

УТВЕРЖДАЮ:

Директор «ИЭГМ УрО РАН»,
Д.М.Н., профессор

С.В. Гейн



«15» сентября 2021 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

Диссертация Пospelовой Юлии Сагитовны «Конъюгативный перенос производной F-плазмиды в клетки штаммов экстраинтестинальной *Escherichia coli*» выполнена в лаборатории молекулярной биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

Научный руководитель – Кузнецова Марина Валентиновна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

В 2019 г. Юлия Сагитовна окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет» по направлению «Биология».

В период подготовки диссертации соискатель являлась аспирантом лаборатории молекулярной биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2021 г. «ИЭГМ УрО РАН».

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

1. Актуальность проблемы. Важность изучения переноса генов между клетками микроорганизмов определяется появлением множества лекарственно-устойчивых бактерий, связанным с широким применением антибиотиков в различных сферах человеческой деятельности. Горизонтальная передача генов у микроорганизмов реализуется через такие каналы генетической коммуникации как конъюгация, трансформация и трансдукция. Самым распространенным вариантом изменения генома при горизонтальном переносе у бактерий является конъюгация, когда происходит

однонаправленная передача плазмиды от клетки-донора к клетке-реципиенту при их непосредственном физическом контакте. Конъюгативные F-подобные плазмиды могут нести дополнительные гены, которые придают устойчивость к антибиотикам или бактериоцинам или гены, кодирующие факторы вирулентности, что может быть связано с возрастающими проблемами при лечении инфекционных заболеваний. Несмотря на многолетнюю историю изучения конъюгации, в настоящее время наблюдается возрастающий интерес к горизонтальной передаче генетической информации в микробных сообществах как механизму формирования новых, в том числе мультирезистентных, групп микроорганизмов.

Escherichia coli – основной модельный объект микробиологии. Однако важность изучения данного микроорганизма определяется также его клинической значимостью. F-подобные плазмиды присутствуют как в комменсальных, так и в различных типах кишечных и внекишечных патогенных штаммов *E. coli*. Доказано, что конъюгативный перенос генов возможен не только в природных биотопах, но и в организме человека и животных, где бактерии часто существуют в прикрепленном состоянии в полимикробных сообществах.

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной биотехнологии в соответствии с планом НИР «ИЭГМ 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 «Факторы, влияющие на конъюгационный перенос в популяциях бактерий» («Factors influencing conjugation in natural bacterial strains»), РФФИ № 19-44-590014-р_а «Биопленкообразование *Escherichia coli* как триггер катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей», МИГ № С-26/792 «Разработка новых методов антимикробной защиты в птицеводстве с целью контроля над распространением бактериальной кишечной инфекции», «УМНИК» «Разработка препарата на основе штамма *Escherichia coli* ZP с конъюгативным механизмом пробиотической активности» № 14837ГУ/2019 от 16.12.2019 г.

2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. При выполнении диссертационной работы Поспелова Юлия Сагитовна проявила себя как квалифицированный специалист, способный самостоятельно планировать и проводить научные исследования, критически анализировать полученные результаты. Требования п. 14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018) «О порядке присуждения ученых степеней» выполнены, соискатель лично участвовала в

получении результатов работы, а также в подготовке к публикации и их представлении на научных конференциях.

3. Степень достоверности результатов проведенных исследований.

Проверка первичной документации комиссией, созданной по приказу директора «ИЭГМ УрО РАН» С.В. Гейна №1252/24 от 03.09.2021 г. в составе председателя, заведующего лабораторией физиологии и генетики микроорганизмов д.б.н. Октябрьского О.Н. и членов комиссии н.с. лаборатории биохимии развития микроорганизмов, к.б.н. Полудовой Т.В., с.н.с. лаборатории адаптации микроорганизмов, к.б.н. Нестеровой Л.Ю., с.н.с. лаборатории иммунорегуляции, к.б.н. Масленниковой И.Л. показала, что она полностью соответствует материалам исследований, представлена в полном объеме и признана достоверным материалом, который соответствует выполненной работе. Результаты получены на сертифицированном оборудовании, обработаны с помощью лицензионных программ и современных методов статистического анализа, используемые в исследовании методики корректны. С материалами проведенных исследований и достоверностью полученных результатов, подтвержденных статистической обработкой, были ознакомлены рецензенты работы. Выводы диссертационной работы обоснованы и согласуются с полученными результатами.

