

Отзыв

о диссертационной работе Корниенко Марии Андреевны на тему «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»

Проблема стафилококковой инфекции уже на протяжении более 30 лет является одной из наиболее важных и интересных для медицинской науки и здравоохранения. Ей посвящено огромное количество публикаций в отечественной и зарубежной литературе, поток которых продолжает нарастать. Ключевой проблемой в изучении микробиологии любых инфекций является систематика микроорганизмов. Помимо теоретического интереса, вопросы систематики имеют непосредственный практический «выход» в бактериологическую диагностику инфекций, оценку удельного веса в патологии разных видов и типов вариантов возбудителя. Представления о классификации бактерий - процесс динамический, связанный с накоплением новой информации и изменениям сложившихся воззрений. Это в полной мере касается так называемых оппортунистических патогенов, к которым, в первую очередь, относятся псевдомонады и стафилококки. Это происходит потому, что для развития инфекционного процесса, вызываемого такими патогенами первостепенным фактором отбора патогенных форм и реализацией их патогенных свойств является организм хозяина и его иммунная система. Основные усилия исследователей прошлого века были направлены на изучение и дифференциацию коагулазоположительных *Staphylococcus aureus*, от других коагулазоотрицательных стафилококков, которые, как тогда считалось, не имеют медицинского значения. Биологическое разнообразие последних не очень волновало медицинских микробиологов в связи с господствовавшей точкой зрения о непатогенности *S. epidermidis*. Однако, в 90-е годы накопилось достаточно данных для понимания роли коагулазоотрицательных (КОС) *S. haemolyticus* и *S. epidermidis* - представителей нормальной микрофлоры человека. Они могут быть причиной септицемии, перитонитов, отитов, инфекций мочевыводящих путей. *S. haemolyticus*

выявляют при инфекционных эндокардитах как искусственных так и нативных клапанов, постнейрохирургических менингитах, инфекциях протезов и других имплантируемых объектов. *S. haemolyticus* - второй по значимости вид КОС в возникновении бактериемии в отделениях интенсивной терапии новорожденных, отделениях. Внутрибольничные штаммы КОС привлекают к себе внимание и по другой причине. Они обычно более устойчивы к антибиотикам и являются постоянным резервуаром генов антибиотикорезистентности для золотистого стафилококка. К факторам патогенности КОС относят многие факторы, такие как продукция фенол-растворимых модулинов, гемолизинов, а также секретируемые ферменты - протеазы, липазы, эстеразы, нуклеазы, которые можно обнаружить у многих штаммов КОС, а при этом вирулентность штаммов изменяется в широком диапазоне. Перечисленные выше причины объясняют необходимость проведения мониторинга внутрибольничных штаммов КОС современными молекулярногенетическими методами. Поэтому, комплексное исследование особенностей молекулярных механизмов проявления патогенности коагулазоотрицательными стрептококками микробиологическими, биохимическими методами, методом MLST и полногеномным секвенированием, предпринятое соискателем М.А.Корниенко, является абсолютно актуальным.

Диссертационная работа Корниенко М.А. представляет собой труд в 186 страниц текста с иллюстрациями, написанный по классическому принципу и состоящий из «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов исследований», «Результатов» «Обсуждения» «Заключения», «Выводов» и «Списка цитируемой литературы» из 187 источников.

Во «Введении» достаточно полно определена проблематика исследований и четко сформулированы цель и задачи диссертационной работы.

В обзоре литературы, состоящим из 4 глав подробно представлены современные данные о факторах патогенности стафилококков, о чувствительности КОС к антибактериальным препаратам. Особый интерес, на мой взгляд, представляет раздел 1.4 обзора литературы, где очень подробно и доступно для читателя любого

уровня подготовки описаны «Современные подходы к комплексному изучению механизмов патогенности коагулазоотрицательных стафилококков»

