

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора Мавзютова Айрата Радиковича на диссертацию Смирновой Дарьи Николаевны на тему: «Разработка экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности CagA *Helicobacter pylori*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03. – микробиология

Актуальность темы диссертационного исследования.

Этиологическая диагностика хеликобактериоза является наиболее важным условием эффективного лечения не только указанного инфекционного заболевания, но и обусловленных инфицированием *Helicobacter pylori* язвенной болезни и онкопатологии ЖКТ.

Для этого в настоящее время могут использоваться различные модификации и варианты культурального, иммунохимического, молекулярно-генетического методов и микроскопия. В большинстве своем предложенные методы ориентированы на детекцию и идентификацию возбудителя по выявлению видоспецифических антигенных и генетических маркеров или же антител к возбудителю. Вместе с тем, чувствительность и специфичность даже самых современных тест-систем, созданных на платформах полимеразной цепной реакции (ПЦР) или твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), может со временем снижаться в связи с изменчивостью микроорганизма. Так показано, что геномы некоторых штаммов *H.pylori* включают мобильные кластеры генов, именуемых «островами» или «островками патогенности» (PAI), отличающихся вариабельностью и детерминирующих ряд факторов патогенности *H.pylori*, определяющих ключевые этапы взаимодействия патогена с макроорганизмом. Указанное кардинально изменяет темпы изменчивости бактерий. Это предполагает настоятельную необходимость перманентного отслеживания происходящих изменений и своевременного адаптирования диагностических лабораторных систем.

Одним из генетических фрагментов «островка патогенности» *H.pylori* является цитотоксинассоциированный ген cagA, детерминирующий синтез белка CagA. Последний обуславливает нарушение целостности эпителия слизистой оболочки желудка и 12-перстной кишки, индукцию неконтролируемой пролиферации эпителиальных и лимфоидных клеток, приводящую в конечном итоге к развитию рака желудка. Выявление штаммов *H.pylori*, экспрессирующих данный белок в этой связи имеет большое диагностическое значение, поскольку не каждое инфицирование приводит к

развитию онкопатологии. Более того, обозначенный белок может служить высокоинформативным маркером эпидемиологической значимости конкретных этиологических агентов, в том числе для эпидемиологического расследования вспышек.

Выбор темы диссертационной работы Смирновой Д.Н., ориентированной на разработку иммунохроматографической тест-системы на основе моноклональных антител к белку CagA *H.pylori* также свидетельствует об актуальности научной работы ввиду диагностической востребованности в настоящее время тест-систем для обеспечения персонализированного подхода к назначению эрадикационной терапии.

Все вышеуказанное являлось более чем достаточным основанием для выполнения представленной работы ввиду её своевременности и актуальности.

Научная новизна диссертационного исследования

Автором самостоятельно была собрана коллекция клинических штаммов *H.pylori*. Впервые с использованием выделенных и идентифицированных штаммов *H. pylori* были разработаны способ определения чувствительности данного вида микроорганизмов к антибиотикам и способ моделирования хеликобактериоза. Научная новизна подтверждена патентами на изобретения: № 2588469 «Способ определения чувствительности *H. pylori* к антибиотикам» от 27.06.2016 г.; №2690943 «Способ моделирования хеликобактериоза» от 07.06.2019.

Предложена оригинальная методика получения наночастиц коллоидного золота со средним диаметром 25-30 нм. В её основе - пошаговый алгоритм, учитывающий условия внесения реагентов (3ХВК и цитрата натрия), режимы перемешивания и температуру нагревания растворов. Научная новизна подтверждена патентом на изобретение: № 2644466 «Способ получения наночастиц коллоидного золота со средним диаметром 25-30 нм» от 12.02.2018 г.

Вышеуказанное позволило автору разработать прототип иммунохроматографической тест-системы, включающий специфические иммунохимические компоненты отечественного производства для выявления белка CagA *H.pylori* в различных биологических материалах. Научная новизна подтверждена патентом на изобретение №2642588 «Иммунохроматографическая тест-система для выявления патогенных штаммов *Helicobacter pylori*» от 25.01.2018 г.

Проведен сравнительный анализ информативности детекции CagA-положительных штаммов *H. pylori* иммунохроматографическим и молекулярно-генетическим методами. В результате этого была обоснована

возможность практического применения разработанного автором иммунохроматографического метода для отбора пациентов, нуждающихся в назначении и контроле за ходом рациональной антихеликобактерной терапии.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость работы заключается в систематизации данных об антигенном строении *H. pylori* и обосновании значимости выявления высокопатогенных штаммов, секретирующих белок CagA, у лиц с инфекционной патологией желудочно-кишечного тракта. В частности полученные автором результаты служат дополнительным подтверждением участия *H. pylori* в развитии кишечной метаплазии, атрофического гастрита, рака желудка.

Практическая значимость работы заключается в выделении, идентификации и создании коллекции патогенных штаммов *H. pylori*. Это позволило автору исследовать некоторые механизмы антибиотикорезистентности указанных микроорганизмов, разработать способ моделирования хеликобактериоза на аутбредных белых мышах и разработать прототип иммунохроматографической тест-системы. Показана возможность её применения для выявления белка патогенности CagA *H. pylori* в культуре, выделенной из различного биологического материала (биопсийного материала желудка, кала и содержимого зубодесневых карманов). Это существенно расширяет диапазон её практического применения для постановки диагноза хеликобактериоз, обоснованного назначения и контроля эрадикационной терапии.

