

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 350.002.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 21.12.2018 г. № 18
о присуждении Шишкиной Лидии Александровны, гражданину РФ, ученой
степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Влияние полиморфизма капсульного антигена *Yersinia pestis* на иммунодиагностику и вакцинопрофилактику чумы» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 03.10.2018 г., протокол № 12 диссертационным советом Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, Оболенск, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Шишкина Лидия Александровна 1991 г. рождения, в 2014 г. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Челябинский государственный университет» по специальности «Биология» и по специальности «Медицинская микробиология». В период с 01 октября 2016 г. по 30 сентября 2017 г. обучалась в аспирантуре в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации на заочной форме обучения. Работает младшим научным сотрудником в

Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Диссертация выполнена в лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций, а также в отделе коллекционных культур Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Научные руководители – доктор медицинских наук Дентовская Светлана Владимировна, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций, главный научный сотрудник;

кандидат биологических наук Богун Александр Геннадьевич, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, отдел коллекционных культур, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Саяпина Лидия Васильевна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, управление экспертизы противобактериальных иммунобиологических препаратов, главный эксперт;

Попов Юрий Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, отдел образовательных программ и подготовки специалистов, главный научный сотрудник,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, в своем положительном Заключении, подписанном доктором биологических наук Дубровиной Валентиной Ивановной, заведующей лабораторией патофизиологии, а также доктором биологических наук, старшим научным сотрудником Марковым Евгением Юрьевичем, заведующим биохимическим отделом, указала, что диссертация Шишкиной Л.А. является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой представлены новые данные о распространенности структурного полиморфизма капсульного антигена в основных внутривидовых группах *Y. pestis*, а также установлена степень перекрестной иммунологической активности и протективности изоформ Caf1, необходимая для совершенствования лабораторной диагностики, специфической профилактики и эпидемиологического мониторинга за заболеваемостью чумой. По объему проведенных исследований, их новизне и научно-практической значимости работа соответствует всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями от 21.04.2016г. № 335 «О внесении изменений в «Положение о порядке присуждения ученых степеней»), в части требований, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а автор

заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 — микробиология.

Соискатель имеет **22** опубликованных работы, в том числе по теме диссертации - **12** работ, из которых опубликованных в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК - **5** статей, и 7 тезисов в материалах конференций. Объем опубликованных статей составляет 5,06 п.л., авторский вклад соискателя составляет 70 %.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Кадникова***, Л.А. Капсульный антиген чумного микроба / Л.А. Кадникова, П.Х. Копылов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Инфекция и иммунитет. – 2015. – Т. 5, № 3. – С. 201–218. Цит. РИНЦ = 6. IF = 0.781.

2. Kislichkina, A.A. Nineteen Whole-Genome Assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *Microtus*, Including Representatives of bv. caucasica, talassica, hissarica, altaica, xilingolensis, and ulegeica / A.A. Kislichkina, A.G. Bogun, **L.A. Kadnikova***, N.V. Maiskaya, M.E. Platonov, N.V. Anisimov, E.V. Galkina, S.V. Dentovskaya, A.P. Anisimov // GenomA. – 2015. – Vol. 3. Цит. Scopus = 10. Цит. РИНЦ = 11.

3. Kopylov, P.Kh. *Yersinia pestis* Caf1 protein: Effect of sequence polymorphisms on intrinsic disorder propensity, serological cross-reactivity and cross-protectivity of isoforms / M.E. Platonov, V.G. Ablamunits, T.I. Kombarova, S.A. Ivanov, **L.A. Kadnikova***, A.N. Somov, S.V. Dentovskaya, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // PLOS ONE. – 2016. – Vol. 8. IF = 2.806.

4. Кисличкина, А.А. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновного подвидов и других представителей *Yersinia pseudotuberculosis* complex / А.А. Кисличкина, **Л.А. Кадникова***, М.Е. Платонов, Н.В. Майская, Л.В. Коломбет, А.Г. Богун, А.П. Анисимов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2017. – №. 2. – С. 43-48. Цит. РИНЦ = 1.

Примечание: * - Кадникова – фамилия Шишкиной Л.А. до 17.02.2018 г.

