ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора Кузнецовой Марины Валентиновны на диссертационную работу **Здвижковой Ирины Александровны** на тему: «**Генетическая и фенотипическая характеристика патогенного потенциала энтеробактерий с генетическими детерминантами хелаторов железа**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность избранной темы

Бактериальные инфекции являются серьезной проблемой общественного здравоохранения и продовольственной безопасности во всем мире. Ведущую роль в инфекционной патологии играют представители семейства *Enterobacteriaceae*, в частности, бактерии *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, входящие в группу ESKAPE-патогенов. При снижении резистентности организма, энтеробактерии способны колонизировать разнообразные ткани и системы хозяина, запуская развитие внекишечных инфекций. Представители *E. coli* и *K. pneumoniae* отличаются высокой генетической пластичностью, опосредованной возможностью горизонтального переноса генов вирулентности и антибиотикоустойчивости, что обусловливает высокий адаптационный потенциал данных микроорганизмов. Многочисленными исследованиями показано, что множественно-лекарственно устойчивые штаммы способны вызывать тяжелые формы гнойно-септических инфекций, в том числе с летальным исходом. Вирулентные свойства бактерий связаны с наличием капсулы, фимбрий, систем эффлюкса и секреции VI типа, а также с продукцией токсинов, ферментов и сидерофоров. Последние являются важным элементом взаимодействия энтеробактерий с макроорганизмом на всех этапах инфекционного процесса. Гены биосинтеза аэробактина являются одними из ключевых маркеров гипервирулентности *K. pneumoniae*. Кроме того, остров *pks* ассоциирован с «островом высокой патогенности» (HPI) в подгруппе высоковирулентных штаммов *E. coli*.

В связи с вышеизложенным, изучение генотипической и фенотипической характеристики патогенного потенциала энтеробактерий, несущих генетические детерминанты колибактина и аэробактина, приобретает особую значимость. Определение детерминант вирулентности у исследуемых культур позволит выявлять среди условно-патогенных энтеробактерий штаммы с повышенным патогенным и персистентным потенциалом. Несмотря на то, что накапливаются данные, свидетельствующие о значении бактериальных хелатирующих факторов в процессах колонизации, выживания и развития инфекционного процесса (патогенности) энтеробактерий в организме хозяина, их роль как факторов вирулентности не раскрыта в полной мере. Кроме того, в настоящее время в качестве одной из стратегий борьбы с

патогенами рассматривается воздействие на процесс ассимиляции ими железа, в частности, с помощью сидерофоров.

Учитывая высокую этиологическую значимость *E. coli* и *K. pneumoniae* в развитии гнойно-септических экстраинтестинальных инфекций госпитальной и внегоспитальной природы у пациентов всех возрастных групп, **актуальность исследования Здвижковой И.А., посвященного изучению генотипа и фенотипа штаммов энтеробактерий с генетическими детерминантами колибактина и аэробактина, не вызывает сомнений.**

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

Представленные в диссертационной работе научные положения, выводы и рекомендации логически вытекают из результатов проведенной научно-исследовательской работы и находят надёжное подтверждение. Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечиваются значительным объёмом экспериментальных данных, применением современных апробированных методов, использованием сертифицированного и поверенного оборудования, а также корректной статистической обработкой. Таким образом, основные выводы, положения и рекомендации автора являются научно обоснованными и адекватно отражают содержание проведённой работы.

Достоверность и новизна исследований и полученных результатов

В работе четко отражены и обоснованы актуальность, научная новизна и практическая значимость проведенного исследования. Основные положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют целям и задачам работы и нашли свое подтверждение в выводах диссертации. Надежность полученных результатов обеспечивается применением методологически верифицированных исследований, выполненных с использованием современных микробиологических, молекулярных и статистических методов. Объем выборки объектов исследования является достаточным, а результаты воспроизведены в необходимом количестве повторностей. Данные представлены логично и последовательно, методы их обработки соответствуют общепринятым научным стандартам.

