

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора (03.00.07 - микробиология), заведующего кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Харсеевой Галины Георгиевны на диссертационную работу Кузнецовой Дарьи Александровны «Роль сидерофора нерсиниахелина в физиологии возбудителя чумы», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 - микробиология (медицинские науки).

### Актуальность темы исследования

Сидерофоры синтезируются множеством бактерий, дрожжей, растений и грибов для хелатирования трехвалентного железа Fe (III). Многочисленные исследования ученых всего мира позволяют утверждать, что железо является универсальным фактором роста микроорганизмов, потребности в железе у всех микроорганизмов разные и зависят от их таксономической принадлежности, однако препятствием для его использования является низкая доступность ионов железа в окружающей среде. Аналогичная ситуация имеет место и в организме млекопитающих, где железо находится в комплексе с железосвязывающими белками и недоступно для микроорганизмов. Успешная колонизация патогенами организма млекопитающих и способность вызывать инфекционный процесс во многом зависят от их способности ассимилировать железо. В связи с этим в ходе эволюции бактерии выработали разные способы получения железа в железодефицитных условиях, в том числе, использование низкомолекулярных хелаторов – сидерофоров.

Активное изучение сидерофоров началось в 90-х годах XX века. Установлено, что они являются важными факторами вирулентности патогенных бактерий и вносят свой вклад в патогенез инфекций. Многие патогенные микроорганизмы обладают способностью синтезировать несколько различных сидерофоров. В некоторых исследованиях описана прямая зависимость между количеством синтезируемых патогеном сидерофоров и тяжестью протекания инфекционного процесса.

До недавнего времени считалось, что возбудитель чумы способен синтезировать только один фенолятный сидерофор иерсиниабактин. Однако в диссертационной работе Кузнецовой Дарьи Александровны представлены убедительные доказательства того, что *Y. pestis* синтезирует еще один гидроксаматный сидерофор иерсиниахелин. До настоящего исследования не было известно, является ли он специфичным для возбудителя чумы и какую функцию выполняет. Это обстоятельство подчеркивает актуальность и перспективность представленной диссертационной работы.

**Новизна исследования, полученных результатов,  
выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационная работа Кузнецовой Дарьи Александровны посвящена изучению нового, специфичного для двух видов патогенных иерсиний, *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, сидерофора иерсиниахелина. Впервые автором проведен глубокий биоинформационный анализ генетического локуса, ответственного за синтез и транспорт этого сидерофора, что создало основу для разработки нового способа внутривидовой дифференциации *Y. pseudotuberculosis*. С этой целью автором предложены праймеры, которые возможно использовать как *in vitro*, так и *in silico* для совершенствования методов генотипирования различных штаммов возбудителя псевдотуберкулеза по длине ампликона (292-257-239-204 п.н.).

В рамках настоящего исследования диссертантом впервые проведен анализ функциональных свойств нового сидерофора. Показано, что при температуре 37°C иерсиниахелин остается внутри бактериальной клетки и демонстрирует антиоксидантную активность. В то время как при 26°C он выделяется во внешнюю среду и способствует усвоению железа бактериями. Также у иерсиниахелина обнаружено ранее не описанное у сидерофоров свойство стимулировать проницаемость кровеносных сосудов и образовывать геморрагии.

**Степень достоверности и обоснованности научных положений,  
выводов и рекомендаций**

Представленные в диссертационной работе Кузнецовой Дарьи Александровны научные положения обоснованы и согласуются с известными концепциями в данной области исследований. Высокая степень достоверности полученных результатов,

выводов и рекомендаций обусловлена использованием адекватных современных бактериологических, молекулярно-биологических, биохимических и биоинформационных методов. Цель, заключающаяся в изучении специфичности и роли сидерофора иерсиниахелина в физиологии возбудителя чумы, достигнута. Задачи, поставленные автором адекватны. Два положения, выносимые на защиту, выполнены в полном объеме. Результаты исследования и их обсуждение описаны в понятной форме с использованием иллюстрированного материала, который позволил представить полученные данные в доступном для понимания виде.

### **Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы**

Теоретическая значимость диссертационного исследования заключается в получении автором новых экспериментальных данных, представляющих фундаментальную основу для дальнейшего изучения роли иерсиниахелина в патогенезе чумы.

Исследование обладает несомненной практической ценностью и вносит значимый вклад в развитие соответствующей области знаний. Перспективы дальнейших исследований в этой области выглядят многообещающими.

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 могут быть использованы для изучения функциональных свойств иерсиниахелина.

Сконструированная плазида pSC-A-5EV, содержащая гены биосинтеза иерсиниахелина, может быть использована для получения чистого препарата этого сидерофора из гетерологичных рекомбинантных штаммов. Наличие препаративных количеств и расшифровка структуры иерсиниахелина открывают перспективы создания конъюгатов этого сидерофора с различными антибиотиками.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы подтверждены патентом на изобретение и свидетельством о государственной регистрации программы для ЭВМ. Материалы диссертации используются в педагогическом процессе в отделе

профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

### **Апробация результатов исследования**

Диссертация апробирована на заседании ученого совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 11 от 18.10.2024 г.). Материалы исследований отражены в 11 научных работах: из них 3 – в рецензируемых изданиях, 2 – в других изданиях, 4 – в материалах конференций (тезисы), 1 патент на изобретение, 1 программа для ЭВМ. Основные положения диссертации представлены на конференциях различного уровня.

