

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Руниной Анастасии
«Новые рекомбинантные белки – антигены *Treponema pallidum* для
серологической диагностики сифилиса», представленную на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.02.03 – микробиология

Актуальность темы исследования

Эпидемиологические сведения о заболеваемости сифилисом в РФ показывают снижение общего числа выявляемых за последние годы случаев, однако вместе с тем увеличивается доля скрытых форм, в особенности ранних скрытых форм сифилиса, а также случаев позднего сифилиса с поражениями внутренних органов и центральной нервной системы. Такая динамика заболеваемости определяет направления дальнейшего совершенствования диагностики сифилитической инфекции. Для выявления скрытых форм сифилиса применение прямых методов этиологической диагностики ограничено, так как у пациентов отсутствуют очаги поражения для выявления возбудителя текущей инфекции.

Основными методами диагностики сифилиса в настоящее время являются непрямые методы исследования, которые включают в себя как нетрепонемные, так и трепонемные серологические исследования. Последние из них – наиболее востребованные в силу своей специфичности, однако их чувствительность может отличаться в зависимости от производителя, набора антигенов в панели теста, от формы и сроков заболевания. Проведение трепонемных серологических тестов подразумевает использование в качестве антигенов белков *Treponema pallidum*, которые в настоящее время возможно получить с применением технологий рекомбинантных белков, так как бледная трепонема не культивируется *in vitro*. Вследствие этого разработка и получение новых высокоэффективных трепонемных белков для применения в серологических исследованиях является одним из важных направлений совершенствования методов лабораторной диагностики сифилитической инфекции.

Новизна исследования

Новой разработкой диссертационной работы является иммуночип и реализованный в нем перечень белков *Treponema pallidum*, предложенных в качестве антигенов для серологической диагностики сифилиса. Иммуночип защищен патентом РФ на полезную модель №181902(U1) от 26.07.2018. Панель антигенов состоит из 10 белков, шесть из которых были выбраны и получены в виде рекомбинантных аналогов путем конструирования экспрессионных плазмид и экспрессии соответствующих белковых продуктов в штаммах-продуцентах. Четыре оставшихся белка –

рекомбинантные антигены, применяемые в настоящее время рутинно в лабораторных серологических тестах.

Каждый из шести новых предложенных белков был получен, подтвержден методом масс-спектрометрии и проанализирован на образцах сыворотки крови больных различными формами сифилиса, что позволило охарактеризовать значения чувствительности и специфичности, а также диагностической эффективности отдельных белков. Автором показана высокая диагностическая эффективность белков Tr0277, Tr0319 и Tr0453, и ограниченная – для белков Tr0684, Tr0965 и Tr1038.

Применение полной панели антигенов позволило статистически дифференцировать ранние и поздние формы сифилиса на основании представленности антител к отдельным рекомбинантным белкам.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

В рамках исследований диссертационной работы сконструированы экспрессионные плазмиды для каждого из предложенных в качестве антигенов белков бледной трепонемы, а также получены соответствующие штаммы-продуценты. Большую практическую значимость работы несет депонирование созданных штаммов-продуцентов во «Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов» при ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт», что позволяет их использование в рамках научных исследований и применение в новых диагностических тестах.

Особо важна предложенная практическая реализация серологического анализа с применением разработанных белков в формате иммуночипа, выполненная на базе ООО «Биочип ИМБ» при ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук (Акт внедрения №54/04-10/2018 от 04.10.2018). Иммуночип является современным подходом к проведению серологических исследований с использованием малого количества исследуемого материала и большим набором аналитов в одной реакции, а также возможностью автоматизации проведения анализа, что несет большой потенциал для практического применения в качестве диагностического теста.

Степень достоверности результатов, научных положений и выводов, представленных в диссертации

Достоверность полученных результатов подтверждается четким планированием экспериментов и соответствующей проверкой результатов на каждом этапе разработки штаммов-продуцентов и проведения серологических исследований. Клонирование кодирующих последовательностей отобранных белков в экспрессионные плазмиды подтверждалось секвенированием региона вставки. Полученные белки

были идентифицированы с помощью масс-спектрометрии и их соответствие заявленным подтверждено по результатам сравнения спектров в базе данных *SwissProt*. Статистическая обработка данных выполнена на высоком уровне с применением соответствующих адекватных аналитических тестов. Выводы и положения, выносимые на защиту, основаны на полученных результатах по каждой из поставленных задач исследования.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Руниной Анастасии изложена на 163 страницах машинописного текста, включает 15 таблиц и 39 рисунков. Список литературы содержит 193 источника и включает в себя 172 статьи в отечественных и зарубежных журналах, 10 книг, 2 патента, 1 диссертация и 8 интернет-сайтов.

