



рит о необходимости дальнейших исследований взаимодействия между бактериофагами, бактериями и организмом человека, выяснения локализации и химической природы распознаваемых бактериофагами рецепторами бактерий (Lin et al., 2017). В связи с этим, актуальность диссертационной работы Л.Г. Дудиной, направленной на комплексное изучение адгезивности иерсиниозных бактериофагов на микробных клетках *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, в том числе, с использованием специфических моноклональных антител, не вызывает сомнения.

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

Диссертационная работа Дудиной Любови Геннадьевны выполнена на кафедре биотехнологии Института биологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Вятский государственный университет» (г. Киров) в рамках плановых научно-исследовательских тем: «Механизмы взаимодействия клеток млекопитающих и бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*» № ГР 01201350808 (2013–2016 гг.) и «Механизмы везикулообразования иерсиний» № ГР 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.

### **Достоверность и научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации.**

Научные положения, выводы, заключение, сформулированные автором, логичны, теоретически обоснованы и основаны на достаточном фактическом материале, полученном в экспериментальных исследованиях с использованием современных бактериологических, физико-химических и иммунохимических методов, адекватных поставленным цели и задачам. Результаты исследований обработаны с помощью общепринятых методов статистического анализа.

На основании анализа результатов исследования взаимодействия моноклональных антител, полученных против поверхностных антигенов иерсиний, с

клетками бактерий *Y. pestis* EV и *Y. pseudotuberculosis* O:1b установлена белковая природа эпитопов, отличных от поринов OmpF и OmpC, а также полисахаридная природа эпитопов, локализованных на O-специфических боковых цепях липополисахарида (ЛПС) псевдотуберкулезного микроба. Автором установлено, что рецепция псевдотуберкулезного диагностического бактериофага с клетками *Y. pseudotuberculosis* происходит с участием коровой области молекулы ЛПС.

Новым является факт образования везикул наружной мембраны клетками *Y. pseudotuberculosis* при выращивании в жидкой питательной среде.

Впервые экспериментально установлено, что моноклональные антитела, специфичные в отношении эпитопов белковой природы, способны частично ингибировать рецепцию бактериофагов псевдотуберкулезного диагностического и чумного Покровской к клеткам *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*.

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

Наиболее значимым научно-практическим результатом выполненной диссертационной работы Дудиной Л.Г. является установление химической природы и локализации на бактериальной клетке эпитопов, распознаваемых моноклональными антителами (МКАт1-9) к поверхностным антигенам иерсиний, а также рецепторов иерсиний, комплементарных бактериофагам псевдотуберкулезному диагностическому и чумному Покровской. С помощью панели моноклональных антител охарактеризован процесс адсорбции на клетках иерсиний бактериофагов псевдотуберкулезного диагностического и чумного Покровской методом конкурентного ингибирования. Важным является выявление рецептора псевдотуберкулезного диагностического бактериофага, ассоциированного с коровой областью ЛПС *Y. pseudotuberculosis*.

Установлен факт образования бактериями *Y. pseudotuberculosis* O:1b и *Y. pestis* EV везикул наружных мембран и усиление их продукции при инкубации указанных бактерий с бактериофагами псевдотуберкулезным диагностическим и чумным Покровской.

По результатам диссертационного исследования подана заявка на изобре-

ние «Способ иммуноферментного выявления возбудителя псевдотуберкулеза 1 серотипа на основе моноклональных антител к О-боковым цепям липополисахарида» (рег. № 2018124577 от 04.07.2018 г.).

Результаты диссертационного исследования Л.Г. Дудиной могут быть рекомендованы к использованию в практической деятельности клинко-диагностических лабораторий, вовлеченных в систему эпидемиологического надзора за чумой и псевдотуберкулезом, а также научно-исследовательских организаций, осуществляющих разработку диагностических тест-систем для индикации и идентификации чумного и псевдотуберкулезного микробов и занимающихся изучением процессов взаимодействия в системе «бактерия рода *Yersinia* – специфический бактериофаг».

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.**

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.

