

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 208.078.02 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО КАЗЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ
ИНСТИТУТ «МИКРОБ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ
ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК
аттестационное дело N _____**

решение диссертационного совета от 24 мая 2017 года N 8

**О присуждении Плеханову Никите Александровичу, гр. России,
ученой степени кандидата биологических наук.**

Диссертация «Анализ структуры и экспрессии генов факторов адаптации у генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 23 марта 2017 г., протокол N 3 диссертационным советом Д 208.078.02 на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46. Создан Приказом Минобрнауки России № 903/нк от 6 августа 2015 г.

Соискатель Плеханов Никита Александрович 1991 года рождения, В 2013 году соискатель окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Министерства образования и науки Российской Федерации.

Соискатель освоил программу подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, год окончания обучения 2016.

Работает младшим научным сотрудником в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертация выполнена в лаборатории патогенных вибрионов в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский

противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель - доктор биологических наук Заднова Светлана Петровна, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, лаборатория патогенных вибрионов, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Викторов Дмитрий Викторович, доктор биологических наук, доцент, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, управление института, заместитель директора по научно-экспериментальной работе;

Шелудько Андрей Вячеславович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук, лаборатория генетики микроорганизмов, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Иркутск, в своем положительном заключении, подписанном Урбанович Людмилой Яковлевной, доктором медицинских наук, лаборатория холеры, старший научный сотрудник и Мироновой Лилией Валерьевной, кандидатом медицинских наук, лаборатория холеры, заведующая лабораторией, указала, что тема диссертационной работы, несомненно, актуальна, результаты исследования отличаются новизной, внедрены в практику; положения, выносимые на защиту, выводы и заключение диссертации теоретически обоснованы, отражают результаты проделанной работы и соответствуют поставленным целям и задачам. Положительно оценивая выполненное Н.А. Плехановым диссертационное исследование в целом, при рассмотрении материалов работы возникли дискуссионные вопросы для обсуждения:

- Насколько корректно в работе (задача 2, главы 3,4) было вести речь об оценке экспрессии генов, а не фенотипических проявлениях адаптации микроорганизма или косвенной оценке экспрессии группы генов факторов адаптации на основании анализа

фенотипических признаков, т.к. экспрессия отдельных генов оценивается по представленности мРНК, а фенотипическое проявление признака является результатом функционирования сложного комплекса генных сетей (экспрессирующихся регуляторных и структурных генов, белковых продуктов и метаболитов) в определенных условиях среды?

- Чем, по мнению автора, можно объяснить вытеснение геновариантов *V. cholerae* O1 E1 Tor с интактной областью VSP-II или с короткой делецией указанного элемента, характеризующихся повышенной устойчивостью к солевому и оксидативному стрессу, вариантами, несущими протяженную делецию, для которых по полученным диссертантом экспериментальным данным оказалась характерна более низкая толерантность к повышенным концентрациям солей и перекиси водорода в среде?

Работа не лишена отдельных опечаток.

В целом, по содержанию и значимости, актуальности и новизне поставленных задач, методическому подходу к их разрешению, научно-практическому значению результатов и их достоверности работа соответствует критериям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», а ее автор Н.А. Плеханов заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Соискатель имеет 9 опубликованных работ, 1 патент на изобретение, в том числе по теме диссертации 9 работ и 1 патент на изобретение, опубликованных в рецензируемых научных изданиях 5 работ.

Авторский вклад составляет 60%, объем научных изданий 2,3 п.л.

1. **Плеханов Н.А.** Конструирование мультиплексной ПЦР для идентификации токсигенных штаммов геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу / **Н.А. Плеханов**, С.П. Заднова, Д.А. Агафонов, Н.И. Смирнова // Биотехнология. – 2015. – №2. – С. 82-90. (журнал из Перечня ВАК)
2. Заднова С.П. Влияние осмотического и оксидативного стрессов на штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор / С.П. Заднова, **Н.А. Плеханов**, И.М. Крепостнова, П.С. Ерохин, Н.И. Смирнова // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2015. – №6. – С. 55-62. (журнал из Перечня ВАК)
3. **Плеханов Н.А.** Структурно-функциональный анализ генов, кодирующих биосинтез маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии у различных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор / **Н.А. Плеханов**, С.П. Заднова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып.4. – С. 75-78. (журнал из Перечня ВАК)

На автореферат поступили отзывы: **Савельев Вилорий Николаевич**, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, заведующий лабораторией диагностики холеры и других кишечных инфекций. Положительный, без замечаний. **Монахова Елена Владимировна**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии холеры. Положительный, без замечаний. **Эсауленко Елена Владимировна**, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, заведующая кафедрой инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии. Положительный, без замечаний. **Микеров Анатолий Николаевич**, доктор биологических наук, ГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии. Положительный, без замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оппоненты и ряд специалистов ведущей организации являются ведущими учеными в области микробиологии и генетики патогенных микроорганизмов, в том числе холерных вибрионов, и других микроорганизмов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