На диссертацию и автореферат поступили 6 положительных отзывов от: (1) д-ра мед. наук, профессора, Заслуженного деятеля науки РФ, лауреата Государственной премии СССР **Тимченко Нэлли Федоровны**, ведущего научного сотрудника НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток – без замечаний; (2) д-ра мед. наук, профессора

Бывалова Андрея Анатольевича, старшего научного сотрудника Центра превосходства «Фармацевтическая биотехнология» Вятского государственного университета, г. Киров - в качестве недочетов отмечена недостаточно четкая формулировка актуальности выбранного направления исследований, немногочисленные невыправленные опечатки по тексту;

(3) д-ра мед. наук, профессора **Федоровой Валентины Анатольевны**, заведующей лабораторией молекулярной биотехнологии и нанобиотехнологий, заместителя директора филиала по НИР Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института – Филиала Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии, г. Саратов – содержит вопрос относительно правомерности использования термина «вакцинация» в случае иммунизации лабораторных животных изоформами Caf1, т.е. антигенами, а не коммерческой или экспериментальной вакциной;

(4) д-ра мед. наук, профессора **Харсеевой Галины Георгиевны**, заведующей кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 Ростовского государственного медицинского университета Минздрава РФ, г. Ростов-на-Дону – без замечаний;

(5) канд. мед. наук, **Ефременко Дмитрия Витальевича**, врача-эпидемиолога лаборатории эпидемиологии ФКУЗ Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора, г. Ставрополь – без замечаний.

(6) д-ра мед. наук, профессора **Хараевой Заиры Феликсовны**, заведующей кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии медицинского факультета Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х.М. Бербекова, г. Нальчик – без замечаний.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что:

доктор мед. наук Саяпина Лидия Васильевна является признанным специалистом в области микробиологии, иммунологии, лабораторной диагностики, вакцинопрофилактики чумы, экспертизы противобактериальных иммунобиологических препаратов и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Шишкиной Л.А. (Проб. О. О. И. - 2018. - № 1. - С. 98-102; Мед. Им. - 2017. - Т. 19. - С. 276-277;

Проб. О. О. И. - 2017. - № 4. - С. 77-80; Проб. О. О. И. - 2016. - № 2. - С. 107-110; Meth. in mol. biol. (Clifton, N.J.). - 2016. - Vol. 1403. - P. 487-498; Проб. О. О. И. - 2015. - № 2. - С. 87-91; Проб. О. О. И. - 2015. - № 4. С. 83; Emerg. Microb. Inf. - 2014. - Vol. 3, No. 12. - e 86);

доктор биол. наук, профессор Попов Юрий Алексеевич является высококомпетентным специалистом в сфере микробиологии и молекулярной биологии особо опасных инфекций и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Шишкиной Л.А. (**Инф. Бол.: новости, мнения, обучение. - 2018. - Т. 7 - № 1(24). - С. 28-34; 2017. - № 5(22). - С. 22-27; Проб. О. О. И. - 2017. - № 2. - С. 45-49; 2017. - № 4. - С. 45-49; 2014. - № 3. - С. 38-41; Жур. Микробиол. Эпидем. Иммунобиол. - 2016. - № 6. - С. 100-108; 2014. - № 4. - С. 22-30; Пат. RUS 2514663 19.02.2013).**

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области изучения геномного полиморфизма патогенных бактерий, молекулярной эпидемиологии особо опасных инфекций, микробиологии, лабораторной диагностики и вакцинопрофилактики чумы, а также наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Шишкиной Л.А. (**Бюлл. Экс. Биол. Мед -. 2016. - Т. 162.- №10. - С. 465-469; 2018. – Т.165. - С.202-206; Бюлл. Вост.-Сиб. Науч. Центра Сиб. Отд. РАМН. - 2016. - Т. 1. - №5(111). - С.133-137; Мед. Параз. Паразит. Бол. - 2016.- № 1. - С. 38-41; 2017. - №4. - С.20-29; Ген. - 2016. - Т. 52. - №: 9.- С. 1012-1020; Эпид. и Вакцинопроф.- 2017. - №5(96). С.58-61; 2017.- №3(94).- С. 84-89; 2017. - Т. 16.- №2(93). С. 45-48; Инфек. бол. - 2017. - Т.15. - №51.- С.90; Проб. О. О. И. - 2017. - №93. - С. 41-44; 2018. - Вып. 2. – С. 6-13; Жур. Микробиол. Эпидем. Иммунобиол. - 2017. - №.1. - С. 55-61).**

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан комплексный подход к изучению изоформ *Cafl* чумного микроба на основе анализа молекулярно-генетических характеристик *cafl*

оперонов, изучения физико-химических и пространственных свойств белков, а также степени перекрестной серологической активности и протективности;

предложено использование специфического для отдельных филогенетических групп *Y. pestis* полиморфизма генов, кодирующих компоненты шаперон/ашерных систем секреции, для идентификации и определения биварной принадлежности изолятов чумного микроба;

доказано, что белок Caf1 существует в трёх изоформах: глобальный тип NT1 (A48 F117) у штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* и subsp. *microti* bv. *altaica*, *qinghaiensis*, *hissarica*, *talassica*; NT2 тип (S48 F117), характерный для штаммов Закавказского высокогорного и Приараксинского низкогорного природных очагов чумы; и впервые обнаруженный NT3 тип (A48 V117), эндемичный для штаммов Дагестанского высокогорного природного очага чумы;

