

Отзыв официального оппонента на диссертацию
Шишкиной Лидии Александровны
«Влияние полиморфизма капсульного антигена *Yersinia pestis* на
иммунодиагностику и вакцинопрофилактику чумы»,
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы диссертации

Несмотря на значительные успехи в изучении генома возбудителя чумы, многие параметры изменчивости этого патогена остаются невыясненными. Определение вариабельности генетических детерминант и структурно-функциональной гетерогенности факторов патогенности возбудителя чумы *очевидно* является актуальным направлением научных исследований. Соответственно актуальна и цель рецензируемого исследования, заключающаяся в характеристике полиморфизма капсульного антигена *Yersinia pestis* и его влиянии на эффективность иммунодиагностики чумного микроба и вакцинопрофилактики инфекции.

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

Диссертационная работа Л.А.Шишкиной представляет собой завершённое исследование, выполненное на высоком научно-методическом уровне. Обоснованность научных положений, выносимых на защиту, выводов и рекомендаций подтверждаются корректно проанализированными объективными экспериментальными данными.

Значительный объём исследований, проведенных при использовании комплекса адекватных современных методов позволил последовательно решить стоявшие перед автором задачи, достичь поставленной цели, обосновать все положения, выводы и рекомендации.

Достоверность и новизна исследования и полученных результатов

Степень достоверности результатов исследования основывается на использовании большого фактического материала, полученного в повторяющихся экспериментах и подвергнутого статистической обработке. Достоверность результатов исследования подтверждается табличными и графическими данными, грамотной интерпретацией и, поэтому, не вызывает сомнений. Новизна достигнутых результатов и выводов не противоречит основным сведениям, полученным ранее другими авторами.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций

Определена степень популяционной изменчивости белковой молекулы капсульного антигена Caf1 в основных внутривидовых филогенетических группах чумного микроба. Впервые обнаружена в клетках штаммов из Дагестанского высокогорного природного очага чумы одна из трех идентифицированных изоформ антигена - Caf1_{NT3}.

Экспериментально доказано, что отечественные коммерческие диагностикумы, используемые в иммунохроматографическом экспресс-тесте для серодиагностики чумы («ИХ тест-система *Y. pestis*») и иммуноферментной тест-системе для детекции чумного микроба («ИФАПестФ1- М») пригодны для индикации штаммов чумного микроба, продуцирующих любую изоформу Caf1. Установлено, что изоформы капсульного антигена индуцируют напряженный перекрестный иммунитет; определена степень перекрестной иммунохимической активности. Показано, что иммунитет, индуцированный изоформой Caf1_{NT1}, достаточен для надежной защиты мышей при заражении штаммами *Y. pestis*, продуцирующими изоформы Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} в дозах, соответствующих таковым при укусе блохи.

На основании анализа полногеномных сиквенсов нуклеотидных последовательностей 19 штаммов возбудителя чумы установлено, что из десяти систем секреции IV типа, присутствующих у этого патогена, полиморфизм аминокислотных последовательностей белков, входящих в их

состав, имеется у пяти ашеров, трех шаперонов и трех субъединицах пилевых адгезинов. У двух наиболее биологически важных систем секреции - капсульного и рН 6 антигенов - последовательности аминокислот в молекулах ашеров и шаперонов консервативны.

В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонированы два штамма чумного микроба, являющиеся продуцентами двух изоформ капсульного антигена Саfl_{NT2} и Саfl_{NT3}. Полногеномные нуклеотидные последовательности 19 штаммов *Y. pestis* депонированы в базе данных GenBank. Результаты диссертационной работы используются в лекционных материалах и на практических занятиях при подготовке кадров высшей квалификации и слушателей курсов дополнительного профессионального образования.

Личный вклад автора

Личное участие автора заключалось в подборе и анализе научной литературы, планировании и выполнении микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, биологических экспериментов, обсуждении полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, написании и оформлении статей и тезисов, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 163 листах компьютерного текста, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, раздела «Практические рекомендации», перечня сокращений, условных обозначений, символов, единиц и терминов, списка использованной литературы, включающего 185 источников, в том числе 29 отечественных и 156 - иностранных авторов, списка работ, опубликованных по теме диссертации и трех приложений. Текст иллюстрирован 10 таблицами и 22 рисунками.