– предложена научная гипотеза о лучшей адаптации недавно появившихся штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор к действию различных неблагоприятных факторов внешней среды (температурному, осмотическому, оксидативному стрессам), что, возможно, явилось одной из причин их селективного преимущества и замещения ими типичных изолятов *V. cholerae* биовара Эль Тор, вызвавших начало текущей 7-ой пандемии холеры;

– выявлены механизмы повышенной устойчивости штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор к высокой (42 °С) и низкой (5 °С) температурам, связанные соответственно с увеличением биосинтеза белков-поринов внешней мембраны OmpU/OmpT и экзополисахарида;

– определена структура и уровни экспрессии необходимых для выживания во внешней среде генов у измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, различающихся по эпидемическому потенциалу;

– выявлены стрессовые воздействия, приводящие к реорганизации генома штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, установлен фактор внешней среды (20 ммоль раствор перекиси водорода), обусловивший утрату отдельных мобильных генетических элементов (острова пандемичности VSP-I и профага вирулентности RS1) у геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

– доказаны положения, вносящие вклад в расширение представлений о выживаемости во внешней среде *V. cholerae* биовара Эль Тор с повышенной вирулентностью. Исследование процессов адаптации штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор к воздействию различных неблагоприятных факторов внешней среды дополняет новыми данными имеющиеся сведения об экологии недавно появившихся штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор;

– применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс микробиологических, молекулярно-генетических и биохимических методов исследования;

– в результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей полных геномов доказана идентичность структуры генов адаптации, обеспечивающих подвижность, биосинтез экзополисахарида, поддерживающих архитектуру биопленки, и ряда регуляторных генов (*rpoS*, *hapR*, *luxO*), контролирующих их экспрессию, у типичных штаммов и штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор. В последовательности генов *mshE* и *mshJ*, участвующих в сборке и секреции маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии, выявлены однонуклеотидные замены, которые могут служить в качестве генетической метки геновариантов, появившихся после 1997 года;

– показано, что исследованные штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, различающиеся по генетической организации, не отличаются по способности формировать биопленку *in vitro*;

– разработан способ выявления штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор и определения их эпидемического потенциала (высокий или низкий) на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II. Приоритетность разработки подтверждена получением патента на изобретение №2560280 от 23.09.2014 г. «Способ одновременной идентификации токсигенных штаммов геновариантов возбудителя холеры Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу методом мультиплексной полимеразной цепной реакции»;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

– разработаны и внедрены методические рекомендации «Способ идентификации токсигенных штаммов геновариантов возбудителя холеры Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу» (утверждены директором института в 2014 г.);

– получен штамм геноварианта, лишенный острова пандемичности VSP-I. Изогенные штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор с интактным и делетированным островом пандемичности VSP-I депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб», а нуклеотидные последовательности полных геномов – в международной базе GenBank;

– новые сведения о лучшей адаптации штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор к действию неблагоприятных факторов внешней среды включены в состав лекций «Микробиология и генетика возбудителя холеры» на курсах профессиональной переподготовки по особо опасным инфекциям при РосНИПЧИ «Микроб».

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Используются современные и высокоточные методы исследований, эксперименты проводились на сертифицированном и прошедшем метрологическую проверку оборудовании. Экспериментальные данные получены в повторяющихся экспериментах, показана воспроизводимость результатов в различных условиях. Экспериментальные данные статистически обработаны. Установлено совпадение ряда результатов, полученных автором, с данными других исследователей.

Личный вклад соискателя состоит в его непосредственном участии в обсуждении цели и задач исследования, планировании и проведении экспериментов, получении исходных данных, обработке и интерпретации полученных результатов. Диссертант лично участвовал в апробации результатов исследования, подготовке 10 основных публикаций по выполненной работе, в 5 из которых он является первым автором.

Диссертация Плеханова Н.А. является научно-квалификационной работой, в которой решена важная научно-практическая задача по выявлению и дифференциации по эпидемическому потенциалу недавно появившихся штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор с повышенной вирулентностью, завозимых на территорию Российской Федерации с эндемичных территорий.

Диссертация Н.А. Плеханова является научно-квалификационной работой, в которой решена важная научно-практическая задача по выявлению и дифференциации по эпидемическому потенциалу недавно появившихся штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор с повышенной вирулентностью, завозимых на территорию Российской Федерации с эндемичных территорий. По основному содержанию диссертация соответствует пунктам 9, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 с дополнениями, содержащимися в Постановлении Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335.

На заседании 24 мая 2017 года диссертационный совет принял решение присудить Плеханову Н.А. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 6 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология (биологические науки), участвовавших в заседании, из 29 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 23, против нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель
диссертационного совета

Ученый секретарь
диссертационного совета



Кутырев В.В.

Слудский А.А.

30 мая 2017 г.