

## Отзыв

на автореферат диссертации Сизовой Юлии Владимировны “Влияние стрессового воздействия на токсинопродукцию и другие свойства холерных вибрионов O1 серогруппы”, представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Особенностью текущего периода седьмой пандемии холеры является изменчивость её возбудителя – появление высокопатогенных генетических вариантов вибриона эльтор, содержащих ген классического холерного токсина, обладающих множественной лекарственной устойчивостью и высокой адаптацией во внешней среде. Интерес представляет выяснение механизмов адаптации холерных вибрионов к изменениям условий при чередовании пребывания их в инфицированном макроорганизме с последующим существованием в водной окружающей среде. Смена экологической ниши сопровождается у возбудителя появлением новых или изменением биологических свойств, облегчающих его адаптацию к иным условиям существования. Биологической функцией адаптации микроорганизмов является стресс (Титов В.Н., 2010), общий комплекс неспецифических компенсаторно-приспособительных процессов в ответ на воздействие чрезвычайных раздражителей-стрессоров (Баснакьян И.А., 2003).

Влияние стрессового воздействия и его степени на биологические свойства холерных вибрионов, их фенотип и генотип изучено недостаточно. Не исследовано воздействие кислоты желудочного сока, желчи, рН среды, снижения парциального давления кислорода, низкой температуры на токсинпродукцию, агглютинабельность холерными сыворотками и формирование персистентного потенциала холерного вибриона – продукцию экзолипополисахарида, кадаверина, антилизоцимную активность и др.

С учётом этого тема диссертационной работы Ю.В. Сизовой “Влияние стрессового воздействия на токсинпродукцию и другие свойства холерных вибрионов O1 серогруппы”, цель которой изучить влияние стрессового воздействия на патогенные культуральные и персистентные свойства холерных вибрионов O1 серогруппы разной эпидемической значимости, а также оценить роль отдельных стрессоров в патогенезе и персистенции возбудителя холеры, несомненно актуальна и отвечает требованиям современной науки и практики. В соответствии с целью исследования определены задачи по выяснению разных сторон вопроса.

Для выполнения настоящей работы автором проведён значительный объём экспериментальных исследований с применением микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических (включая ПЦР на наличие генов *ctxAB*, *tcpA*, *vps*; полногеномное секвенирование; INDEL-типирование) и биоинформационный анализ. В работе использовано

24 штамма *V. cholerae* O1, выделенных на территории России, Индии, Ирака от людей и из поверхностных водоёмов в период с 1962 по 2014 гг. Для определения токсинопродукции исходных и подвергнутых стрессу культур применялся метод M. Ivanaga et al. (1986). Количество продуцируемого токсина определялось в GM<sub>1</sub>-ИФА по стандартной методике с соответствующими контролями. Способность к биоплёнкообразованию холерных вибрионов изучалась по методике P.L. Watnick et al. (1999) с измерением оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 570 нм. Продукция кадаверина определялась по методике S. Contacero-Ramirez et al. (2007) в модификации автора (патент, 2015 г.).

На первом этапе работы диссертантом установлено, что музейные токсигенные штаммы в разной степени продуцируют *in vitro* холерный токсин: из 15 – два обладают высокой активностью (10,0 мкг/мл); два – средней (0,31 мкг/мл); остальные – слабопродуцирующие.

В экспериментах, моделирующих условия макроорганизма (воздействие низкого и высокого pH, гипоксии) большинство типичных и генетически изменённых штаммов O1 резко повышает количество продуцируемого холерогена до среднего и высокого уровня, что, видимо, свидетельствует об активации экспрессии в условиях организма генов *ctxAB*, кодирующих основной фактор вирулентности – холерный токсин. При этом отличия в реакции на стресс между типичными и генетически изменёнными вариантами не имеют статистически достоверных различий.

В природной водной экосистеме холерные вибрионы подвергаются воздействию таких факторов, как низкая температура, осмолярность среды, сложность в питании, гипоксия. При моделировании условий пребывания холерного вибриона в стерильной речной воде при 22°C отмечается увеличение или сохранение токсинпродукции у большей части штаммов по крайней мере в течение 14 дней. При этом средние показатели токсинпродукции у генетически изменённых вариантов в 2-8 раз выше, чем у типичных. При понижении температуры до 10°C и ниже уровни токсинпродукции в популяции вибрионов в течение 1-2 месяцев снижаются, вплоть до полного исчезновения признака, несмотря на рост культуры и сохранение генов *ctxAB*. Через три месяца культивирования при низких температурах ни одна из культур роста не дала.

Заслуживает внимание факт наличия профага CTX $\phi$  (несущего гены, ответственные за синтез холерного токсина) в популяции клеток вибрионов, выживших после низкотемпературного стресса, о чём свидетельствуют данные полногеномного секвенирования и INDEL-типирования исходных и подвергнутых стрессу культур. Диссертант предполагает, что изменение токсинпродукции в стрессовых условиях у вибриона 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 культуры *V. cholerae* и

управляется малыми РНК (Писанов Р.В., Симакова Д.И, 2016; Song T. et al., 2008).

Исследование влияния ряда стрессоров на один из диагностических признаков *V. cholerae* – агглютинабельность холерными сыворотками показало, что у холерных вибрионов при персистенции в условиях длительной гипоксии окружающей среды происходит снижение или утрата агглютинабельности холерными сыворотками (у 50-70% штаммов), что вызывает затруднения при идентификации культур и проведении мониторинга. Низкотемпературный стресс в комбинации с гипоксией индуцирует SR-диссоциацию холерных вибрионов и образование “ругозных” форм.

