

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»

УТВЕРЖДАЮ

Председатель Ученого совета
ФБУН ГНЦ ПМБ



И.А. Дятлов

04. 2021 г.

ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ УЧЕБНЫЙ ПЛАН
АСПИРАНТА

Дата зачисления " 01 " октября 2020 г.

Дата окончания " 30 " сентября 2024г.

1. Фамилия, имя, отчество Трунякова Александра Сергеевна
2. Направление подготовки 06.06.01 – Биологические науки
3. Направленность микробиология [03.02.03]
4. Форма обучения очная
5. Тема научно-квалификационной работы «Аттенуированный рекомбинантный штамм возбудителя псевдотуберкулеза - основа для создания видо- и родоспецифичного иммунитета»
6. Научный руководитель: доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы Дентовская Светлана Владимировна

ОБОСНОВАНИЕ ТЕМЫ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Тема: «Аттенуированный рекомбинантный штамм возбудителя псевдотуберкулеза - основа для создания видо- и родоспецифичного иммунитета».

Актуальность:

Y. pestis - этиологический агент чумы, передается инфицированными блохами, чаще вызывая бубонную форму инфекции (WHO, 2004), которая может осложняться развитием вторичной легочной пневмонии с возникновением возможности передачи инфекции от человека к человеку посредством образования аэрозоля. Высокая летальность легочной чумы обуславливает использование *Y. pestis* в качестве агента биотерроризма (Inglesby *et al.*, 2000). Кроме того, на Мадагаскаре обнаружили несколько штаммов *Y. pestis* с естественной устойчивостью к восьми антибиотикам, включая рекомендованные для лечения и профилактики чумы (Galimand *et al.*, 1997, Welch *et al.*, 2007). Одним из путей борьбы со штаммами *Y. pestis* с множественной лекарственной устойчивостью является вакцинация.

Два отличных от возбудителя чумы представителя рода *Yersinia* – энтеропатогенные *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* - вызывают склонные к затяжному течению заболевания желудочно-кишечного тракта средней тяжести, обеспечивающие длительное выделение патогенов с фекальными массами в окружающую среду и последующее алиментарное заражение новых хозяев. Иерсиниоз и псевдотуберкулез - пищевые зоонозные инфекции природно-очагового характера, с основным резервуаром среди диких и синантропных грызунов, домашних и сельскохозяйственных животных (Galindo *et al.*, 2011, Bottone, 1997; Brubaker, 1991). Иерсиниозы являются очень распространенными заболеваниями в США, Северной Европе, Скандинавии и Японии (Fukushima H, 2011; MacDonald *et al.*, 2014) и третьим наиболее часто регистрируемым

зоонозом в Европейском Союзе (Rosner *et al.*, 2010), что ведет к значительным экономическим потерям (Quintard *et al.*, 2010). Ежегодно в РФ переболевают псевдотуберкулезом в среднем 3115 и кишечным иерсиниозом 2328 человек, показатель заболеваемости составляет, соответственно, 2,2 и 1,4 на 100 тыс. населения (0/0000) [ЗНиСО, 2017, № 9, С. 59-64].

Доступная к настоящему моменту в России, странах СНГ и Китае живая чумная вакцина на основе аттенуированного штамма *Y. pestis* EV76 не является безопасной. Вакцина эффективно защищает от гибели при бубонной и легочной чуме и индуцирует высокие титры специфических антител, однако вакцинация может вызывать побочные эффекты от легких до тяжелых (Meyer *et al.*, 1974). Иммуногенность и остаточная вирулентность используемых в разных странах живых чумных вакцин сильно отличаются из-за вероятного генетического дрейфа используемых линий штамма EV76 (Meyer *et al.*, 1974, Zhou *et al.*, 2004). Действительно, высокая пластичность генома *Y. pestis* (Anisimov *et al.*, 2004, Parkhill *et al.*, 2001) обусловлена присутствием многочисленных копий инсерционных последовательностей (IS), часто обеспечивающих хромосомные перестройки. Убитые цельноклеточные чумные вакцины, ранее производившиеся в США (USP) и в Австралии (CSL), также реактогенны и вызывают более короткую и менее эффективную защиту по сравнению со штаммом EV76 (Meyer *et al.*, 1974). К настоящему времени созданы несколько субъединичных чумных вакцин, находящихся на разных стадиях испытаний. Большинство из них состоят из специфичного для *Y. pestis* капсульного антигена (фракция I, F1) и/или V антигена (LcrV), который присутствует у всех трех патогенных видов *Yersinia*. Было обнаружено, что такие вакцины эффективно защищают мышей от бубонной и легочной чумы и хорошо переносятся людьми (Anderson *et al.*, 1998, Andrews *et al.*, 1996, Heath *et al.*, 1998, Leary *et al.*, 1995, Simpson *et al.*, 1990, Une *et al.*, 1984, Williamson *et al.*, 1995, Williamson *et al.*, 2005). Однако, из-за существования высоковирулентных природных штаммов возбудителя чумы, лишенных способности продуцировать F1

