

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио директора
Федерального казенного учреждения
здравоохранения «Ростовский-на-Дону
ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный
институт» Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

И.М.Н. Гасевская Н.Е.
2024 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону
Ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный
институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

Диссертация Кузнецовой Дарьи Александровны «Роль сидерофора
иерсиниахелина в физиологии возбудителя чумы» на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 - Микробиология выполнена
в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону
Ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный
институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека.

В период подготовки работы Кузнецова Дарья Александровна работала в
должности младшего научного сотрудника в лаборатории микробиологии чумы и
других иерсиниозов, в должности научного сотрудника в лаборатории природно-
очаговых и зоонозных инфекций и лаборатории экспериментально-биологических
моделей и биологической безопасности Федерального казенного учреждения
здравоохранения «Ростовский-на-Дону Ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по
надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

В 2019 году Дарья Александровна Кузнецова окончила Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лечебно-профилактический факультет по специальности «Лечебное дело» (Диплом специалиста 106121 4540597, регистрационный № 9550 от 24.06.2019 г.).

Кузнецова Дарья Александровна для выполнения диссертационной работы, была прикреплена соискателем по специальности 1.5.11- микробиология в лабораторию микробиологии чумы и других иерсиниозов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол заседания Ученого совета № 3 от 17.06.2021 г.). Для завершения диссертационной работы, апробации, получения заключения организации Дарья Александровна была прикреплена в лабораторию экспериментально-биологических моделей и биологической безопасности ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол заседания Ученого совета № 5 от 27.04.2024 г.).

Справка о сдаче кандидатских экзаменов № 0012 выдана Федеральным государственным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации 05.09.2024 года.

Научный руководитель - Подладчикова Ольга Николаевна, кандидат химических наук, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций.

По итогам обсуждения диссертации «Роль сидерофора иерсиниахелина в физиологии возбудителя чумы», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 – Микробиология, принято следующее заключение:

Диссертация Дарьи Александровны Кузнецовой «Роль сидерофора иерсиниахелина в физиологии возбудителя чумы» является законченной

самостоятельной научно-исследовательской работой, содержащей новые фундаментальные данные по вопросу, который многие годы был предметом дискуссий в научном сообществе, занимавшимся поиском новых факторов вирулентности возбудителя чумы. Дарьей Александровной получены экспериментальные доказательства того, что чумной микроб, помимо хорошо изученного фактора вирулентности чумного микроба – сидерофора иерсиниабактина, продуцирует второй низкомолекулярный хелатор железа – сидерофор иерсиниахелин, характеристике которого посвящена диссертационная работа. В ходе выполнения работы методом молекулярного клонирования однозначно идентифицированы генетические детерминанты иерсиниахелина, которые с помощью методов биоинформатики обнаружены в геномах всех штаммов только двух видов высокопатогенных иерсиний: *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Выявлена их высокая стабильность у чумного микроба и вариабельность у разных штаммов псевдотуберкулезного микроба. Полученные данные позволили не только выявить влияние этой вариабельности на продукцию сидерофора, но и использовать ее в практических целях для дифференциации разных штаммов *Y. pseudotuberculosis* методом ПЦР. При сравнении трех сконструированных в работе изогенных вариантов чумного микроба, различающихся по продукции иерсиниахелина, получены важные сведения о возможных функциях этого сидерофора, связанных с его участием в ассимиляции железа и защите бактерий от реактивных соединений кислорода, о также с его действием на организм инфицированных чумным микробом животных.

Актуальность темы диссертационной работы

Понимание важности сидерофоров для патогенеза инфекционных заболеваний сделало их одним из активно изучаемых объектов в микробиологии патогенных микроорганизмов. За последние десятилетия получено огромное количество данных о генетических детерминантах, структуре и путях метаболизма сидерофоров бактерий и грибов. Экспериментально доказано, что сидерофоры вносят существенный вклад в развитие инфекционного процесса и являются признанными факторами вирулентности, которые, помимо обеспечения бактерий

железом, выполняют множество других функций. Они участвуют в поглощении других биологически значимых металлов и защищают бактерии от токсического действия тяжелых металлов, обладают антиоксидантными свойствами, выполняют регуляторную функцию. Многочисленные фундаментальные исследования сидерофоров позволили не только выявить их важную роль в вирулентности микроорганизмов и патогенезе инфекций, но и способствовали развитию различных направлений их практического применения для диагностики, профилактики и лечения инфекционных болезней.

