



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного
Знамени научно-исследовательский
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»
**ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора**

664047 Иркутск, Трилиссера, 78

Тел. 22-01-35, факс 22-01-40

E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

<http://irknipchi.ru/>

ОКПО 01898090, ОГРН 10223801543017

ИНН/КПП 3811015807/381101001



ОТЗЫВ

**ведущей организации о научно-практической значимости
диссертационной работы Борисенко Андрея Юрьевича «Молекулярно-
генетический и биоинформационный скрининг вирулентных бактериофагов
Staphylococcus aureus на основе анализа CRISPR/CAS-Системы бактерии»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 – микробиология.**

Актуальность темы диссертационного исследования. Отмечающийся в настоящее время рост заболеваемости стафилококковыми инфекциями обусловлен как нарастанием резистентности возбудителя к антимикробным препаратам за счет их повсеместного и не всегда рационального применения, так и в целом снижением иммунной защиты макроорганизма на популяционном уровне. Нерациональное применение химиопрепаратов в клинической практике способствует распространению устойчивых к их действию штаммов стафилококков и появлению мультирезистентных вариантов возбудителя, что существенно снижает эффективность антибактериальной терапии.

В такой ситуации лечение заболеваний, вызванных *Staphylococcus aureus*, основывается на повышении доз и применении новых поколений антибиотиков. В плане альтернативы такому подходу в последние годы исследователи вновь обращаются к оценке эффективности фаготерапии инфекционных болезней. В качестве преимуществ использования бактериофагов рассматриваются их

безопасность для человека, отсутствие влияния на иммунитет и нормофлору, строгая специфичность действия. Наряду с преимуществами существует и ряд проблем использования бактериофагов, одна из существенных – подбор специфического эффективного препарата на основании анализа литических свойств бактериофага в лабораторных условиях. Вместе с тем в последние годы активно ведутся исследования CRISPR/Cas системы, посредством которой бактерии распознают и расщепляют ДНК фагов с использованием ферментной системы *Cas*. Информация о структурных особенностях CRISPR/Cas системы позволят целенаправленно моделировать процесс отбора высокоспецифичных и вирулентных фагов против патогенов.

Исходя из вышеизложенного, диссертационная работа Борисенко А.Ю., цель которой заключается в разработке алгоритма отбора вирулентных бактериофагов *S. aureus* на основе молекулярно-генетических и биоинформационных технологий анализа CRISPR-системы бактерии в качестве платформы для персонализированной фаготерапии несомненно своевременна и актуальна.

Новизна полученных результатов и выводов диссертации.

Новизна проведенного исследования очевидна. Автором на основе современных биоинформационных инструментов разработан программный алгоритм анализа CRISPR/Cas- системы *S. aureus*. С применением разработанного алгоритма проведено изучение и анализ CRISPR/Cas-системы большого массива геномов *S. aureus*, представленных в международной базе данных GenBank, а также собственной сформированной коллекции штаммов золотистого стафилококка. В результате установлена гетерогенность строения CRISPR-локусов у *S. aureus*, выявлено количественное содержание спейсеров в CRISPR-кассетах. Кроме того, определено участие плазмид *S. aureus* в качестве дополнительных источников генов *cas* и CRISPR-кассет.

Установлены маркерные последовательности CRISPR-локусов *S. aureus*, которые послужили основой разработки специфических фланкирующих праймеров для CRISPR-кассет и детекции генов *cas*.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.

Автором установлена комплексная резистентность и приспособляемость золотистого стафилококка при оценке коллекции штаммов по спектру антибиотико- и фагорезистентности.

На основе обнаруженных особенностей структуры CRISPR-кассет и генов *cas* в геномах *S. aureus* разработаны детектирующие и фланкирующие праймеры для выявления генов *cas* и выделения CRISPR-кассет.

В результате анализа коллекции *S. aureus* выявлены гены *cas*, определено 45 CRISPR-кассет с последующим их секвенированием и оценкой устойчивости штаммов к препаратам бактериофагов. Показано, что идентифицированное большее количество спейсерных участков в геномах *S. aureus* обуславливает большую резистентность культур к бактериофагам. В ходе проведенных экспериментальных исследований обоснованно доказано, что подбор лечебного фага следует осуществлять, основываясь на полном отсутствии комплементарности между нуклеотидами спейсерных последовательностей и геномами бактериофагов.

Разработанный биоинформационный алгоритм расширил представления об устройстве CRISPR-системы *S. aureus* и может быть использован с целью скрининга антибактериальных вирулентных фагов. Предполагается возможность применения алгоритма для изучения CRISPR-систем в других бактериях с целью создания персонализированной терапии.