антиген (Winter *et al.*, 1960) и структурного полиморфизма LcrV *Y. pestis* (Anisimov *et al.*, 2004), было бы неверным включать в состав кандидатных вакцин только эти протективные белки. До настоящего времени мало внимания уделяется созданию вакцин для профилактики иерсиниоза и псевдотуберкулеза. Т.о., разработка средств профилактической вакцинации крайне необходимы для долгосрочной профилактики и борьбы с чумой, иерсиниозом и псевдотуберкулезом.

Живые вакцины имеют несколько преимуществ перед рекомбинантными. Их высокая антигенная сложность гарантирует развитие иммунного ответа против широкого спектра антигенных мишеней. В живых вакцинах антигены присутствуют в своих нативных конформациях, они продуцируются *de novo*, пока бактерии персистируют в макроорганизме, что обеспечивает длительную стимуляцию иммунной системы, нет необходимости в добавлении адьюванта, поскольку бактериальные антигены (липополисахарид и другие патоген-ассоциированные молекулы) естественным образом стимулируют систему врожденного иммунитета. Как правило, живые вакцины вызывают выработку антител и клеточно-опосредованный иммунный ответ. Все это делает их массовое производство экономически целесообразным (Achtman *et al.*, 1999).

Известно, что нуклеотидные последовательности *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* подобны приблизительно на 73 % (Chen *et al.*, 2010). *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* имеют более 90 % генетической идентичности (Chain *et al.*, 2004). Все три вида иерсиний обладают плазмидой pCad (pCD1/pYV), кодирующей систему секреции типа III (Т3SS) (Cornelis, 2006). Геном *Y. pseudotuberculosis* более стабилен, потому содержит меньше копий IS и имеет более широкий диапазон хозяев (грызуны, собаки, кошки, крупный рогатый скот, кролики, олени и люди) (Anisimov *et al.*, 2004, Chain *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2004). Таким образом, на основе аттенуированного штамма *Y. pseudotuberculosis* может быть

разработан вакцинный препарат с пероральной доставкой, который обладает рядом преимуществ по сравнению с парентерально вводимыми вакцинами.

Цель работы: Получение новых сведений о развитии у лабораторных животных видо- и родоспецифичного иммунитета после орального введения живого аттенуированного штамма возбудителя псевдотуберкулеза.

Задачи исследования:

1. Выбрать и охарактеризовать штамм *Y. pseudotuberculosis*.
2. Провести аттенуацию выбранного штамма *Y. pseudotuberculosis* путем делеции генов, отвечающих за вирулентность, методом сайт-направленного мутагенеза.
3. Методами генной инженерии оптимизировать структуру липополисахарида, понизив его эндотоксическую активность, но сохранив адьювантные свойства.
4. Сконструировать штамм *Y. pseudotuberculosis*, стабильно продуцирующий капсульный антиген *Y. pestis*.
5. Оценить остаточную вирулентность, реактогенность, иммуногенную активность сконструированного штамма *Y. pseudotuberculosis* при оральном применении на нескольких животных моделях.

Предполагаемая научная новизна:

Будет изучена перспективность использования различных молекулярных мишеней для снижения остаточной вирулентности штамма возбудителя псевдотуберкулеза. Будет изучена возможность создания видо- и родоспецифичного иммунитета после введения полученного генетически стабильного аттенуированного рекомбинантного штамма *Y. pseudotuberculosis*.

Ожидаемая теоретическая значимость:

Полученные в рамках диссертационного исследования данные о формировании перекрестного иммунитета при использовании живых аттенуированных штаммов *Y. pseudotuberculosis* для специфической профилактики заболеваний, вызываемых патогенными представителями рода

Yersinia, приведут к более глубокому пониманию молекулярных механизмов патогенеза инфекций бактериальной этиологии и микроэволюции их возбудителей.

Предлагаемые методы исследования: В работе будут использованы микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические, иммунологические и биоинформационные методы, а также методы статистической обработки данных.

Возможность открытой публикации: если в ходе выполнения исследования будут получены сведения, составляющие государственную тайну, то они будут исключены из диссертации.