Исследования выполнены в рамках плановой НИР, выполняемой по государственному контракту и поддержаны грантом Российского научного

фонда. Результаты исследований Л.А.Шишкиной были доложены на семи российских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 7 статей в международных реферируемых журналах и 5 тезисов в материалах научных конференций.

Содержание диссертации, её завершенность

Во введении автором обоснованы актуальность исследования, сформулированы цель, четыре задачи исследования, приведена информация по новизне, теоретической и практической значимости, степени достоверности и апробации полученных результатов. Четыре положения, выносимые на защиту, отражают результаты работы, их научная весомость соответствует кандидатскому рангу и не вызывают возражений ни по сути, ни по форме изложения. Описана структура диссертации, дана информация о публикациях.

В первой главе диссертационной работы - «Обзоре литературы» - проанализированы данные научных публикаций, касающиеся разных аспектов исследуемой проблемы. Изложены сведения по генетической детерминированности, физико-химических и биологических свойствах капсульного белка чумного микроба, описанию и характеристике шаперон/ашерных систем секреции у патогенных бактерий, в том числе, возбудителя чумы. Обзор основан на использовании большого объема научных данных, изложенных логично и грамотно. Автор диссертации проявляет себя эрудированным специалистом, знающим современную научную литературу. В целом, содержание «Обзора литературы» полностью вводит читающего в курс решаемых диссертантом задач и свидетельствует не только об актуальности темы исследования, но и о том, что диссертант хорошо ее теоретически проработал.

Уместным считаю наличие в этой главе краткого «Заключения», в котором автор делает связку-переход к собственным исследованиям, хотя оно и заканчивается совершенно тривиальным утверждением: «...всестороннее изучение...факторов патогенности...может способствовать

их рациональному использованию в качестве...мишеней для диагностики, профилактики и лечения...болезней». Таким образом, представленный обзор литературы, в котором достаточно обстоятельно освещены основные вопросы, относящиеся к предмету исследований соискателя, заслуживает положительной оценки. Однако, следует тут же заметить, что в разделе 1.1 («Основные сведения о *Y.pestis*») речь идет почти исключительно о чумной инфекции, а не о ее этиологическом агенте, а в разделе 1.7 («Иммуногенные свойства *Cafl Y. pestis*»), в основном, обсуждается лишь структура эпитопов этого антигена.

Глава 2 «Материалы и методы» свидетельствует о том, что автором применен широкий спектр методов: микробиологических, молекулярно-генетических, иммунологических, биоинформационных, компьютерного моделирования. Все данные экспериментов подвергали статистической обработке. Работа была проведена на 125 штаммах двух патогенных видов иерсиний - псевдотуберкулезном и чумном. При этом выборки разных биоваров *Y. pestis subsp. microti* (по используемой автором внутривидовой классификации чумного микроба схема которой приведена на рис 1.1, где биовар *microtus* определен как подвид, а входящие в него филогенетические группы *altaica*, *angola*, *caucasica*, *hissarica*, *qinghaiensis*, *talassica*, *ulegeica* и *xilingolensis* обозначены как биовары) были очень неравными: от двух (*qinghaiensis*) до семидесяти девяти (*caucasica*).

В результате проведенной работы Лидия Александровна, решая, в соответствии с поставленной целью диссертационные задачи, получила интересные и оригинальные материалы, отвечающие требованиям научной новизны и практической значимости. Результаты собственных исследований изложены в главах с третьей по пятую.