**Структура и содержание диссертации, её завершенность.**

Диссертация Л.Г. Дудиной является законченным, логически выстроенным научным трудом, имеет традиционную структуру и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Результаты исследований и их обсуждение», «Заключение», а также «Выводов» и библиографического списка, который включает 254 научные работы отечественных и зарубежных авторов. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, иллюстрирована 21 рисунком и 11 таблицами.

В главе «Обзор литературы», состоящей из двух подразделов, достаточно

детально изложено современное представление о возбудителях псевдотуберкулёза и чумы, строения и функциях их поверхностных структур и везикул наружной мембраны, моноклональных антител против антигенов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, бактериофагах, включая чумные и псевдотуберкулезные, и методических подходах выявления их рецепторов на поверхности бактерий. Диссертант продемонстрировал свою эрудицию в изучаемой проблеме. Проведенный анализ литературы позволил отчетливо сформулировать актуальность, цель и задачи диссертационной работы.

Собственные исследования автора выполнены с использованием описанных в главе «Материалы и методы» высокотехнологичного оборудования и адекватных поставленным задачам современных микробиологических, иммунохимических и физико-химических методов.

Глава 3 «Результаты исследований и их обсуждение» разбита на четыре раздела.

В разделе 3.1 описываются культурально-морфологические свойства иерсиниозных бактериофагов, влияние температуры культивирования иерсиний на литическую способность бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и чумного Покровской, особенности культивирования псевдотуберкулезного диагностического бактериофага, влияние бактериофагов на морфологию клеток и образование везикул наружной мембраны клетками исследуемых иерсиний.

Раздел 3.2 посвящен выяснению химической природы антигенных эпитопов, распознаваемых моноклональными антителами методами иммуноферментного анализа (ИФА) и иммуноблотинга с использованием цельных клеток иерсиний и выделенных и очищенных антигенов (ЛПС и Б-антиген). Проведена оценка влияния периодата натрия и протеаз на иммунохимическую активность последних в ИФА с использованием моноклональных антител. Изучена природа эпитопов, выявляемых методом иммуноблотинга моноклональными антителами, ряда антигенных препаратов, включая порины OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis* (предоставленных д.х.н. О. Д. Новиковой из ФГБУН Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН).

Установлено, что поликлональная мышьяная антисыворотка, полученная против OmpF, взаимодействует с белками-поринами, а также с O-специфическими боковыми цепями ЛПС, выявляя эти компоненты также и в бактериальных клетках, включая таковые *Y. pestis*. Это позволило сделать вывод о наличии общих родоспецифических антигенных детерминант поринов наружной мембраны иерсиний.

В целом, результаты изучения химической природы эпитопов свидетельствуют о том, что использованные в работе моноклональные антитела (МКАТ) 1–4 являются видоспецифическими и взаимодействуют с различными детерминантами, расположенными на O-специфических боковых цепях молекулы ЛПС псевдотуберкулёзного микроба. С другой стороны, МКАТ5–9 выявляют эпитопы поверхностных белков, являющихся общими для бактерий *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*.

В разделе 3.3 описываются результаты исследования химической природы рецепторов бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и чумного Покровской с разрушением соответствующих компонентов наружной мембраны бактерии с дальнейшей оценкой изменений способности бактериофагов к адсорбции.

Проведено сравнение адгезии бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и Покровской на живых и убитых клетках. В результате проведенных исследований показана возможность изучения адсорбции бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и Покровской на инактивированных формалином бактериальных клетках.

Для определения химической природы рецепторов бактериофага Покровской использовали обработку бактериальных клеток периодатом натрия и протеиназой К. В результате проведенных исследований установлено, что рецептор псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага имеет полисахаридную природу и, предположительно, локализован на коровой части молекул ЛПС.

Раздел 3.4 посвящен изучению конкуренции иерсиниозных бактериофагов и моноклональных антител за сайты связывания на поверхности бактериальных

клеток. В результате проведенных исследований установлено, что моноклональные антитела, взаимодействующие с эпитопами О-антигена, практически не препятствуют адсорбции исследуемых бактериофагов к клеткам чумного и псевдотуберкулезного микробов. Моноклональные антитела, направленные против белковых эпитопов наружной мембраны иерсиний, частично блокируют адгезию бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и Покровской, вероятно, из-за неспецифического препятствования доступа бактериофагов к рецепторам. Интересно отметить факт ингибирования адсорбции бактериофагов к клеткам *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, обработанных поликлональной чумной агглютинирующей сывороткой, что хорошо согласуется с близким молекулярным составом поверхностных структур бактерий этих двух видов иерсиний.

