

## ОТЗЫВ

научного руководителя на диссертационную работу Плеханова Никиты Александровича «Анализ структуры и экспрессии генов факторов адаптации у генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор», представляемой на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Диссертационная работа Плеханова Никиты Александровича выполнена в лаборатории патогенных вибрионов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в соответствии с плановой тематикой НИР.

Актуальность исследования обусловлена тем, что в связи с интенсивным и широким распространением холеры на эндемичной территории, вызванной генетически измененными штаммами *V. cholerae* биовара Эль Тор с повышенной вирулентностью, и возможностью заноса инфекции в любую страну мира прогноз по холере в мире, а также в Российской Федерации, остается неблагоприятным. В настоящее время молекулярно-генетические свойства штаммов геновариантов, циркулирующих на эндемичной территории и завезенных в различные страны, изучены достаточно детально. Установлено, что в современный период глобальное распространение получили «гипервирулентные» штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор с высоким эпидемическим потенциалом и повышенной устойчивостью к антибиотикам. Одной из генетических отличий данных изолятов от ранее появившихся штаммов геновариантов является наличие обширной делеции в острове пандемичности VSP-II. Однако не менее важным является изучение экологии штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор. При анализе типичных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, вызвавших текущую, 7-ую, пандемию холеры, было показано, что данные вибрионы хорошо приспособлены к выживанию во внешней среде. В тоже время механизмы адаптации штаммов геновариантов к действию различных повреждающих факторов внешней среды, их влиянию на структуру и экспрессию генов, практически не исследованы. Возможно, более детальное изучение процессов адаптации штаммов геновариантов к действию различных неблагоприятных факторов внешней среды позволит выявить причины их широкого распространения в современный период.

В связи с вышеизложенным, диссертационная работа Н.А. Плеханова, посвященная исследованию структуры и экспрессии генов, кодирующих факторы адаптации к неблагоприятным воздействиям окружающей среды, в штаммах геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор,

завезенных из эндемичной территории в Российскую Федерацию в разные годы, является актуальной.

Диссертационная работа проведена на большой выборке штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, завезенных в Россию с 1993 по 2012 годы и вызвавших как вспышки, так и единичные случаи холеры. При этом исследованные штаммы отличались по структуре острова пандемичности VSP-II, играющего важную роль в адаптации возбудителя к неблагоприятным факторам. Штаммы геновариантов, занесенные в 1993-2001 гг. содержали, как и типичные изоляты, интактный VSP-II. Среди данной группы штаммов один изолят (P17644) имел VSP-II с небольшой делецией. В тоже время штаммы геновариантов, изолированные в современный период (2004-2012 гг.) и получившие глобальное распространение в мире, содержали VSP-II с обширной делецией. Структура острова пандемичности взятых в работу штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор была изучена ранее (Агафонов, 2014).

В первой главе собственных исследований проведено сравнительное изучение структуры 26 генов, участвующих в адаптации возбудителя во внешней среде и макроорганизме, у семи модельных штаммов геновариантов, завезенных в РФ в 1993-2012 гг., нуклеотидные последовательности полных геномов которых представлены в GenBank. В результате во всех штаммах выявлено наличие идентичных референс-штамму *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор нуклеотидных последовательностей глобального регулятора стрессового ответа (*rpoS*), ключевых регуляторов системы Quorum-Sensing (*hapR*, *luxO*), а также структурных генов необходимых для формирования биопленки (обеспечивающих подвижность, регуляцию архитектуры биопленки, продукцию экзополисахарида). Однако при анализе 17 генов *msh* оперона, кодирующего биосинтез маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии (MSHA), установлено, что в штаммах геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, изолированных с 1997 года, в последовательности генов, участвующих в сборке и секреции MSHA пилей, присутствуют SNPs которые, могут служить в качестве генетической метки изолятов, появившихся после 1997 года.

При последующем сравнительном изучении продукции экзополисахарида, MSHA пилей, способности к формированию биопленки у 18 штаммов геновариантов показано, что исследуемые штаммы геновариантов, имеющие разную структуру VSP-II, не отличались между собой и от типичных изолятов по продукции MSHA пилей и по способности формировать биопленку.

