



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека



**Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)**

п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, 142279
тел: (4967) 36-00-03, факс: (4967) 36-00-10

e-mail: info@obolensk.org, <http://www.obolensk.org>

ОКПО 78095326 ОГРН 1055011113772 ИНН 5077018190 КПП 507701001

№ _____

На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН ГНЦ ПМБ
акад. РАН, д.м.н., проф.



И.А. Дятлов

2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора на диссертационную работу Голомидовой Аллы Константиновны на тему «Структурная и функциональная организация адсорбционного аппарата T5-подобных бактериофагов DT57C и DT571/2», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03. – микробиология.

Актуальность темы диссертации. Современная медицинская практика сталкивается с существенными проблемами, связанными с распространением лекарственной резистентности у патогенных бактерий. В связи с этим разработка альтернативных методов антибактериальной терапии приобретает все большую актуальность. В качестве одной из альтернатив антибиотикам рассматриваются бактериофаги – природные «пожиратели» бактерий, которые являются наиболее многочисленными биологическими объектами нашей планеты. Между тем исследована лишь очень незначительная часть из этого множества. Несмотря на большой научный материал, накопленный за столетнее изучение биологических свойств бактериофагов, многие вопросы остаются не выясненными, другие требуют дополнительных исследований и уточнений. Следует отметить, что даже у наиболее изученных бактериофагов не известны функции, по крайней мере, трети синтезируемых ими продуктов, не до конца

понятны тонкие механизмы взаимодействия бактериофагов с клеткой-хозяином.

В числе возможных мишеней фаговой терапии наибольшее медицинское значение на сегодня имеют граммотрицательные бактерии, в том числе представители семейства Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella* и др.). T5-подобные бактериофаги, исследованию которых посвящена работа А.К. Голомидовой, являются перспективными кандидатами для терапии инфекций, вызываемых этими микроорганизмами. Эти фаги используют литический цикл развития, т.е. они являются вирулентными для бактериальных клеток, часто обладают широким спектром хозяев, устойчивы к различным условиям окружающей среды; геномы этих фагов не содержат генов потенциальных факторов патогенности.

Исследования, направленные на изучение структурной и функциональной организации адсорбционного аппарата бактериофагов, в данном случае T5-подобных, являются крайне актуальными как с точки зрения получения новых знаний о молекулярных механизмах и особенностях взаимодействия фагов с клетками бактерий-хозяев, так и с точки зрения разработки на основе полученных знаний новых фаговых антибактериальных препаратов.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Полученные в диссертационной работе данные существенно расширяют представление о важности фундаментальных основ биологии бактериофагов для их рационального практического применения. В работе А.К. Голомидовой подробно исследована стратегия адсорбции двух новых бактериофагов DT57C и DT571/2 на клетках их хозяев – бактерий *E. coli*. Детально изученная организация адсорбционного аппарата T5-подобных бактериофагов и механизм распознавания ими клеток-хозяев является основой для разработки системы управления хозяйской специфичностью вируса, с помощью которой можно быстро адаптировать бактериофаг к штаммам *E. coli*, продуцирующим различные варианты O-антигенов. В данной работе впервые охарактеризованы O-антигены штаммов *E. coli*, лизируемых исследуемыми бактериофагами: HS1/2 (O87), HS3-104 (O81) и 4S (O22).

В диссертационной работе впервые показано, что латеральные хвостовые фибриллы (LTF) бактериофагов DT57C и DT571/2 имеют разветвленную структуру и состоят из двух белков – LtfA и LtfB. При этом оба белка имеют свои рецептор-узнающие домены - полисахаридные лиганды O-антигенов клеток *E. coli*, взаимодействие с которыми обеспечивает возможность проникновения осевой фибриллы фага к конечному рецептору - белку внешней мембраны VtuB. Ранее такая структура не была описана у T5-подобных бактериофагов, однако проведенный диссертантом биоинформатический поиск

показал, что сходная организация LTF-фибрил имеется также у некоторых T5-подобных фагов, геномы которых депонированы в базу данных GenBank.

Интересным научным наблюдением, отмеченным в работе, является генетическая нестабильность двухгенного локуса *ltf* в результате мутаций, происходящих при культивировании фагов на лабораторных штаммах *E. coli*, не несущих поверхностных O-антигенов. Данный результат может свидетельствовать о наличии в природном местообитании бактериофагов селективных механизмов, стабилизирующих двухгенную структуру *ltf*, направленных, по-видимому, на расширение спектра хозяев бактериофага.