Этот раздел обзора наиболее интересен оппоненту и необходим для введения читателя диссертационной работы в проблему представляемой работы и методические подходы для ее решения. Необходимо отметить очень хороший литературный стиль текста и, несмотря на профессиональный редакторский глаз оппонента, в нем практически нет грамматических ошибок, неправильных согласований и даже опечаток. Обзор легко читается и может быть полезен широкому кругу микробиологов. К обзору есть только одно замечание и один вопрос. Первое - автор в тексте и в списке сокращений всегда пишет - «коагулазоотрицательные стафилококки» и в сокращении «КОС». Однако в своих же статьях всегда пишет «Коагулазонегативные». Почему нет единообразного обозначения? И общее замечание относится к вольному обращению диссертанта с общепринятыми терминами «патогенность и вирулентность». Так, Глава 1 (Обзор литературы) и раздел 1.1. обзора, соответственно, называются «Современные представления о механизмах патогенности и вирулентности КОС» и «Факторы вирулентности и патогенности КОС». На стр. 62 написано «Поиск факторов вирулентности и патогенности в составе нуклеотидных последовательностей ???». Из текста обзора неясно, автор отождествляет или разделяет эти понятия? Грамотнее было бы в названиях говорить лишь о факторах патогенности, характеризующих любой вид патогенных бактерий, тогда как, вирулентность - это свойство конкретного штамма, которое можно количественно или качественно определить. Об этом теперь написано даже в интернете.

В разделе «Материалы и методы», занимающем 21 страницу диссертации содержится подробное описание всех использованных в работе методов - микробиологических, биохимических и современных микроскопических и, конечно, современных молекулярно-генетических и протеомных методов. Этот раздел написан очень тщательно, так, что применить аналогичные методы сможет каждый, имеющий доступ к современному оборудованию и реактивам. Особое удовлетворение вызывает конечно коллекция собранных автором работы 169

изолятов, выделенных «из кала, соскобов из зева, бронхоальвеолярного аспирата, отделяемого конъюнктивы, с поврежденной кожи, из крови, мочи, ликвора, асцитической и плевральной жидкости, аутопсийного материала». Только из перечисления мест выделения изолятов понятно, насколько широк спектр локализации инфекций, вызываемых КОС. Позволю себе остановиться на разделе «Результатов» 3.2. «Выявление госпитальных штаммов КОС». Проблема госпитальной инфекции и госпитальных штаммов существует и более всего она изучена, конечно, для *S.aureus*. Для стафилококков этого вида показано, что госпитальные штаммы действительно сильно отличаются от негоспитальных, чему, кстати, нет окончательного объяснения. Определение госпитальных штаммов согласно ВОЗ приводится автором на стр. 16. Для КОС таких различий пока не обнаружено. Именно поэтому, все собранные автором штаммы можно априори считать госпитальными, так как они собраны в стационарах от больных с различной локализацией инфекции. И утверждать, что на основании «Генетического анализа собранных изолятов были сформированы группы типичных госпитальных штаммов» не совсем корректно. При этом к генетическому анализу отнесена лишь характеристика антибиотикорезистентности изолятов и MLST в сравнении с данными литературы? Для корректности такого утверждения нужно было включить в сравнительный анализ несколько негоспитальных штаммов. Тем более, что автор «разработала эффективную схему MLST» и исследование нескольких дополнительных штаммов не сильно утяжелило бы и без того сложную работу. По разработке эффективной схемы MLST автор проделала большую работу по выбору генов, позволяющих дифференцировать штаммы, клонированию фрагментов этих генов и определению их нуклеотидных последовательностей и получения достоверных дифференциционных коэффициентов. В результате этой работы вся коллекция изолятов (71) была поделена на 19 сиквенс-типов. Такая работа проделана не впервые. Автор сама ссылается на аналогичную работу №170 в списке литературы и в нашем институте Ворониной О.Л. с соавт. в 2011 была опубликована статья «Разработка схемы мультилокусного секвенирования *S. haemolyticus* и ее применение для молекулярно-эпидемиологического анализа

штаммов, выделенных в стационарах РФ в 2009-20 Югт», на которую я не нашла ссылки в списке литературы. Для пионерских работ на тему мультилокусного секвенирования стафилококков это совсем не много, но для того, чтобы говорить, что «на сегодняшний день для *S. haemolyticus* нет апробированной схемы MLST типирования» надо было сравнить свою работу с двумя другими и оценить преимущества своей разработанной схемы.

Наиболее приоритетным является раздел диссертационной работы 3.3, посвященный системному анализу индивидуальных штаммов КОС, включающему полногеномное секвенирование 3-х изолятов *S. epidermidis* и 4-х *S. haemolyticus*. Это большая часть работы, выполненная с привлечением специалистов по геномике и достоверность полученных сиквенсов, правильности аннотирования секвенированных геномов не вызывают сомнения. Эти главы хорошо написаны и иллюстрированы. Автором проделана большая биоинформационная работа и все 7 геномов зарегистрированы в международных базах данных.

