

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Дудиной Любови Геннадьевны на тему «Иммунохимическая характеристика рецепции бактериями *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* специфических бактериофагов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

### **Актуальность темы диссертации**

Чума - опасное природно-очаговое инфекционное заболевание, эпидемии которого приводили к многомиллионным человеческим жертвам. В настоящее время широко развивающиеся экономические и культурные связи с зарубежными странами, на территории которых расположены природные очаги чумы, создают предпосылки для проникновения чумы на территорию России.

Псевдотуберкулез является инфекционным заболеванием, передающимся алиментарным путем, вызывающим поражением желудочно-кишечного тракта, кожи, опорно-двигательного аппарата и других органов, характеризующимся проявлением рецидивов и хронических форм.

В последние годы все более пристальное внимание специалистов направлено на использование фагов при лечении различных инфекционных заболеваний. Особенно актуален поиск альтернативных средств лечения инфекций, вызываемых антибиотико-резистентными штаммами патогенных микроорганизмов, в том числе фаготерапией.

В настоящее время для диагностики чумы и псевдотуберкулеза в лабораторной практике используются псевдотуберкулезный и чумные бактериофаги. Однако механизмы их адсорбции на микробных клетках чумного и псевдотуберкулезного микробов остаются мало изученными. Практически не известно об использовании бактериофагов для лечения больных псевдотуберкулезной и чумной инфекциями людей. Вместе с тем для разработки схем и методов лечения с помощью специфических бактериофагов требуется проведение исследований, направленных на изучение механизмов взаимодействия фагов и микробных клеток современными методами. Учитывая вышеизложенное работа, проводимая в этом направлении, является актуальной.

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

Диссертационная работа Дудиной Л.Г. является законченной научно-квалификационной работой, в которой получены новые сведения о химической природе эпитопов, распознаваемых моноклональными антителами МКАт1-9 к поверхностным антигенам иерсиний; с применением иммунохимических методов установлен механизм адсорбции бактериофагов с псевдотуберкулезным и чумным микробными клетками, показано, что инкубация микроорганизмов с чумным Покровской и псевдотуберкулезным бактериофагами приводит к повышению уровня везикулообразования, сопровождающегося изменением морфологии бактериальных клеток.

В работе четко обоснованы актуальность исследований; научная новизна; практическая значимость; положения, выносимые на защиту; сведения об апробации и публикациях. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах, отвечающих цели и задачам исследования.

В автореферате диссертационной работы Дудиной Л.Г. представлены положения, выносимые на защиту, выводы, личный вклад автора в проводимое исследование, степень достоверности и апробация работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимости и перспективы дальнейшей разработки темы.

### **Достоверность и новизна исследования и полученных результатов**

Высокая степень достоверности и обоснованности полученных данных и выводов диссертации не вызывает сомнения и подтверждает правильность выбора методических подходов. Степень достоверности полученных данных основана на использовании

большого фактического материала, с применением современных информативных методов исследования.

Получены новые данные о химической природе эпитопов, распознаваемых моноклональными антителами МКАт1-9 к поверхностным антигенам иерсиний. Показано, что МКАт5-9 выявляют неидентичные эпитопы антигенов иерсиний белковой природы, не являющихся поринами Omp F и Omp C. МКАт1-4 реагируют с неидентичными видоспецифическими детерминантами, расположенными на О-боковых цепях липополисахарида (ЛПС) *Y. pseudotuberculosis*.

Новыми являются данные, свидетельствующие об образовании бактериями *Y. pseudotuberculosis* 1b и *Y. pestis* EV внеклеточных везикул при инкубации с псевдотуберкулёзным и чумным Покровской бактериофагами, приводящими к изменению морфологии бактериальных клеток. Показано, что рецептор псевдотуберкулёзного бактериофага ассоциирован с коровой областью липополисахарида *Y. pseudotuberculosis*.

Требованиям научной новизны отвечают исследования по определению взаимодействия моноклональных антител с эпитопами белковой природы, способных частично блокировать рецепцию чумного и псевдотуберкулёзного бактериофагов. При этом показано, что МКАт5-8 ингибировали адгезию к соответствующим микробным клеткам псевдотуберкулёзного бактериофага, а МКАт5, 7 и 8 – бактериофага чумного Покровской.

