



**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Оренбургский федеральный исследовательский центр  
Уральского отделения Российской академии наук  
(ОФИЦ УрО РАН)

**ИНСТИТУТ КЛЕТОЧНОГО И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СИМБИОЗА**  
Уральского отделения Российской академии наук  
(ИКВС УрО РАН)

460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11  
тел.: (3532) 77-54-17, факс (3532) 77-44-63; E-mail: icis-ofrc@list.ru

---

---

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора В.А. ГРИЦЕНКО на диссертацию ПОСПЕЛОВОЙ Юлии Сагитовны **«Конъюгативный перенос производной F-плазмиды в клетки штаммов экстраинтестинальной *Escherichia coli*»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

### **Актуальность темы диссертации**

Изменчивость микроорганизмов лежит в основе их микроэволюции, экологической пластичности и адаптивных возможностей. Это свойство реализуется как на фено-, так и генотипическом уровнях. И если в первом случае речь идет о способности микроорганизмов реагировать на действие каких-то внешних факторов, модифицируя свой фенотип в пределах нормы реакции генотипа, то во втором случае изменения затрагивают непосредственно генетический аппарат клетки и связаны с широким спектром процессов – от появления точечных мутаций в генах до приобретения (или утраты) больших «объемов» генетической информации. В этом смысле интересен процесс конъюгации у бактерий, сопровождающийся переносом ДНК из клетки-донора в клетку-реципиента, в который могут вовлекаться как участки бактериальной хромосомы, так целые плазмиды, и который, являясь одним из основных способов горизонтальной передачи генов, играет важную роль в поддержании генетического разнообразия микроорганизмов за счет приобретения новых генов, в том числе, детерминирующих их резистентность к антимикробным (химиотерапевтическим) препаратам, тяжелым металлам, бактериоцинам, а также факторы патогенности и персистенции. Следовательно, конъюгативный процесс у микроорганизмов может лежать в основе многих явлений, сопряженных с медицинскими и ветеринарными проблемами, связанными, в первую очередь, с распространением антибиотикоустойчивых вариантов бактерий и снижением эффективности применения лекарственных препаратов при терапии инфекционно-воспалительных заболеваний человека и животных. Кроме того, конъюгативный перенос генов является одним из удобных «инструментов» при создании химер-

ных микроорганизмов в биотехнологии. Таким образом, изучение особенностей конъюгации у бактерий и влияния на нее различных факторов (биопротекторы доноров и реципиентов; условия окружающей среды) имеет важное теоретическое и прикладное значение.

Пожалуй, наиболее «удобным» объектом для исследования отдельных аспектов бактериальной конъюгации являются бактерии вида *Escherichia coli*. Этот вид весьма гетерогенен и объединяет в себе представителей разных групп, часть из которых относится к индигенной кишечной микробиоте человека и животных, а часть – к патотипам, способным вызывать кишечные или внекишечные инфекции. Причем вне зависимости от принадлежности бактерий к определенной группе в них могут присутствовать F-подобные плазмиды, несущие гены, ответственные за вирулентность микроорганизмов и их устойчивость к антибиотикам и определяющие не только развитие инфекционной патологии, но и трудности в ее лечении. Поскольку на эффективность внутривидового переноса плазмид могут влиять биологические характеристики реципиентов – филогенетическая группа, лизогения, бактериоциногенность, факторы вирулентности и др., изучение влияния этих свойств на межклеточное взаимодействие с участием различных штаммов экстраинтестинальной *E. coli* представляется очень значимым.

Кроме того, определенные надежды в борьбе с распространением полиантибиотикорезистентных возбудителей связывают с использованием пробиотиков, созданных, в том числе, на основе искусственно сконструированных штаммов бактерий с множественной продукцией бактериоцинов. Однако такие препараты могут быть недостаточно эффективными из-за наличия бактериоциноустойчивых микроорганизмов. Для решения этой проблемы планируется использовать штаммы с альтернативным механизмом доставки колицинов на основе горизонтального переноса генов при участии конъюгативных плазмид.

Вышеизложенное определяет **актуальность избранной темы** диссертационного исследования Поспеловой Юлии Сагитовны, которое посвящено решению важной задачи микробиологии, а именно – анализу влияния биотических и абиотических факторов на конъюгативный перенос плазмиды рОХ38 в клетки штаммов *E. coli* дикого типа. Актуальность выбранной темы подтверждается представленным Ю.С. Поспеловой обзором литературных данных, в котором критически освещены вопросы патогенности *E. coli* двух групп (возбудители инфекций мочевыводящих путей человека и эшерихии, вызывающие системный колибактериоз птиц), а также механизмов и регуляции конъюгативного переноса генов у бактерий.