Связь темы исследования с планом научной работы учреждения

Работа выполнена в рамках плановых научных тем: № 191-3-17 «Изучение неизвестных механизмов и факторов, участвующих в реализации патогенных свойств возбудителя чумы», № 210-3-19 «Генотипирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* с применением INDEL-маркеров», № 225-3-21 «Внутривидовое генотипирование штаммов возбудителей чумы и туляремии».

Вклад автора в получении научных результатов

Личный вклад автора состоит в анализе отечественной и зарубежной литературы, обсуждении и определении цели работы, выборе путей решения поставленных задач. Основная часть экспериментальной работы (бактериологические, молекулярно-генетические, биологические и биохимические исследования) автором выполнена самостоятельно. Секвенирование и биоинформационный анализ штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* проводили совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций А.С. Водопьяновым и ведущим научным сотрудником лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций А.Л. Трухачевым. Конструирование плазмид, получение рекомбинантных штаммов и изучение свойств иерсиниахелина выполнялось совместно с научным сотрудником лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций В.А. Рыковой. Организация подтверждает, что диссертация выполнена с личным участием Кузнецовой Дарьи Александровны 90%.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность результатов обусловлена использованием разнообразных общепринятых современных методов исследования (бактериологического, биологического, молекулярно-генетического, биохимического) и оборудования, имеющего сертификаты качества и свидетельства о поверке, а также значительным объемом исследований. В работе использованы 55 штаммов *Y. pestis* (36 – основного подвида, 19 – неосновных подвидов) и 100 штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Для анализа генов биосинтеза иерсиниахелина использованы полные нуклеотидные последовательности 583 штаммов *Y. pestis* и 303 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из базы данных NCBI.

Степень новизны полученных результатов

В настоящей работе впервые проведен детальный анализ генетических детерминантов сидерофора иерсиниахелина, расположенных в хромосомном *usi* локусе, и показана их специфичность для бактерий *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Сравнительный анализ этих детерминантов позволил обнаружить различия в структуре терминаторов транскрипции оперонов биосинтеза иерсиниахелина у разных штаммов двух видов иерсиний. Эти различия использованы для выявления новой ДНК-мишени, позволяющей дифференцировать различные группы штаммов *Y. pseudotuberculosis* методом ПЦР.

Впервые с помощью методов молекулярного клонирования получены прямые доказательства того, что сидерофор иерсиниахелин кодируется функционально активными генами *usi* локуса бактерий *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. С этой целью сконструированы три рекомбинантные плазмиды, содержащие гены биосинтеза иерсиниахелина из штаммов *Y. pestis* KIM и EV76, а также *Y. pseudotuberculosis* YPIII в составе плазмидного вектора pSC-A-amp/kan. Введение этих плазмид в штамм *E. coli* H1884 Δ entDF, не синтезирующий собственный сидерофор энтеробактин, позволило продемонстрировать сидерофорную и антиоксидантную активность рекомбинантных штаммов, что свидетельствовало о функционировании генов, кодирующих синтез иерсиниахелина.

В работе впервые проведен анализ функциональной активности иерсиниахелина в бактериях чумного микроба путем сравнения трех вариантов вакцинного штамма *Y. pestis* EV76, различающихся по продукции иерсиниахелина. На модели этих штаммов установлено, что при 26°C в железодефицитных условиях иерсиниахелин секретируется в среду и способствует ассимиляции железа, а при 37°C – остается внутри бактерий и защищает их от бактерицидного действия реактивных соединений кислорода. Помимо этих свойств, у иерсиниахелина выявлена способность стимулировать образование геморагий в организме хозяина, которая не была обнаружена у других сидерофоров.