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.Г. Дудиной соответствует отрасли науки «Биологические науки» и паспорту специальности 03.02.03 – «Микробиология» в областях исследований по пунктам 2 – «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов», 3 – «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов».**

**Личное участие автора** заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, выполнении микробиологических, физико-химических, иммунохимических исследований, анализе полученных результатов, в подготовке публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях. Разделы работы с просвечивающей электронной микроскопией выполнены совместно с сотрудником НОЦ Нанотехнологии ФГБОУ ВО «Вятского государственного университета».

## **Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати.**

Основные результаты диссертации опубликованы в 22 научных работах, из них 7 в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных работ. Материалы диссертации доложены и представлены на российских и международных научных конференциях.

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

В автореферате изложены основные идеи и выводы диссертации, показаны актуальность, новизна и практическая значимость результатов исследования, приведен список публикаций, в которых отражены основные научные результаты диссертации. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационной работы.

## **Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы.**

К достоинствам диссертационной работы можно отнести умелое изложение современных данных по исследуемой теме, корректно сформулированные цель и задача исследования, использование адекватных методов исследования, логически грамотное построение всей работы, включая рекомендации по использованию полученных результатов на практике.

По существу изложенных в диссертационной работе Л.Г. Дудиной материалов принципиальных замечаний нет. Вместе с положительными сторонами отметим ряд неточностей и опечаток в тексте рукописи.

1. На стр. 8 допущена опечатка в слове «*enterokolitica*». Кроме того, на этой же странице во втором абзаце указаны опубликованные в 1976 и 1979 гг. работы по выделению антибиотикорезистентных штаммов *Y. pseudotuberculosis*, тогда как есть более современные публикации по этому вопросу (Cabanel N., Galimand M., Bouchier C., Chesnokova M., Klimov V., Carniel E. Molecular bases for multidrug resistance in *Yersinia pseudotuberculosis* // Int. J. Med. Microbiol. – 2017. – Vol. 307, N 7. – P. 371–381.)

2. На стр. 30 ошибочно использован термин «наномеры» вместо «нонаме-

ры» (см. Palva, Randall, 1978; Nikaido, Nakae, 1980).

3. В настоящее время «стандарт мутности ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича» (стр. 53) называется «ОСО мутности бактериальных взвесей ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ.

4. Не совсем удачно сравнивать форму молекулы адгезина YadA с «леденцом» (стр. 31). Правильнее, на наш взгляд, говорить о форме молекулы в виде «шара и стержня».

5. На стр. 16. неудачно приведены параметры температуры («При низких температурах культивирования (4-30 °С) ... »): 30 °С не является низкой.

6. В библиографическом списке ссылки 28, 29 и 153–155 приведены на английском языке, хотя оригиналы указанных статей опубликованы на русском языке в отечественных журналах.

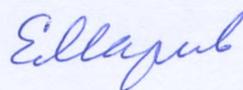
### **Заключение.**

В целом, диссертация Дудиной Любови Геннадьевны «Иммунохимическая характеристика рецепции бактериями *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* специфических бактериофагов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой представлены новые данные о химической рецепции клетками *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* специфических бактериофагов, полученные с использованием моноклональных антител против поверхностных антигенов иерсиний. По объему проведенных исследований, их новизне и научно-практической значимости работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018 г.), 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 Дудиной Любови Геннадьевны «Иммунохимиче-

ская характеристика рецепции бактериями *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* специфических бактериофагов» обсужден и одобрен на ученом совете ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, протокол № 3 от 14.03.2019 г.

Доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий биохимическим отделом 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

 Е. Ю. Марков

Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела эпидемиологии того же института



В. Т. Климов

Подписи Маркова Евгения Юрьевича и Климова Валерия Тимофеевича заверяю начальник отдела кадров и спец. части 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://irknipchi.ru/>; E-mail: [adm@chumin.irkutsk.ru](mailto:adm@chumin.irkutsk.ru)