

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Корниенко Марии Андреевны

«Биохимические и генетические особенности реализации патогенности госпитальными штаммами *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus haemolyticus*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07- Генетика

Диссертационная работа Корниенко Марии Андреевны посвящена системному изучению патогенности штаммов *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus haemolyticus*. В отличие от хорошо изученного штамма *Staphylococcus aureus*, данные стафилококки относятся к виду коагулазоотрицательных и в течении долго времени не рассматривались как серьезная угроза для здоровья человека. Однако, в последние годы все больше инфекций, в первую очередь оппортунистических и госпитальных инфекций ассоциируют именно с коагулазоотрицательными стафилококками. Ввиду явного недостатка данных о распространении и патогенности коагулазоотрицательных стафилококков системное изучение этих вопросов крайне актуально и с фундаментальной, и с практической точки зрения. Полученные в ходе работы обширные микробиологические, геномные, и протеомные данные имеют важное практическое значения для понимания роли коагулазоотрицательных стафилококков в госпитальных инфекциях.

Диссертация построена по традиционному принципу, насчитывает 186 страницу, состоит из введения и восьми глав. Основной части работы предпослан обзор литературы, который прекрасно предваряет саму работу, и полностью вводит читателя в курс дела. Описаны особенности коагулазоотрицательных стафилококков, перечислены потенциальные факторы вирулентности, а также охарактеризованы методы исследования, как классические, так и самые современные. Обзор литературы хорошо написан и структурирован, иногда в нем не хватает картинок и схем, которые сделали бы понимание проще, однако, это по всей видимости связано с тем, что

диссертант сам очень хорошо разобралась в теме и ей такие наглядные пояснения не нужны.

Прочтение основного рабочего раздела диссертации вызывает восхищение объемом и скрупулёзностью проделанной работы. Обычные микробиологические работы включает в себя изучения нескольких или десятка разных штаммов, здесь же было **индивидуально** изучено 169, проведено определение вида, проведено молекулярное типирование, проведено определено профиля лекарственной устойчивости (десять антибиотиков для каждого изолята!), полногеномное секвенирование ряда штаммов, протеомный анализ (в качестве метода типирования и для изучения патогенности), несколько штаммов было изучено более подробно, с особым вниманием к возможным причинам патогенности. Особо стоит отметить, что автор работал не с безопасным лабораторным штаммом кишечной палочки, а с реальными патогенами, что заслуживает особого уважения.

Представленная работа абсолютно заслуженно может считаться удачным примером применения методов системной биологии к решению практических биомедицинской задачи. На довольно большой выборке коагулазоотрицательных стафилококков было показано, что доминирующие в стационарах России виды — это *S.epidermidis* и *S.haemolyticus*, при помощи методов молекулярного типирования было показано принадлежность большинства штаммов к госпитальным, была показана клональная структура. Стоит особо отметить, что использованный метод MLST (от англ. Multilocus Sequence Typing), требует секвенирования набора генов для каждого штамма в отдельности (очень трудоемкая работа). И если для *S.epidermidis* MLST схема типирования существует, то для *S.haemolyticus* Мария разработала схему сама, подтвердила ее адекватность и применила. Кроме того, было проведено типирование на основе прямого бактериального профилирования, на основе масс-спектрометрии лизатов. Накопленные при этом подходе данные в дальнейшем упростят процесс типирования, так время анализа для МАЛДИ масс-спектрометрии значительно меньше, чем для MLST или гель-

электрофореза в пульсирующем поле. Кроме идентификации видов было проведено широкомасштабное изучение геномных и протеомных данных, с целью обнаружить факторы патогенности.

Все системные исследования нашли отражения в выводах, вынесенных на защиту. Один из важных практических результатов, о предпочтительности использования ванкомицина при лечении *S.epidermidis* и *S.haemolyticus*, судя по всему, из скромности даже не был включен в выводы. В тоже время, когда диссертант от системного подхода перешла к изучению конкретных штаммов можно отметить некоторые недостатки в постановке экспериментов и их интерпретации. К чести диссертанта стоит сразу отметить, что эта часть работы практически не нашла отражения в выводах (только обобщения), так как видно, что строгих выводов из проведенных экспериментов сделать нельзя. Во-первых, сомнения вызывает выбор штаммов, очевидно, что полногеномное секвенирование и детальное исследование всех 169 изолятов сделать было невозможно, но в качестве основной причины выбора указана «клиническая значимость», например, смерть пациента. Но нигде не сказано, что все остальные изоляты выделены из выживших, и что причина смерти была именно в этих заражениях. Никаких вопросов не вызвал был случайный выбор штаммов или еще лучше основанный на столь скрупулезном молекулярном типировании, хотя факт учета этих данных и приведен в работе, возможно, следовало расписать процесс выбора более подробно (взять наиболее отличающиеся или наиболее схожие и объяснить почему?). Во-вторых, эксперимент по сравнительной оценке способности формировать биопленки явно нуждается в том, чтобы быть дополненным *S. aureus* (хорошо изучен, биопленки образует) и каким-нибудь коагулазоотрицательный стафилококк, который биопленки не образует. Без таких контролей (только с контролем пустая среда) трудно интерпретировать полученные данные, о чем говорит несколько кратное превышение фона? Это много или мало? Различия между штаммами значимы? Или это все примерно одно и тоже и просто значит, что биопленки могут образовываться. Абсолютно схожие претензии к

кинетики изменения ЛДГ, почему здесь не измерены все штаммы? Почему опять нет какой-нибудь не патогенного? Гемолитическая активность измерена для все всех штаммов плюс не патогенный (ATCC12228), но тут нет *S. aureus*. Что дают эти цифры для понимания патогенности? Сканограммы взаимодействия с клетками человека очень красивы, но сделаны опять для очень маленькой выборки штаммов. В отличие от аккуратных системных экспериментов и анализа, все эти результаты скорее запутывают читателя, так как не позволяют сделать однозначных выводов (автор диссертации их, к счастью, и не делает. Один из результатов этой части все-таки попал в выводы, это роль фага Sp β в патогенности SE36-1. Из данных секвенирования четко показано наличие этого фага в виде внехромосомного элемента (интересно, что для других изолятов видно наличие этого фага в геноме). Способность этого фага лизировать клетки так же показана, однако, для подтверждения роли этого фага в патогенности явно не достаточно проведенных экспериментов, сам диссертант очень честно в выводах пишет «можно расценивать как фактор», а не «является фактором». Красота структурной части работы, скорее даже подчеркивается этими небольшими недочетами в проведении экспериментов с конкретными изолятами, потому что большинство выводов уже можно было сделать из геномных и протеомных данных. Если рассматривать эксперименты по характеристике индивидуальных штаммов как иллюстрацию эффективности системного анализа этой популяции коагулазоотрицательных стафилококков, не делая значимых выводов из конкретных значений оптической плотности, ЛДГ активности и т.д., то к работе не останется никаких претензий.

Сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Корниенко Марии Андреевны, которая является научно-квалификационной работой, содержащей решение важной генетической задачи, и полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842, предъявленным к

кандидатским диссертация, а ее автор Корниенко Мария Андреевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07- Генетика.

01.12.2016

Старший научный сотрудник кафедры Химии природных соединений
Химический факультет Московского государственного университета имени
М.В. Ломоносова

к.х.н.

И.А. Остерман

Илья Андреевич Остерман

89162557762 osterman@yandex.ru

Подпись И.А. Остермана

ЗАВЕРЯЮ

Декан Химического факультета Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова

академик РАН, д.х.н., профессор

> В.В. Лунин

