



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

Федеральное казенное учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного  
Знамени научно-исследовательский  
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

**ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора**

664047 Иркутск, Трилиссера, 78

Тел. 22-01-35, факс 22-01-40

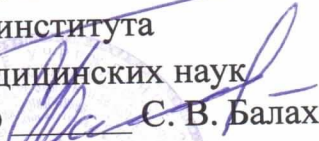
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

<http://www.irkutsk.ru/chumin>

ОКПО 01898090, ОГРН 1023801543017

ИНН/КПП 3811015807/381101001

**УТВЕРЖДАЮ:**

Директор института  
доктор медицинских наук  
профессор  С. В. Балахонов

« 29 » ноября 2018 г.



№ \_\_\_\_\_  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_ г.

**О т з ы в**

ведущей организации

о научно-практической значимости диссертационной работы

Шишкиной Лидии Александровны

«Влияние полиморфизма капсульного антигена *Yersinia pestis* на  
иммунодиагностику и вакцинопрофилактику чумы», представленной на  
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности:  
03.02.03 – микробиология

**Актуальность темы выполненной работы** определяется тем, что чума и в настоящее время остается опасной природно-очаговой инфекцией, способной к эпидемическому распространению, эрадикация которой не представляется возможной в силу существования природных очагов во многих регионах мира, включая Российскую Федерацию и сопредельные страны. Возбудитель чумы, *Yersinia pestis*, относится к наиболее опасным агентам биотерроризма. Существующие живые и убитые вакцины недостаточно эффективны, особенно в случае аэрозольного заражения. Многие из факторов патогенности чумного

микроба изучены не полностью, в частности, не известен механизм избирательной вирулентности штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*. Одним из основных факторов патогенности и протективных антигенов возбудителя чумы является капсульный антиген (CafI, F1), биогенез которого осуществляется по консервативному шаперон/ашерному пути. Однако до последнего времени не было установлено, влияет ли, и если влияет, то каким образом, предполагаемая вариабельность аминокислотной последовательности белка CafI на вирулентность штаммов и протективные свойства этого антигена. Сформулировав рабочую гипотезу о том, что полиморфизм аминокислотной последовательности белка CafI может обеспечивать его разные структурно-конформационные состояния и соответственно, иммуногенность и протективность, диссертант поставила цель – провести структурно-функциональный и генетический анализ CafI антигена *Y. pestis* для рационального конструирования субъединичных противочумных вакцин, выработки напряженного противочумного иммунитета и создания диагностических препаратов. Кроме *cafI* оперона геном *Y. pestis* содержит еще девять генетических кластеров, продукты которых образуют шаперон/ашерные системы секреции (ШАСС). Поиск *in silico* возможного полиморфизма остальных генов *cafI* оперона и генов, кодирующих компоненты других ШАСС у штаммов, представляющих различные внутривидовые группы *Y. pestis*, и их прародителя *Yersinia pseudotuberculosis*, также не осуществлялся.

Таким образом, актуальность работы не вызывает сомнения ввиду явно недостаточных сведений о структуре вариантов CafI и насущной потребности в эффективных вакцинах против чумы, а также отсутствии сведений о полиморфизме компонентов шаперон/ашерных систем секреции у штаммов неосновного подвида чумного микроба, как возможных мишеней для лабораторной диагностики и поиска факторов «избирательной» вирулентности.

**Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства.**

Диссертационная работа Шишкиной Лидии Александровны выполнена в

рамках проекта Российского Научного Фонда № 14-15-00599 «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоочьих штаммов *Yersinia pestis*», а также в рамках темы НИР «Совершенствование нормативно-методической базы процедуры депонирования штаммов патогенных микроорганизмов, клеточных культур и результатов их исследований в государственных коллекциях Роспотребнадзора» Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по государственному контракту № 12-д от 25.09.2015 г.

**Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации.**

На основании анализа аминокислотных последовательностей белка CafI, выполненного для представительной коллекции штаммов чумного микроба неосновного подвида, пополнены научные знания о степени популяционной изменчивости капсульного антигена в основных внутривидовых филогенетических группах возбудителя чумы. Автором установлено, что классическая изоформа белка CafI<sub>NT1</sub> характерна для штаммов *Y. pestis* подвида *microti* биоваров *altaica*, *qinghaiensis*, *hissarica*, *talassica* и *ulegeica*. Изоформа CafI<sub>NT2</sub> обнаружена у штаммов из Закавказского высокогорного и Приараксинского низкогорного природных очагов чумы. Впервые выявлена изоформа CafI<sub>NT3</sub>, эндемичная для штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* из Дагестанского высокогорного природного очага чумы. Впервые экспериментально подтверждено, что три изоформы CafI способны индуцировать перекрёстный иммунитет, и определена степень перекрёстной иммунохимической активности белка. Впервые осуществлено полногеномное секвенирование штаммов bv. *caucasica* из Дагестанского высокогорного природного очага чумы, а также изолятов bv. *hissarica*, bv. *talassica* и bv. *ulegeica*. Автором установлено, что специфический для отдельных филогенетических групп чумного микроба полиморфизм генов, кодирующих

компоненты ШАСС (систем секреции IV типа), может быть использован для идентификации и определения биоварной принадлежности изолятов чумного микроба.

**Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации.**

Наиболее значимым научно-практическим результатом выполненной Шишкиной Лидией Александровной диссертационной работы является доказательство того, что коммерческие диагностические препараты способны обеспечить эффективную индикацию/идентификацию, а вакцина чумная живая сухая – напряженный иммунитет в отношении любых инфраструктурных таксонов *Y. pestis*, независимо от продуцируемых ими изоформ капсульного антигена.

Депонированные в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» два аттенуированных в ходе исследования штамма *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *caucasica*, синтезирующих изоформы Caf1<sub>NT2</sub> и Caf1<sub>NT3</sub> капсульного антигена чумного микроба могут быть использованы в качестве продуцентов белка. Выделенные препараты Caf1 были использованы для получения миниантител к возбудителю чумы в группе иммунохимии филиала Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Депонированные в базе данных GenBank полногеномные последовательности 19 штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* существенно дополнили количество доступных для исследования геномов представителей неосновного подвида и позволяют проводить исследования в области сравнительной геномики и изучения филогенетических связей российских штаммов возбудителя чумы со штаммами, выделенными на территории сопредельных государств, а также в других природных очагах инфекции.

**Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.**

Методология и цель исследования соответствует заявленной теме

диссертации, а поставленные задачи позволили раскрыть ее суть. Результаты исследования получены с использованием современного поверенного и сертифицированного оборудования, позволяющего документально регистрировать изучаемые объекты и явления. Достаточный объем фактического материала, наличие соответствующих контролей, статистический анализ полученных результатов определяют степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, представленных в диссертации.

Основные результаты диссертации опубликованы в 12 научных работах, из них 7 – в международных и отечественных рецензируемых журналах. Материалы диссертации доложены и представлены на российских и международных научных конференциях.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов научной работы.**

Результаты диссертационного исследования Л.А. Шишкиной могут быть рекомендованы к использованию в практической деятельности клиничко-диагностических лабораторий, вовлеченных в систему эпидемиологического надзора за чумой, а также научно-исследовательских организаций, осуществляющих разработку диагностических тест-систем для индикации и идентификации чумного микроба и средств специфической профилактики чумы.

#### **Общая характеристика работы.**

Диссертация Л.А. Шишкиной является законченным, логически выстроенным научным трудом, имеет традиционную структуру, и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Результаты собственных исследований и их обсуждение», «Заключение», а также представлены выводы и список использованных источников, который включает 185 научных работ отечественных и зарубежных авторов. Работа изложена на 163 страницах машинописного текста, иллюстрирована 22 рисунками и 10 таблицами.

Обзор литературы дает представление как о современном уровне научных знаний о структуре и функциях капсульного антигена и других компонентов шаперон/ашерных систем секреции чумного микроба, генетической

вариабельности гена *caf1*, его иммуногенности и проблеме иммунопрофилактики чумы, так и об уровне научной эрудиции соискателя. Анализ в заключении по обзору литературы проявляет суть проблемы и служит обоснованием цели и задач диссертации.

Раздел «Материалы и методы» свидетельствует о том, что в работе использованы адекватные поставленным задачам современные микробиологические, молекулярно-биологические, генетические, биохимические, иммунологические методы и биоинформационные технологии, исследовано достаточное для получения достоверных результатов количество штаммов чумного микроба.