Практическая значимость работы обусловлена тем, что, как было сказано выше, T5-подобные бактериофаги являются перспективными агентами для терапии инфекций, вызываемых бактериями сем. *Enterobacteriaceae*, в том числе штаммами устойчивыми к антибактериальным химиопрепаратам.

Стратегия инфекции T5-подобных фагов, при которой взаимодействие со вторичным бактериальным рецептором (при условии его стерической доступности) может протекать без узнавания первичного рецептора, расширяет возможность использования этих фагов в составе терапевтических смесей. Например, совместное использование T5-подобных фагов с несколькими фагами узкого спектра действия, распознающими разные O-антигены штаммов, не чувствительных напрямую к данным T5-подобным фагам, может существенно улучшить эффективность фаготерапии.

Следует отметить еще один аспект практического применения результатов диссертационной работы. Охарактеризованные T5-подобные фаги и их LTF-мутанты могут быть использованы в качестве зондов для характеристики O-антигенов *E. coli*.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Голомидовой Аллы Константиновны изложена на 125 страницах, проиллюстрирована 32 рисунками и 7 таблицами. Диссертация имеет традиционную структуру и содержит следующие разделы: введение, основную часть, включающую 6 глав (обзор литературы в 4 главах, и экспериментальная часть в 2 главах), заключение, выводы, список литературы, включающий 211 источников и приложение.

Во «Введении» обоснована актуальность и значимость существующей научной проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, личное участие автора в получении экспериментальных данных; представлена информация о работах автора, опубликованных по теме диссертации.

Раздел «Обзор литературы» состоит из четырех глав. В первой главе рассматриваются общие вопросы биологии бактериофагов (история открытия и исследования вирусов бактерий, разнообразие бактериофагов и их распространение в природе, жизненный цикл фагов, адаптация бактерий к бактериофагам). Вторая и третья главы обзора посвящены вопросам взаимодействия бактериофагов и их бактерий-хозяев. Автор подробно рассматривает приобретенные в ходе коэволюции механизмы защиты бактерий от фаговой инфекции и пути преодоления этих механизмов бактериофагами. Последняя глава обзора полностью посвящена предмету диссертационного исследования - T5-подобным фагам. Лаконично, но достаточно подробно для понимания описана структура вириона этих фагов и механизм адсорбции фага T5.

В «Экспериментальной части» в главе 5 «Материалы и методы исследования», детально описаны использованные в работе природные образцы и питательные среды, представлено подробное описание методологии экспериментов, в ходе выполнения которых автор использовал широкий спектр микробиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов, что даёт полное представление о большом объеме и высоком качестве выполненной работы.

В разделе "Результаты и обсуждение" приводятся данные собственных исследований А.К. Голомидовой, направленных на выделение и изучение T5-подобных бактериофагов. Диссертантом детально изучены два бактериофага DT57C и DT571/2, являющиеся представителями нового вида в составе рода T5virus подсемейства Tunavirinae семейства Siphoviridae: изучена морфология фагов, их специфичность и спектр активности на лабораторных и природных штаммах *E.coli*, определены полные нуклеотидные последовательности геномов бактериофагов, выявлены гены, кодирующие белки адсорбционного аппарата, определены первичные и вторичный (конечный) клеточные рецепторы для исследуемых бактериофагов. Из наиболее значимых результатов исследований следует еще раз отметить установление структуры латеральных хвостовых фибрилл (LTF) изученных фагов, состоящих из двух белков – LtfA и LtfB, кодируемых отдельными генами. Ранее такая разветвленная структура LTF не была описана у T5-подобных бактериофагов.

По завершении экспериментальных исследований диссертантом предложена модель, объясняющая специфичность адсорбции фагов DT57C и DT571/2 на поверхности клеток *E.coli*, продуцирующих O-антигены. Важным следствием из предложенной «адсорбционной» модели является то, что выявленные особенности взаимодействия исследуемых фагов с бактериальной клеткой расширяют возможности искусственной манипуляции спектром хозяев

T5-подобных бактериофагов и их использовании в качестве агентов фаготерапии нового поколения.

В «Заключении» диссертации обобщены результаты экспериментов, обоснованы практические рекомендации и перспективы дальнейших исследований.

Выводы диссертационной работы четко сформулированы и полностью соответствуют цели и задачам проведенного исследования, а также полученным результатам, изложенным в главах экспериментальной части диссертации.

Замечания. Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. Вместе с тем, следует отметить некоторые недостатки оформления работы.

1) Несколько небрежно оформлен демонстрационный материал (рисунки, таблицы) в экспериментальной части диссертации.

