

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Макашовой Марины Александровны на тему:
“Анализ взаимодействия *Yersinia pestis* с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы”, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология

Актуальность темы диссертации

Для успешной борьбы с чумой необходимы глубокие знания о природной очаговости инфекции. Несмотря на успехи в изучении молекулярных механизмов патогенеза и иммуногенеза чумы, причины сохранения возбудителя инфекции, *Yersinia pestis*, в течение межэпизоотических периодов и последующей активизации природных очагов инфекции остаются невыясненными.

Диссертационная работа Макашовой М.А., представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, посвящена комплексной характеристике свойств и взаимодействия штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Исследование выполнено с использованием штаммов *Y. pestis* и представителей почвенной микрофауны, выделенных на эпизоотически активной по чуме территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

Актуальность работы Макашовой М.А., в том числе, обусловлена необходимостью определения видового разнообразия амёб и нематод в очагах чумы горного и высокогорного типов на территории РФ и расширения фундаментальных знаний о процессе взаимодействия на молекулярном, организменном и популяционном уровнях, в том числе долговременного, клеток *Y. pestis* и почвенных простейших, а также *Y. pestis* и нематод, выделенных на территории одного биоценоза.

Раздел "актуальность проблемы" дает представление о современном состоянии вопроса и логично подводит читателя к цели и задачам исследования.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертантом вынесено на защиту три положения, которые последовательно обоснованы в рецензируемой рукописи и публикациях по теме диссертации. Пять выводов основаны на продуманном плане работ, сочетании классических микробиологических и современных геномных методов исследований, достаточном объеме фактического материала.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность полученных результатов опирается на статистическую обработку и не противоречит современным научным данным. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, вытекают из результатов проведенных исследований и подтверждены фактическим материалом. В разделе «Заключение» диссертант обобщает и анализирует полученные результаты.

Проведено сравнение питательных потребностей штаммов *Y. pestis* различных филогенетических линий античного биовара и определены генетические основы зависимости роста от лейцина, метионина, цистеина, фенилаланина и треонина.

Впервые при анализе нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов в почве нор грызунов различных участков Горно-Алтайского высокогорного очага чумы показано широкое распространение простейших *A. castellanii* и *D. sphaerocephalum*. Новыми являются данные о длительном сохранении жизнеспособности штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT без питательных веществ при совместном культивировании с *A. castellanii*, а также цикличность изменения концентрации возбудителя чумы в этих условиях.

Автором доказано отсутствие токсичности и влияния штамма *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT на продолжительность жизни почвенных нематод

Panagrolaimus sp. из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы при их совместном культивировании в течение 24 ч.

В блохах *Citellophyllus tesquorum* и *Frontosylla elatoides* с территории Тувинского горного очага чумы обнаружены энтомопаразитические нематоды рода *Rubzovinema*, филогенетически близкие полигостальному виду *R. polyxenica* из Волго-Уральского степного и Горно-Алтайского высокогорного очагов чумы.

Впервые в составе микробиоты паразитарной системы «нематода-блоха» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы выявлены представители α -протеобактерий, γ -протеобактерий и актиномицетов, а именно родов *Cutibacterium*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Wolbachia*.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

В теоретическом плане ценность представляют полученные автором сведения об отличиях в питательных потребностях, дополняющие характеристику и молекулярный портрет штаммов *Y. pestis* различных филогенетических линий античного биовара; расширение знаний о членах почвенного биоценоза Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, условиях персистенции и сообществе организмов, в которых может оказаться возбудитель чумы во время своего жизненного цикла, дополняет имеющиеся представления о паразитарной системе природных очагов данной инфекции; выявленная полигостальность нематод-паразитов блох важна для понимания регуляции интенсивности эпизоотических процессов в природных очагах чумы.

Установление возможности длительного сохранения и размножения в амебах *A. castellanii* штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT, выделенных на тех же участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, и получение данных о взаимодействии этих штаммов с почвенными нематодами составляют основу для выявления природных резервуаров чумы в почвенных биоценозах природных очагов. Сконструированные флуоресцентные штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, содержащие плазмиды pTurboGFP-B и Katushka-2S, могут быть использованы для изучения взаимодействия *Y. pestis* с микро- и макроорганизмами.