Методики получения наночастиц коллоидного золота и усиления тест-систем лактатом серебра и гидрохиноном несомненно найдут применение при разработке новых линеек иммунохроматографических тест-систем для выявления возбудителей различных заболеваний.

Выполнение диссертационного исследования на базе образовательного учреждения позволило внедрить авторскую технологию в учебный процесс двух университетов: в ФГБОУ ВО Вятский государственный университет и ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Диссертация Смирновой Д.Н. представляет собой завершённую научно-квалификационную работу и состоит из введения, основной части, заключения, выводов, рекомендации по использованию результатов работы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, в который входит 114 источников, списка публикаций автора, приложений.

В обзоре литературы представлена эпидемиологическая и микробиологическая характеристика *H. pylori* как этиологического агента,

вызывающего заболевания желудочно-кишечного тракта, раскрыто влияние антигенов патогенности *H. pylori* на формирование патологического процесса, обоснована актуальность выявления высокопатогенных CagA⁺ штаммов *H. pylori*, у лиц, страдающих заболеваниями желудочно-кишечного тракта, обоснована необходимость разработки и использования иммунохроматографической тест-системы для индикации патогенных штаммов *H. pylori*, а также указаны основные направления повышения специфичности и чувствительности иммунохроматографических тест-систем.

Практическая часть диссертационной работы Смирновой Д.Н. отражает выделение и идентификацию патогенных штаммов *H. pylori*, отработку основных этапов создания иммунохроматографической тест-системы, начиная от синтеза маркера, до подбора состава буферных растворов при приготовлении конъюгата и проведения тестирования. В результате был разработан экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы, предназначенный для выявления белка CagA *H. pylori* с использованием отечественных сертифицированных моноклональных антител к соответствующему белку патогенности микроорганизма. На примере созданного автором прототипа обоснована возможность применения на этапе разработки иммунохроматографических тест-систем, предназначенных как для диагностики инфекционных, так и неинфекционных агентов, лактата серебра и гидрохинона для повышения их чувствительности. Необходимо особо отметить обоснованность использования Смирновой Д.Н. чистых культур возбудителя, выделенных из биологического материала пациентов на этапе разработки методики для повышения чувствительности иммунохроматографических тест-систем, поскольку при этом повышается уровень доказательности в частности на этапе экспериментального повышения чувствительности иммунохимического анализа на фоне применения лактата серебра и гидрохинона.

Возможность применения разработанной иммунохроматографической тест-системы для выявления CagA-позитивных штаммов *H. pylori* подтверждена в работе Смирновой Д.Н. статистически-достоверными данными.

Положения, выносимые на защиту, и выводы работы логичны и вытекают из поставленной цели и задач. Полностью отражают суть проведенных экспериментов, обоснованы достаточным экспериментальным материалом и являются логическим завершением работы. Содержание работы отражено в 17 публикациях, в том числе в пяти статьях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ и четырех патентах на изобретения.

Диссертационная работа хорошо оформлена, достаточно иллюстрирована рисунками и таблицами, изложена понятным литературным языком. Содержание реферата полностью отражает основные положения диссертационной работы.

Соответствие специальности

Диссертационная работа, выполненная Смирновой Дарьи Николаевны, по тематике, методам исследования, научным положениям и выводам, полностью соответствует формуле специальности 03.02.03 – микробиология (биологические науки) со следующими областями исследований: выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов (пункт 2 паспорта специальности); морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов (пункт 3); сапрофитизм, паразитизм, симбиоз микроорганизмов (пункт 6).

Замечания по диссертационной работе

Принципиальных замечаний по диссертации нет. В процессе рецензирования диссертационной работы возник ряд вопросов.

1. Какова чувствительность предложенной Вами тест-системы в сравнении с применяемыми в настоящее время методами?
2. Каковы на Ваш взгляд основные преимущества и ограничения иммунохроматографических методов в сравнении с иммуноферментными тест-системами, ориентированными на детекцию антигенов возбудителя?
3. Насколько на Ваш взгляд правомерно сравнение между собой информативности тест-систем, ориентированных на детекцию антигенов и антител при хеликобактериозе и других заболеваниях, при которых формируется нестерильный иммунитет?

Возникшие вопросы носят уточняющий характер и не снижают общей научной и практической ценности рецензируемой работы.

Заключение

Диссертационная работа Смирновой Дарьи Николаевны на тему «Разработка экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности CagA *Helicobacter pylori*» является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача по созданию новых иммунохроматографических диагностических систем.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, объему выполненных исследований, достоверности полученных результатов и внедрению результатов исследований диссертационная работа Смирновой Д.Н. «Разработка экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности

СagA *Helicobacter pylori*» полностью соответствует требованиям, установленным п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями, утвержденными Постановлением правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор – Смирнова Дарья Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03. – микробиология.

Официальный оппонент

Заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России), заслуженный деятель науки РБ, доктор медицинских наук, профессор



Мавзютов Айрат Радикович

Адрес ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России:

450008, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3;

Тел.: (347) 2721160; Факс: (347) 2723751;

E-mail: rectorat@bashgmu.ru, ufalab@mail.ru

