

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Сизовой Юлии Владимировны
«Влияние стрессового воздействия на токсинопродукцию и другие свойства холерных
вибрионов O1 серогруппы»
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы.

На международном и национальном уровнях признано, что холера, наряду с рядом других особо опасных инфекций, способна вызывать чрезвычайные ситуации в здравоохранении. Ярчайшим свидетельством этому является эпидемия холеры в 2010-2011 г.г. в Доминиканской Республике и Республике Гаити. Не исключена вероятность образования эпидемических очагов холеры за счет заноса ее из эндемичных территорий. На территории России почти каждый год выявляют заболевших холерой, прибывших из других стран.

К специфическим особенностям *Vibrio cholerae* следует отнести смену его пребывания в инфицированном организме человека на дальнейшее существование в природных биотопах. Смена среды обитания приводит к возникновению новых или измененных биологических свойств, способствующих адаптации *V. cholerae* к измененным условиям существования.

При пребывании *V. cholerae* в вышеназванных экологических нишах он испытывает различные стрессовые воздействия, такие как кислота желудочного сока, желчь, pH среды, снижение парциального давления кислорода, низкая температура, недостаток питания и ряд других. Воздействие стресса может вызывать изменение таких свойств как токсинопродукция, агглютинабельность холерными сыворотками, продукция экзополисахарида, персистентный потенциал. Недостаточная изученность данного вопроса обуславливает актуальность его комплексного исследования.

По моему мнению, именно к таким исследованиям относится диссертационная работа Сизовой Ю.В., посвященная изучению влияния стрессовых воздействий на биологические свойства холерных вибрионов O1 серогруппы.

Работа выполнена в ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора в рамках двух НИР.

Цель диссертации определена ясно и направлена на изучение влияния таких стрессовых воздействий как неблагоприятная температура и pH, кислота, желчь, микроаэрофильные условия, анаэробноз на патогенные, культуральные и персистентные свойства

Восходящий № 5/11-404-30
от 01.03.2018 г.

холерных вибрионов O1 серогруппы различной эпидемической значимости, а также оценку роли стрессоров в патогенезе и персистенции возбудителя холеры.

Задачи, сформулированные для решения поставленной цели, являются четкими, понятными и обеспечивают решение поставленной цели.

Научная новизна и теоретическая значимость представленной для оппонирования работы состоит в:

установлении прямой взаимосвязи воздействия моно- и полистрессоров с ответной реакцией вибрионов, различающихся по эпидемической значимости. При этом в опытах, моделирующих воздействие стрессоров на возбудителя холеры в организме человека, отмечено резкое повышение количества продуцируемого холерогена; в речной воде при низкой температуре и гипоксии, напротив – показатели быстро снижаются;

доказанности положения о том, что фенотипические изменения уровней токсинопродукции, коррелирующие в эксперименте со степенью и видом стрессового воздействия, не сопровождаются утратой профага *CTX ϕ* , несущего гены, ответственные за синтез холерного токсина, а также других значимых участков генома, что подтверждается в полногеномном секвенировании и INDEL-типировании исходных и стрессированных культур;

доказанности положения о том, что холерные вибрионы O1 серогруппы после стрессового воздействия образуют как внутриклеточный, так и внеклеточный полиамин кадаверин, количество которого прямо коррелирует с патогенностью возбудителя холеры. Выявлено, что по мере снижения эпидемической значимости вибрионов отмечается снижение значений суммарной продукции кадаверина в микроаэрофильных условиях – с 445,0 мкг/мл у *ctx+tcp+* и 435,8 мкг/мл у *ctx-tcp+* штаммов до 292,5 мкг/мл у *ctx-tcp-* штаммов. При этом отработан метод определения полиамина кадаверина у холерных вибрионов и получен патент на изобретение «Способ определения кадаверина при моделировании стрессовых ситуаций *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп» RU № 2566558 от 29.09.2015г.;

получении новых данных о роли гипоксии в адаптивном изменении антигенного состава холерных вибрионов O1 серогруппы. При этом доказано, что гипоксия приводит к утрате агглютинабельности у 50-70% штаммов, что может вызывать затруднения при идентификации культур и следует учитывать при проведении мониторинга.

доказанности стрессорной роли низкой температуры и гипоксии на процесс выживания и образования биопленок *V. cholerae* O1, различающихся по эпидемической значимости;

установлении влияния стресса на антилизоцимную активность: у токсигенных штаммов показатели снижались в меньшей степени, чем у нетоксигенных холерных вибрионов O1 серогруппы.