Следующий раздел работы посвящен изучению влияния неблагоприятных факторов внешней среды на выживаемость, а также экспрессию генов и структуру генома штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор. В результате установлено, что штаммы геновариантов, завезенные в Российскую Федерацию в 1993-2001 гг. и имеющие интактный (или с небольшой делецией) остров

пандемичности VSP-II, отличаются большей устойчивостью к повышенной и пониженной температуре, а также лучшей сопротивляемостью к оксидативному и осмотическому стрессам. В результате адаптации к повышенной температуре (42 °С) в клетках геновариантов увеличивается биосинтез белков-поринов внешней мембраны OmpU/OmpT, а при ее понижении (5 °С) и после действия осмотического стресса (3 моль NaCl) – экзополисахарида. Так же выявлено, что после действия 20 ммоль перекиси водорода (оксидативный стресс) некоторые штаммы геновариантов могут утрачивать остров пандемичности VSP-I или профаг RS1.

В связи с циркуляцией на эндемичной территории штаммов геновариантов *V. cholerae* с разной структурой генома и разным эпидемическим потенциалом заключительная экспериментальная глава диссертации посвящена разработке мультиплексной ПЦР, позволяющей одновременно идентифицировать штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор и дифференцировать их на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II на штаммы с высоким и низким эпидемическим потенциалом. Принадлежность анализируемого штамма *V. cholerae* к O1 или O139 серогруппе устанавливаются на основе выявления соответственно участков генов *rfbO* и *rfbR*, наличие фрагмента гена *ctxA* указывает на токсигенность штамма. Ген *rstC* из профага RS1 был выбран в качестве метки при определении биовара штаммов O1 серогруппы. Геноварианты выявляли по присутствию классического аллеля гена *ctxB* (*ctxB<sup>Class</sup>*) в токсигенных штаммах *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. Дифференциацию геновариантов по эпидемическому потенциалу проводили на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II (интактный или с обширной делецией) по двум генам – *vc0514* и *vc0502*, расположенных соответственно в краевой и центральной части VSP-II. У штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, имеющих обширную делецию в VSP-II и высокий эпидемический потенциал, выявляется только фрагмент гена *vc0514*. На разработанную ПЦР получен патент на изобретение.

Практическая значимость работы состояла в депонировании в Государственной коллекции изогенных штаммов геновариантов *V. cholerae* M1275 с интактным и делетированным островом пандемичности VSP-I, которые могут быть использованы для проведения научно-исследовательской работы по изучению влияния данного мобильного генетического элемента на выживаемость штаммов возбудителя холеры. Нуклеотидные последовательности полных геномов указанных штаммов депонированы в GenBank (коды доступа LRAF00000000, LLAG00000000). Разработаны, одобрены Ученым советом (протокол №5 от 24.06.2014 г.) и утверждены директором института методические рекомендации «Способ идентификации токсигенных штаммов геновариантов возбудителя холеры Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу». Полученные новые сведения о выживаемости штаммов геновариантов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор после

действия неблагоприятных факторов внешней среды используются при чтении лекций «Микробиология и генетика возбудителя холеры» на курсах первичной специализации по особо опасным инфекциям при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Работа выполнена с привлечением как классических методов микробиологии, так современных молекулярно-генетических (ПЦР, секвенирование).

На основании вышеизложенного считаю, что научная новизна и практическая значимость работы вполне очевидна. Основное содержание диссертации полностью отражено в автореферате и 10 публикациях, из которых 5 статей опубликованы в изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК и рекомендованных для публикации результатов диссертации на соискание искомой степени. Все положения, выносимые на защиту, доказаны. Результаты исследования представлены на российских и международных конференциях и получили одобрение ведущих специалистов.

Никита Александрович является перспективным молодым ученым, способным к выполнению как фундаментальных, так и прикладных исследований.

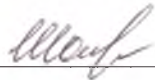
Считаю, что диссертационная работа Плеханова Н.А. «Анализ структуры и экспрессии генов факторов адаптации у генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор» представляет собой законченное научное исследование, выполненное лично соискателем на современном методическом уровне, которое полностью соответствует «Положению о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842. Диссертация может быть представлена к защите по специальности 03.02.03 – микробиология.

Ведущий научный сотрудник отдела микробиологии  
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора,  
доктор биологических наук

  
/С.П. Заднова/

Подпись С.П. Задновой заверяю  
Начальник отдела кадров  
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора



  
/Е.Ф. Шамшурина/

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46, тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12, e-mail: rusrapi@microbe.ru.