Практическая ценность исследования, кроме указанных выше данных, заключается в формировании и регистрации базы данных «Спейсерные последовательности CRISPR-Cas систем штаммов *Staphylococcus aureus*» (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2021621294 от 18.06.2021), а также определении нуклеотидной последовательности CRISPR-кассет *S. aureus*, которые депонированы в международную базу данных NCBI (Center for Biotechnology Information) GenBank (№: MT542988.1; MT542987.1; MT542986.1; MT542985.1; MT542984.1.).

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений. Положения, выносимые на защиту, выводы и заключение диссертации обоснованы и логичны, отражают результаты работы и соответствуют поставленной цели и задачам. Достоверность результатов подтверждается значительным объемом проведенных исследований с использованием современных биоинформационных ресурсов, микробиологических и молекулярно-генетических методов, соответствующих поставленным задачам.

Оценка содержания диссертации, её завершенность в целом, предложения по оформлению. Диссертационная работа Борисенко А.Ю. построена по традиционному принципу, изложена на 151 странице машинописного текста и состоит из оглавления, введения, двух глав «Обзора литературы», главы «Материалы и методы исследования», трех глав «Результаты собственных исследований», заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 17 рисунками и 14 таблицами. Список литературы содержит 373 источника, из них отечественных – 48, зарубежных – 325.

Во «Введении» соискателем обоснована актуальность исследования, степень разработанности проблемы, определена цель и поставлены задачи,

охарактеризованы новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены положения, выносимые на защиту.

Главы 1 и 2 «Обзор литературы» содержат анализ опубликованных работ отечественных и зарубежных ученых по вопросам биологических и клинко-эпидемиологических особенностей *S. aureus*, роли данного микроорганизма в развитии различных заболеваний человека, аспектам диагностики и проблемам борьбы с данным возбудителем. В главе 2 подробно излагаются особенности структуры и функции CRISPR/Cas-системы микроорганизмов, оценена степень изученности молекулярно-генетических особенностей строения генома и системы CRISPR *S. aureus*.

В главе 3 «Материалы и методы исследования» автором приведена детальная информация по изучаемым объектам и комплексу биоинформационных, микробиологических и молекулярно-генетических методов, сформированных в единый алгоритм исследования. Заслуживает особого внимания большой массив используемых в работе объектов исследования, включающих как последовательности геномов золотистого стафилококка из международной базы данных GenBank, так и собственную коллекцию *S. aureus*, представленную 106 штаммами.

В главе 4 представлены результаты исследования антибиотикорезистентности и чувствительности к специфическим бактериофагам 106 штаммов *S. aureus* из сформированной автором коллекции. При оценке с использованием выборочного линейного коэффициента корреляции установлена прямая связь между резистентностью к отдельным антимикробным и бактериофаговым препаратам у штаммов *S. aureus*, выделенных от пациентов.

Глава 5 посвящена молекулярно-генетическому и биоинформационному исследованию CRISPR/Cas-системы *S. aureus*. Автором разработан программный алгоритм анализа CRISPR-системы *S. aureus*, с применением которого обнаружены гены *cas*, получены их структурные и функциональные характеристики, идентифицированы CRISPR-кассеты. Продемонстрирована гетерогенность строения хромосомной CRISPR/Cas-системы золотистого стафилококка из базы данных GenBank, по структуре CRISPR-локусов все штаммы распределены автором на 5 групп. При анализе плазмидного профиля установлено, что плазмиды *S. aureus* также содержат гены *cas*, фланкированные генами с неизвестными функциями.

В главе 6 приводятся результаты экспериментальной апробации разработанного алгоритма молекулярно-генетического и биоинформационного скрининга бактериофагов на основе изучения CRISPR-кассет в CRISPR/Cas-системах. В результате проведенного биоинформационного анализа автором

разработана панель праймеров для идентификации CRISPR-кассет и детекции генов *cas1*, *cas2* и *cas6* с последующим их секвенированием. Всего при тестировании коллекции *S. aureus* было идентифицировано 45 CRISPR-кассет небольших размеров, содержащих от 1 до 5 спейсеров размером 34 н.о.

Проведена оценка гомологии спейсеров CRISPR-кассет *S. aureus* и протоспейсерных последовательностей бактериофагов, на основании результатов которой сделано заключение о том, что протоспейсерами выступают не случайные последовательности, а отобранные в результате эволюционных взаимодействий CRISPR-системы *S. aureus* с бактериофагами участка. Далее автор проводит определение устойчивости штаммов золотистого стафилококка с разным набором спейсерных последовательностей к препаратам бактериофагов и приходит к заключению, что штаммы с содержанием большего количества спейсерных последовательностей (4, 5 спейсеров) характеризуются большей устойчивостью к препаратам бактериофагов, чем штаммы с 1 и 2 спейсерными последовательностями. С учетом полученных результатов обосновывается необходимость подбора бактериофаговых препаратов для терапии на основании анализа генома бактериофагов в сопоставлении со спейсерными последовательностями бактерии.