В главе 3 «Сравнение молекулярно-генетических, физико-химических и структурно-пространственных свойств изоформ Caf1, выявление отличий» описано секвенирование гена *caf1* у 122 штаммов разных внутривидовых групп *Y. pestis*, подробно охарактеризован полиморфизм соответствующих аминокислотных последовательностей белка Caf1 и разделение на группы в соответствии с полиморфизмом аминокислотных остатков, проведено компьютерное моделирование двухмерных, трехмерных структур выявленных изоформ белка и поиск влияния аминокислотных замен на внутреннюю неупорядоченность фолдинга. В ходе исследования проведена аттенуация двух штаммов, продуцентов изоформ белка Caf1<sub>NT2</sub> и Caf1<sub>NT3</sub>, выделены и очищены три изоформы Caf1 в количествах достаточных для изучения иммунологической активности и протективности.

Глава 4 «Изучение иммуногенной активности трех изоформ Caf1 *Y. pestis*» обосновывает возможность использования препарата глобально распространенной изоформы Caf1<sub>NT1</sub> *Y. pestis* как основы субъединичной вакцины против чумы и основного компонента иммунодиагностических препаратов.

Глава 5 «Полиморфизм нуклеотидных последовательностей шаперон/шерных систем секреции *Y. pestis*» посвящена проведению полногеномного секвенирования 19 штаммов *Y. pestis* подвида *microti* шести

биоваров: *ulegeica*, *caucasica*, *xilingolensis*, *hissarica*, *talassica*, *altaica* и поиску variability продуктов ШАСС у штаммов *Y. pestis* различных внутривидовых групп. Автор предлагает использовать выявленный специфический полиморфизм генов, кодирующих системы секреции IV типа, в качестве дополнительных критериев для идентификации и определения биоварной принадлежности штаммов чумного микроба.

Заключение подводит итог проделанной работе, в нем обобщены и проанализированы полученные данные. Выводы, представленные автором, полностью отражают полученные результаты диссертационного исследования и соответствуют поставленным задачам. Текст диссертации достаточно иллюстрирован, что облегчает восприятие материала.

**Диссертационная работа Л.А. Шишкиной соответствует отрасли науки «Биологические науки» и паспорту специальности 03.02.03 – «Микробиология» в областях исследований по пунктам 1 – «Проблемы эволюции микроорганизмов, установление их филогенетического положения», 2 – «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов», 3 – «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов».**

**Личное участие автора** заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, в выполнении микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, биологических экспериментов, анализе полученных результатов, в подготовке публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с сотрудниками лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций 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.

#### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации.**

В автореферате изложены основные идеи и выводы диссертации, показана новизна и практическая значимость результатов исследования, приведен список

публикаций, в которых отражены основные научные результаты диссертации. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационной работы.

По существу изложенных в диссертационной работе Л.А. Шишкиной материалов принципиальных замечаний нет, в дискуссии адресуем соискателю несколько вопросов:

1. Обладают ли изоформы белка  $\text{Cafl}_{\text{NT2}}$  и  $\text{Cafl}_{\text{NT3}}$  антифагоцитарной активностью?

2. Что можно сказать о токсичности выделенных препаратов трех изоформ капсульного антигена, использованных для иммунизации животных?

### **Заключение.**

Диссертация Шишкиной Лидии Александровны «Влияние полиморфизма капсульного антигена *Yersinia pestis* на иммунодиагностику и вакцинопрофилактику чумы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 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  $\text{Cafl}$ , 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.

Отзыв на диссертацию Шишкиной Лидии Александровны «Влияние



полиморфизма капсульного антигена *Yersinia pestis* на иммунодиагностику и вакцинопрофилактику чумы» обсужден и одобрен на ученом совете ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, протокол № 11 от 29.11.2018 г.

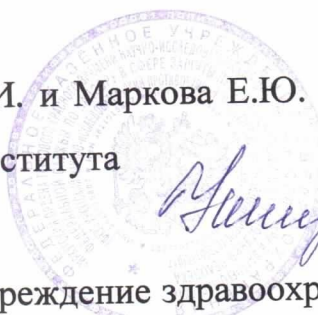
Доктор биологических наук, заведующая лабораторией патофизиологии Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

 В.И. Дубровина

Доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий биохимическим отделом того же института

 Е.Ю. Марков

Подписи Дубровиной В.И. и Маркова Е.Ю. заверяю начальник отдела кадров и спецчасти того же института



 Н.И. Шангареева

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) 664047, Иркутская область, г. Иркутск, ул. Трилиссера, д. 78; Телефон: +7(3952) 22-01-39; Факс: +7(3952) 22-01-40; <http://www.irkutsk.ru/chumin>; E-mail: [adm@chumin.irkutsk.ru](mailto:adm@chumin.irkutsk.ru)