На стр. 69, рис. 14 - к фрагменту А (рестрикционный анализ) нет пояснения и не понятно, что из себя представляют обозначения на электрофореграмме (морфотип фага?, название фага?), и где на рисунке исследуемые фаги. На том же рисунке (фрагмент В) – не соответствуют обозначения на рисунке и в подписи к рисунку.

Таблица 3 (стр. 71) – нет заголовка данных и расшифровки обозначений «+» и «-».

На стр.72 при описании эксперимента по адсорбции двух исследуемых фагов (DT57С и DT571/2) на 6 штаммах *E.coli* дается ссылка на рисунок приложения 4. Однако на этом рисунке представлены данные по адсорбции только одного фага, причем, обозначенного как DT71/2, на 4 штаммах *E.coli*. Далее, анализируя специфичность адсорбции исследуемых фагов, автор ссылается на результаты табл. 4. Однако в этой таблице представлены результаты изучения «эффективности роста» (т.е. эффективности бляшкообразования, а не специфичности адсорбции) бактериофагов на различных штаммах *E. coli*. В связи с чем сделанный вывод «Эти результаты свидетельствуют о том, что хозяйский спектр исследуемых фагов на штаммах-хозяевах определяется специфичностью их адсорбции» можно считать верным только из общих представлений о биологии фагов, а не из данных, представленных в диссертации.

На стр. 74 при анализе генома фагов автор ссылается на таблицу 3 приложения. Однако в этой таблице представлены олигонуклеотидные праймеры. По-видимому, речь идет о таблице Приложения 2 («Различие генов и ОРС у фагов...»).

Размещение таблиц и рисунков, в которых представлены основные результаты исследования, в Приложениях, к тому же с ошибками, затрудняет восприятие материала.

Рис. 25 (стр. 85) – представленная электрофореграмма требует объяснения.

Следует также обратить внимание на неудачное расположение некоторых рисунков. Например, рис. 4 упоминается на стр. 30, а расположен на стр. 38. Большая часть данных упомянутой выше таблицы 4 (стр. 73) обсуждается только на стр. 87-88.

2) Встречаются неудачные выражения, например, миграторные инфекции (стр. 5), «домен гидролизует пептидогликаны по средствам» (стр. 36), «неструктурные открытые рамки считывания» (стр. 74), «на С-конце бактериофага T5 Ltf белка» (стр. 84), «консервативные фланки» (стр. 88), фаг-платформы и их таргетирование (стр. 101).

3) Достаточно много ошибок, связанных, по-видимому, с невнимательным переносом текста из разных документов (пропуск и повторение слов, несогласованность отдельных фрагментов текста): «патогенными бактериями» (стр. 6), «Фаги *Haemophilus influenzae* фаги» (стр. 24), «Обратимо связанные фаги диссоциировать от поверхности клетки сохраняя свою биологическую активность» (стр. 54), «Фаги имели изометрическими головки ... и длинными несократимыми хвостами» (стр. 70), «в присутствии с плазмид», «что в была передана» (стр. 86), «фагов, содержащих разветвленные LTF, многие из которых имеют разветвленные LTF» (стр. 98) и т.п.

Сделанные замечания не умаляют достоинств диссертации. Работа Голомидовой Аллы Константиновны – цельный научный труд, отвечающий на поставленные задачи и имеющий перспективу для дальнейших исследований.

Автореферат в полной мере раскрывает содержание диссертации. По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, включая семь статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК. Результаты диссертации доложены и представлены на многочисленных научных международных и российских конференциях.

Заключение. Диссертационная работа Голомидовой Аллы Константиновны представляет собой завершённое научно-квалификационное исследование. По своей актуальности, научной новизне, уровню проведённых исследований работа соответствует п. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а сам автор заслуживает присуждения искомой учёной

степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03-«микробиология».

Отзыв заслушан и одобрен на заседании учёного совета ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (протокол № 4 от 21.05.2019 г.).

Ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярной диагностики
и генно-инженерных препаратов ФБУН
«Государственный научный центр
прикладной микробиологии и
биотехнологии» Роспотребнадзора,
кандидат биологических наук

Воложанцев Николай Валентинович

Адрес: 142279, Московская обл.,
Серпуховский район, п. Оболенск,
ФБУН ГНЦ ПМБ,
тел. (4967)360147,
E.mail: nikvol@obolensk.org

Подпись Воложанцева Николая Валентиновича заверяю:

Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ПМБ
доктор биологических наук



Л.В. Коломбет