



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение  
высшего образования

«Ростовский государственный  
медицинский университет»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации

(ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России)

344022, г. Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29

Телефоны: (863)250-42-00, 250-40-65 Факс(863)201-43-90

Email: [okt@rostgmu.ru](mailto:okt@rostgmu.ru) <http://www.rostgmu.ru>

ОКПО 01896857 ОГРН 1026103165736

ИНН/КПП 6163032850/616301001

10 НОЯ 2021 № 3929/01.01

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор ФГБОУ ВО «Ростовский  
государственный  
медицинский университет» Министерства  
Здравоохранения Российской Федерации,  
доктор медицинских наук, профессор

С.В. Шлык  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

## ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Пospelовой Юлии Сагитовны «Конъюгативный перенос производной F-плазмиды в клетки штаммов экстраинтестинальной *Escherichia coli*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология в диссертационный совет Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера

### Актуальность темы диссертации

Наращение антибиотикорезистентности среди микроорганизмов является острой проблемой современной микробиологии. Исследованию уровня устойчивости к антимикробным агентам и механизмов ее распространения посвящено большое количество исследований как отечественных, так и зарубежных авторов. Приобретение устойчивости у бактерий происходит в результате мутаций в геноме или путем горизонтального переноса детерминант резистентности. Мутационные изменения в большинстве случаев – редкие явления, а конъюгация (перенос автономной молекулы ДНК из клетки донора в клетку реципиента при их непосредственном физическом контакте), согласно некоторым литературным данным, является настолько универсальным и важным адаптивным механизмом, что бактерии не могут избегать участия в этом процессе. Кроме того, в результате мутационного изменения может сформироваться устойчивость к одному агенту, в то время как в результате конъюгации могут быть переданы гены устойчивости сразу к нескольким веществам. Известно, что устойчивый к ванкомицину *Staphylococcus aureus* произошел от метициллин-резистентного *S. aureus* в результате приобретения плазмиды от

*Enterococcus faecalis* (Gardete, Tomasz, 2014). Это событие представляет собой ключевой пример того, как горизонтальный перенос концентрирует гены устойчивости в геномах, способствуя появлению так называемых «супербактерий», для которых отсутствуют эффективные антибиотики. Таким образом, изучение механизма конъюгации в бактериальных сообществах приобретает новый глобальный смысл.

Важность проведенной работы определяется также тем, что имеющиеся в литературе данные получены в результате изучения коллекционных штаммов различных видов бактерий. В работе Юлии Сагитовны были использованы референтные выборки штаммов, выделенных от пациентов медицинских учреждений, а также птиц, выращиваемых на крупных сельскохозяйственных предприятиях. Представленные данные имеют особую ценность, поскольку отражают особенности процесса конъюгации в гетерогенных популяциях представителей различных патотипов *E. coli*. Актуальным данное исследование также делает тот факт, что в отличие от описанных в литературе экспериментов, проведенных с использованием стандартных поверхностей – полистирола или стекла, часть исследований были проведены на моделях, приближенных к реальным условиям: конъюгация в биопленках, сформированных на поверхности урологического катетера, применяющихся в медицинской практике; конъюгативный перенос в кишечном тракте крыс и перепелов.

В условиях постоянного нарастания антибиотикорезистентности среди микроорганизмов и ограниченного набора действующих антибактериальных веществ предложенная антибактериальная система с конъюгативно-опосредованным механизмом действия вызывает значительный интерес. Отличительной особенностью использованного штамма *E. coli* ZP с геном колицина ColE7, обладающего ДНК-азной активностью, является эндогенный путь воздействия на клетки-мишени. В то время как применяющиеся сегодня штаммы реализуют свою активность через экзогенный синтез антибактериальных молекул, рассмотренный штамм сочетает в себе экзогенную продукцию колицина и возможность конъюгативной доставки гена его синтеза непосредственно внутрь клетки, что позволяет воздействовать, в том числе, и на бактериоциноорезистентные микроорганизмы.

Учитывая вышеизложенное, диссертационная работа Поспеловой Юлии Сагитовны, посвященная изучению важного вопроса современной микробиологии – распространению детерминант устойчивости к антимикробным препаратам в бактериальных популяциях путем горизонтального переноса, а также особенностей межклеточной коммуникации в разных условиях, является актуальной.

### **Связь работы с научными программами**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиала Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН и является частью исследований, проводимых по теме «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды», регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290009-1. Исследования поддержаны грантами VI-RU/16-18-047, РФФИ № 19-44-590014-р\_а, МИГ № С-26/792, УМНИК № 14837ГУ/2019.

### **Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационное исследование Юлии Сагитовны имеет безусловную научную новизну полученных результатов и выводов. Впервые проанализирована связь генетического



профиля культур уропатогенной *E. coli* (гены адгезинов) с уровнем специфической и неспецифической адгезии. Автором показано, что фимбриальные адгезины в большей степени определяли бактериальную адгезию и биопленкообразование, чем афимбриальные. Изучена встречаемость некоторых генов вирулентности, характеризующих группы уропатогенных, диареогенных и патогенных для птиц *E. coli*, среди штаммов, выделенных от сельскохозяйственной птицы. В результате проведенного исследования было показано, что штаммы могут быть носителями генов всех групп одновременно, кроме того, по генетическому профилю они близки к представителям диареогенных эшерихий, что свидетельствует о зоонозном потенциале данной группы *E. coli*.