4. Новизна и практическая значимость диссертации.

Результаты выполненного исследования расширяют представления о механизмах фенотипической и генотипической изменчивости *E. coli*, дополняют знания по биологическим свойствам и распространенности генетических детерминант патогенности и антибиотикорезистентности штаммов уропатогенной *E. coli* и патогенных для птиц *E. coli*. Впервые оценена связь генетического профиля культур с уровнем специфической и неспецифической адгезии. Выявлено, что фимбриальные адгезины в большей степени определяли бактериальную адгезию и биопленкообразование, чем афимбриальные. Проанализирована встречаемость набора генов вирулентности уропатогенных, диареегенных и патогенных для птиц *E. coli* среди штаммов АРЕС, показано, что культуры имеют высокий зоонозный потенциал и по генетическому профилю наиболее близки к представителям диареегенных эшерихий.

Впервые при анализе эффективности конъюгативной передачи применен комплексный подход, а именно, конъюгация оценена в зависимости от свойств клеток реципиента, а также внешних факторов и условий передачи: состояния бактерий – свободное/прикрепленное, взаимного расположения клеток донора и реципиента в биопленке, физико-

химических характеристик поверхности, присутствия клеток других видов бактерий или их метаболитов. Показано, что способность к приему конъюгативных плазмид широко распространена среди клинических штаммов *E. coli*, при этом, в условиях формирования биопленки передача плазмиды происходит значительно эффективнее. Массивность биопленки играет существенную роль в частоте конъюгации, а именно, штаммы, образующие менее массивные биопленки, имели более высокую частоту переноса плазмиды. Филогенетическая группа реципиентов, продукция бактериоцинов или наличие бактериофага, а также взаиморасположение клеток донора и реципиента не определяли данный параметр, тогда как конъюгативный перенос плазмиды был эффективнее в группе штаммов с множественной устойчивостью. Доказан конъюгативный перенос гена *colE7* в клетки *E. coli* *in vitro* и *in vivo*. Впервые проведены эксперименты по конъюгации с плазмидой рОХ38 в смешанных микробных сообществах в условия *in vitro* (для УРЕС) и *in vivo* (для АРЕС). На примере трех ассоциаций продемонстрированы взаимоотношения между разными видами микроорганизмов в биопленочном сообществе. Установлено, что совместный рост *E. coli* и *K. pneumoniae* значительно не изменял частоту передачи плазмиды внутри биопленки, а клетки *E. faecalis* и *P. aeruginosa* снижали данный показатель.

Результаты выполненного исследования расширяют представления о механизмах фенотипической и генотипической изменчивости *E. coli*, дополняют знания по биологическим свойствам и распространенности генетических детерминант патогенности и антибиотикорезистентности штаммов уропатогенной *E. coli* и патогенных для птиц *E. coli*.

5. Ценность научных работ соискателя. Информация о бактериальной адгезии и колонизационной активности ведущего этиопатогена инфекций мочевыводящих путей на поверхности наиболее востребованных в урологической практике уретральных катетеров может быть полезна в экспериментальной работе, направленной на модификацию поверхности катетеров, с целью предотвращения или ингибирования формирования бактериальных биопленок. Разработанные и предложенные методики определения адгезивной активности и биопленкообразования (зарегистрирован патент RU 2665840 С1, подана заявка на патент «Способ оценки влияния средств на бактериальную колонизацию поверхности катетеров») могут быть использованы для оценки новых антибактериальных средств и материалов, предлагаемых для практического здравоохранения.

Полученные результаты о принадлежности штаммов АРЕС к разнообразным патотипам с преобладанием гибридных патотипов

APES/DEC и связи наличия генов *bla*_{STX-M} с множественной устойчивостью к антибактериальным агентам, могут служить эпидемиологическим инструментом в планировании и реализации методов профилактики и контроля эшерихиозов птиц, а также иметь решающее значение в руководстве эмпирического лечения инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных (подана заявка на патент «Способ оценки патогенности штаммов *Escherichia coli*, выделенных в условиях сельскохозяйственного предприятия, для контроля эпидемической и эпизоотической ситуации).