### **Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации**

Диссертационная работа Кузнецовой Дарьи Александровны изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и приложений.

В разделе «Обзор литературы» проанализированы имеющиеся публикации о сидерофорах. Приводится подробное описание их структуры, функций и роли в патогенезе различных инфекций. Также в обзоре приведены данные о возможности практического применения сидерофоров в медицине.

Раздел «Результаты собственных исследований» состоит из двух глав, одна из которых посвящена анализу генетических детерминантов иерсиниахелина, а другая – изучению его функциональных свойств и роли в физиологии возбудителя чумы.

Во второй главе в результате проведенного исследования показано, что генетические детерминанты, кодирующие биосинтез и транспорт иерсиниахелина, выявляются абсолютно во всех проанализированных геномах *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Сравнительный анализ с помощью программы BLAST, а также авторского скрипта, нуклеотидной последовательности отдельных генов *usi* локуса в разных штаммах возбудителей чумы и псевдотуберкулеза, показал, что все гены этого локуса имеют высокую степень гомологии (98-99%). Это свидетельствует об эволюционной стабильности генов, кодирующих специфичный для *Y. pestis* и *Y.*

*pseudotuberculosis* сидерофор иерсиниахелин.

Интересные результаты получены при сравнении *usu*-терминатора штамма *Y. pestis* CO92 с аналогичной областью других штаммов иерсиний. Показано, что структура *usu*-терминатора идентична у всех исследованных штаммов *Y. pestis*, а у разных штаммов *Y. pseudotuberculosis* она содержит tandemные повторы нуклеотидов (VNTR – *variablenumbertandemrepeats*), различающиеся по количеству копий. Эти VNTR-маркеры, выявленные в структуре *usu*-терминатора, автор предлагает использовать для внутривидовой дифференциации *Y. pseudotuberculosis* с помощью ПЦР *in vitro* и *in silico*. Для оценки влияния VNTR в структуре *usu*-терминатора на экспрессию иерсиниахелина опероны биосинтеза этого сидерофора, различающиеся по величине терминаторной области, были клонированы в клетках кишечной палочки.

В третьей главе изложен процесс изучения функциональных свойств иерсиниахелина как на модели кишечной палочки, так и чумного микроба. Для этого диссертант использовала рекомбинантную плазмиду, содержащую гены биосинтеза этого сидерофора и обеспечивающую его экспрессию.

На основании проведенного исследования сформулировано 5 выводов, которые резюмируют полученные результаты и полностью соответствуют поставленным задачам. Практические рекомендации, предложенные автором, представляют ценность как для дальнейших фундаментальных исследований сидерофора, так и для его применения в медицине.

Список литературы содержит 210 источников, из которых 12 – отечественных и 198 – зарубежных. Диссертация иллюстрирована 20 рисунками и 7 таблицами. Структура и содержание диссертации, научные положения, полученные результаты, выводы и рекомендации в необходимом объеме представлены в автореферате и соответствуют тексту диссертации. Оформление диссертации и автореферата полностью соответствуют требованиям ВАК РФ.

#### **Соответствие специальности**

По тематике, методам исследования, научным положениям и выводам диссертационная работа Кузнецовой Дарьи Александровны соответствует паспорту специальности научных работников 1.5.11. – микробиология (медицинские науки):

пункт 5 – «Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов», пункт 11 – «Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ», пункт 12 – «Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности».

Все материалы, включенные в диссертацию, объединены основной идеей исследования, аргументированы, логически взаимосвязаны, изложены ясно и последовательно. В целом, работа не вызывает принципиальных замечаний, но в процессе ознакомления с диссертацией возникли вопросы:

1. В опытах с участием лабораторных животных использован штамм *Y. pestis* EV. Чем обоснован выбор вакцинного штамма для изучения роли иерсиниахелина в патогенезе инфекции?

2. Почему в ходе экспериментов по изучению функциональных свойств иерсиниахелина не использовались вирулентные штаммы возбудителя чумы?

### **Заключение**

Кандидатская диссертация Кузнецовой Дарьи Александровны на тему «Роль сидерофора иерсиниахелина в физиологии возбудителя чумы», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология, является законченным научным трудом, в котором решена важная научная проблема – выявление и изучение ранее неизвестного сидерофора возбудителя чумы *Y. pestis*, определение его специфичности, функциональной активности и участия в патогенезе чумы. Диссертационная работа содержит новые научные результаты, обоснованные выводы, обладает внутренним единством и имеет важное практическое значение.

По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Кузнецовой Дарьи Александровны отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного Постановлениями Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539,

от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. № 1786, от 25.01.2024 г. № 62, от 16.10.2024 г. № 1382 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Кузнецова Дарья Александровна, заслуживает присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология (медицинские науки).

**Официальный оппонент:**

заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 344022, Российская Федерация, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, здание 38, строение 11

Телефон: +7 (863) 250-41-90, harseeva\_gg@rostgmu.ru

доктор медицинских наук, профессор *Г. Харсеева* Галина Георгиевна Харсеева  
« 16 » декабря 20 25 г.

Подпись Харсеевой Галины Георгиевны заверяю:

Ученый секретарь ученого совета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 344022, Российская Федерация, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29

Телефон: +7 (863) 305-89-00, okt@rostgmu.ru

доктор медицинских наук, профессор  
Сапронова

« 16 » декабря 20 25 г.



Наталия Германовна