В результате автору удалось логично и аргументировано сформулировать общую цель и задачи диссертационного исследования.

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Сформулированные в диссертации Ю.С. Поспеловой основные положения, выносимые на защиту, выводы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость базируются на анализе результатов тщательно проведенных бактериологических, микробиологических и молекулярно-генетических исследований.

Четкий дизайн работы, достаточный объем фактического материала, полученного с использованием набора адекватных методов исследования, корректная статистическая обработка полученных результатов и их математический анализ (с

использованием современного программного продукта) позволили Ю.С. Поспеловой решить поставленные в работе задачи, обосновать все положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, и достичь заявленной цели.

Материалы диссертации Ю.С. Поспеловой прошли широкую научную «экспертизу» и были обсуждены на 9 международных и всероссийских форумах, а также нашли свое отражение в 24 публикациях, включая 6 работ в научных изданиях, входящих в перечень ВАК при Минобрнауки России, из них 5 – опубликовано в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus, WoS, Pubmed. Проведенные диссертантом исследования были поддержаны несколькими международными проектами и российским грантом. Все это свидетельствует о том, что диссертационная работа подвергалась всестороннему анализу со стороны российских и зарубежных специалистов.

### **Новизна исследования, значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Научная новизна и ценность диссертационной работы Ю.С. Поспеловой определяются следующими основными наиболее значимыми результатами.

Автором впервые при анализе конъюгативной передачи генов применен комплексный подход, включающий оценку эффективности конъюгации в зависимости от свойств бактерий реципиента, а также внешних факторов и условий передачи: состояния клеток – свободное/прикрепленное, физико-химических характеристик поверхности, присутствия клеток других видов бактерий или их метаболитов. Новизна этого подхода подчеркивается ограниченным количеством исследований горизонтального переноса генов с участием диких штаммов бактерий, которые могут иметь более высокий вирулентный потенциал по сравнению с коллекционными штаммами.

Кроме того, в работе впервые оценена эффективность конъюгации в биопленке, формируемой эшерихиями, в присутствии других условно-патогенных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus faecalis*) или их супернатантов. Установлено, что в присутствии клеток бактерий других видов или их метаболитов частота переноса плазмиды рОХ38 в клетки уропатогенных *E. coli* (UPEC) снижалась на один-два порядка, независимо от взаимного положительного или отрицательного влияния ассоциантов друг на друга при формировании биопленки, что позволило автору разработать способ оценки эффективности конъюгативного переноса в полимикробных сообществах, который отличается простотой и высокой производительностью за счет унификации обеих моделей эксперимента – в планктоне и в биопленке.

Диссертантом впервые параллельно определены уровни неспецифической и специфической (к разным по происхождению эритроцитам) адгезии, и установлена связь этих параметров с генетическим профилем культуры UPEC.

Автором получены данные, подтверждающие эффективность применения напыления ионов серебра на поверхность катетера для снижения контаминации, выживаемости и коммуникации клеток. Конденсация генетического материала бактерий, вызванная воздействием серебра, препятствует репликации и передаче плазмидной ДНК. Именно эти аспекты являются определяющими при оценке эффективности использования катетеров с антибактериальным покрытием. Полученные результаты расширяют представление об особенностях формирования

биопленок ведущего уропатогена – *E. coli*, на изделиях медицинского назначения, применяемых в современной медицинской практике.

Анализ частоты встречаемости генов вирулентности у уропатогенных, диареогенных и патогенных для птиц *E. coli* (АРЕС), а также детерминант устойчивости к бета-лактамам среди штаммов АРЕС, циркулирующих на предприятиях промышленного птицеводства в Пермском крае, показал, что последние имеют высокий зоонозный потенциал и по генетическому профилю наиболее близки к представителям диареогенных эшерихий, и в большом проценте случаев имеют гены бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), а также участков интегронов 1 класса. Более того, наличие генов *bla*<sub>СТХ-М</sub> обычно коррелировало с множественной устойчивостью к антибактериальным агентам.

Кроме того, автором получены перспективные данные об эффективности киллинга клеток АРЕС, получивших плазмиду, несущую ген бактериоцина ColE7, которые могут служить как теоретической основой для разработки бактериальных векторов, имеющих биотехнологическую ценность, так и способствовать получению ветеринарного пробиотика нового поколения, обеспечивающего активную защиту животного от патогенных микроорганизмов за счет механизма горизонтального переноса.