На основе полученных результатов: 1) оформлены методические рекомендации «Получение рекомбинантных биолюминесцентных штаммов *Yersinia pestis* и *Escherichia coli*» (учрежденческий уровень внедрения); 2) полученные флуоресцентные штаммы *Y. pestis* KM2083 и KM2084 депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российского противочумного института «Микроб» (федеральный уровень внедрения); 3) 29 нуклеотидных последовательностей, включающих участки рибосомальных генов почвенных амеб и нематоды из Горно-Алтайского высокогорного очага, энтомопаразитических нематод *Rubzovinema* sp. и бактерии *Wolbachia* sp. депонированы в международной базе данных NCBI GenBank (международный уровень внедрения).

К сожалению, научная значимость диссертационной работы подтверждается публикацией полученных результатов только в отечественных научных изданиях.

Личный вклад автора заключается в поиске и анализе литературных данных по теме работы, определении цели и задач исследования, планировании, проведении основного объема исследований, обработке полученных результатов. Работа выполнена в рамках двух плановых тем НИР ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 189 страницах, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы, включающего 287 источников, из них 84 отечественных. Текст иллюстрирован 18 таблицами и 28 рисунками.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность

Во введении четко обозначена актуальность выбранного направления, дана краткая характеристика существующего положения по изучению взаимодействия чумного микроба с почвенной микрофауной; сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая ценность, положения, выносимые на защиту, данные об апробации работы, публикациях и структуре диссертации, свидетельствующие о соответствии требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по этим позициям.

В обзоре литературы (глава I) представлен обширный материал, творчески осмысленный и обобщенный автором. Приведены сведения о генетическом разнообразии и географическом распространении штаммов чумного микроба. Особое внимание уделено характеристике современных представлений о природной очаговости чумы и взаимодействию чумного микроба с представителями почвенных биоценозов. Обзор написан на основании анализа достаточного объема научных публикаций, процитированных логично и грамотно. В целом, содержание «Обзора литературы» полностью вводит читающего в курс решаемых диссертантом задач и свидетельствует об актуальности темы исследования.

Вторая глава посвящена материалам и методам исследования. В работе использовали классические микробиологические, молекулярно-генетические, геномные подходы. Полученные в ходе исследования данные подвергали филогенетическому анализу и статистической обработке. В экспериментах использовали 39 штаммов *Y. pestis*, один штамм *Y. pseudotuberculosis* и один штамм *E. coli*. Биоинформатические исследования проводили с применением современных компьютерных программ.

Описание методологии естественно перетекает в изложение результатов исследования, представленных в главах с третьей по пятую.

Третья глава посвящена сравнительной оценке фенотипических и генетических особенностей штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT из Горно-Алтайского высокогорного очага и штаммов античного биовара из других природных очагов чумы. Особое внимание уделено определению потребностей в факторах роста, что необходимо для подбора оптимальных экспериментальных условий при моделировании взаимодействий организмов. Во второй половине главы приводится описание методики получения штаммов чумного микроба, маркированных коммерческими плазмидами pTurboGFP-B и pKatushka-2S, а также основных характеристик сконструированных штаммов.

Четвертая глава описывает изучение взаимодействия штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с простейшими из почв Горно-Алтайского высокогорного очага. На первом этапе определена систематическая принадлежность простейших из почв нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага, а затем осуществлено моделирование долговременного сохранения флуоресцентного штамма *Y. pestis* 4.ANT с плазмидой pTurboGFP-B и анализ динамики взаимодействия штамма возбудителя чумы и акантамеб. Кроме того было оценено влияние длительного сосуществования *Y. pestis* и акантамеб на сохранение фенотипических, генетических свойств и вирулентности *Y. pestis*.

В пятой главе проведен анализ взаимодействия *Y. pestis* с нематодами. Как и в предыдущей главе, вначале диссертант определил систематическую принадлежность нематод из Горного Алтая и Тувы, а затем проанализировал взаимодействия *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с почвенными нематодами из природного биоценоза Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы.

В главе «Заключение» автор подводит итоги работы, обобщает полученные данные.

Пять выводов, соответствующих поставленным задачам, основаны на представленном экспериментальном материале, являются логическим итогом проделанной работы и не вызывают сомнений в достоверности. Диссертация имеет законченный характер.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации, подтверждения опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Автореферат полностью отражает основные результаты и содержание диссертации. Основные результаты работы отражены в 14 научных работах, в числе которых 4 статьи – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки

Российской Федерации, и один патент на изобретение. Материалы, изложенные в диссертации, представлены и обсуждены на международных, всероссийских и региональных научных конференциях.