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Вятского государственного университета» в рамках плановых научно-исследовательских тем: «Механизмы взаимодействия клеток млекопитающих и бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*», № ГР № 01201350808 (2013-2016 гг.) и «Механизмы везикулообразования иерсиний», № ГРН № АААА-А17-117012310155-3 (2017-2020 гг.), а также Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», Проект: 12-П-4-1051 «Разработка тест-системы псевдотуберкулёзной моноклональной», 2012-2014 гг.

#### **Содержание диссертации, ее завершенность**

Во введении диссертации обоснована актуальность исследований; приведены научная новизна; практическая значимость; положения, выносимые на защиту; сведения об апробации и публикациях. Пять поставленных задач соответствуют цели работы и положениям, выносимым на защиту.

Литературный обзор посвящен анализу современных представлений о возбудителях псевдотуберкулеза и чумы, с описанием их характеристики, особенностей клинических проявлений и специфики лечебно-профилактических мероприятий. Автор особое внимание уделила поверхностным структурам псевдотуберкулёзного и чумного микробов, в том числе липополисахариду и белкам наружной мембраны, имеющим важное значение в поддержании целостности мембраны и формы бактериальной клетки. Проанализирована информация, касающаяся моноклональных антител, полученных к основным антигенным детерминантам чумного и псевдотуберкулёзного микробов.

Автор привела сведения о методах выделения бактериофагов, характеристики их свойств, возможности применения в лабораторной практике и лечении больных. Представлены сведения о составе и морфологии диагностических чумных и псевдотуберкулёзных бактериофагов, их структуре и природе рецепторов. Анализ литературных данных позволил Любови Геннадьевне обосновать необходимость научного подхода для решения поставленных задач об изучении природы и локализации на бактериальной клетке специфичных эпитопов и оценить процесс адсорбции бактериофагов на поверхности бактериальных клеток с помощью разработанных наборов моноклональных антител МКАт1-9.

В главе 2 «Материалы и методы» изложены методические приемы, с помощью которых решены поставленные задачи. Работа выполнена на представительном материале с использованием штаммов *Y. pseudotuberculosis* серотипа 1b, *Y. pestis* EV, *Escherichia coli* M17, *Staphylococcus aureus* 6538-p, препаратов псевдотуберкулёзного и чумного

Покровской диагностических бактериофагов; ЛПС *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*; были использованы также препараты ЛПС *E. coli* 055:B5; Б-антигена; поринов Omp F и Omp C *Y. pseudotuberculosis*, а также антитела и антивидовые конъюгаты. Следует отметить высокий уровень методических подходов с применением микробиологических, иммунохимических, иммунологических (твердофазный ИФА, ДОТ-ИФА, иммуноблотинг), электронной микроскопии и статистических методов, что свидетельствует о высоком профессионализме соискателя. Объем фактического материала является достаточным для проведения статистической обработки результатов.

В главе 3 «Результаты исследований и их обсуждение» представлены подглавы, посвященные изучению культурально-морфологических свойств псевдотуберкулезного и чумного Покровской бактериофагов; особенностям их культивирования, определению их влияние на морфологию бактериальных клеток и условиям, способствующим процессу везикулообразования у иерсиний.

Учитывая, что температура культивирования влияет на состав наружной мембраны чумного и псевдотуберкулезного микробов, для определения концентрации и доступности рецепторов, распознаваемых бактериофагами, штаммы инкубировали с псевдотуберкулезным и чумным Покровской бактериофагами при различных температурных режимах (подглава 3.1). В результате проведенных исследований показано, что бактериофаг чумной Покровской лизировал только штамм *Y. pestis*, в то время как псевдотуберкулезный бактериофаг лизировал культуры обоих штаммов. При этом был активен в отношении псевдотуберкулезного и чумного микробов, выращенных при температурах 27 и 37 °С, что может свидетельствовать об изменении структуры внешней мембраны бактериальных клеток, препятствующем прикреплению к ним бактериофага.