введены основы для дальнейшего совершенствования иммунодиагностики и вакцинопрофилактики чумы.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказана степень популяционной изменчивости капсульного антигена и компонентов других шаперон/ашерных систем секреции в основных филогенетических группах чумного микроба; полученные в рамках работы данные о капсульном антигене *Y. pestis*, влиянии изменений его структуры на биологические свойства бактерий, дополняя друг друга и способствуя более глубокой взаимной интерпретации, способствуют пониманию молекулярных механизмов патогенеза чумы и микроэволюции *Y. pestis*;

применительно к проблематике диссертации результативно, то есть с получением обладающих новизной результатов, использован комплекс существующих базовых методов: микробиологических (культивирование, аттенуация штаммов); молекулярно-генетических (выделение бактериальной ДНК, ПЦР, секвенирование по Сенгеру, полногеномное секвенирование); иммунологических (твёрдофазный ИФА, ИХ-тест); биологических (иммунизация животных, заражение вирулентными штаммами); биохимических (гидрофобная хроматография); биоинформационных методов

(выявление внутренней неупорядоченности фолдинга, моделирование двухмерной и трёхмерной структуры, анализ секвенированных последовательностей, депонирование последовательностей в международные базы данных); статистической обработки данных;

изложены доказательства того, что иммунитет, индуцированный введением изоформы Caf1NT1, достаточен для надежной защиты при заражении штаммами *Y. pestis*, продуцирующими эндемичные изоформы Caf1NT2 и Caf1NT3;

раскрыта эффективность отечественных коммерческих диагностикумов, пригодных для индикации штаммов чумного микроба, продуцирующих любую из трех изоформ капсульного антигена;

изучена пространственная структура изоформ капсульного антигена *Y. pestis* и выявлено увеличение склонности к местной внутренней неупорядоченности в коротких регионах белка, окружающих аминокислотных замены, произошедшие в Caf1_{NT2} (A48→S48) и Caf1_{NT3} (F117→V117);

проведена модернизация процесса гидрофобной хроматографии с установлением параметров, оптимальных для выделения изоформ капсульного антигена.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработан и внедрен раздел учебной Программы дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при ФБУН ГНЦ ПМБ (Справка № 73 от 26 октября 2017 г.) - учрежденческий уровень внедрения;

определены возможности практического использования препаратов капсульного антигена возбудителя чумы для получения миниантител в группе иммунохимии Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Акт внедрения от 22.10.2018 г.) – региональный уровень внедрения;

созданы два аттенуированных штамма чумного микроба для выделения эндемичных изоформ Caf1NT2 и Caf1NT3 капсульного антигена, депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» – федеральный уровень внедрения;

представлены в международную базу данных GenBank полногеномные нуклеотидные последовательности 19 штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* – международный уровень внедрения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты экспериментальной работы были получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов в разных условиях, задействованы современные методы исследований, работы проводились согласно существующим российским и международным протоколам;

теория исследования согласуется с экспериментальными данными, опубликованными исследователями в русскоязычных и англоязычных литературных источниках;

идея диссертационного исследования базируется на анализе и обобщении передового международного опыта в области изучения патогенеза и иммуногенеза чумы, микроэволюции *Y. pestis*;

использовано сравнение данных, полученных автором в ходе исследования, с представленными в научной литературе;

установлено качественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике: высокая степень консервативности нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих факторы патогенности у эпидемических штаммов чумного микроба, и полиморфизм, свойственный эндемичным – полевоочьим штаммам; значимость капсульного антигена *Y. pestis* для лабораторной диагностики и вакцинопрофилактики чумы; роль продуктов шаперон/ашерных систем секреции штаммов чумного микроба основного подвида в патогенезе чумы;

использованы современные методы получения и обработки информации.

Личный вклад соискателя состоит в:

проведении автором лично работ по культивированию штаммов; выделению ДНК; проведении секвенирования по Сенгеру и полногеномного секвенирования, изучении двухмерной и трехмерной структуры белков, выделении и очистке изоформ капсульного антигена, определении перекрестной иммунореактивности в иммуноферментном анализе и иммунохроматографическом тесте, вакцинации лабораторных животных, определении титров анти-Cafl антител в сыворотках лабораторных животных, биоинформационном анализе нуклеотидных последовательностей изучаемых генов и геномов; депонировании результатов в базу данных GenBank. Кроме того, автор принимала участие в изучении протективности на биологических моделях, аттенуации штаммов, в изучении внутренней неупорядоченности фолдинга разных изоформ белка, в подготовке материалов к публикации в научных журналах и представлению на конференциях.

На заседании 21.12.2018 г. диссертационный совет принял решение присудить Шишкиной Лидии Александровне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **15** человек, из них **7** докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология, участвовавших в заседании, из человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **15**, против – **нет**, недействительных бюллетеней – **нет**.

Председатель
диссертационного совета _____ (Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета _____ (Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 21.12.2018 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.