Раздел результатов 3.3.3. Раздел экспериментальных исследований «Оценка вирулентности исследуемых изолятов КОС» начинается с рассмотрения особенностей формирования биопленок стафилококками различных видов и включает данные по сравнительной оценке формирования биопленок изолятами КОС в экспериментах *in vitro*, электронные микрофотографии формирующихся биопленок и, особенно, интересная часть - формирование биопленок на культуре клеток НТ-29. Оппоненту известно, что довольно трудно экспериментально показать формирование биопленок на эукариотических клетках и, поэтому хочется отметить эту экспериментальную удачу диссертанта. Вызывает лишь возражение первая фраза этого раздела, где утверждается, что «одним из основных факторов вирулентности стафилококков является способность формировать биопленки». Способность к формированию биопленок, особенно, в условиях лаборатории, может быть продемонстрирована практически для любого микроорганизма, а вот доказать, что инфекция вызвана биопленочным существованием возбудителя в организме очень сложно. Только в 2014 году на Европейском симпозиуме клинических микробиологов была разработана система микробиологических,

микроскопических, молекулярно-генетических критериев, положительные подтверждения которых могут доказать, что хроническая инфекция вызвана биопленками. Есть один бесспорный случай существования стафилококков и псевдомонад в состоянии биопленок, приводящих к летальным пневмониям - это муковисцидоз или кистозный фиброз. Но это случается только у индивидуумов, у которых есть наследственная мутация, приводящая к кистозному фиброзу. То есть образование биопленок возбудителем - это результат взаимодействия микро- и макроорганизма, поэтому это не может быть основным фактором вирулентности. Последний раздел работы посвящен фенотипическому выявлению тех факторов патогенности стафилококков, наличие генов для которых было предсказано при анализе секвенированных геномов. Среди них, например, гемолизины, липазы. Очень хорошее впечатление оставляет обсуждение работы, в котором были найдены ответы на некоторые возникшие в ходе прочтения диссертации вопросы. Внимательно изучив работу Корниенко М.А. вызывает сожаление то, что в «Выводах» отсутствуют наиболее выигрышные результаты, полученные автором - например в разделе «Новизна» написано, что «собрана коллекция КОС, циркулирующих на территории России» Коллекция состоит из 169 клинических изолятов и именно собранная коллекция послужила основой для создания эффективной схемы мультилокусного секвенирования, а геномы наиболее интересных 7ми штаммов коллекции были полностью секвенированы и зарегистрированы в базах данных. Это и должно было бы являться первым важным выводом работы. Есть замечание и к 3-ему выводу, в котором написано «выявленный в составе генома госпитального изолята препрофаг SpB, способный в случае перехода на литический путь развития вызвать токсический шок, обусловленный гибелью части бактериально популяции» В этом выводе можно было бы остановиться только на том, что выявлен профаг, а не писать про токсический шок, который не был показан экспериментально, а кроме того при антибиотикотерапии обязательно происходит гибель части популяции, что далеко не всегда приводит к токсическому шоку.

Заключение. Диссертация Корниенко М.А. на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является научно-квалификационной работой, которую несмотря на высказанные замечания можно оценить положительно, потому что в ней получен большой объем данных современного уровня, который пополняет базу для изучения реализации патогенности такими медицински значимыми в наше время возбудителями как стафилококки. Применение в медицинской практике разработанной схемы мультилокусного секвенирования и анализ секвенированных геномов позволит понять механизмы изменчивости видов и, возможно, разработать подходы для быстрой диагностики и элиминации высоковирулентных штаммов. Результаты, полученные автором отражены в автореферате и 9 публикациях, 4 из которых в рецензируемых журналах и доложены на конференциях различного уровня.

Работа полностью соответствует п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842. Автор работы Корниенко М.А. заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности «генетика».

Романова Юлия Михайловна
Ведущий научный сотрудник
ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи МЗ РФ,
доктор биологических наук, профессор
30 ноября 2016 года

genes2007@yandex.ru, 89161604875

Подпись Ю.М.Романовой заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ ФНИЦЭМ им. "

Кандидат биологических наук

ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи

СЕРИЙНЫЙ И НЕ ВИДОВАЯ ПОДАРО
ОХРАНЕНИЯ

К./

1, 18