Научная новизна и значимые результаты работы заключаются в следующем. Автором были установлены региональные особенности распределения генов *clbBN* и *iucBC* среди культур энтеробактерий. Выявлено, что штаммы энтеробактерий, несущие гены колибактина и аэробактина, характеризуются наличием ряда специфических генов, кодирующих белки, разрушающие лизоцим, а также генов, способствующих патогенности и устойчивости к антимикробным препаратам. Показана корреляция между наличием детерминант *clbBN* и *iucBC* в штаммах и их гемолитической

активностью. Охарактеризован комплекс вирулентных свойств у данных штаммов, включающий продукцию сидерофоров, протеазную активность (антилизоцимную, антикарнозиновую, антипептидную и антииммуноглобулиновую), направленную на разрушение ключевых антимикробных факторов хозяина, а также способность к биопленкообразованию. Таким образом, достоверность исследования и научная новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций не вызывают сомнений.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования, полученные Здвижковой И.А., убедительно свидетельствуют о персистентном и патогенном потенциале штаммов условно-патогенных кишечных энтеробактерий, содержащих гены, ответственные за синтез и транспорт колибактина и аэробактина. Изучена взаимосвязь между наличием данных генетических детерминант и ключевыми факторами вирулентности: протеазной, гемолитической активностью, а также уровнем персистентных свойств (биопленкообразованием, антипептидной, антилизоцимной, антииммуноглобулиновой и антикарнозиновой активностью). Полученные данные вносят вклад в фундаментальные знания о роли бактериальных сидерофоров на различных этапах инфекционного процесса (адгезии, колонизации, защиты от факторов врожденного иммунитета хозяина). Впервые показаны региональные особенности (на примере Оренбургской и Тюменской областей) распространения штаммов, продуцирующих колибактин и аэробактин, среди энтеробактерий. Эта информация может быть использована для прогнозирования эпидемиологических рисков, в том числе потенциальных канцерогенных рисков среди населения.

В международную базу данных GenBank депонированы шесть полногеномных последовательностей штаммов с различными комбинациями генов колибактина и аэробактина. На основе анализа генотипа и фенотипа изученных штаммов созданы оригинальные праймеры для детекции генов *clbBN*, *iucBC* и ингибиторов лизоцима. Эти разработки легли в основу запатентованной ПЦР-тест-системы (Патент № 2662930 РФ), предназначенной для выявления энтеробактерий с повышенным патогенным и персистентным потенциалом. Её применение позволит ускорить и повысить информативность ПЦР-диагностики. Результаты диссертации были успешно внедрены в практику научно-исследовательской работы ИКВС УрО РАН (акт внедрения № 01-01-01-13/192 от 24.09.24) и Тюменского ГМУ Минздрава России (акт внедрения №19 от 13.09.2024).

Таким образом, работа обладает существенной теоретической и высокой практической значимостью, результаты внедрены в виде конкретного патента и пополняют международные геномные базы данных.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом, качества оформления

Диссертация изложена на 154 страницах компьютерного текста, написана в традиционной форме и состоит из введения, обзора литературы, подробного описания материалов и методов, использованных в работе, трех глав результатов собственных исследований, главы обсуждения результатов с заключением, выводов. Диссертационная работа содержит 17 таблиц и 23 рисунка. Список литературы включает 177 источников, из них – 57 отечественных и 120 зарубежных авторов.

В литературном обзоре проведён анализ, освещающий современные представления о персистенции и патогенности популяций условно-патогенных энтеробактерий. Рассмотрены данные об экологии энтеробактерий, а также их биологической роли в организме человека. Особое внимание уделено изучению патогенного потенциала и антибиотикорезистентности этих микроорганизмов с позиций генотипа и фенотипа. Описаны особенности персистенции энтеробактерий и роль ингибиторов лизоцима в устойчивости грамотрицательных бактерий. Расписаны механизмы секреции и функции сидерофоров и железосвязывающих систем представителей семейства *Enterobacteriaceae*. В заключение рассмотрены современные методы идентификации энтеробактерий и оценки их патогенного потенциала. Обзор литературы информативен, в нем подробно освещены необходимые для понимая сути работы факты и гипотезы. В обзоре литературы недостаточно (1 стр.) информации о значимости аэробактина для энтеробактерий (патогенности, адаптации), хотя именно это признак (*iucBC*) был взять для отбора и изучения штаммов. На мой взгляд, можно было более подробно охарактеризовать функции аэробактина как фактора вирулентности.