Далее Любовь Геннадьевна с помощью электронной микроскопии изучила морфологию микробных клеток *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* в процессе их взаимодействия со специфическими бактериофагами и установила, что даже незначительная инкубация (20 мин), вызывала изменение морфологии бактерий в виде появления форм клеток с «обрубленными» концами и пустотами и особой с бугристой поверхностью. При этом было отмечено некоторое увеличение доли клеток, продуцирующих везикулы.

В ходе проведенных исследований показано, что при поверхностном и глубинном культивировании штамма *Y. pestis* EV с бактериофагом чумным Покровской образование внеклеточных везикул наблюдается менее чем у 10 % бактериальных клеток. Вместе с тем, присутствие псевдотуберкулезного бактериофага в суспензии бактериальных культур обоих видов приводит к значительному повышению уровня везикулообразования бактерий *Y. pseudotuberculosis*.

В подглаве 3.2 «Иммунохимическая природа антигенных эпитопов, распознаваемых моноклональными антителами МКАт1-9» представлены результаты изучения иммунохимической природы антигенных эпитопов с помощью моноклональных антител МКАт1-9 к поверхностным антигенам иерсиний. На первом этапе изучена специфическая активность моноклональных антител в отношении различных антигенных препаратов семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе рода *Yersinia*, и определена природа эпитопов, с которыми взаимодействуют МКАт1-9. В результате проведенных исследований моноклональные антитела, в зависимости от их специфической активности, были условно разделены на две группы МКАт1-4 и МКАт5-9. Показано, что эпитопы, распознаваемые моноклональными антителами МКАт1-4, являются неидентичными и расположены на О-боковых цепях молекулы липополисахарида *Y. pseudotuberculosis*; МКАт5-9 выявляют различные белковые эпитопы наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*, не являющиеся поринами Omp F и Omp C.

Установлено, что МКАт1-4 активно взаимодействовали с «холодовыми» препаратами клеток и ЛПС, в то время как МКАт5-9 эффективнее выявляли клетки

*Y. pseudotuberculosis*, выращенные при температуре 37 °С, а также препараты *Y. pestis* и Б-антигена. При этом МКАт1-3 в меньшей степени выявляли ЛПС, *Y. pestis* и *E. coli*, что свидетельствует об их высокой специфичности в отношении псевдотуберкулёзного микроба.

Для определения химического состава и локализации рецепторов бактериофагов псевдотуберкулёзного и чумного Покровской (подглава 3.3) Любовь Геннадьевна с применением специальной методики, направленной на разрушение преимущественно ЛПС наружной мембраны бактерий псевдотуберкулёзного и чумного микробов, оценила способность к изменению адсорбционной активности бактериофагов. Показано, что количество прикрепившихся частиц бактериофага чумного Покровской при обработке бактерий *Y. pestis* периодом натрия приводило к полной потере их способности адсорбировать бактериофаг на своей поверхности. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей о том, что механизм взаимодействия бактериофага чумного Покровской с рецепторами полисахаридной природы, расположенными, вероятнее всего, на коровой части молекулы липополисахарида *Y. pestis* EV. Аналогичные результаты были получены при взаимодействии клеток *Y. pseudotuberculosis* с псевдотуберкулёзным бактериофагом. Установлено, что бактериофаг псевдотуберкулёзный относится к морфотипу C1 семейства *Podoviridae* и способен лизировать бактерии *Y. pestis* EV. Его рецепторы, так же как и рецепторы бактериофага чумного Покровской, ассоциированы с коровой областью липополисахарида бактерий.

Следует подчеркнуть целенаправленный подход соискателя при выполнении поставленных задач. На следующем этапе (подглава 3.4) Любовь Геннадьевна с целью экспериментальной разработки эффективных и экспрессных схем лечения и профилактики ряда бактериальных инфекций оценила принципиальную возможность сочетанного применения средств фаго- и серотерапии. В связи с этим методом конкурентного ингибирования изучила адгезивность и возможную конкуренцию специфических бактериофагов с различными моноклональными антителами за сайты адсорбции на поверхности бактериальной клетки.