Практическая значимость

В работе получены два рекомбинантных штамма *Y. pestis* EV76, один из которых содержит делецию генов биосинтеза иерсиниахелина (*Y. pestis* KM1933), а другой (*Y. pestis* KM1986) – плазмиду с генами его биосинтеза под контролем векторного промотора. Оба штамма депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора и могут быть использованы с целью дальнейшего изучения функциональных свойств иерсиниахелина в бактериях чумного микроба.

Сконструированная плазида pSC-A-5EV, содержащая гены биосинтеза иерсиниахелина, может быть использована для получения чистого препарата этого сидерофора из гетерологичных рекомбинантных штаммов и изучения его структуры и физико-химических свойств (Патент на изобретение РФ 2670949 от 25.10.2018 г.).

На основе нуклеотидных последовательностей генов *usi* локуса предложены праймеры, позволяющие проводить внутривидовую дифференциацию штаммов *Y. pseudotuberculosis* методом ПЦР *in silico* и *in vitro*.

В рамках исследования разработана и зарегистрирована компьютерная программа «SiderophoreAnalyzer – программа для выявления генов, отвечающих за синтез сидерофоров, в полногеномных нуклеотидных последовательностях энтеробактерий» (Программа для ЭВМ 2022680676 от 03.11.2022 г.). Программа дает возможность оценить наличие и разнообразие в геномах бактерий сидерофор-

зависимых систем ассимиляции железа и используется ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 10.10.2024 г.) и ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (акт внедрения от 10.10.2024 г.).

Материалы диссертации используются в педагогическом процессе в отделе профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в программе профессиональной переподготовки врачей и биологов «Бактериология. Основы безопасной работы с ПБА I-II групп патогенности» и циклах повышения квалификации «Природно-очаговые и другие опасные зоонозные инфекционные болезни», «Выявление и типирование возбудителей инфекционных болезней с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)» (акт внедрения от 25.09.2024 г.).

Соответствие специальности

Диссертационная работа Кузнецовой Д.А. «Роль сидерофора иерсиниэхелина в физиологии возбудителя чумы» по тематике, методам исследования, научным положениям соответствует паспорту специальности 1.5.11 – Микробиология (медицинские науки). Результаты исследования не требуют присвоения пометки «Для служебного пользования».

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Материалы исследований отражены в 11 научных работах, из них 3 в рецензируемых изданиях, 2 – в других изданиях и 4 в материалах конференций (тезисы), 1 патент на изобретение, 1 программа для ЭВМ.

Основные положения диссертации представлены на конференциях различного уровня: 16th Medical Biodefense Conference (г. Мюнхен, 28-31 октября 2018 г.), II Региональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы медицинской микробиологии на современном этапе» (г. Ростов-на-Дону, 22 декабря 2018 г.), XII Ежегодном Всероссийском интернет-конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (7-9 сентября 2020 г.), XI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии,

микробиологии и гигиены» (г. Ростов-на-Дону, 21–22 октября 2020 г.), Межучрежденческих онлайн конференциях «Совершенствование молекулярно-генетических методов индикации и идентификации возбудителей природно-очаговых и зоонозных инфекций, актуальных для юга европейской части России» (30 марта 2021г., 21 февраля 2023 г.), Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на Юге России. Ермолевские чтения» (г. Ростов-на-Дону, 9-10 сентября 2021 г.), Международном симпозиуме «Yersinia 14» (г. Санкт-Петербург, 26-28 сентября 2022 г.), XV Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (г. Москва, 27-29 февраля 2023 г.).