Цель исследования и задачи для ее реализации четки, лаконичны и вполне конкретны.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны методы выделения штаммов энтеробактерий из различных биотопов, а также представлены методики биохимической идентификации штаммов и идентификации исследуемых культур по прямому белковому профилированию (с помощью масс-спектрометра). Следует отметить большое количество культур, изученных в работе на том или ином этапе, всего проанализировано около 300 штаммов. Детально представлены молекулярно-генетические методы исследования энтеробактерий, включающие в себя конструирование праймеров, полногеномное секвенирование и разработку тест-системы мультиплекс ПЦР. Приведена методика для определения филогенетических групп *E. coli*. Представлены методики для определения биологических свойств энтеробактерий, таких как протеолитическая и гемолитическая активности, оценки чувствительности штаммов к антибиотикам, ростовых свойств, биопленкообразующей способности энтеробактерий, факторов персистенции микроорганизмов (антилизоцимная, антикарнозиновая, антипептидная и

антииммуноглобулиновая активности культур). Описаны методики по определению продукции железосвязывающих соединений у штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*, а также по регуляции персистентных свойств и продукции хелаторов железа у штаммов энтеробактерий ионами железа. Кроме того, в работе представлен метод изучения комбинированного воздействия карнозина и лизоцима в сочетании с антимикробными препаратами на штаммы *K. pneumoniae*. Тем не менее, в изложении методической части диссертации присутствуют незначительные недочеты. В ряде случаев описание методов не является исчерпывающим, что может затруднить оценку воспроизводимости экспериментов. Например, на 55 стр. при определении протеолитической активности указано лишь, что в качестве субстрата использовался «белок альбумин», без уточнения его типа (бычий, человеческий) и производителя. На этой же странице, при описании оценки антикарнозиновой активности, указано, что результат выражен в «мг/мл», но не поясняется, что именно отражает эта величина - концентрацию продукта реакции или количество разложенного субстрата. Также отсутствует информация о построении калибровочной кривой для пересчета оптических плотностей в концентрационные единицы.

Результаты собственных исследований последовательно изложены в трех главах. В третьей главе представлены данные по анализу нуклеотидных последовательностей *clbBN* и *iucBC* с целью разработки специфических праймеров, что впоследствии позволило осуществить детекцию генов колибактина и аэробактина, а также их комбинаций, у штаммов энтеробактерий, изолированных из различных биотопов человека. Кроме того, выполнено исследование геномов референтных штаммов энтеробактерий, положительных и отрицательных по генам *clbBN* и *iucBC*. Представлено описание способности штаммов энтеробактерий, содержащих гены *clbBN* и *iucBC*, синтезировать железосвязывающие соединения. Эти исследования служат основой для последующих исследований, представленных в четвертой и пятой главах диссертации.

Четвертая глава диссертационного исследования посвящена комплексному изучению ключевых факторов вирулентности у штаммов-носителей детерминант *clbBN и iucBC*. В ней представлен детальный анализ патогенных (гемолитическая, протеазная активность) и персистентных свойств (способность к биопленкообразованию, резистентность к антимикробным пептидам), а также профили антибиотикочувствительности данных штаммов. Важным аспектом главы являются результаты, демонстрирующие регуляцию экспрессии продукции сидерофоров ионами железа (II), что вносит вклад в понимание механизмов адаптации энтеробактерий в условиях хозяина.