Изучение конкурентноспособности искусственно сконструированных штаммов в сравнении с дикими культурами позволило более точно оценить возможность использования генно-модифицированных микроорганизмов в живых системах. Полученные данные могут служить теоретической основой для разработки бактериальных систем, имеющих биотехнологическую ценность, например, ветеринарных пробиотиков нового поколения – препаратов направленного действия, обеспечивающих активную защиту животного от патогенных микроорганизмов за счет колонизационной резистентности и механизма горизонтального переноса выбранных генов.

6. Специальность, которой соответствует диссертация.
Диссертационная работа соответствует п. 3 «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» и п. 10 «Использование микроорганизмов в народном хозяйстве, ветеринарии и медицине» паспорта специальности 03.02.03 «Микробиология», отрасль науки – биология.

7. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. Основной объем диссертационной работы представлен в 24 печатных научных работах, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ (из них 5 публикации в журналах, входящих в базу Scopus и Web of Sciences). Зарегистрирован патент RU 2665840 C1 «Способ оценки эффективности конъюгативного переноса в полимикробном сообществе».

Материалы диссертации доложены и обсуждены на IV Международной конференции ICOMID «Микробное разнообразие: ресурсный потенциал» (Москва, 2016), II Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Казань, 2016), II Международной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018), 8 конгрессе сообщества генетиков Словении «GENETIKA 2018» (Любляна, 2018), Краевой сельскохозяйственной выставке «Агрофест 2019» (Пермь, 2019), Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии (XXII Кашкинские

чтения; С.-Петербург, 2019), XII Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2020» (Пермь, 2020), 45 международном конгрессе FEBS 2021 (Любляна, 2021) и World Microbe Forum 2021 (online worldwide, 2021).

8. Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Гизатуллина Ю. С., Кузнецова М. В. Формирование биопленок уропатогенными штаммами *Escherichia coli* на различных абиотических поверхностях // Вестник ПГУ. Серия Биология. – 2017. – № 2. – С. 185-192.
2. Гизатуллина Ю. С., Аптуков В. Н., Митин Ю. А., Морозов И. А., Starčić Erjavec M., Кузнецова М. В. Экспериментальное обоснование применения покрытых серебром урологических катетеров // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21, № 1. – С. 75-80.
3. Кузнецова М.В., Масленникова И.Л., Гизатуллина Ю.С., D. Zgur-Bertok, M, Starčić Erjavec. Биопрепарат на основе штамма *Escherichia coli* ŽP. Сообщение I. Оценка эффективности колицина при конъюгативной доставке *colE7* в клетки АРЕС *in vitro* и *in vivo* // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55, №2. – С. 364-377.
4. Marina V. Kuznetsova, Julia S. Gizatullina, Larisa Yu. Nesterova and Marjanca Starčić Erjavec. *Escherichia coli* Isolated from Cases of Colibacillosis in Russian Poultry Farms (Perm Krai): Sensitivity to Antibiotics and Bacteriocins // Microorganisms. – 2020. – V. 8(741).
5. Кузнецова М.В., Гизатуллина Ю.С. Генетические профили адгезии и адгезивная вариабельность уропатогенных штаммов *Escherichia coli*. Инфекция и иммунитет. 2021. – Т. 11, № 3. – С. 481-490.
6. Кузнецова М.В., Гизатуллина Ю.С. Характеристика уропатогенных изолятов *Escherichia coli*, выделенных в условиях стационара // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Т. 66. - №4. – С. 248-256.

Диссертация Поспеловой Юлии Сагитовны «Конъюгативный перенос производной F-плазмиды в клетки штаммов экстраинтестинальной *Escherichia coli*» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Заключение принято на заседании Проблемной комиссии «ИЭГМ УрО РАН» по специальности 03.02.03 Микробиология.

Присутствовало на заседании 12 чел. из 15 списочного состава комиссии. Результаты голосования «за» – 12 чел. (единогласно), «против» – 0 чел., «воздержались» – 0 чел., протокол № 4 от «07» сентября 2021 г.

К.Б.Н., зам. директора

«ИЭГМ УрО РАН» «ИЭГМ УрО РАН»

Подпись

Egorova D.O.

Егорова Дарья Олеговна

заверяю

главный специалист по кадрам М.В.Корепанова

