

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, члена-корреспондента РАН Черкасова Сергея Викторовича на диссертационную работу Руниной Анастасии на тему: «Новые рекомбинантные белки – антигены *Treponema pallidum* для серологической диагностики сифилиса», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «микробиология» в диссертационный совет Д 208.130.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

### **Актуальность избранной темы**

Актуальность проблемы лабораторной диагностики сифилиса определяется как сохраняющейся распространенностью заболевания, так и особенностями клинических проявлений, связанных с хроническим длительным течением, наличием скрытых форм заболевания и тяжелыми последствиями для здоровья и жизни пациентов. В последнее время в странах с низким и средним уровнем доходов заболеваемость сифилисом остается относительно высокой, составляя 47-93 случая на 100 000 населения. Напротив, в Западной Европе и Северной и Южной Америке показатели заболеваемости имели тенденцию периодически колебаться, снижаясь после усиления мер контроля, а затем повышаясь (WHO, 2015; Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance, US Department of Health and Human Services, 2015; Public Health England. Infection Report, London: Public Health England, 2015) Несмотря на то что в России эпидемиологическая ситуация несколько улучшилась, тем не менее она сравнима по заболеваемости с США и европейскими странами. В настоящее время серьезной проблемой эпидемиологии сифилиса является преобладание скрытых форм. По некоторым данным доля случаев скрытого течения раннего и позднего сифилиса составляет до 72% (R.E. LaFond and S.A. Lukehart, 2016). Это обстоятельство актуализирует задачу разработки современных высокочувствительных и специфичных методов диагностики сифилиса. Поэтому целью настоящей работы явилось совершенствование серологической диагностики сифилиса на основе применения новых рекомбинантных белков – антигенов *Treponema pallidum*.

### **Научная новизна диссертационной работы**

По результатам биоинформатического анализа были отобраны белки наружной и внутренней мембраны, а также цитоплазматические белки, содержащие липидные группы и без липидной модификации. В разработку и серологические исследования были включены: белок внешней мембраны Trp0453

(липопротеин), белки цитоплазматической мембраны Tr0319 (липопротеин), Tr0684 (липопротеин) и Tr0965 (нелипидный), а также белки цитоплазмы Tr0277 (нелипидный) и Tr1038 (нелипидный). Для каждого из них была описана высокая или средняя серореактивность с антителами в сыворотке крови больных сифилисом. В результате был реализован анализ иммуногенности белков различной структуры и клеточной локализации.

Получены генно-инженерные экспрессионные системы для каждого из отобранных белков, содержащие соответствующий ген, которые позволили сформировать соответствующие штаммы-продуценты, используемые для синтеза и очистки фракций рекомбинантного белка.

Была проведена оценка эффективности диагностического использования рекомбинантных белков Tr0453, Tr0319, Tr1038, Tr0965, Tr0277 и Tr0684 *T. pallidum* в качестве антигенов для трепонема-специфической диагностики сифилиса. Сделан вывод, что наиболее перспективными по индивидуальной оценке специфичности и чувствительности методами иммуно-ферментного анализа (ИФА) и непрямой реакции иммунофлюоресценции (ИРИФ) являются белки Tr0453, Tr0319 и Tr0277.

Разработан иммуночип с расширенной панелью антигенов *T. pallidum*, позволяющий проводить серологический анализ профиля антител к 10 антигенам *T. pallidum* с возможностью вероятностной дифференциации форм сифилиса со значениями чувствительности 90,6 % и специфичности 100 % серодиагностики сифилиса (Патент РФ на полезную модель № 181902 от 26.07.2018). Для эффективной диагностики сифилиса с использованием иммуночипа предложен алгоритм интерпретации результатов исследования серологического ответа.

### **Степень обоснования и достоверности полученных результатов**

Достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, доказывается широко представленным фактическим и наглядным материалом. Все эксперименты выполнены с использованием современных микробиологических методов исследования и на современном оборудовании, включая биоинформатический анализ протеома *Treponema pallidum*, конструирование экспрессионных систем с амплификацией кодирующих последовательностей генов целевых белков, секвенированием, получение рекомбинантных белков на основе металл-хелатной хроматографии и денатурирующего электрофореза и анализ их специфичности и чувствительности в составе диагностических тест-систем.

Биоинформатическое прогнозирование клеточной локализации базируется на использовании многих программных ресурсов и уточнение результата

дает возможность верифицировать и получить в итоге точные данные о характере расположения данного белка внутри клетки. Из этого можно сделать вывод, что результаты подобного прогнозирования являются достоверными и могут быть экстраполированы на малоизученные белки при подборе кандидатных антигенов для диагностики бактериальных инфекций. Для всех белков с сигнальной последовательностью по результатам исследования программой *SignalP 3.0* прогнозирование было подтверждено данными базы *UniProt*.