Практическая значимость проведенных исследований подтверждается разработкой и внедрением в практику НИР ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора методических рекомендаций «Методики создания условий стресса для холерных вибрионов при изучении персистентного потенциала возбудителя холеры», а также использованием результатов диссертации при чтении лекций по микробиологии и лабораторной диагностике холеры на курсах дополнительного послевузовского образования.

Диссертационная работа изложена на 143 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану: состоит из введения, обзора литературы (глава 1), собственных исследований, включающих: материалы и методы (глава 2) и 3 глав экспериментальных исследований; списка сокращений; заключения; выводов; приложения и списка литературы. Работа иллюстрирована 21 таблицей, включая 4 размещенных в приложении и 13 рисунками. Список литературы содержит 257 источников, из них 163 зарубежных.

В **введении** автор представил актуальность исследований, сформулировал цель и задачи диссертации, представил научную новизну и теоретическую значимость исследований, изложил научно-практическую ценность работы, а также положения, выносимые на защиту. Во введении представлены данные по апробации результатов исследований, публикациям, утверждению плана диссертационной работы, объеме и структуре диссертации, сведения о личном вкладе автора.

Обзор литературы (Глава 1), состоит из 2 подглав. В первой подглаве Сизовой Ю.В. приведены данные о влиянии различных стрессоров (голодание по источнику железа, углерода и энергии; воздействие низких и повышенных температур; окислительный стресс, возникающий в результате воздействия высоких и низких температуры, высоких концентраций солей; осмотический стресс, обусловленный высоким или низким содержанием соли во внеклеточном пространстве, а также их комбинаций) на жизнедеятельность микроорганизмов. Во второй подглаве автором, исходя из цели диссертации, конкретизированы данные о роли стрессового воздействия в эволюции холерных вибрионов. При этом рассмотрено как данный микроорганизм отвечает на неблагоприятные воздействия при нахождении в двух основных экологических нишах вибрионов – кишечнике человека и водной среде.

Обзор литературы занимает примерно 10 % объема диссертации и позволяет получить достаточно полное представление о современном состоянии изучаемого вопроса. К несомненным достоинствам обзора литературы следует отнести использование данных из «свежих» источников (из 257 наименований только 17 датированы до 2000 года).

В главе 2 «**Материалы и методы**» описаны основные материалы и условия проведения экспериментальных исследований. Используемые методические приемы соответствуют современному методическому уровню, являются широко апробированными, легко воспроизводимыми и надежными. Объем наблюдений, планирование и проведение экспериментов адекватны поставленным задачам, достаточны для доказательного статистического анализа.

Результаты исследований обобщены в 3 главах. В главе 3 представлены результаты изучения влияния стрессового воздействия на продукцию холерного токсина в условиях организма человека и в окружающей водной среде, а также проведен анализ стабильности генома холерных вибрионов O1 серогруппы в условиях стрессового воздействия. В результате проведения экспериментов выявлено, что условия, имитирующие прохождение как типичными, так генетически измененными штаммами холерного вибриона через желудочно-кишечный тракт человека способствуют усиленному повышению продукции экзотоксина, что свидетельствует об активации в условиях макроорганизма экспрессии генов *ctxAB*, кодирующих основной фактор вирулентности – холерный токсин.

Также было установлено, что токсигенные штаммы *V. cholerae* способны персистировать в условиях, имитирующих воду открытых водоемов при температуре 22-24 °С с сохранением продукции холерогена до 9 месяцев, что свидетельствует о сохранении эпидемического потенциала; уменьшение температуры до 10 °С и ниже приводит к уменьшению уровня токсинопродукции, при этом к 5 месяцу наблюдений к ее практически отсутствию. При моделировании условий пребывания холерных вибрионов в речной воде в летнее, осеннее, зимнее время при разных температурах (два месяца при 22 °С; далее два месяца при 10 °С; далее четыре месяца при 4 °С) установлено, что на протяжении 4 летне-осенних месяцев при 22 °С и 10 °С уровень токсинопродукции в среднем в 2-4 раза выше у генетически измененных вариантов, что необходимо учитывать при проведении эпиднадзора за холерой.