Название главы 3 - «Сравнение молекулярно-генетических, физико-химических и структурно-пространственных свойств изоформ *Cafl*, выявление отличий» - неудачно хотя бы потому, что сами по себе белки-изоформы молекулярно-генетическими свойствами не обладают. Однако,

содержанию главы оно, в целом, соответствует. Определение нуклеотидных последовательностей *caf1* генов у 122 штаммов *Y. pestis* и проведенный анализ кодируемых ими аминокислотных последовательностей белков показал наличие определенных отличий, влияющих на так называемую внутреннюю неупорядоченность макромолекул, что в свою очередь сказывается на их физико-химических свойствах. Установлено, что белок Caf1 образует три изоформы: глобальную - NT1; тип NT2, свойственный штаммам из Закавказского высокогорного Приараксинского низкогорного природных очагов и новый тип NT3, эндемичный для штаммов Восточно-Кавказского высокогорного природного очага чумы. В разделе 3.4 – заключении по главе 3 - Л.А.Шишкина логично обсуждает полученные результаты в сопоставлении с данными из публикаций других авторов. Однако, на наш взгляд, не следовало начинать этот раздел с «ВУЗовских» сведений о чумном микробе, а заканчивать его вообще «школьными» определениями - принципом метода хроматографии и что «гидрофобная хроматография основана на свойстве гидрофобности белков».

В главе 4, представлены результаты экспериментов, направленных на решение вопросов, важных не только в теоретическом, но и в практическом отношении: могут ли штаммы, несущие NT2 и NT3 аллели гена *caf1*, преодолеть протективный иммунитет, опосредованный изоформой Caf1NT1, а также способны ли существующие методы иммуноанализа обнаруживать чумной микроб с разными аллелями *caf1* гена. На модели вакцинированных мышей установлено, что индуцированный изоформой Caf1NT1 иммунитет, достаточно прочен для защиты животных при укусах блох, несущих низкую дозу возбудителя, от инфекции, вызванной не только штаммами с той же изоформой, но и от изолятов, продуцирующих Caf1NT2 и Caf1NT3 варианты. При помощи иммунохроматографии и иммуноферментного анализа, обнаружено, что все изоформы Caf1 имеют высокую степень перекрестной серологической активности, следовательно, моноклональные антитела, использованные при тестировании, специфичны для общих эпитопов

Caf1NT1, Caf1NT2 или Caf1NT3. Тем не менее, Лидия Александровна считает, что при разработке новых тестов для детекции чумного микроба и капсульного антигена, рационально включать в панель штаммов для тестирования и изоляты, продуцирующие эндемичные изоформы Caf1.

В главе 5 приведены данные, характеризующие полиморфизм нуклеотидных последовательностей, кодирующих шаперон/ашерные системы секреции чумного микроба. Проведено полногеномное секвенирование 19-ти штаммов *Y. pestis*, отличающихся по продуцируемым изоформам капсульного антигена и затем проведен анализ вариабельности последовательностей аминокислот белков, участвующих в работе каждой из десяти систем секреции IV типа, задействованных в сборке поверхностных структур, обеспечивающих адгезивные свойства возбудителя чумы.

В сверхкратком «Заключении» подведены итоги работы, приведены обобщающие материалы по главам «Собственных исследований», высказано мнение об использовании определения полиморфизма генов, детерминирующих молекулярные компоненты систем секреции IV типа для идентификации и определения биоварной принадлежности изолятов *Y. pestis*.

Однако, перспективам дальнейших исследований по разрабатываемому автором направлению уделено недостаточное внимание. Только на стр. 111 диссертант утверждает, что дальнейшие исследования «...должны быть посвящены определению роли отдельных шаперон/ашерных систем секреции в патогенезе чумной инфекции. Кроме того, необходимо определить при каких условиях они собираются в полноценные структуры...».

Восемь выводов диссертации основываются на представленном экспериментальном материале, они аргументированы, являются логическим завершением проделанной работы и не вызывают сомнений в их достоверности. Однако, вывод 7 в представленном виде не несет никакой существенной информации; констатируется просто сам факт проведения секвенирования и депонирования; вся научная конкретика полученная по

этому направлению исследования содержится в разделе «Теоретическая и практическая значимость» и в главе 5.

Все вынесенные на защиту положения нашли отражение в соответствующих публикациях. Диссертация носит завершённый характер. Автореферат полностью отражает основные материалы диссертации, хорошо иллюстрирован, но рисунки 3 и 10 – на наш взгляд – уместные и даже обязательные в тексте диссертации, в автореферате лишние, поскольку они «узкоспециальные»; для их понимания требуются обширные комментарии, невозможные в силу ограниченного объема автореферата.