Пятая глава носит прикладной характер и содержит результаты исследований по двум основным направлениям. Во-первых, в ней изучен эффект сочетанного воздействия карнозина и лизоцима с антибиотиками на клинически значимые штаммы *K. pneumoniae*, что имеет непосредственное значение для разработки новых терапевтических стратегий. Во-вторых, на

основе полученных ранее данных представлены результаты разработки оригинальной тест-системы для мультиплексной ПЦР. Эта система предназначена для быстрого выявления штаммов энтеробактерий с повышенным патогенным и персистентным потенциалом. Учитывая высокую гетерогенность представителей семейства *Enterobacteriaceae* (от комменсалов до патогенов), разработанный инструмент позволяет эффективно и целенаправленно отбирать клинически значимые условно-патогенные культуры для последующего анализа.

Основные научные положения диссертации убедительно аргументированы в заключении. Содержание работы соответствует поставленной цели. Выводы и рекомендации логичны, обоснованы, четко сформулированы, соответствуют задачам и положениям диссертации и полностью отражают результаты исследования.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертационного исследования отражены в 9 публикациях, включая 2 статьи в журналах, индексируемых в RSCI, и 2 статьи в изданиях, входящих в базу данных Scopus (согласно перечню ВАК). Дополнительно опубликовано 3 статьи в изданиях РИНЦ, 1 тезисы и получен 1 патент на изобретение РФ.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат соответствует стандартам ГОСТ 7.0.11-2011, полностью отражает содержание работы, положения, выносимые на защиту и выводы диссертации.

Соответствие специальности

Тема диссертации, цели, задачи, основные положения и выводы соответствуют специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки).

Замечания и вопросы

Представленная диссертационная работа является значимым и качественным исследованием. Вместе с тем, в ходе ознакомления с текстом возник ряд вопросов и замечаний.

В тексте работы колибактин неоднократно называется хелатором железа. Поскольку его первичная функция связана с повреждением ДНК, а роль в хелатировании железа, если и существует, является вторичной и не до конца изученной (участие ионов металлов, прежде всего Fe^{2+}, в реализации его генотоксичности считается высоковероятным и обсуждается как механизм, но

хелатирование металлов не доказано как самостоятельное свойство), считаю использование этого термина не удачным.

В работе отмечена высокая частота встречаемости гена *iucBC* (67,0%) среди уропатогенных *E. coli*. Однако дальнейшее изучение персистентных свойств (АЛА, АКрА, АИгА, АПА, биопленкообразование) в главах 4 и 5, по-видимому, не проводилось на этой клинически крайне значимой группе. Исключение штаммов UPEC из исследования по изучению персистентных свойств, на мой взгляд, является ошибочным, так как они вызывают гнойно-септические инфекции, в том числе уросепсис, где как раз очень важны данные характеристики. В обзоре литературы справедливо подчеркнута важность гипервирулентного/гипермукоидного патотипа *K. pneumoniae*. Учитывая, что в работе проанализировано большое число штаммов клебсиелл, отсутствие даже минимальной фенотипической (стринг-тест) или генотипической оценки этого признака выглядит как некоторое упущение при характеристике коллекции.

При анализе влияния комбинации лизоцима и карнозина с антибиотиками штаммы были разделены лишь по генетическому профилю (*clbBN+/iucBC+* и т.д.). Считаю, что более логичным и информативным было бы разделение культур на группы с высокой и низкой антилизоцимной активностью (АЛА), непосредственно измеренной в работе. Это позволило бы сделать более прямые выводы о связи фенотипической устойчивости к пептиду и эффективности комбинации.

В тексте диссертации присутствует ряд опечаток и стилистических неточностей. Например: в тоже время" следует писать раздельно: "в то же время" (стр. 18), "цил-гомосерин лактон" – вероятно, опечатка: "ацил-гомосерин лактон" (стр. 29), "которые были мутированы для способности производить аэробактин" – неясная формулировка (стр. 23), "16S РНК" вместо "16S рРНК" (стр. 35), "Присутствие иро (салмохелина)" – следует "iro" (стр. 36), "мвсспекторометрический" вместо "масс-спектрометрический" (стр. 41), "Сочетанное влияние ... в отношении штаммов" – предпочтительнее "влияние ... на штаммы" (стр. 110), "Длины получаемых амликонов были в диапазоне от 201 до 115" – не указана единица измерения (п.н.) (стр. 115).