Заключение логично обобщает полученные результаты литературного обзора, экспериментальных исследований и обосновывает положения, представленные в выводах.

Подтверждение опубликованных результатов диссертации в научной печати. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 10 – в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, представлены на научных конференциях разного уровня.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Министерства науки и высшего образования РФ и полностью отражает основные положения диссертационной работы, замечаний нет.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе, пожелания. Диссертационная работа Борисенко А.Ю. носит логически последовательный и завершённый характер. Представленный материал дополнен информативными рисунками и таблицами, что позволяет ориентироваться в массиве данных. Положения диссертации, выносимые на защиту, обоснованы достаточным объемом экспериментальных данных. В работе были использованы три группы методов: микробиологические, молекулярно-генетические и биоинформационные.

Несмотря на высокую оценку работы, необходимо обозначить несколько комментариев и вопросов уточняющего характера:

1. В разделе «Материалы и методы» избыточно подробно приведено описание метода постановки и анализа результатов ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией с использованием тест-системы, зарегистрированной и имеющей утвержденную в установленном порядке инструкцию по применению. Наряду с этим, в работе не приведены методологические подробности по экспериментальному выявлению элементов CRISPR-системы с использованием разработанных автором праймеров, в частности, не указаны параметры реакции для амплификации отдельных локусов генома, нет данных по используемым для амплификации и секвенирования реагентов.
2. Приведенные в таблице 6 данные по выявлению в ПЦР чувствительных/резистентных к метициллину штаммов расходятся с приведенными в разделе 4.1 данными, полученными этим же методом: в первом случае указано, что из 100 исследованных штаммов *S. aureus* к метициллин чувствительному золотистому стафилококку отнесен 81 штамм, во втором случае – из 104 идентифицировано 85 штаммов этой группы, тогда как исследованная собственная коллекция автора в соответствии с разделом «Материалы и методы» диссертационной работы – 106 штаммов *S. aureus*, того же раздела автореферата – 100 штаммов.
3. Чем обусловлен выбор антибактериальных препаратов при определении спектра чувствительности *S. aureus*? Связано ли это с географическими особенностями циркуляции популяций *S. aureus* в Иркутской области?
4. Проводили ли Вы оценку встречаемости профагов в штаммах *S. aureus* из базы данных NCBI?
5. Можно ли предполагать, что плазмиды являются основополагающими в изменчивости систем CRISPR у *S. aureus*?
6. С чем, по Вашему мнению, связано малое количество спейсеров в CRISPR-кассетах *S. aureus*? Есть ли связь между наличием элементов системы CRISPR/Cas, количеством спейсеров в геноме этиологического агента инфекции и тяжестью клинического течения заболевания и/или территориальной приуроченностью?

В качестве рекомендаций по дальнейшим исследованиям хотелось бы отметить целесообразность скрининга плазмид в штаммах из авторской коллекции с последующей детекцией CRISPR-кассет непосредственно в препаратах плазмид.

Обозначенные вопросы и замечания не снижают общей положительной оценки диссертационной работы А.Ю. Борисенко.

Заключение. Диссертационная работа А.Ю. Борисенко «Молекулярно-генетический и биоинформационный скрининг вирулентных бактериофагов *Staphylococcus aureus* на основе анализа CRISPR/CAS-Системы бактерии» на соискание ученой степени кандидата биологических наук является завершенной научной квалификационной работой, в которой предлагается комбинированный подход для изучения систем CRISPR *S. aureus* с целью формирования индивидуальной фаговой терапии с привлечением биоинформационных, молекулярно-генетических и микробиологических методов.

По своей актуальности, научной новизне, практической значимости и уровню проведенных исследований диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018 г.) «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор Борисенко А.Ю. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология.

Отзыв обсужден на заседании Ученого совета ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, протокол № 7 от 11.11.2021 г.

Доктор медицинских наук заместитель директора
по лабораторно-диагностической работе
Федерального казенного учреждения здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и
Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека

Л.В. Миронова

Подпись Мироновой Л.В. заверяю
Начальник отдела кадров и спецчасти



Н.И. Шангареева

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) 664047 г. Иркутск, Трилиссера, 78. Тел. (3952)22-01-35, факс (3952)22-01-40. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)