Представленные экспериментальные данные вполне убедительны и критических возражений по существу рецензируемой работы нет. Рецензируемая работа хорошо оформлена и иллюстрирована. Диссертация Л.А.Шишкиной содержит новые научные результаты и положения и обладает внутренним единством.

Вопросы. Положительно оценивая работу в целом и подчёркивая её новизну и значимость для науки и практики, хотелось бы получить ответы на следующие вопросы, которые возникли при анализе материалов диссертационной работы.

1. Что автор подразумевает под *гипервирулентностью* штаммов чумного микроба (стр. 4 и др.) – в количественном выражении?
2. Как понимать утверждение, что «капсульный антиген F1 ... служит *прототипом* для непилевых органелл, собранных по шаперон-ашерному пути...» (стр. 57)?

Замечания (кроме тех, которые отмечались по ходу рецензии):

1. В первом положении *дважды* пропущено слово «штаммов».
2. Содержащаяся в разделе «Теоретическая и практическая значимость» информация о том, что «выявлено различие в поведении Cafl_{NT3} изоформы во время гидрофобной хроматографии: элюирование Cafl_{NT3} распределялось между 600 мМ и 50 мМ градиента сульфата аммония (СА), в то время как Cafl_{NT1} и Cafl_{NT2} изоформы достигали максимума в 350

мМ при тех же условиях элюирования» не является ни той, ни другой значимостью. Это - не более, чем методический аспект в эксперименте.

3. В «Перечне сокращений...» Государственная коллекция патогенных бактерий «Микроб» (ГКПБ – официальный статус) ошибочно именована «Российской» (РКПБ). Не имело смысла приводить расшифровку общеизвестных терминов: *in vitro*, *in vivo*, напоминать какие единицы измерения молекулярных масс, все это - ВУЗовские сведения.

4. Стилистические погрешности: «высокорастворимый... белок...» (стр.20); биофильм (англицизм, стр. 27); «секвенирование капсульного антигена проводили с целью сравнения нуклеотидных последовательностей...» (стр. 50); некорректны эмоциональные оценки соискателя (стр. 21 – ...великолепные обзорные работы...; стр.36 – яркий пример того...) и т.п.

Перечисленные замечания, разумеется, не носят принципиального характера и не снижают теоретической и практической ценности диссертации.

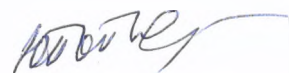
Заключение

Все изложенное свидетельствует о том, что диссертация Л.А.Шишкиной выполнена на высоком методическом уровне, является законченной научно-исследовательской работой, в основу которой положен большой фактический материал по разработке перспективного направления – определению влияния структурно-функциональной изменчивости капсульного антигена чумного микроба на достоверность результатов иммунодиагностических тестов и эффективность вакцинопрофилактики чумы. Соответствие рецензируемого исследования паспорту специальности 03.02.03 «микробиология» (пунктам 1,2,3) обосновано целью, задачами, полученными результатами, положениями, выносимыми на защиту и выводами.

В целом, по значимости и актуальности поставленной проблемы, уровню методического подхода к её разрешению, теоретическому и научно-

практическому значению результатов представленная работа соответствует критериям пп. 9, 10, 11 и 13 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., в редакции Постановления Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., является завершенной научно-квалификационной работой, в которой дано решение задачи, имеющей важное значение в области микробиологии, а её автор – Лидия Александровна Шишкина - заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Попов Юрий Алексеевич,
доктор биологических наук, профессор
Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Российский научно-исследовательский
противочумный институт "Микроб»,
отдел образовательных программ
и подготовки специалистов, главный научный сотрудник
410005 г. Саратов, ул. Университетская, 46.
Тел. 845-2-51-52-30; E-mail – rusrap1@microbe.ru



Подпись главного научного сотрудника, профессора Ю.А. Попова

Заверяю

Начальник отдела кадров
ФКУЗ Российского научно-исследовательского
противочумного института "Микроб"



О.В.Шумигай