Впервые при анализе эффективности конъюгативной передачи применен комплексный подход, а именно, конъюгация оценена в зависимости от таких характеристик реципиента как состояние клеток (планктон, биопленка), филогенетическая группа, наличие генетических маркеров вирулентности, бактериоциногенения, лизогения, устойчивость к антибиотикам, а также внешних факторов и условий передачи: взаимного расположения клеток донора и реципиента в биопленке, физико-химических характеристик поверхности, присутствия клеток других видов бактерий или их метаболитов. Показано, что в условиях формирования биопленки передача плазмиды происходит значительно эффективнее, при этом массивность биопленки играет существенную роль в частоте конъюгации, а именно, штаммы, образующие менее массивные биопленки, имели более высокую частоту переноса плазмиды. Из изученных свойств реципиентов положительная связь с частотой конъюгации была определена для уровня устойчивости штаммов к антибиотикам.

Показано, что характеристики материала, к которому происходит адгезия, влияют на формирование биопленки, а именно, гидрофилизация поверхности снижает эффективность биопленкообразования *E. coli* в течение 24 часов. Оценена эффективность применения напыления ионов серебра на поверхность урологического катетера. Отмечено, что на «серебряном» катетере ингибируется не только колонизационная активность, но и межклеточная коммуникация бактерий в биопленке, что выражалось в практически полном отсутствии конъюгативного переноса плазмиды.

На примере трех ассоциаций продемонстрированы взаимоотношения между разными видами микроорганизмов в полимикробных сообществах биопленки. Установлено, что вектор взаимодействий микроорганизмов в ассоциации не вносит значительный вклад в процесс конъюгативного переноса. Конъюгация снижалась при добавлении в среду клеточного компонента любого из описанных видов бактерий.

Доказан конъюгативный перенос гена *colE7* на плазмиде pOX38 в клетки *E. coli in vivo* на моделях крыс и перепелов. Показано, что штамм *E. coli* ЖР, несущий ген синтеза колицина, эффективно заселяет кишечник животных, сохраняется в нем длительное время и обеспечивает передачу плазмиды с высокой частотой. Доказана работа механизма конъюгативно-опосредованной антимикробной активности сконструированной системы в условиях *in vitro* и *in vivo*.

### **Значимость для науки и практики, полученных автором диссертации результатов**

Полученные диссертантом результаты расширяют представление о разнообразии фенотипических и генотипических характеристик *E. coli*. Практическая ценность работы состоит в том, что полученные данные подтверждают эффективность применения напыления ионов серебра на поверхность катетера для снижения бактериальной колонизации, выживаемости и коммуникации клеток. Кроме того, показано, что использование более

гидрофильных материалов для инвазивных медицинских устройств является предпочтительным для снижения риска образования на них бактериальной биопленки.

На основании полученных данных об особенностях конъюгации в клетки *E. coli* в присутствии клеток других бактерий или их метаболитов автором разработан способ оценки эффективности конъюгации в полимикробных сообществах (Патент РФ).

Показана конкурентоспособность генно-модифицированного штамма *E. coli* ŽP при совместном росте с дикими штаммами, в том числе, продуцентами бактериоцинов, что расширяет представления о возможностях и перспективах применения искусственно сконструированных бактериальных систем на практике. Подтвержден перенос плазмиды pOX38 в клетки штаммов АРЕС в условиях *in vitro* и *in vivo*.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Выводы, полученные автором, о влиянии физико-химических характеристик поверхности на биопленкообразование *E. coli* и конъюгативный перенос детерминант устойчивости к антимикробным препаратам могут быть использованы для разработки методических материалов в медицинских учреждениях.

Полученные данные о встречаемости носителей генов диареогенных *E. coli* среди штаммов, циркулирующих на птицефабриках, могут быть использованы в качестве дополнения к существующим методикам эпидемиологического мониторинга состояния сельскохозяйственных животных. Внедрение таких показателей значимо не только для сельского хозяйства и ветеринарии, но также важно и с точки зрения медицины для предотвращения случаев заражения людей диареогенными штаммами *E. coli* животного происхождения.

Штамм *E. coli* ŽP может быть рассмотрен как перспективная база для разработки пробиотического препарата. Альтернативный механизм воздействия на клетки-мишени, включая резистентные формы, позволит сделать препарат более эффективным для профилактики и лечения бактериальных кишечных инфекций животных.

#### **Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений**

Диссертация Поспеловой Ю.С. является законченной научно-квалификационной работой. В ней четко отражены и обоснованы актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость проведенного исследования. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли подтверждение в сделанных выводах, которые отвечают поставленным в исследовании цели и задачам.