Данные замечания, или даже предложения, носят частный характер и не отменяют общей высокой оценки научной ценности и практической значимости выполненной работы.

Вопросы.

1. При анализе филогенетической структуры коллекции *E. coli* использована «устаревшая», а не более новая схема (quadruplex PCR) (O. Clermont и соавт., 2013). Чем был обусловлен выбор именно этой схемы? Могло ли это повлиять на результат исследования, а именно – на неожиданно высокий процент штаммов филогрупп B2 (70,9%) и D (59,2%) среди кишечных изолятов, выделенных от условно здоровых людей, где должны преобладать культуры комменсальных филогрупп?

2. Вами обнаружена значительная распространенность генов колибактина – мощного генотоксина, среди штаммов, выделенных от здоровых лиц. Какое биологическое или конкурентное преимущество, по вашему мнению, дает способность к продукции колибактина бактериям в микробиоте кишечника здорового человека? Является ли, на ваш взгляд, такая распространенность региональной особенностью (Оренбургская /Тюменская области) или отражает общую, возможно, недооцененную тенденцию? Согласны ли вы с тем, что выявление у здорового человека *E. coli* с генотипом *hlyA+clb+* можно рассматривать как маркер повышенного риска развития колоректального рака (КРР)? Следует ли, по результатам Вашей работы, рекомендовать скрининг на такие штаммы в регионе в контексте профилактики КРР?
3. Почему было принято решение о необходимости создания новых праймеров генов *clbBN* и *iucBC*? Были ли использованы известные праймеры в работе в качестве контроля для валидации вновь разработанных праймеров, так как специфичность и чувствительность новых проверены (сделан полногеномный сиквенс) лишь на ограниченной панели из 6 штаммов? Было ли сравнение эффективности новых праймеров с уже существующими?
4. Ваши данные указывают, что только ~9% штаммов, лишенных *clbBN/iucBC* (составляют около 65% всех культур), продуцируют сидерофоры на хромогенной среде. Однако известно, что >90% *E. coli* продуцируют энтеробактин, и они также должны быть положительными в фенотипическом тесте. Как Вы объясняете это противоречие? Связано ли это с методическими ограничениями или же с тем, что в исследуемой коллекции действительно низкая доля продуцентов других сидерофоров?
5. Вы отмечаете, что все гемолитические штаммы Вашей коллекции были носителями *clbBN* (или его комбинации с *iucBC*). При этом общеизвестно, что гемолиз обусловлен в первую очередь гемолизинами (HhlyA, HlyF), а корреляция с pks-островом не является абсолютной, хотя и очень сильная. Как Вы объясняете наблюдаемую в вашей выборке 100% связь этих признаков? Проводился ли поиск классических генов гемолизинов для проверки, является ли их наличие обязательным условием гемолитического фенотипа у *clbBN*-положительных штаммов?

Заключение

Диссертационная работа Здвижковой Ирины Александровны «Генотипическая и фенотипическая характеристика патогенного потенциала энтеробактерий с генетическими детерминантами хелаторов железа», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки), является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи по изучению генотипической и

фенотипической характеристики патогенного и персистентного потенциала энтеробактерий с генетическими детерминантами колибактина и аэробактина.

Таким образом, диссертационная работа Здвижковой Ирины Александровны «Генотипическая и фенотипическая характеристика патогенного потенциала энтеробактерий с генетическими детерминантами хелаторов железа» соответствует требованиям пп. 9-11,13,14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Здвижкова Ирина Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

«12» января 2026 г. Кузнецова Марина Валентиновна

доктор медицинских наук (03.02.03 – Микробиология), профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии «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

614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13

тел.: +7(342)212-44-76; e-mail: mar@iegm.ru

Директор ПФИЦ УрО РАН
чл.-корр. РАН д. ф.-м. н О.А. Плехов