

Отзыв

официального оппонента

кандидата медицинских наук Поспеловой Светланы Валерьевны на диссертацию **Борисенко Андрея Юрьевича** «Молекулярно-генетический и биоинформационный скрининг вирулентных бактериофагов *Staphylococcus aureus* на основе анализа CRISPR/Cas-системы бактерии»

на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология

Актуальность темы диссертации

Staphylococcus aureus по-прежнему сохраняет лидирующие позиции как возбудитель широкого спектра заболеваний - от кожных инфекций до тяжелых септических состояний. Активное использование антибиотиков в практической медицине и некоторых отраслях сельского хозяйства наряду с положительными результатами привело и к активизации процесса формирования различных механизмов резистентности к антибактериальным препаратам у бактерии. Разработка новых поколений антибиотиков для лечения инфекций, вызванных *S. aureus*, дорогостоящий и длительный процесс с неясной перспективой. На фоне этой проблемы вновь актуальной альтернативой антибиотикам становится фаготерапия. Однако эффективность лечения бактериофагами зависит от чувствительности бактериальных культур к лечебным штаммам бактериофагов, а классическое определение такой чувствительности представляет собой длительный процесс. Современные геномные и биоинформационные технологии позволяют целенаправленно моделировать процесс отбора высокоспецифичных и вирулентных фагов против патогенных микроорганизмов на основе геномных структур CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами») бактерий. Посредством CRISPR-системы бактерии распознают и эффективно расщепляют ДНК фагов, используя ферментную систему *Cas* (CRISPR-associated). Однако, CRISPR-система у золотистого стафилококка изучена недостаточно, поскольку в научных работах говорится о разном строении и даже отсутствии CRISPR-системы у этого вида (Cao *et al.*, 2016; Xihong *et al.*, 2018). Таким образом, актуальность темы диссертации **Борисенко Андрея Юрьевича** «Молекулярно-генетический и биоинформационный скрининг вирулентных бактериофагов *Staphylococcus aureus* на основе анализа CRISPR/Cas-системы бактерии» несомненна. Анализ имеющихся и получение новых данных о CRISPR-системе *Staphylococcus aureus* является шагом к созданию персонализированной фаговой терапии.

Достоверность и новизна исследований и полученных результатов

Значительный фактический материал, повторяемость выполненных исследований, адекватная современная обработка статистических данных свидетельствуют о достоверности полученных результатов.

Что касается новизны, то автором проведено изучение и анализ CRISPR-системы в геномах *S. aureus* из базы данных Genbank и сформированной коллекции при помощи биоинформационного программного алгоритма. Установлена и продемонстрирована гетерогенность строения CRISPR-локусов у *S. aureus*. В результате, в геномах *S. aureus* идентифицированы гены CRISPR-систем: I-A, II-A, III-A, IV-A, I-B. Также выявлено участие плазмид *S. aureus*, используемых в качестве дополнительных источников генов *cas* и CRISPR-кассет. Изучение степени защищенности бактерии позволило выявить CRISPR-кассеты содержащих от 1 до 15 спейсеров разделенных разными повторяющимися последовательностями. При помощи биоинформационных программ удалось установить, что наибольшее генетическое влияние на анализируемые штаммы *S. aureus* оказывали бактериофаги рода *Staphylococcus* - 70%, *Streptococcus* - 67%, *Mycobacterium* - 67%, *Bacillus* - 54%, *Gordonia* - 53%, *Arthrobacter* - 23%, *Streptomyces* - 12%.

Обнаруженные CRISPR-кассеты и гены *cas* в геномах *S. aureus* из базы NCBI данных при помощи биоинформационного программного алгоритма послужили платформой для синтеза детектирующих и фланкирующих праймеров. В результате автору удалось выявить наличие генов *cas* и выделить 45 CRISPR-кассет с последующим их секвенированием и оценкой устойчивости штаммов *S. aureus* к препаратам бактериофагов. Используемый автором биоинформационный алгоритм позволил расширить представления о проблеме устройства CRISPR-системы *S. aureus* и возможности применения его для изучения CRISPR-систем в других бактериях с целью создания персонализированной фаговой терапии.

Значимость для науки и практики

Интересен подход автора к решению поставленных задач – на высоком методическом уровне проведенные исследования геномов своих штаммов золотистых стафилококков и анализ аннотированных геномов из базы данных NCBI внесли новые данные в раздел структуры, устройства CRISPR-системы *S. aureus*, что представляет большую научную ценность.

Результаты исследования помогут обосновать новые подходы к анализу природы антагонистических взаимодействий бактерий и фагов, на основе которых могут быть получены новые знания о фундаментальной природе антагонизма между бактериями и фагами. Практическая значимость представляемого научного исследования будет особенно важна при разработке технологического алгоритма скрининга антибактериальных вирулентных фагов, которые могут стать основой создания новых высокоспецифичных фаговых препаратов нового поколения для фаготерапии, заменив или дополнив во многих случаях антибиотикотерапию в медицинской практике.

Содержание диссертации, ее завершенность

Диссертация А.Ю. Борисенко изложена на 158 страницах компьютерного текста, построение работы традиционно и логично, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 48 отечественных и 325 зарубежных источников. Фактический материал наглядно иллюстрирован 14 таблицами и 17 рисунками. Последовательность глав коррелирует с порядком решаемых задач. Сформулированные в диссертации выводы и положения, выносимые на защиту, логично вытекают из представленных результатов.