«Введение» содержит обоснование актуальности темы диссертационной работы, включая особенности эпидемиологии, актуальные вопросы и современные направления развития диагностики сифилиса. Раздел также содержит описание степени разработанности темы, ее новизну, теоретическую и практическую значимость, цель и задачи исследования, а также основные положения, выносимые на защиту, с описанием степени достоверности полученных результатов.

«Обзор литературы» содержит описание морфологии и физиологии бледной трепонемы, которые определяют ее особенности как патогена при взаимодействии с организмом хозяина. Охарактеризованы различные формы течения сифилиса и эпидемиология данного заболевания за последние годы в мире и в России, в частности. Подробно описаны современные методы диагностики сифилиса, сферы их применения, чувствительность и специфичность, а также недостатки и возможности их совершенствования. Особое внимание сфокусировано на современных подходах к применению рекомбинантных антигенов *T. pallidum*, описаны способы изучения протеома и предсказания клеточной локализации белков по анализу их последовательности с помощью биоинформатических ресурсов. Обзор литературы четко структурирован и достаточно полно охватывает современное состояние и перспективы развития трепонемных серологических методов диагностики.

«Материалы и методы» описывают применяемые автором биоинформатические программы, методики проведения лабораторных исследований, включая молекулярно-генетические, белковые и серологические методики, а также способы статистической обработки полученных данных.

Раздел «Результаты» содержит 4 основные части в соответствии с задачами диссертационной работы и описывает полученные в ходе выполнения исследований данные. Охарактеризованы результаты биоинформатического анализа последовательностей кандидатных белков и предсказание их клеточной локализации, описано получение штаммов-

продуцентов, экспрессия и очистка целевых рекомбинантных белков *T. pallidum*, оценка их диагностических характеристик, и далее их применение в формате иммуночипа.

В «Обсуждении» автором рассматриваются полученные результаты в свете данных других современных исследований в данной области и характеризуется ценность полученных результатов для развития и совершенствования серологической диагностики сифилиса.

«Заключение» резюмирует описанные в диссертационной работе результаты проведенных исследований и выделяет наиболее ценные из них.

Диссертационная работа также содержит раздел «Практические рекомендации», характеризующий перспективы применения разработанной методики для повышения качества проводимых серологических исследований.

Представленные в диссертации «Выводы» обоснованы, логично вытекают из анализа полученных результатов исследований и соответствуют поставленным задачам.

Диссертационная работа характеризуется грамотным изложением и четкой структурой. Все поставленные задачи решены автором в полной мере.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы Руниной А. нет. После ознакомления с работой возникли следующие вопросы, которые, однако, не носят принципиального характера и не снижают ценность представленной диссертации:

1. Какое влияние на результаты серологического тестирования при сифилисе могут играть индивидуальные особенности функционирования иммунной системы, связанные с генетическим полиморфизмом генов сигнальных рецепторов врожденного иммунитета?

2. Существуют ли перспективы практического использования у серологических тестов с использованием нативных антигенов *T. pallidum*?

3. Какие, по мнению автора, наиболее значимые перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования?

Заключение

Диссертация Руниной Анастасии на тему «Новые рекомбинантные белки – антигены *Treponema pallidum* для серологической диагностики сифилиса», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология, выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Дерябина Дмитрия Геннадьевича, является законченной научно-квалификационной работой, в которой описано конструирование экспрессионных систем, а также получение и применение на иммуночипе новых рекомбинантных белков *Treponema pallidum* в качестве антигенов для

серологической диагностики сифилиса. По актуальности, новизне, объему выполненных исследований, теоретической и практической значимости диссертационная работа Руниной А. соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями в редакции постановлений Российской Федерации от 10.11.2017 г. № 1093, от 24.02.2021 г. №118, от 07.05.2021 г. №458), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология (биологические науки).

Официальный оппонент:

член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор,
заведующий кафедрой клинической биохимии
и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО
«Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова»
Министерства обороны Российской Федерации
194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.6
E-mail: iamvma@mail.ru
Тел. +7(931)240-64-39

А. М. Иванов

«12» октября 2021 г.