Характеристика каждого полученного антигена была осуществлена как классическим методом ИФА, так и методом нРИФ на стеклянных слайдах.

Оценка вклада совокупности всех исследуемых белков в диагностику сифилиса была охарактеризована на иммуночипах в сравнении разработанной расширенной панели из 10 антигенов с известной панелью из 4 антигенов, традиционно применяемых для трепонема-специфической диагностики сифилиса.

Корректный дизайн исследования, соответствующий цели работы, а также адекватная интерпретация данных позволяют судить о полученных результатах как о достоверных. Сформулированные соискателем выводы и рекомендации сделаны на основе глубокого научного анализа экспериментальных данных и логично вытекают из результатов лабораторных исследований.

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

Для синтеза рекомбинантных белков *Treponema pallidum* созданы экспрессионные системы и штаммы-продуценты, что позволило разработать диагностические тест-системы, основанные на использовании расширенной панели диагностических белков. Штаммы-продуценты рекомбинантных белков *Treponema pallidum* депонированы в Национальном биоресурсном центре – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов при ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (регистрационные номера №13267, №13266, №13268, №13458, №13457 и №13459), откуда могут быть получены для последующего научного и коммерческого применения.

Получение синтезированных *de novo* антигенов *T. pallidum* позволило изготовить модельную серию иммуночипов для специфической диагностики сифилиса 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). Использование иммуночипа с расширенной панелью антигенов *T. pallidum* в комплексе лабораторных тестов дает

возможность повысить чувствительность и специфичность серологической диагностики сифилиса.

### **Соответствие работы требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.**

Диссертация изложена на 163 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, главы собственных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, иллюстрирована 17 рисунками и 11 таблицами. Библиографический указатель включает 193 источника (22 отечественных и 171 зарубежный). Диссертация и автореферат написаны грамотным литературным языком с использованием общепринятой терминологии.

Работа А. Руниной носит целостный и завершённый характер. Цель исследования согласуется с темой диссертации, а поставленные задачи обеспечивают достижение этой цели. Выводы сформулированы на основе представленных в диссертации результатов, соответствуют цели и задачам исследования и позволяют обосновать сформулированные соискателем положения. Содержание диссертационной работы и её выводы полностью соответствуют данным, приведенным в автореферате.

Материалы диссертации доложены на 10 различных российских научных форумах, опубликованы в 8 печатных работах, в рецензируемых журналах рекомендованных ВАК РФ, 1 публикация в зарубежной печати, а также получен 1 патент РФ на полезную модель (4 статьи опубликованы в журналах, включенных в базы данных *Web of Science* и *Scopus*).

Наряду с высокой оценкой работы, при чтении диссертации у оппонента возникли следующие вопросы:

1. Как можно объяснить наличие только 80-83,3 % отрицательных результатов в группе здоровых по сравнению со 100% отрицательных результатов в группе больных боррелиозом при определении антител методом ИФА к белкам Tr0277, Tr0319 и Tr0453, имеющим наибольшую диагностическую ценность?
2. Какое биологическое значение могут иметь белки Tr0277, Tr0319 и Tr0453 в инфекционном процессе при сифилисе?

В целом заданные вопросы носят уточняющий характер и не умаляют достоинства данной работы.



## Заключение

Таким образом, диссертация Руниной Анастасии на тему: «Новые рекомбинантные белки-антигены *Treponema pallidum* для серологической диагностики сифилиса», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение научной задачи по получению рекомбинантных белков *Treponema pallidum* с целью создания диагностических тест-систем на основе иммуночипов для эффективной диагностики сифилиса с возможностью дифференциации ранних и поздних скрытых форм сифилиса, что имеет существенное значение для микробиологии.

По своей научной новизне, научной и практической значимости, объему исследований, диссертационное исследование А. Руниной полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации №335 от 21 апреля 2016 г., №1168 от 1 октября 2018г., №118 от 24 февраля 2021 г., №458 от 7 мая 2021 г.), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «микробиология».

Официальный оппонент: директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН

С.В. Черкасов

08.10.2021 г.

460014, г. Оренбург, ул. Набережная, д. 29.  
ФГБУН Оренбургский исследовательский центр УрО РАН  
Тел.: 8(3532)77-54-17, 8-912-848-52-18  
E-mail: [cherkasovsv@yandex.ru](mailto:cherkasovsv@yandex.ru)

Подпись Черкасова Сергея Викторовича заверяю:  
Ученый секретарь ОФИЦ УрО РАН,  
д.м.н., профессор



В.А. Гриценко