В разделе «Введение» автор отражает актуальность избранной темы, формулирует цель и задачи исследования, описывает методологию, степень достоверности и личное участие автора. Здесь же представлены положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Работа представляется завершенной, все положения обоснованы.

В Главах 1 и 2 («Обзор литературы») А.Ю. Борисенко подробно рассматривает общую характеристику бактерий рода *Staphylococcus*, включая биологические и физико-химические свойства, факторы патогенности (1.1), а так же общие сведения о бактериофагах золотистых стафилококков (1.2). В главе 2 обзора литературы автор представляет сведения о структуре, функциональных механизмах действия, технологии анализа CRISPR/Cas-системы бактерий, в том числе *Staphylococcus aureus*. Обзор является достаточно полным, автором проведен анализ значительного числа источников, как отечественных, так и зарубежных.

Глава 3 «Материалы и методы» посвящена описанию взятых в работу штаммов стафилококков, изолированных от больных, обратившихся за медицинской помощью в лечебные учреждения г. Иркутска и методов их исследования, включая микробиологические и молекулярно-генетические. Так же были проанализированы 398 полногеномных последовательностей ДНК *S. aureus* из базы данных GenBank NCBI. Отдельно описаны биоинформационные методы поиска и анализа CRISPR/Cas-систем. Представлена информация о методиках статистического анализа и оценке достоверности полученных результатов.

Глава 4 посвящена характеристике чувствительности выделенных от больных 106 штаммов *Staphylococcus aureus* к действию антибиотиков и лечебных бактериофагов, приведены данные микробиологических и молекулярно-генетических исследований, проведена статистическая обработка материала с использованием корреляционного анализа. Автору удалось отметить корреляцию между устойчивостью ряда штаммов к антибиотикам и препаратам бактериофагов.

В главе 5 («Результаты молекулярно-генетических и биоинформационных исследований CRISPR/ cas системы в штаммах *S. aureus*») автором была представлена новая информация о строении CRISPR- системы *S. aureus*, в

геномах золотистых стафилококков выявили присутствие генов CRISPR: I-A, II-A, III-A, IV-A, I-B. Были обнаружены *cas*-гены, получены их структурные и функциональные характеристики, идентифицированы CRISPR-кассеты и проанализирована фаговая устойчивость каждого штамма.

Проведенная биоинформационная работа позволила автору наработать праймеры для идентификации CRISPR-кассет с последующим их секвенированием, результаты практической работы которой были представлены в главе 6.

Результаты исследований и их соответствие имеющимся литературным данным обобщены и проанализированы в главе «Заключение», представлены перспективы дальнейшего использования полученных данных.

Выводы диссертации соответствуют поставленной цели и задачам, базируются на анализе достаточного по объему материала, логично вытекают из собственных данных автора.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Работа выполнена на достойном методическом уровне. Структура исследования представлена логично, главы заканчиваются обобщением изложенного материала. По оформлению рукописи диссертации у меня возникло одно замечание – разделение обзора литературы на 2 главы, которого, с моей точки зрения, можно было избежать, используя нумерацию разделов главы.

Материалы диссертации достаточно полно отражены в автореферате, доложены на научных и научно-практических мероприятиях, представлены в научной печати.

Положительно оценивая представленную работу в целом, подчеркивая ее актуальность, новизну, теоретическую и практическую значимость, хотелось бы получить ответ диссертанта на ряд вопросов:

Замечания и вопросы:

1. В работе использовано 398 полногеномных последовательностей ДНК *S. aureus* из базы данных GenBank NCBI. Какие критерии отбора штаммов вы использовали?
2. В Таблице 8, стр.71 - доля резистентных к ванкомицину золотистых стафилококков составила $3,8 \pm 1,9\%$, тогда как этот вариант резистентности сегодня еще встречается крайне редко (к счастью), каждая культура описана. Как можно объяснить такую значительную долю VRSA?
3. В разделе главы 3 - 3.2 Микробиологические методы исследования перечислены среды для выделения стафилококков, но для этого достаточно ЖСА, Кровяного агара и Мюллера-Хинтон для определения антибиотикочувствительности. Остальные среды из данной таблицы используют для выделения других видов микроорганизмов.

Заданные вопросы носят дискуссионный характер и ни в коей мере не умаляют значения результатов, полученных автором.

Заключение

Таким образом, диссертация **Борисенко Андрея Юрьевича** «Молекулярно-генетический и биоинформационный скрининг вирулентных бактериофагов *Staphylococcus aureus* на основе анализа CRISPR/Cas-системы бактерии» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение научной задачи по анализу CRISPR/Cas-системы *Staphylococcus aureus* и созданию на основе полученных результатов алгоритма оптимизации подбора препаратов бактериофагов для клинической практики.

По своей научной новизне, научной и практической значимости, объему исследований, диссертационное исследование А.Ю. Борисенко полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями, утвержденными постановлениями Правительства РФ от 21.04.2016 г. №748, 28.08.2017 г. №1024 и 01.10.2018 г. №1168), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор - Борисенко Андрей Юрьевич – заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

23.11.21

Официальный оппонент

Доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО

«Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.м.н.

Пospelова Светлана Валерьевна

Контактные данные официального оппонента:

Почтовый адрес: 614000, г.Пермь, ул.Петропавловская, 26 - ФГБОУ ВО

«ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ

Контактный телефон: 8-902-792-02-30;

Адрес электронной почты: pospelova_svetlana@mail.ru

Подпись доцента кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ к.м.н. Пospelовой С.В. заверяю

Начальник отдела кадров ФГБОУ ВО «ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации



И.А. Болотова