При анализе стабильности генома холерных вибрионов O1 серогруппы в условиях стрессового воздействия выявлено, что гены *ctxAB* обнаруживаются в ПЦР до тех пор, пока в популяции исследуемых штаммов сохраняются живые вибрионы. Изменений в популяции клеток вибрионов, выживших после низкотемпературного стресса, связанных с утратой профага *CTXφ*, несущего гены, ответственные за синтез холерного токсина, а

также утратой других значимых участков генома, не выявлено. Это подтверждено в полногеномном секвенировании и INDEL-типировании исходных и стрессированных культур. Высказано предположение о том, что изменение токсинопродукции в стрессовых условиях связано не с реорганизацией генома, а с изменением экспрессии каскада регуляторных генов *ToxR-S*, *ToxT*, регуляция которых находится в непосредственной зависимости от состояния кворум-сенсинга бактериальной культуры *V.cholerae* и управляется малыми РНК, получившими название Qrr1-4.

Глава 4 посвящена изучению влияния гипоксии на антигенные свойства холерных вибрионов, желчи на агглютинабельность холерных вибрионов O1 серогруппы, а также комбинированного стресса на агглютинабельность холерных вибрионов в условиях организма человека. Представлены данные по изменению агглютинабельности холерных вибрионов при культивировании в речной воде в условиях температурного стресса и гипоксии. К основным результатам исследований, изложенным в данной главе можно отнести: в микроаэрофильных условиях, начиная с четвертого дня наблюдения отмечено снижение агглютинабельности холерной O1 сывороткой и серовароспецифическими сыворотками Огава и Инаба. К 11 дню исследования более 70% штаммов *V.cholerae* O1 почти полностью утратили способность агглютинироваться O1 холерной сывороткой и серовароспецифическими сыворотками. В связи с этим высказано предположение о том, что в условиях длительной гипоксии в экотопах, где условия микроэробноза и анаэробноза являются факторами окружающей среды, холерные вибрионы включают механизмы адаптации к действию стрессоров, в частности, путем фенотипической модификации поверхностных структур, синтеза экзополисахарида, что может вызывать определённые затруднения при идентификации культур холерных вибрионов;

показана неизменность агглютинабельных свойств *V.cholerae* как под воздействием желчи, как и комбинированного стрессового воздействия (последовательное воздействие на популяцию микробных клеток кислоты, желчи, щелочи в микроаэрофильных условиях, т.е. имитация условий в желудке и тонком кишечнике человека);

пребывание холерных вибрионов в речной воде в течение 6 дней при 4 °С в микроаэрофильных условиях не вызывает значимых изменений в агглютинабельности холерными сыворотками. При этом выявлено изменение поверхностных структур микробных клеток, начинающихся с SR-диссоциации: SR-вариант стал агглютинироваться РО-сывороткой на два разведения выше, и у 2 штаммов, выделенных от больных людей появилась способность агглютинироваться РО сывороткой до титра.

Глава 5 посвящена исследованиям по изучению влияния стресса на свойства, обуславливающие персистентный потенциал холерных вибрионов в условиях организма человека и в речной среде. В результате проведения исследований было показано:

эпидемически значимые холерные вибрионы и холерные вибрионы, обладающие генами токсинкорегулируемых пилей адгезии, обладают более высоким персистентным потенциалом по сравнению с нетоксигенными неадгезивными штаммами и более устойчивы к таким видам стрессового воздействия, как кислота, низкие и высокие показатели рН и их комбинации;

эпидемически значимые токсигенные холерные вибрионы даже в условиях стерильной речной воды достаточно быстро (в течение 2-3 месяцев) погибают, гибель идет тем быстрее, чем ниже температура. Показатели выживания коррелируют с показателями биопленкообразования. Нетоксигенные (*ctx-tcp+* и *ctx-tcp-*) вибрионы выживают в речной воде и сохраняют биопленки достаточно продолжительное время, что может свидетельствовать об их выраженном антистрессовом и персистентном потенциале;

холерные вибрионы Эль Тор образовывали как внутриклеточный, так и внеклеточный кадаверин в значительном количестве. При этом отмечается снижение значений суммарной продукции кадаверина по мере снижения эпидемической значимости: в микроаэрофильных условиях – на 34,3% у *ctx+tcp+* и 32,9% у *ctx-tcp+*; в анаэробных условиях концентрация кадаверина снижалась на 14,7% и 15,5% соответственно. В микроаэрофильных условиях тонкого кишечника соотношение внутри- и внеклеточного кадаверина практически равно, внеклеточного –1:1,5, в анаэробных условиях толстого кишечника –1:4;

холерные вибрионы Эль Тор обладают способностью к фенотипической его вариабельности в зависимости от температурных и других условий обитания холерных вибрионов. По результатам влияния комбинированного стресса наиболее «стойкими» оказались токсигенные *ctx+tcp+* варианты (снижение антилизоцимной активности всего на 19%), у атоксигенных (*ctx-tcp+* и *ctx-tcp-*), соответственно, на 63,3% и 83,0%, что косвенно свидетельствует о роли этого «малого признака персистенции» в патогенезе холеры.