В целом результаты выполненного Ю.С. Поспеловой исследования расширяют представления о механизмах адаптации бактерий в окружающей среде.

#### **Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Собранная автором рабочая коллекция культур *E. coli*, различающихся по фено- и генотипу, может быть востребована и перспективна для проведения фундаментальных и прикладных исследований по изучению биологических свойств и физиологических процессов эшерихий, в том числе, характеризующих межвидовые взаимоотношения в бактериальных популяциях *E. coli*.

Исходя из полученных результатов по определению встречаемости эпидемиологически значимых птичьих патогенных штаммов *E. coli* (культуры оказались носителями энтеротоксинов термостабильного и термолабильного, токсина субтилазы и др.), проблема мониторинга АРЕС на сельскохозяйственных предприятиях выходит из чисто ветеринарной, но и медико-экологический уровень. Именно эти маркерные гены необходимо контролировать в ветеринарных референс-лабораториях. Поскольку у представителей семейства *Enterobacteriaceae*, и в частности *E. coli*, наличие гена *bla*<sub>СТХ-М</sub> свидетельствует о высоком эпидемиологическом потенциале и, как оказалось, коррелирует с множественной устойчивостью к антибактериальным агентам, при мониторинге возбудителей колибактериоза желательно проводить скрининг на продукцию БЛРС СТХ-М типа, а эти данные могут служить эпидемиологическим инструментом при планировании и реализации методов профилактики и контроля эшерихиозов птиц в птицеводческих хозяйствах.

Штамм *E. coli* ЖР перспективен в качестве основы пробиотического препарата за счет возможности воздействия на устойчивые к антибиотикам и бактериоцинам энтеробактерии, циркулирующие в условиях птицеводческих и животноводческих комплексов. Разрабатываемый пробиотический препарат будет направлен на профилактику и лечение кишечных инфекций у промышленных животных и будет востребован на предприятиях сельского хозяйства.

Результаты исследования Ю.С. Поспеловой внедрены в учебный процесс и используются в научно-исследовательской деятельности кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России.

### **Содержание диссертации, ее завершенность**

Диссертация Ю.С. Поспеловой изложена на 158 страницах компьютерного текста, оформлена в соответствии с предъявляемыми требованиями, выдержана в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов, двух глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 26 отечественных и 202 зарубежных источников. Фактический материал наглядно иллюстрирован 18 таблицами и 21 рисунком. Последовательность глав корреспондирует с порядком решаемых задач. Сформулированные в диссертации выводы и положения, выносимые на защиту, логично вытекают из представленных результатов.

Диссертация носит внутренне целостный и завершенный характер. Замечания по оформлению рукописи диссертации и языку изложения отсутствуют.

В разделе «Введение» автор отражает актуальность избранной темы, формулирует цель и задачи исследования, описывает методологию, степень достоверности и личное участие автора. Здесь же представлены положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В Главе 1 («Обзор литературы») Ю.С. Поспелова подробно рассматривает биологические свойства представителей двух патотипов, уропатогенной и патогенной для птиц, экстраинтестинальной *E. coli*. Автор приводит данные по основным характеристикам возбудителей – филогенетической группе и факторам патогенности, которые проанализированы в контексте инфекционной патологии, вызываемой эшерихиями из описываемых групп – ИМВП и колибактериоза. Отдельно представлены многочисленные данные отечественных и зарубежных исследователей по антибиотикочувствительности *E. coli*, которые свидетельствуют о нарастании устойчивости возбудителя к антибиотикам и появлении патогенов с множественной лекарственной устойчивостью как в клинике, так и в условиях сельскохозяйственных предприятий. Основная подглава обзора посвящена описанию конъюгации у бактерий: приведены современные классификации плазмид, представлено строение конъюгативных факторов, подробно описан механизма конъюгативного переноса, регуляторные факторы процесса. В конце обзора литературы автор подводит итоги накопленному опыту исследователей и определяет вектор и подходы собственного исследования.

Глава 2 «Материалы и методы исследования» посвящена описанию взятых в работу штаммов и методов их исследования. Представлена информация о методиках статистического анализа и оценке достоверности полученных результатов.