Научный руководитель _____

Аспирант _____

« _____ » _____ 20 ____ г.

РАБОЧИЙ ПЛАН

**1 полугодие 1 года обучения [2020/2021 учебный год]
С 01.10.2020 по 30.03.2021 гг.**

Наименование элемента программы	Содержание работы	Сроки выполнения	Форма контроля	Срок контроля
Блок 1. «Дисциплины [модули]»				
Биологическая безопасность микробиологических и бактериологических исследований	Лекционный курс	Октябрь, 2020 – март, 2021	экзамен	Март, 2021
Общая микробиология	Лекционный курс	Октябрь, 2020 – январь, 2021	Зачет с оценкой	Март, 2021
Методы микробиологических исследований	Лекционный курс	Октябрь, 2020 – декабрь, 2020	зачет	Март, 2021
Английский язык	Семинарские [практические занятия]	февраль – март, 2021	зачет	Март, 2021
История и философия науки	Семинарские и лекционные занятия	февраль – март, 2021	зачет	Март, 2021
Блок 3. «Научные исследования»				
Научно-исследовательская работа	выбор и обоснование темы исследования	01.10.2020 – 23.12.2020	Обсуждение с научным руководителем	23.12.2020
	утверждение темы исследования	15.01.2020 – 28.02.2021	Ученый совет ФБУН ГНЦ ПМБ	10.03.2021

	утверждение индивидуального учебного плана	15.01.2020 – 28.02.2021	Ученый совет ФБУН ГНЦ ПМБ	10.03.2021
	участие в конференциях, публикации	В течение семестра	Служебная записка от научного руководителя, копии сертификатов участника	Март, 2021

Аспирант
Научный руководитель
20 ____ г.

« ____ » _____ 20 ____ г.
« ____ » _____

РАБОЧИЙ ПЛАН

2 полугодие 1 года обучения [2020/2021 учебный год]
С 01.04.2021 по 30.09.2021 гг.

Наименование элемента программы	Содержание работы	Сроки выполнения	Форма контроля	Срок контроля
Блок 1. «Дисциплины [модули]»				
Английский язык	Семинарские [практические занятия]	Апрель – июнь, 2021	кандидатский экзамен	Июнь, 2021
История и философия науки	Семинарские и лекционные занятия	Апрель – июнь, 2021	кандидатский экзамен	Июнь, 2021
Блок 3. «Научные исследования»				
Научно-исследовательская работа	Работа с литературой по теме научно-квалификационной работы	до 29.05.2021 г.	Обсуждение с научным руководителем проекта раздела «Обзор литературы» научно-квалификационной работы	Сентябрь, 2021
	Освоить методы постановки иммуноферментного анализа	Апрель - май, 2021	Отчет об освоении метода	Май, 2021
	Освоить метод проведения иммуноблота	Апрель-июнь, 2021	Отчет об освоении метода	Сентябрь, 2021
	Выбрать и охарактеризовать штамм <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Апрель-сентябрь, 2021	Отчет по НИР	Сентябрь, 2021
	Участие в работе научно-практической конференции	Апрель-сентябрь, 2021	Копия опубликованных тезисов	Сентябрь, 2021 г
Подготовка научно-квалификацион	Работа над главой научно-квалификационн	Июль-август, 2021	Проект главы «Обзор литературы»	Сентябрь, 2021г.

-ной работы	й работы «Обзор литературы»			
-------------	-----------------------------	--	--	--

Аспирант

«_____» _____

20____ г.

Научный руководитель

«_____» _____

20____ г.

РАБОЧИЙ ПЛАН

3 полугодие 2 года обучения [2021/2022 учебный год]
С 01.10.2021 по 30.03.2022 гг.

Наименование элемента программы	Содержание работы	Сроки выполнения	Форма контроля	Срок контроля
Блок 1. «Дисциплины [модули]»				
Микробиология бактериальных патогенов	Лекционный курс	Октябрь, 2021 – февраль, 2022	Зачет с оценкой	Март, 2022
Методика преподавания в высшей школе	Лекционный курс	Октябрь-декабрь, 2021	Экзамен	Март, 2022
Блок 2. «Практики»				
Педагогическая практика	Практические занятия	Декабрь, 2021	зачет	Март, 2022
Блок 3. «Научные исследования»				
Научно-исследовательская работа	Теоретическая работа: продолжение работы с литературой по теме научно-квалификационной работы, дополнение раздела «Обзор литературы», работа над разделом НКР «Материалы и методы»	01.10.2021-30.03.2022	Обсуждение с научным руководителем	Март, 2022
	Экспериментальная работа: провести аттенуацию штамма путем делеции генов, отвечающих за вирулентность, методом сайт-направленного мутагенеза	01.10.2020-26.02.2021	Предоставление информации о результатах выполненной работы в виде справки,	Март, 2022

			подписанно й научным руководите- лем; устный отчет на лабораторн ом семинаре; отчет об освоении методов	
	Участие в конференциях, публикации	В течение семестра	Копия опубликова н-ных тезисов	Март, 2021
	Выступление с отчетом по НИР	Март, 2022	Отчет по НИР и выписка из протокола межлаборат орного семинара о заслушива- нии отчета	Март, 2022 г.