Соответствие диссертационного исследования специальности 1.5.11. Микробиология

Объект изучения, поставленные цель и задачи исследования, изучаемые явления, применяемые методы и экспериментальные подходы, результаты, выводы и положения, вносимые на защиту, полностью соответствуют паспорту специальности 1.5.11. Микробиология, в частности - пунктам: 1. Систематика и филогения микроорганизмов, 2. Эволюция микроорганизмов, 3. Биологическое разнообразие микроорганизмов, включая разнообразие типов энергетического обмена и источников углерода, 5. Физиология и метаболизм микроорганизмов в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов, 8. Микробная экология и биогеохимия, 9. Биосферная микробиология, в том числе почвенная микробиология, микробиология водных экосистем, подземной биосферы, горных пород, атмосферы, 11. Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ, 12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности, 13. Симбиотические микробные сообщества, в том числе микробиота человека и животных.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом

Представленная на отзыв диссертация Макашовой Марины Александровны на тему: “Анализ взаимодействия *Yersinia pestis* с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы” на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология имеет несомненную практическую ценность, а автор показала себя способным и профессионально состоявшимся исследователем. Текст диссертационной работы написан грамотно. Рисунки высокого качества, информативны.

Основным достоинством работы является уникальная информация о характеристиках штаммов *Y. pestis* филогенетических линий 0.ANT3, 0.ANT5, 1.ANT, 2.ANT3, 3.ANT2 и 4.ANT из Государственной коллекции возбудителей особо опасных бактериальных инфекций I-II групп патогенности при Российском противочумном институте «Микроб». Несомненный интерес представляют и результаты экспериментов по взаимодействию *Y. pestis* с амебами и нематодами. Было бы интересно продолжить исследования в этом направлении с целью разработки метода моделирования оценки вирулентности штаммов чумного микроба.

Вопросы и замечания по диссертационной работе:

Принципиальных замечаний к работе нет, однако в процессе изучения диссертации возник один вопрос и два комментария:

1) “Цель исследования: Комплексная характеристика свойств и взаимодействие штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы”. Возможно целью исследования было не “взаимодействие штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с почвенной микрофауной ...”, а “комплексная характеристика ... взаимодействия штаммов *Y. pestis* ...”?

2) “ГЛАВА 3 ХАРАКТЕРИСТИКА СВОЙСТВ ШТАММОВ *Y. pestis* АНТИЧНОГО БИОВАРА ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ 4.ANT, **КОНСТРУИРОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ШТАММОВ**”. Конструирование флуоресцентных штаммов было бы уместнее поместить в раздел “Материалы и методы”, тем более, что для их создания использовали коммерческие плазмиды, которые вводили в реципиентные клетки бактерий в соответствии с опубликованными методиками.

3) Есть разница в количестве цитируемых источников списка литературы, указанном в автореферате и представленном в диссертации (288 и 287, соответственно).

Заключение.

Диссертация Макашовой Марины Александровны выполнена на высоком методическом уровне, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи – изучения взаимодействия штаммов *Y. pestis* с почвенной микрофауной природного очага чумы, важной для понимания сохранения возбудителя чумы в течение межэпизоотических периодов, имеющей значение для дальнейшего развития теории природной очаговости и лучшего понимания экологии чумы. В целом, по значимости и актуальности поставленной проблемы, уровню методического подхода к её решению, теоретическому и научно-практическому значению результатов представленная работа соответствует критериям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.23 № 415, от 26.10.2023 № 1768, от 25.01.2024 № 62), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – «микробиология».

Официальный оппонент:

Док. мед. наук, руководитель
лаборатории микробиологии чумы
Федерального бюджетного учреждения
науки «Государственный научный
центр прикладной микробиологии и
биотехнологии»
27.05.2023 г.

<https://orcid.org/0000-0002-1996-8949>

<http://www.researcherid.com/rid/F-4623-2017>

<http://www.scopus.com/inward/authorDetails.url?authorID=6507448575&partnerID=MN8TOARS>

Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская обл., 142279,
Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор).

E-mail: dentovskaya@obolensk.org, тел.: 8-916-425-04-74.

 /Светлана Владимировна
Дентовская/

Подпись Дентовской С.В. заверяю.

Ученый секретарь ФБУН ГНЦПМБ,
док. биол. наук



 /Любовь Васильевна Коломбет