Глава 3 посвящена характеристике биологических свойств штаммов *E. coli*, выделенных из разных источников. Представлен большой материал по фенотипическим и генотипическим особенностям возбудителей. Для каждой из групп акцент сделан на наиболее значимые характеристики. Так, при анализе UPEC подробно изучены генетические профили адгезии штаммов, проанализирована их связь с неспецифической и специфической адгезией. При исследовании APEC культур основное внимание было уделено их профилям устойчивости к антибио-

тикам и бактериоцинам. Последнее является важным в контексте разработки пробиотических препаратов с антагонистической активностью. Кроме того, автором установлено, что независимо от патотипа культуры являются носителями множественных генов вирулентности, имеют высокий уровень устойчивости к антимикробным веществам и продуцируют БЛРС преимущественно TEM и CTX типов, часто содержат в геноме *tra* и фрагменты интегронов 1 типа, характеризующих горизонтальный перенос генов. В результате этих исследований были отобраны штаммы, которые использовали в качестве реципиентов для изучения внутривидового конъюгативного переноса производной F-плазмиды в различных модельных системах *in vitro* и *in vivo*.

В Главе 4 представлены результаты по конъюгативному переносу в клетки штаммов UPES, эффективность которого была оценена в зависимости от состояния клеток (свободное/прикрепленное), взаиморасположения клеток в биопленке, физических свойств поверхности, присутствия других микроорганизмов и их метаболитов. Что касается значимости свойств самих реципиентов, то автору удалось установить, что только полиантибиотикоустойчивые штаммы характеризовались более высокой частотой конъюгации в биопленке. Исследования конъюгативного переноса *in vivo* было сделано на штаммах APES. Эксперимент *in vivo* показал, что генно-модифицированный штамм *E. coli* ŽP, несущий ген синтеза колицина ColE7, способен эффективно заселять кишечник крыс и сельскохозяйственной птицы и сохраняться там на протяжении длительного времени. Конъюгативный перенос плазмиды от «контрольного» донора в условиях кишечного тракта происходил с достаточно высокой частотой, в то время как, в группе с «киллерным» донором трансконъюганты отсутствовали, что свидетельствует об эффективности работы конъюгативно-опосредованной антибактериальной системы.

В главе «Заключение» автор проводит анализ полученных данных, формулирует перспективы дальнейшей разработки темы.

Выводы, сделанные автором, полностью соответствуют поставленной цели, задачам и содержанию работы.

#### **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации**

Работа выполнена на высоком методическом уровне, написана хорошим литературным языком. Достоинствами работы являются четко сформулированные цель и задачи исследования, подробно описанные материал и методики исследования и статистического анализа. Отдельно хотелось бы отметить, что каждая глава заканчивается обобщением и обсуждением результатов в виде резюме.

Автореферат составлен стандартно, соответствует требованиям и полностью отражает основные результаты диссертационного исследования.

Положительно оценивая представленную диссертацию, хотелось бы уточнить у автора ряд вопросов, которые возникли при анализе материала работы:

1. Почему в условиях экспериментов по оценке эффективности конъюгации в биопленках, формируемых эшерихиями, в присутствии других бактерий и их метаболитов, *Klebsiella* spp. не влияли на этот процесс, а *P. aeruginosa* и *E. faecalis* его подавляли?

2. С чем, на Ваш взгляд, связана более высокая эффективность передачи плазмид в условиях формирования *E. coli* биопленок, чем в планктоне, а также у штаммов *E. coli*, образующих менее массивные биопленки, в сравнении со штам-

мами, формирующими более массивные биопленки?

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, диссертационная работа Ю.С. ПОСПЕЛОВОЙ на тему: «Конъюгативный перенос производной F-плазмиды в клетки штаммов экстраинтестинальной *Escherichia coli*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение актуальной научной задачи, связанной анализом влияния биотических и абиотических факторов на конъюгативный перенос плазмиды рОХ38 в клетки штаммов *E. coli* дикого типа, что имеет существенное значение для развития микробиологии. Данная работа характеризуется актуальностью, научной новизной, теоретической и практической значимостью, что указывает на ее соответствие критериям, изложенным в «Положении о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями, утвержденными постановлениями Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, 02.08.2016 г. №748, 28.08.2017 г. № 1024 и 01.10.2018 г. № 1168), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – ПОСПЕЛОВА Юлия Сагитовна – заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Главный научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, д.м.н., профессор

Гриценко Виктор Александрович

Адрес ИКВС УрО РАН: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. (3532) 77-54-17; E-mail: [icis-ofrc@list.ru](mailto:icis-ofrc@list.ru), [vag59@mail.ru](mailto:vag59@mail.ru).

*Подпись главного научного сотрудника ИКВС УрО РАН, доктора медицинских наук, профессора В.А. Гриценко заверяю.*

Начальник отдела кадров ОФИЦ УрО РАН  
« 18 » ноября 2021 г.



И.В. Турленко