



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

30.11.2016

№ 12307-2171-1077

На № 382

от 26.10.2016

«УТВЕРЖДАЮ»

директор ФИЦ Биотехнологии РАН
д.б.н. Н.В. Пименов

« » декабря 2016 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Марии Андреевны Корниенко «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»

Актуальность темы выполненной работы

Проблема возрастающей антибиотикорезистентности возбудителей нозокомиальных инфекций является одним из ведущих вызовов системе здравоохранения в РФ и в мире. Арсенал средств антибактериальной терапии пополняется значительно медленнее, чем падает эффективность препаратов, уже имеющих на рынке. В этой связи, если не будут приняты действенные меры, человечество рискует вновь оказаться в эпохе, когда эффективная антибактериальная терапия невозможна.

Коагулазо-отрицательные стафилококки (КОС) являются одним из важных возбудителей внутрибольничной инфекции. С ними связаны до 30 % инфекций в хирургических стационарах, в группу риска также попадают новорожденные дети. В настоящее время около 30% случаев всех госпитальных инфекций в неонатальных отделениях интенсивной терапии, а также 73 % случаев бактериемии вызвано КОС. Среди КОС наибольшее клиническое значение имеют виды *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus haemolyticus*. Летальность при сепсисе, вызванным *S. epidermidis* составляет 27,0-44,7 %.

Безусловно, для эффективной профилактики госпитальных инфекций необходимо проводить тщательное эпидемиологическое расследование с целью выявления и пресечения цепочек

распространения агрессивных штаммов возбудителя, а для разработки альтернативных подходов к терапии инфекций, вызванных КОС, требуется детальное понимание механизмов реализации ими патогенного потенциала. Все это делает исследование диссертанта, направленное на разработку методов генетического типирования КОС и исследование генетических детерминант патогенности и вирулентности у малоизученных видов стафилококков актуальными.

Степень обоснованности, достоверность и новизна научных положений и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Целью диссертационного исследования было раскрытие особенностей молекулярных механизмов проявления патогенности КОС. Для достижения этой цели автором были поставлены разумные задачи и использованы адекватные методы.

Для решения задач типирования коллекции изолятов КОС автором применены ставшие золотым стандартом методы мультилокусного сиквенс-типирования. Для типирования штаммов *S. haemolyticus* разработана новая схема, основанная на анализе вариабельности последовательностей ряда генов домашнего хозяйства у более чем 70 изолятов, и выборе среди этих генов набора, обладающего достаточной дифференцирующей способностью.

Для целей идентификации и типирования изолятов использовался также метод прямого MALDI-TOF профилирования. Для группировки штаммов автор применила анализ корреляции спектров. Этот методический прием хотя и не обладает столь же высокой дискриминирующей способностью и надежностью, как MLST (расшифровать), но значительно превосходит его по производительности и дешевизне исследования.

Для целей идентификации генов факторов патогенности применены методы геномики. Неожиданным результатом полногеномного секвенирования оказалось доминирование последовательностей геномной ДНК бактериофага в массиве прочтений генома изолята ST36-1. Автором были применены методы микробиологии и вирусологии, позволившие продемонстрировать, что это связано с необычной репликацией фага, подобного умеренному фагу Spφ. Полученные данные однозначно свидетельствуют, что 1) этот вирус потенциально способен к истинной лизогении (т.к. близкородственные профаги обнаружены в составе геномной ДНК других штаммов), 2) он может переходить к литическому развитию (была достигнута индукция и продемонстрировано образование вирионов, содержащих ДНК, по последовательности идентичную ДНК, реплицирующейся в клетках и 3) фаг активно реплицируется независимо от хромосомы хозяина (подтверждается анализом покрытия, а также тем, что последовательность фага собирается в единую кольцевую последовательность). Автор корректно характеризует это состояние как псевдолизогению, которая ранее не была описана у фагов стафилококков. Автор использует для обозначения фаговой ДНК, поддерживающейся в клетках таким образом, несколько неудачный термин «препрофаг», видимо, заимствованный из работ по лизогении, где таким образом могли обозначать состояние ДНК фага до интеграции (либо до начала репликации). Для выявления связи обнаруженных факторов патогенности автор поставила эксперименты, прямо демонстрирующие степень цитопатического действия бактерий и их продуктов жизнедеятельности на клетки, способность к образованию биопленок и способность к индукции гемолиза. Обращает на себя внимание, что при анализе воздействия бактерий на культуры клеток автор не ограничилась изучением морфологических изменений клеточного монослоя, но использовала тест на высвобождение клеточного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ), который восполняет отсутствие количественного описания морфологических изменений.