Аспирант

« _____ » _____

20 ____ г.

Научный руководитель

« _____ » _____

20 ____ г.

РАБОЧИЙ ПЛАН

4 полугодие 2 года обучения [2021/2022 учебный год]
С 01.04.2022 по 30.09.2022 гг.

Наименование элемента программы	Содержание работы	Сроки выполнения	Форма контроля	Срок контроля
Блок 1. «Дисциплины [модули]»				
Методы микробиологических исследований	Лекционный курс	Апрель-июнь, 2022	Экзамен	Июнь, 2022 г.
Основы медицинской биотехнологии	Лекционный курс	Апрель-июнь, 2022	Экзамен	Июнь, 2022 г.
Блок 2. «Практики»				
-	-	-	-	-
Блок 3. «Научные исследования»				
Научно-исследовательская работа	Теоретическая работа: дополнение обзора, обновление ссылок, план раздела НКР «Материалы и методы»	01.04.2022 - 01.06.2022	Проект плана раздела НКР «Материалы и методы»	Июнь, 2022
	Экспериментальная работа: Методами генной инженерии оптимизировать структуру липополисахарида, понизив его эндотоксическую активность,	01.04.2022 - 01.07.2022 гг.	Предоставление информации о результатах выполненной работы в виде справки, подписанной научным руководителем	До 15.07.2022

	но сохранив адьювантные свойства			
	Участие в конференциях, публикации	В течение семестра	Копия опубликованных тезисов, документы, подтверждающие участие в работе конференций	Сентябрь, 2022
	Выступление с отчетом по НИР	Сентябрь, 2022	Отчет по НИР, выписка из протокола межлабораторного семинара о заслушивании и отчета	Сентябрь, 2022
Подготовка научно-квалификационной работы	Оформление главы «Материалы и методы» научно-квалификационной работы	июль, 2022	Проект главы «Материалы и методы» научно-квалификационной работы	Сентябрь, 2022

Аспирант

« _____ » _____

20____ г.

Научный руководитель

« _____ » _____

20____ г.

РАБОЧИЙ ПЛАН

5 полугодие 3 года обучения [2022/2023 учебный год]
С 01.10.2022 по 30.03.2023 гг.

Наименование элемента программы	Содержание работы	Сроки выполнения	Форма контроля	Срок контроля
Блок 1. «Дисциплины [модули]»				
-	-	-	-	-
Блок 2. «Практики»				
-	-	-	-	-
Блок 3. «Научные исследования»				
Научно-исследовательская работа	Продолжение работы над разделом «Материалы и методы» научной работы и раздела «Экспериментальная часть»	01.10.2022-30.03.2023.	Дополнение проекта раздела «Материалы и методы» научной работы	Март, 2023
	Экспериментальная работа: сконструировать штамм <i>Y. pseudotuberculosis</i> , стабильно продуцирующий капсульный антиген <i>Y. pestis</i>	01.10.2022-30.03.2023	Предоставление информации о результатах выполненной работы в виде справки, подписанной научным руководителем	Март, 2023
	Участие в конференциях, публикации	В течение семестра	Копии опубликованных тезисов, документы, подтверждающие участие в работе конференций	Март, 2023
	Подготовка статьи в журнал	Январь-февраль,	Рукопись статьи по	Март, 2023

	ВАК по результатам НИР	2023	результатам НИР, либо заключение экспертной комиссии	
	Выступление с отчетом по НИР	Март, 2023	Отчет по НИР и выписка из протокола межлабораторного семинара о заслушивании отчета	Март, 2023

Аспирант

« _____ » _____

20____ г.

Научный руководитель

« _____ » _____

20____ г.

РАБОЧИЙ ПЛАН

6 полугодие 3 года обучения [2022/2023 учебный год]
С 01.04.2023 по 30.09.2023 гг.