Достоверность результатов работы определяется использованием обоснованных, комплексных, современных методических подходов к проведению бактериологических и молекулярно-генетических исследований. В работе использован достаточный объем материала (количество штаммов, повторов экспериментов) и адекватные методы статистического анализа для получения достоверных результатов поставленных задач. Материалы диссертации обсуждены на 9 международных и всероссийских конференциях и конгрессах, а также нашли свое отражение в 24 публикациях, из них 5 работ опубликовано в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus, WoS, это свидетельствует о том, что диссертационная работа подвергалась всестороннему анализу со стороны российских и зарубежных специалистов.



## **Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению**

Работа изложена на 158 страницах машинописного текста, содержит 21 рисунок и 18 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов, двух глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 228 наименований работ, в том числе 26 отечественных и 202 зарубежных авторов.

Диссертация построена по стандартному плану. В главе Введение автор обосновывает актуальность выбранной темы исследования, акцентирует внимание на наиболее значимых аспектах изучаемого вопроса, формулирует цель, задачи диссертационного исследования, основные положения, выносимые на защиту. В главе также отражена новизна, научная и практическая значимость работы, количество публикаций автора.

Глава 1 посвящена обзору литературы, в котором подробно описаны биологические свойства представителей выбранных групп *E. coli*. Автором проанализирован большой объем отечественных и зарубежных исследований по конъюгативному переносу плазмид, описан механизм конъюгативного переноса и его регуляция. В конце главы подводятся итоги анализа литературных источников и делается акцент на недостаточном объеме информации о конъюгативном переносе в природные штаммы.

В Главе 2, посвященной описанию объектов и методов исследования, представлены данные об использовании современных микробиологических и молекулярно-генетических методов, позволяющих получить достоверные результаты на достаточном количестве исследуемых образцов. Использование пакета современных компьютерных программ математической и статистической обработки позволяет автору делать обоснованные выводы по результатам своих исследований.

В главах, в которых представлены результаты собственных исследований, последовательно решаются поставленные задачи, соответствующие цели работы.

Глава 3 посвящена изучению фенотипических и генотипических свойств представителей уропатогенных и патогенных для птиц *E. coli*, представлен большой объем данных по устойчивости штаммов к различным антимикробным веществам, проанализированы связи признаков между собой. Изучена распространенность генов разных групп эшерихий среди штаммов АРЕС, сделан вывод об их зоонозном потенциале.

В Главе 4 представлены данные о влиянии различных биотических (свойства реципиента, присутствие ассоциантов) и абиотических (характер поверхности, взаиморасположение клеток в биопленке) факторов на процесс конъюгации плазмиды рОХ38 в клетки штаммов экстраинтестинальной *E. coli*. Отдельным блоком выделяются эксперименты *in vivo*, проведенные на крысах и перепелах, результаты которых демонстрируют возможность практического применения полученных данных.

В главе Заключение автор анализирует и обсуждает полученные данные с точки зрения современных тенденций, представляет перспективы разработки темы. Выводы логичны и вытекают из результатов исследования, соответствуют поставленным задачам.

**Общие комментарии.** В целом работа Пospelовой Ю.С. корректна. Содержание диссертации, ее оформление, характер изложения материала соответствуют всем установленным критериям. Принципиальных замечаний к работе нет.

### Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации структурирован, содержит логичное изложение наиболее важных результатов работы и список публикаций по теме диссертации. Все разделы автореферата в полной мере отражают основное содержание диссертации.

### Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертации автор опубликовал 24 работы: 6 работ в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданиях для опубликования основных научных результатов диссертации (из них 5 работ – в международных базах Scopus, WoS, Pubmed, 1 – в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК, 1 патент РФ на изобретение), 9 работ опубликованы в журнал базы РИНЦ, 9 работ опубликовано в материалах Всероссийских и международных конференций.

Отзыв на диссертационную работу Поспеловой Ю.С. «Конъюгативный перенос производной F-плазмиды в клетки штаммов экстраинтестинальной *Escherichia coli*», обсужден и утвержден на заседании кафедры микробиологии и вирусологии №1 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России (09 ноября 2021 г., протокол №5).

### Заключение

Таким образом, диссертация Поспеловой Юлии Сагитовны «Конъюгативный перенос производной F-плазмиды в клетки штаммов экстраинтестинальной *Escherichia coli*» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной проблемы, связанной с механизмами адаптации бактерий в окружающей среде и макроорганизме, обусловленными горизонтальной передачей генетической информации в микробных сообществах, полностью отвечает требованиям п.9 «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. № 842 (с изменениями от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Поспелова Юлия Сагитовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.03 – микробиология.

Доктор медицинских наук, профессор,  
03.02.03 – микробиология (медицинские науки),  
заведующий кафедрой микробиологии и  
вирусологии №1

Набока Юлия Лазаревна

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации 344022, Ростовская область г. Ростов-на-Дону пер. Нахичеванский, д. 29, +7 (863) 285-32-13, e-mail:okt@rostgmu.ru, nagu22@mail.ru.

09.11.2021 г.

Подпись д.м.н., профессора Ю.Л. Набока заверяю.  
Ученый секретарь ученого совета  
ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России  
доктор медицинских наук, доцент



Сапронова Наталия Германовна