Выводы диссертации подтверждаются приведенными результатами, основываются на современных научных концепциях и не содержат противоречий друг другу.

В работе использован широкий спектр методов, включая и наиболее современные методы геномики, протеомики, масс-спектрометрического профилирования бактерий и биоинформатики. Используемые методы адекватны поставленным задачам.

Структура и объем работы

Диссертация построена по стандартной схеме и состоит из введения и 8 глав, включающих «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», а так же «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, иллюстрирована 24 таблицами и 23 рисунками. Указатель литературы состоит из 187 источников.

Обзор литературы подробно освещает вопросы разнообразия КОС, механизмы патогенности у стафилококков, методологические аспекты идентификации и типирования стафилококков.

Методический раздел содержит достаточно подробные описания экспериментальных процедур, достаточные для их воспроизведения.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Полученные автором фундаментальные результаты могут быть использованы как для развития исследований в области механизмов патогенности бактерий, так и для совершенствования клинической практики. В частности, возможно развитие методик прогнозирования течения инфекций в зависимости от присутствия генов ФВП у возбудителя. Понимание спектра ФВП, характерных для КОС – возбудителей нозокомиальных инфекций может также способствовать созданию новых средств антибактериальной терапии.

Особое практическое значение имеет разработанная автором схема MLST изолятов *S. haemolyticus*, которая может напрямую применяться для эпидемиологической работы в медицинских учреждениях.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Результаты работы М.А. Корниенко, несомненно, должны быть использованы в качестве отправной точки для дальнейших исследований в ФНКЦ ФХМ. Результаты по демонстрации псевдолизогенности у *S. epidermidis* и охарактеризованный псевдолизогенный штамм должны быть использованы для расшифровки механизмов этого явления, предположительно имеющего важное значение для экологии бактериофагов и для патогенности микроорганизмов. Такие исследования могут быть осуществлены специализированными вирусологическими лабораториями в ФГБУН ИБХ РАН, ФГБУН ФИЦ Биотехнологии РАН и в других научных учреждениях.

Особо следует отметить разработанную автором схему MLST изолятов *S. haemolyticus* на основе которой целесообразно разработать нормативно-техническую документацию, которая позволит ввести данную схему в практическую эпидемиологическую работу в учреждениях здравоохранения.

Замечания

Хотя в целом работа выполнена на высоком научном и методическом уровне, к ней можно сделать ряд достаточно существенных замечаний как технического, так и редакционного характера.

Работа написана хорошим языком, стиль изложения удобен для восприятия. В то же время текст

плохо вычитан и в нем встречаются многочисленные погрешности. Так, например, на стр. 21 смысл фразы «Первичной функцией РНКIII является связывание с регуляторами синтеза секретируемых белков посредством антисмыслового механизма...» ускользает от читателя; На стр. 24 в первом предложении говорится, что энтеротоксины, обладающие разными а.к. последовательностями имеют идентичные третичные структуры, что очевидно, невозможно, и следует говорить о сходных или близких, но никак не об идентичных структурах; На стр. 51 указана концентрация митомицина С 0,2 мкл/л, тогда как очевидно имелось в виду мкг/мл; На стр. 96 в подписях к рис. 11 не указано, что обозначено буквами N , b и c.; На стр. 8 автореферата вместо DEAE целлюлозы написано DAE и т.д.

Работа также содержит ряд неточностей технического характера. Так, в разделе, посвященном типированию штаммов *S. epidermidis* автор делает неожиданно заключение, что 62 из 64 изолятов являются госпитальными, потому, что входят в состав клонального комплекса, характерного для таких изолятов. В то же время связь принадлежности к комплексу CC2 со способностью вызывать госпитальные инфекции не является, по-видимому, абсолютной, то есть, не все изоляты комплекса CC2 обязательно будут обладать этим свойством и не все изоляты за пределами данного клонального комплекса лишены этой особенности. Было бы более корректно строить рассуждения в противоположном направлении, используя в качестве посылок достоверно известное происхождение изолятов и их генетический тип.