Наименование элемента программы	Содержание работы	Сроки выполнения	Форма контроля	Срок контроля
Блок 1. «Дисциплины [модули]»				
Микробиология	Самостоятельная работа по подготовке к сдаче кандидатского экзамена по микробиологии	Июнь, 2023 г.	Кандидатский экзамен по специальности микробиология [03.02.03]	Сентябрь, 2023 г.
Блок 3. «Научные исследования»				
Научно-исследовательская работа	Теоретическая работа: составление плана глав, касающихся экспериментальной части	01.04.2023 - 10.05.2023	Проект плана экспериментальной главы НКР	10.05.2023
	Экспериментальная работа: освоить метод постановки вертикального электрофореза в полиакриламидном геле. Провести анализ полученного ранее белка	01.04.2023 - 01.07.2023	Отчет об освоении методов	Июль, 2023
	Участие в конференциях, публикации	В течение семестра	Копии тезисов	Сентябрь, 2023
	Сдача подготовленно	Апрель-май, 2023	Препринт статьи, или	Сентябрь, 2023

	й статьи в редакцию журнала		документ, подтверждающий принятие статьи в печать	
	Выступление с отчетом по НИР	Сентябрь, 2023	Отчет по НИР и выписка из протокола межлабораторного семинара о заслушивании отчета	Сентябрь, 2023
Подготовка научно-квалификационной работы	Оформление экспериментальной главы НКР	Июль, 2023 г.	Проект экспериментальной части НКР, согласно разработанного плана	Сентябрь, 2023 г.

Аспирант

« _____ » _____

20____ г.

Научный руководитель

« _____ » _____

20____ г.

РАБОЧИЙ ПЛАН

7 полугодие 4 года обучения [2023/2024 учебный год]
С 01.10.2023 по 30.03.2024 гг.

Наименование элемента программы	Содержание работы	Сроки выполнения	Форма контроля	Срок контроля
Блок 3. «Научные исследования»				
Научно-исследовательская работа	Обсуждение с научным руководителем проектов глав научно-квалификационной работы и их редакция	Октябрь 2023 – ноябрь 2023	Изменения и дополнения глав НКР	Декабрь, 2023
	Экспериментальная работа: оценить иммуногенность, протективность и остаточную вирулентность сконструированного штамма <i>Y. pseudotuberculosis</i> при пероральном применении на нескольких животных моделях	Декабрь 2023 – март 2024	Отчет по НИР	Март, 2024
	Участие в конференциях, публикации	В течение семестра	Копии тезисов, препринты статей или др. документы, подтверждающие опубликование	Март, 2024
	Выступление с отчетом по НИР	Март, 2024	Отчет по НИР и выписка из	Март, 2024

			протокола межлабораторн ого семинара о заслушивании отчета	
--	--	--	--	--

Аспирант

20 ____ г.

« ____ » _____

Научный руководитель

20 ____ г.

« ____ » _____

РАБОЧИЙ ПЛАН

8 полугодие 4 года обучения [2023/2024 учебный год]
С 01.04.2024 по 30.07.2024 гг.

Наименование элемента программы	Содержание работы	Сроки выполнения	Форма контроля	Срок контроля
Блок 3. «Научные исследования»				
Научно-исследовательская работа	Подготовка и оформление результатов, полученных экспериментальных данных для написания НКР.	Апрель – май, 2024	Выводы, полученные в ходе выполнения научно-квалификационной работы	Май, 2024
	Участие в конференциях, публикации	Май – июнь, 2024	Копии опубликованных работ	Июнь, 2024
Подготовка научно-квалификационной работы	Оформление научно-квалификационной работы по требованиям ВАК	Май-июнь, 2024	Распечатанный вариант подготовленной научно-квалификационной работы, выполненной в соответствии с требованиями ВАК и оформленный по ГОСТу	Первая декада июня, 2024
Блок 4. «Государственная итоговая аттестация»				
Подготовка к Государственному экзамену и сдача государственного экзамена	Самостоятельная работа по подготовке к Государственному экзамену	15-30 июня, 2024	Государственный экзамен	Июнь, 2024
Подготовка научного доклада об основных	Подготовка научного доклада и презентации об	Июль, 2024	Предварительная апробация научного доклада на	20 июля, 2024

результатах научно-квалификационной работы	основных результатах, подготовленной НКР [диссертации]		межлабораторном семинаре	
Представление научного доклада об основных результатах научно-квалификационной работы		Июль, 2024	Представление научного доклада на Государственной итоговой аттестации	Конец июля, 2024

Аспирант

« _____ » _____ 20____

Научный руководитель

« _____ » _____

20____ г.