Результаты проведенных исследований процесса адсорбции бактериофага чумного Покровской методом конкурентного ингибирования подтвердили, что МКАт1-4 не подавляли процесс адсорбции бактериофага. При взаимодействии с МКАт3 и 4 отмечается тенденция к частичному экранированию рецепторов бактериофага, что может объясняться их пространственной близостью к комплементарным эпитопам, расположенным на О-боковых цепях, достаточно близко к коровой области ЛПС *Y. pestis* EV. Из использованных моноклональных антител существенный ингибирующий эффект на процесс адсорбции бактериофага чумного Покровской оказывали МКАт5 и МКАт8 и в несколько меньшей степени – МКАт7. Поликлональная чумная агглютинирующая сыворотка, содержащая антитела к различным эпитопам на поверхности чумного микроба, в большей мере блокировала рецепцию бактериофага чумного Покровской, чем МКАт3 и МКАт4. На основании полученных результатов автор предположила, что блокирующее действие этих антител определяется их взаимодействием с белковыми эпитопами наружной мембраны, находящимися в непосредственной близости к рецептору фага.

При определении адгезивности псевдотуберкулёзного бактериофага на клетках *Y. pseudotuberculosis* также установлено, что МКАт1-4 и 9 не препятствуют рецепции, в то время как поликлональная чумная агглютинирующая сыворотка полностью блокировала рецепторы псевдотуберкулёзного бактериофага из-за взаимодействия непосредственно с рецептором бактериофага или за счет неспецифического экранирования рецепторов антителами. Отмечено уменьшение количества частиц прикрепившегося к клеткам *Y. pseudotuberculosis* бактериофага при использовании МКАт5-8.

На основании полученных результатов автор предложила новый методический подход для изучения процессов взаимодействия в системе «бактерия рода *Yersinia* –

специфический бактериофаг», основанный на конкурентном ингибировании процесса адсорбции бактериофагов с помощью моноклональных антител.

Вышеизложенное позволяет сделать заключение о том, что проделанная большая и кропотливая работа существенно расширяет представление о механизмах взаимодействия бактериофагов псевдотуберкулезного и чумного Покровской с микробными клетками иерсиний, а полученные результаты в дальнейшем могут быть использованы при проведении исследований, направленных на разработку средств фаготерапии и методов иммунодиагностики инфекций, вызываемых патогенными иерсиниями.

Несомненный интерес представляют данные о способности бактерий *Y. pseudotuberculosis* 1b и *Y. pestis* EV к везикулообразованию, степень которого повышается в присутствии бактериофагов псевдотуберкулезного диагностического и чумного Покровской.

В заключении диссертационной работы обобщены собственные данные, отражена новизна, теоретическая и практическая значимости полученных результатов. Логическим завершением проделанной работы явилось заключение Дудиной Л.Г. о том, что полученные данные существенно расширяют представление о механизмах взаимодействия псевдотуберкулезного и чумного Покровской бактериофагов с псевдотуберкулезным и чумным микробами и могут быть использованы при проведении исследований, направленных на разработку диагностических и лечебных иерсиниозных препаратов.

#### **Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций**

Работа имеет большой теоретический и практический выходы.

Получены данные о химической природе эпитопов, распознаваемых моноклональными антителами МКАт1-9 к поверхностным антигенам иерсиний. Проведены исследования по определению взаимодействия с эпитопами белковой природы набора моноклональных антител, способных частично блокировать рецепцию чумного и псевдотуберкулезного бактериофагов с микроорганизмами *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* EV.

Показана возможность образования бактериями *Y. pseudotuberculosis* 1b и *Y. pestis* EV внеклеточных везикул при инкубации с псевдотуберкулезным и чумным Покровской бактериофагами и изменению морфологии бактериальных клеток. Установлено, что рецептор псевдотуберкулезного бактериофага ассоциирован с коровой областью липополисахарида *Y. pseudotuberculosis*.

Предложен новый методический подход для изучения процессов взаимодействия в системе «бактерия рода *Yersinia* – специфический бактериофаг», основанный на конкурентном ингибировании процесса адсорбции бактериофагов с помощью набора МКАт1-9. Охарактеризованная панель МКАт1-9 имеет большой научный и практический интерес и может использоваться при разработке лечебных и диагностических препаратов для выявления возбудителя псевдотуберкулеза.

