук и пожелать успехов в дальнейшей работе.

Заседание диссертационного совета объявляется закрытым.

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.

