

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Дудиной Любови Геннадьевны "Иммунохимическая характеристика рецепции бактериями рода *Yersinia* специфических бактериофагов" по специальности 03.02.03 Микробиология на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Актуальность избранной темы

Бактерии рода *Yersinia* являются возбудителями таких заболеваний, как кишечный иерсиниоз, псевдотуберкулез, чума и другие. Полная ликвидация данных заболеваний невозможна, поскольку они являются зоонозными инфекциями. В результате, не смотря на принимаемые меры предосторожности в соответствии с положениями Всемирной организацией здравоохранения, до сих пор в мире на территории эндемичных районов периодически возникают вспышки инфекций. Большинство природных очагов чумы географически не связаны, что приводит к значительным экологическим различиям между штаммами *Y. pestis* по выживанию и вирулентности за счет формирования значительного разнообразия генотипов и фенотипов среди изолятов. Однако, оба патогена *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* эволюционно связаны и генетически почти идентичны, причем последний способен иногда вызывать у человека геморрагическую пневмонию, напоминающую легочную чуму. Летальность заболеваний без лечения при некоторых формах чумы достигает 100%. Ситуация осложняется появлением штаммов с множественной антибиотикорезистентностью, что определяет необходимость разработки дополнительных способов нейтрализации патогена. В случае псевдотуберкулеза характерна быстрая хронизация заболевания из-за несвоевременного или неправильного лечения и диагностики.

В связи с этим использование бактериофагов является хорошей альтернативой, что позволит приблизиться к решению вышеуказанных проблем. Исследования рецепторного аппарата бактерий рода *Yersinia*, участвующих в адсорбции бактериофагов, может иметь значение при дифференциальной диагностике псевдотуберкулеза и чумы для начала своевременного лечения или для разработки эффективных вакцин. Поэтому тема диссертационной работы Л.Г. Дудиной является несомненно актуальной для научно-технического развития России и соответствует тенденциям развития мировой науки в данной отрасли знаний.

Достоверность и новизна исследований и полученных результатов

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертации не вызывает сомнений и определяется достаточным объемом проведенных экспериментов, а также использованием современных микробиологических, биохимических, иммунохимических, физико-химических методов исследования, просвечивающей электронной микроскопии. Эксперименты хорошо спланированы и выполнены в соответствии с поставленными задачами диссертации. Результаты обработаны статистически.

Автором впервые предложен новый подход использования моноклональных антител для блокировки рецепторов, необходимых для адсорбции бактериофага, что позволило выявить их химическую природу и видоспецифичность. Так, антитела МКАт1-4 выявляли эпитопы, расположенные на О-боковых цепях липополисахарида *Y. pseudotuberculosis*, а МКАт5-9 - белковые детерминанты наружной мембраны патогенных иерсиний.

Впервые изучен процесс везикулообразования *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, причем стимуляция данного процесса происходила только при воздействии видоспецифичных бактериофагов. В работе представлены электронно-микроскопические фотографии формирования везикул и адгезии изучаемых бактериофагов на клетках бактерий.

Выявлена природа рецепторов для бактериофага псевдотуберкулезного у *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. У обоих видов бактерий рецепторы были ассоциированы с коровой частью липополисахарида.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций диссертанта

Совокупность проведенных исследований позволила более глубоко рассмотреть механизмы рецепции бактериофагов клетками патогенных микроорганизмов, что может послужить теоретической основой для разработки новых вакцин, диагностических и лечебных фаговых препаратов.

Отработана методика инактивации бактерий *Yersinia* для анализа адсорбции бактериофагов, что может быть использовано в рекомендациях по безопасной работе с высокопатогенными возбудителями.

Подана заявка на изобретение «Способ иммуноферментного выявления возбудителя псевдотуберкулеза 1 серотипа на основе моноклональных антител к О-боковым цепям липополисахарида» рег. № 2018124577 от 04.07.2018.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы собственных исследований, заключения и выводов. Список цитируемой литературы включает 254 источника, в том числе 48 отечественных и 206 зарубежных. Работа изложена на 146 страницах текста, проиллюстрирована 11 таблицами и 21 рисунком.

Введение раскрывает актуальность выбранной темы, включает формулировку целей и задач исследований, научную новизну, практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, информацию о личном вкладе автора в представленную работу.