В разделе, посвященном исследованию псевдолизогении у штамма ST36-1 автор не приводит данных о том, выделяет ли культура этого штамма вирусные частицы без индукции митомицином С, и насколько стабильно наследование «препрофага» (хотя, как было выяснено в ходе семинара, данного диссертантом в нашем институте, эти данные имеются). В тексте диссертации автор корректно называет препрофаг *кольцевой последовательностью*, однако в автореферате появляется «кольцевая внехромосомная ДНК». Между тем, в работе нет данных, по которым можно судить о топологии физических молекул ДНК «препрофага». Кольцевая последовательность может означать не только физически замкнутую ДНК, но также наличие кольцевых перестановок, длинных терминальных повторов или образование конкатемерной ДНК. В разделе, посвященном анализу генов факторов патогенности по данным полногеномного секвенирования *S. haemolyticus* автор описывает локусы, содержащие гены токсинов у двух изолятов как профаги, однако при внимательном анализе аннотации этих локусов, приведенной на рис. 13. сложно однозначно согласиться с таким заключением. Действительно, непосредственно рядом с генами токсинов в этих штаммах имеются гены интеграз и гены фактора регуляции транскрипции, встречающегося в профагах. Имеется также один ген, аннотированный как “phage protein”. Однако остальные гены, окружающие гены токсинов, аннотированы как гены метаболизма ДНК и прочие гены домашнего хозяйства. Таким образом, сложно точно утверждать, являются ли эти локусы дефектными профагами, находящимися на очень поздних стадиях деградации, или же это (возможно, также дефектные) сателлитные элементы, способные паразитировать на фагах, подобно SaPI *S. aureus*, либо наконец их следует описывать как геномные островки патогенности, которые могут содержать гены интеграз, не будучи никак прямо связаны с фагами. В целом, формулировка вывода 5, отражающего факт обнаружения некоторых генов, сходных с генами бактериофагов, ассоциированных с генами токсинов у *S. haemolyticus* представляется не очень удачной.

В том же разделе, на стр. 116-126 в деталях обсуждается гипотеза о роли триацилглицерол-липаз в гемолитической активности стафилококков. Активность данного белка не была проверена экспериментально, и автор принимает на веру предсказание активности, сделанное на основе

сходства аминокислотных последовательностей. Между тем, участие триацилглицерол-липазной активности в разрушении мембран эритроцитов выглядит маловероятным так как триацилглицериды в составе мембран не обнаруживают. Было бы логичнее наблюдать такое действие эстераз, способных разрушать фосфолипиды. Мы ни в коей мере не ставим под сомнение обнаруженную автором корреляцию аллелей данного гена с гемолитической активностью, однако биохимический механизм, предположенный в работе, представляется сомнительным.

Наконец, высказанное автором смелое предположение о роли обнаруженного гена *icaC* в связке с предположением, что другие гены оперона отличаются у КОС от *S. aureus* до такой степени, что не могут быть идентифицированы, логично было бы проверить экспериментально, определив наличие полиацетилглюкозамина в составе матрикса биопленок. Если технической возможности поставить такой эксперимент не имелось, к интерпретации генетических данных в этом случае следовало бы подойти более осторожно.

Нужно отметить, что сделанные замечания не умаляют в целом высокого качества диссертационного исследования.

Заключение по диссертационной работе

Таким образом, диссертационная работа Корниенко М.А. является научно-квалификационной работой, в которой изложены новые научные сведения о механизмах реализации патогенности важных возбудителей нозокомиальных инфекций и предложены научно-обоснованные технические решения для осуществления быстрой идентификации и генетического типирования КОС, важные для эпидемиологической работы. Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне, соответствующем современному состоянию генетики, биохимии, микробиологии и вирусологии.

Диссертационная работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (редакция от 30.07.2014 г.), предъявляемых ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Корниенко Мария Андреевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании совместного семинара лаборатории вирусов микроорганизмов и лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН (протокол № 1 от 23 ноября 2016 года).

Зав. лабораторией вирусов микроорганизмов
Института микробиологии им. С.Н. Виноградского
ФИЦ Биотехнологии РАН, д.б.н.

119071, Ленинский проспект 33. стр 2.
(499)135-72-64, letarov@gmail.com

А.В.Летаров