Перечень работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Кузнецова, Д.А. Сидерофоры бактерий: структура, функции и роль в патогенезе инфекций / Д.А. Кузнецова, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. - № 3. – С. 14-22.
2. Кузнецова, Д.А. Роль сидерофора иерсиниахелина в физиологии *Yersinia pestis* / Д.А. Кузнецова, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. - № 4. – С. 75-81.
3. Кузнецова, Д.А. Анализ генетических детерминантов сидерофора иерсиниахелина иерсиний / Д.А. Кузнецова, А.С. Водопьянов, А.Л. Трухачев, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2024. - № 3. – С. 126-132.
4. Кузнецова, Д.А. Использование структурного разнообразия генов биосинтеза сидерофоров для внутри и межвидовой дифференциации патогенных иерсиний / Д.А. Кузнецова, А.Л., Трухачев, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова // Санитарный врач. - 2021.- №8.- С.50-56.
5. Кузнецова, Д.А. Клонирование и экспрессия генов биосинтеза сидерофора иерсиниахелина *Yersinia pestis* в клетках *Escherichia coli* / Д.А. Кузнецова, О.Н. Подладчикова // Бактериология. – 2018. – Т. 3. - № 1. – С. 36–44.

6. Кузнецова, Д.А. Функциональные свойства сидерофора иерсиниахелина возбудителя чумы / Д.А. Кузнецова, В.А. Рыкова, И.В. Морозова, О.Н. Подладчикова // Сборник трудов XII Ежегодного Всероссийского интернет-конгресса по инфекционным болезням с международным участием. Под ред. В.И. Покровского, 7-9 сентября 2020 г., г. Москва. - Москва, 2020. - С. 115.

7. Кузнецова, Д.А. Множественные функции бактериальных сидерофоров / Д.А. Кузнецова, О.Н. Подладчикова // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены, 21–22 октября 2020 г., г. Ростов-на-Дону. – Ростов-на-Дону, 2020. - С. 355-358.

8. Kuznetsova, D.A. The analysis of the siderophore yersiniachelin genetic determinants in *Yersinia* / D.A. Kuznetsova, A.S. Vodopyanov, A.L. Trukhachev, V.A. Rykova, O. N. Podladchikova // Proceedings of International Symposium «Yersinia 14», 26-28 сентября 2022 г., г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2022. - Р. 85.

9. Podladchikova, O.N. Multiple siderophores of the plague agent / O.N. Podladchikova, D.A. Kuznetsova, V.A. Rykova, I.V. Morozova, I.A. Ivanova // Proceedings of International Symposium «Yersinia 14», 26-28 сентября 2022 г., г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2022. - Р. 86.

10. Программа для ЭВМ № 2022680676 Российская Федерация. Siderophore Analyzer – программа для выявления генов, отвечающих за синтез сидерофоров, в полногеномных нуклеотидных последовательностях энтеробактерий / Д.А. Кузнецова, А.С. Водопьянов, О.Н. Подладчикова, В.А. Рыкова, А.Л. Трухачев. Правообладатель: ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU). - № 2022664662: заявл. 03.08.2022; опубл. 03.11.2022, Бюл. № 11. – 1с.

11. Патент № 2670949 Российская Федерация, СПК C12N 15/74, C07K 14/24. Рекомбинантная плазмида, экспрессирующая клонированные гены биосинтеза сидерофора иерсиниахелина возбудителя чумы, способ ее получения и штамм *Yersinia pestis* – суперпродуцент иерсиниахелина: № 2017131017: заявл.

01.09.2017: опубл. 25.10.2018 / Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Кузнецова Д.А.;
заявитель: ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU), Бюл. № 30. – 2с.

Диссертация Кузнецовой Д.А. «Роль сидерофора иерсиниахелина в физиологии возбудителя чумы» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 - Микробиология (медицинские науки).

Заключение принято на заседании Ученого совета. Присутствовало на заседании 59 человек. Результаты голосования: «за» - 15 чел. (из 15 присутствующих членов Ученого совета), «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол № 11 от 18.10.2024 г.

Врио заместителя директора по научной и экспериментальной работе
Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону
ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный
институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека, кандидат биологических
наук  Виктория Владиславовна Агафонова

Ученый секретарь Федерального казенного учреждения здравоохранения
«Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в
сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (344002, г. Ростов-на-
Дону, ул. М. Горького, 117/40, 8 (863) 240-27-03, plague@aaanet.ru), кандидат
биологических наук  Марина Владимировна Полеева