В **Заключении** диссертации последовательно и аргументировано сформулированы итоги исследований. Автор также делает заключение, что результаты исследования могут быть использованы специалистами-микробиологами, изучающими вопросы персистенции возбудителей инфекционных заболеваний в организме человека и объектах окружающей среды, а также иметь значение при решении ряда вопросов, связанных с совершенствованием эпидемиологического надзора за холерой. **Выводы** соответствуют поставленным задачам и отражают сущность работы.

В материалах **приложения** приведены таблицы экспериментальных данных по

оценке биопленкообразования у холерных вибрионов и их выживаемости в речной воде.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность обеспечивается значительным объемом полученных экспериментальных данных, их соответствием теоретическим положениям, статистической обработкой данных экспериментов. Выводы из проведенных исследований теоретически и экспериментально обоснованы и отражают цель и задачи диссертации.

Диссертация написана четким и ясным языком, с использованием принятой терминологии, оформление диссертации существенных замечаний не вызывает.

Содержание диссертации в достаточной степени отражено в публикациях автора (в том числе в 6 статьях в журналах из перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук), патенте РФ на изобретение, материал доложен на научных конференциях и известен научной общественности, а ее основные положения обстоятельно изложены в автореферате.

Автореферат диссертации, изложенный на 22 страницах, соответствует содержанию и основным итогам диссертации.

По содержанию диссертации имеются следующие **замечания**:

1. Оформление диссертации не в полной мере соответствует требованиям пункта 30 Приказа Минобрнауки № 1093 от 10 ноября 2017 г. «Об утверждении Положения о совете по защите диссертаций...». В частности, в введении отсутствуют такие структурные элементы, как: степень разработанности темы диссертации, методология и методы диссертационного исследования, степень достоверности результатов работы. Следует отметить, что структурный элемент «степень разработанности темы диссертации» присутствует в автореферате. Также не совсем понятно, что автор подразумевает под научной новизной, а что под теоретической значимостью. Непонятно в силу того, что автор объединил эти структурные элементы в одну группу.

2. На мой взгляд, название подглавы 2 литературного обзора «Роль стрессового воздействия в адаптации и эволюции холерных вибрионов» не совсем корректное, так как адаптация является одним из результатов биологической эволюции.

3. Вызывает сомнение необходимость в таблицах 2-5, 7, 10-13, 15 и таблицах 1-4 приложения таких данных исследуемых штаммов холерного вибриона, как дата выделения, место выделения и источник выделения в силу того, что по данным показателям они были охарактеризованы в таблице 1 главы «Материалы и методы».

4. К сожалению, в диссертации некоторые значения параметров проведения экспериментов приведены в фиксированных значениях, без указания допустимых диапазонов,

например, температура – 37 °С. Такую точность обеспечить невозможно, так как средства измерения, использующиеся для контроля, всегда имеют какой-то уровень погрешности.

Необходимо отметить, что сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение

Представленная диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой, в результате проведенных исследований содержится решение научной задачи, имеющей важное значение для расширения знаний о биологии возбудителя холеры, патогенезе заболевания, а также может способствовать решению ряда практических задач при проведении эпиднадзора за этой инфекцией.

Полученные автором результаты достоверны, выводы являются четкими, аргументированными и обоснованными. Работа базируется на достаточном числе исходных данных. Она написана доходчиво, грамотно и аккуратно оформлена. Диссертационная работа «Влияние стрессового воздействия на токсинопродукцию и другие свойства холерных вибрионов О1 серогруппы» отвечает критериям п. 9, 10, 11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Сизова Юлия Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Заведующий отделом экспериментальных фармацевтических форм Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), доктор биологических наук, доцент
Адрес организации

410005, г. Саратов, ул. Университетская, д.46
Тел.: (8452) 26-21-31
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Начальник отдела кадров
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора
«1» марта 2018 г.

Комиссаров Александр
Владимирович

Подпись Комиссарова А.В. заверяю



О.В. Шумигай