При изучении влияния на процесс биоплёнкообразования стрессоров, которым подвергаются холерные вибрионы в организме человека, диссертантом показано, что на эпидемически значимые штаммы  $ctx^+ tcp^+$  максимальное влияние оказывает комбинированный стресс (влияние кислоты, желчи и щелочной рН), после которого вибрионы образуют наиболее выраженную биоплёнку.

У потенциально эпидемически значимых штаммов ( $ctx^- tcp^+$ ) образование биоплёнки стимулируют все стрессоры, особенно щелочь, желчь и комбинированный стресс. Эта группа штаммов обладает более выраженной адаптивной способностью, чтобы противостоять стрессовым воздействиям среды в кишечнике и выживать в организме вибрионосителя. В качестве примера диссертант приводит вспышку в Каменском районе Ростовской области в 2005 г., вызванную эпидемически значимыми штаммами ( $ctx^- tcp^+$ ) с двумя больными и 32 вибрионосителями.

Нетоксигенные штаммы ( $ctx^- tcp^-$ ) после воздействия стресса (кроме влияния желчи) снижают способность вибрионов к образованию биоплёнки, что, как считает автор, косвенно свидетельствует об отсутствии способности их длительного сохранения в организме человека. Проведённые диссертантом серии продолжительных опытов (9 мес) по выяснению закономерностей персистенции холерных вибрионов разной эпидемической значимости в воде поверхностных водоёмов показали, что эпидемически значимые токсигенные холерные вибрионы в условиях стерильной речной воды быстро (в течение 2-3 месяцев) погибают и тем быстрее, чем ниже температура. Нетоксигенные и потенциально эпидемически значимые штаммы в этих условиях выживают и сохраняют биоплёнку значительное время, что свидетельствует об их персистентном потенциале. В последние годы рассматривается роль полиаминов (Kusano T. et al., 2008; Rhee Y.Y. et al., 2007), группы низкомолекулярных азотсодержащих соединений, образующихся при декарбоксилировании аминокислот (кадаверин из лизина, путресцин – из орнитина и т.д.) и оказывающих влияние на устойчивость микроорганизмов к стрессу за счёт антиоксидантных свойств (Ткаченко А.Г., Федотова М.В., 2007 и др.), а также способности снижать проницаемость

пориновых каналов клеточной стенки путём проникновения в их просвет (Ткаченко А.Г., 2012; De La Vega A.L., Delcour A.H. 1995, 1996).

Диссертантом впервые показано, что холерные вибрионы O1 после стрессового воздействия (резкое изменение газового состава среды обитания) образуют как внутриклеточный, так и внеклеточный полиамин кадаверин, количество которого прямо коррелирует с патогенностью возбудителя холеры. По мере снижения эпидзначимости вибрионов автором отмечено также снижение значений суммарной продукции кадаверина. При этом показано, что в микроаэрофильных условиях тонкого кишечника соотношение внутри и внеклеточного кадаверина 1:1,5, а в анаэробных условиях толстого кишечника преобладает синтез внеклеточного кадаверина в соотношении 1:4.

Разработаны и одобрены решением Учёного совета и утверждены директором ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора (2014г.) методические рекомендации “Методики создания условий стресса для холерных вибрионов при изучении персистентного потенциала возбудителем холеры” (Акты внедрения от 19.05.2017; 22.05.2017 и 24.05.2017 г.). Материалы работы используются при чтении лекций на курсах подготовки специалистов по программе дополнительного профессионального образования и выполнении НИР института.

Положения, выносимые на защиту, и выводы диссертации отражают результаты проведённой работы. Изложенные в ней материалы представлены на конференциях молодых учёных, российских научных конференциях, заседаниях проблемной комиссии “Холера и патогенные для человека вибрионы” и др. Исследования выполнены в рамках двух плановых тем НИР. Опубликовано 18 научных работ, из них 6 – в изданиях, рекомендованных ВАК. Получен патент “Способ определения кадаверина при моделировании стрессовых ситуаций *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп (RU 2566558 от 29.09.2015).

Всё изложенное позволяет заключить, что диссертация Ю.В. Сизовой выполнена на высоком методическом уровне, является завершённой научно-квалификационной работой, в основу которой положен большой материал по исследованию биологических свойств (включая фенотипические свойства, токсинпродукцию, персистентный потенциал и др.) холерных вибрионов разной эпидемической значимости, подвергающихся стрессовым воздействиям в инфицированном организме человека и условиях природной водной экосистемы. Представленная работа вносит существенный вклад в проблему “Холера” и открывает перспективы новых исследований в области микробиологии и экологии холеры в понимании природы адаптационной изменчивости возбудителя. Работа имеет практическое значение для лабораторной диагностики, решения вопросов мониторинга и совершенствования эпиднадзора за холерой.

В целом по характеру постановки проблемы, методическим подходам к её разрешению, новизне и научно-практическому значению результатов исследований представленная работа соответствует требованиям п. 9 “Положения о порядке присуждения учёных степеней”, утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г, а её автор Ю.В. Сизова, безусловно, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Доктор медицинских наук  
старший научный сотрудник лаборатории  
холеры Федерального казённого учреждения  
здравоохранения “Иркутский ордена Трудового  
Красного Знамени научно-исследовательский  
противочумный институт Сибири и Дальнего  
Востока” Федеральной службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и благополучия человека”

12.03.18.

Л.Я. Урбанович

Подпись Урбанович Л.Я. заверяю

Начальник отдела кадров  
и спецчасти того же института



Н.И. Шангареева

664047 Иркутская область, Иркутск, ул. Трилиссера, д. 78;  
телефон +7(3952) 22-01-39, Факс +7(3952) 22-01-40,  
<http://www.irkutsk.ru/chumin>, E-mail: [adm@chumin.irkutsk.ru](mailto:adm@chumin.irkutsk.ru)