В литературном обзоре (Глава 1) представлена характеристика исследуемых бактерий, состава поверхностных структур, информациях о специфичных бактериофагах и обзор методических подходов изучения иммунохимической характеристики рецепторов бактериофагов.

В главе 2 (Материалы и методы) подробно изложены данные об штаммах бактерий, бактериофагах, антигенных препаратах, дана характеристика основным иммунохимическим, биохимическим, иммуноферментным и микробиологическим методам, что дает возможность при необходимости получить воспроизводимые результаты в подобных исследованиях.

Результаты исследований и их обсуждение приведены в третьей главе. В первом подразделе представлены культуральные свойства бактериофагов псевдотуберкулезного диагностического и чумного Покровской. Выявлено ослабление литической способности псевдотуберкулезного бактериофага в отношении *Y. pseudotuberculosis* при снижении температуры ее культивирования до 10°C. С помощью электронной микроскопии представлены морфология бактериофага псевдотуберкулезного диагностического, а также процесс образования везикул у обоих видов бактерий в присутствии специфических бактериофагов. Второй подраздел посвящен изучению иммунохимической природы антигенных эпитопов иерсиний с применением 9 линий моноклональных антител. В результате проведения ИФА, иммуноблоттинга и электрофореза в ПААГ с применением протеолитических ферментов и периодата натрия автор считает, что МКАт1-4 взаимодействуют с О-боковыми цепями липополисахарида *Y. pseudotuberculosis*, а МКАт5-9 – с белковыми детерминантами иерсиний. В третьем разделе исследована химическая природа бактериальных рецепторов для двух видов бактериофагов, используя прием конкурентного связывания моноклональных антител.

Работу завершает раздел Заключение, который обобщает полученные данные проведенного исследования. Выводы диссертации основаны на результатах исследования автора и достаточно глубоко обсуждены в работе.

Замечания и вопросы

В ряде таблиц (табл. 1 автореферата) и рисунков (рис. 4, 5, 6, 7 автореферата) не указаны критерии, использованные для оценки достоверности различий между вариантами опыта. Результаты данной статистики не отражены ни в диссертации, ни в автореферате, что несомненно требует пояснения автора работы.

По мере прочтения работы возник ряд вопросов:

1. Располагаете ли Вы данными о наличии штаммов бактерий рода *Yersinia* в природных очагах на территории России в настоящее время? Если да, то являются ли данные штаммы патогенными для человека?
2. На сколько отличаются скорости роста *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* при температурах 10°C, 27°C и 37°C? Чем вы можете объяснить отсутствие способности бактериофагов лизировать бактерии, выращенные при 10°C?
3. Известно ли о нейтрализующем действии моноклональных антител в отношении патогенных иерсиний? Охарактеризованы ли в этом отношении МКАт1-9, используемые в данной работе?
4. Исходя из данных о конкурентном взаимодействии МКАт с сайтами связывания бактериофагов, сформулируйте, пожалуйста, обоснование возможности использования фаготерапии совместно со специфическими сыворотками при лечении иерсиниозных инфекций, вызванных, например, мультирезистентными штаммами бактерий.

Необходимо подчеркнуть, что заданные вопросы носят уточняющий характер и не умаляют значение полученных автором результатов.

Опубликованные результаты диссертации в научной печати

По теме диссертации опубликованы 22 работы, из них семь – в изданиях, рекомендованных ВАК России, из них 6 статей – в журналах, цитируемых в базе Scopus.

Соответствие автореферата диссертации

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Дудиной Любови Геннадьевны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является научно-квалификационной работой, в которой содержится информация об иммунохимической характеристике рецепции бактериями рода *Yersinia* специфических бактериофагов, имеющей важное значение для развития микробиологической отрасли научного знания, что полностью соответствует требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842. А ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.02.03 – Микробиология.

25.03.2019

Официальный оппонент,
старший научный сотрудник
лаборатории иммунорегуляции
«ИЭГМ УрО РАН»

к.б.н. по специальности
03.02.03 – микробиология

Масленникова Ирина Леонидовна

Контактные данные официального оппонента:

Почтовый адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиал Федерального государственного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения наук Российской академии наук.

Контактный телефон: 8 (342) 2808431

Адрес электронной почты: I.Maslennikova1974@gmail.com

Подпись Масленниковой И.Л. удостоверяю:

Директор «ИЭГМ УрО РАН», чл.-корр. РАН

В.А.Демаков