Разработан методический подход, основанный на использовании инактивированных формальдегидом бактериальных клеток при количественной оценке адсорбции частиц иерсиниозных бактериофагов, который может применяться при работе с возбудителями опасных инфекций, а также с бактериофагами, характеризующимися относительно высокой и низкой адсорбцией.

Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на Всероссийских и международных научно-практических конференциях, а также на Всероссийских ежегодных научно-практических конференциях «Общество, наука, инновации» в 2012 - 2018 гг. (Киров).

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключение, выводы; список литературы, включающий 243 источника, в том числе 48 отечественных и 206 работ зарубежных авторов. Объем

диссертации составляет 146 страниц машинописного текста. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 11 таблицами.

#### **Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы.**

Основные результаты диссертационной работы получены при личном участии диссертанта, что подтверждено научными публикациями. Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, в выполнении микробиологических, иммунологических, иммунохимических исследований, анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях.

По материалам диссертационной работы опубликовано 22 научные работы, в том числе 7 статей в международных реферируемых научных журналах, рекомендованных ВАК России. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в пяти выводах.

Диссертационная работа производит положительное впечатление, написана литературным языком, хорошо читается. Вместе с тем обращает внимание несоответствие последовательности изложения материала в автореферате и по тексту диссертации. Учитывая, что работа имеет большой практический выход, рекомендую в дальнейшем предусмотреть разработку методических рекомендаций, способствующих внедрению эффективных методов. Принципиальных замечаний по работе нет. Имеющиеся погрешности, касающиеся неточности некоторых выражений, не влияют на высокую положительную оценку работы.

К Любви Геннадьевне имеются следующие вопросы:

1. Более подробно поясните, что вы подразумеваете под терминами «неидентичные» эпитопы антигенов иерсиний белковой природы, не являющиеся поринами Omp F и Omp C и «неидентичные» видоспецифические детерминанты, расположенные на O-боковых цепях липополисахарида (ЛПС) *Y. pseudotuberculosis*».

2. Какую роль, на ваш взгляд, играет образование внеклеточных везикул у псевдотуберкулезного и чумного микробов, и как можно использовать это явление при разработке диагностических и лечебных иерсиниозных препаратов или в других направлениях исследований?

3. До проведения ваших исследований набор моноклональных антител МКАт1-9 к поверхностным антигенам иерсиний был аттестован, и если был, то на каком материале? В соответствии с полученными данными в вашей работе расширилась область их применения? Ваши рекомендации о возможности дальнейшего использования набора МКАт1-9 в научных исследованиях или практическом здравоохранении.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Дудиной Л.Г. на тему «Иммунохимическая характеристика рецепции бактериями *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* специфических бактериофагов» является законченным научно-квалификационным самостоятельным исследованием, в котором получены новые сведения о химической природе эпитопов, распознаваемых набором МКАт1-9 к поверхностным антигенам иерсиний. Показана возможность образования бактериями *Y. pseudotuberculosis* 1b и *Y. pestis* EV внеклеточных везикул при инкубации с псевдотуберкулезным и чумным Покровской бактериофагами, что позволяет расширить представление о механизмах взаимодействия бактериофагов псевдотуберкулезного и чумного Покровской и микробных клеток иерсиний, имеющее важное научно-практическое значение для микробиологии опасных инфекций. По актуальности, объему, новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ (Постановление

Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., в редакции от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 микробиология.

Официальный оппонент

Главный эксперт  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения «Научный центр экспертизы  
средств медицинского применения»  
Минздрава России,  
доктор медицинских наук,  
старший научный сотрудник

Саяпина Лидия Васильевна  
22.03.2019 г.

Юридический адрес:

127051, г. Москва,  
Петровский бульвар, д. 8, стр. 2  
Тел: +7 495-2346106 доб. 6592  
E-mail: Sayapina@expmed.ru

Подпись д.м.н. Саяпиной Л.В. удостоверяю:

Начальник отдела подготовки кадров  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Макаров А.В.

