

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

комиссии диссертационного совета 64.1.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора по докторской диссертации Гостева Владимира Валерьевича на тему: «Популяционная структура *Staphylococcus aureus* и траектории эволюции устойчивости к антимикробным препаратам», выполненной в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

**Соответствие соискателя ученой степени требованиям, необходимым для допуска к защите.** Гостев В.В. соответствует требованиям, изложенным в п. 3 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г.: имеет степень кандидата биологических наук, подтвержденную дипломом ДКН № 199857, выполнил диссертационную работу на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», давшего положительное заключение по данной диссертации.

**Соответствие диссертации специальности, по которой совету предоставлено право защиты.** Диссертация Гостева В.В. выполнена при консультировании члена-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора Сидоренко Сергея Владимировича (1.5.11. Микробиология, медицинские науки) на современном научно-методическом уровне с использованием экспериментально-микробиологических, молекулярных, генно-инженерных, биоинформатических методов исследования. Члены комиссии считают, что диссертация Гостева В.В. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к докторским диссертациям, отрасли науки «Биологические науки», паспорту специальности 1.5.11. Микробиология по пунктам: 2 – Эволюция микроорганизмов, 11 – Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ, 12 – Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности.

**Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных автором. Выполнение требований к публикации основных научных результатов диссертации.** По теме диссертации опубликованы 32 научные работы, в том числе 24 статей в журналах, входящих в базы данных международных индексов научного

цитирования WoS, Scopus и в российских журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, 5 патентов на изобретения, что является вполне достаточным для проведения защиты.

Автор самостоятельно сформулировал концепцию и предложил дизайн исследования. Автор принимал участие на всех этапах исследования – от ведения коллекции бактериальных культур и проведения экспериментов по адаптивной селекции устойчивости *in vitro* до биоинформатического анализа. Отдельные этапы работы были проведены на базах Санкт-Петербургского филиала ИОГЕН РАН совместно с сотрудниками к.б.н Соповой Ю.В., Велижаниной М.Е., ФГБУ ЦСП ФМБА России совместно с сотрудниками Шаповаловой В.В., Мацвай А.Д., Нурмукановой В.А. и Институте фотонных технологий им. Лейбница, (Йена, Германия) совместно с Стефаном Монеке.

Присвоения авторства чужого научного труда (плагиата), результатом которого может быть нарушение авторско-правового и патентного законодательства, в данной диссертации не обнаружено.

Диссертационная работа изложена в виде рукописи на 333 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: содержание, введение, 7 глав, включающих обзор литературы по тематике исследования, описание бактериальной коллекции и использованных инструментальных, экспериментальных методов исследования, результаты собственных исследований, а также их обсуждение, заключение, выводы, список литературы и приложений. Список литературы включает 506 источников, в том числе 34 отечественных и 472 публикации зарубежных авторов. Работа проиллюстрирована 54 рисунками и включает 38 таблиц.

**Актуальность** выбранной темы определяется тем, что *Staphylococcus aureus* имеет важнейшее клиническое значение в мировой системе здравоохранения. Так, *S. aureus* занимает первое место по абсолютному числу смертей среди всех бактериальных инфекций и по уровню летальности в 135-ти странах мира. Данный микроорганизм сочетает в себе два свойства – это высокая природная вирулентность и способность быстро аккумулировать устойчивость к действию антимикробных препаратов. Метициллин-резистентные стафилококки (Methicillin-resistant *S. aureus* - MRSA) проявляют устойчивость ко всем бета-лактамам антибиотикам, за исключением цефалоспоринов с анти-MRSA активностью (цефтаролина и цефтобипрола). Такая устойчивость связана с наличием гена *mecA*, который кодирует альтернативный пенициллинсвязывающий белок Pbp2a. Несмотря на большое количество исследований по изучению устойчивости *S. aureus* к бета-лактамам не решенными остаются многие вопросы. В частности, оксациллин-чувствительные MRSA

(oxacillin-susceptible MRSA, OS-MRSA) являются примером, когда наличие *tesA* не отражается в проявлении фенотипической устойчивости к оксациллину. Такая «молчащая» устойчивость является неблагоприятным фактором, влияющим на корректную фенотипическую оценку чувствительности к антибиотикам, и, следовательно, на назначение адекватной антибактериальной терапии.

Кроме хорошо известных механизмов резистентности *S. aureus* реализует и другие стратегии ухода от действия антимикробных препаратов – это гетерорезистентность и толерантность. Резистентность у *S. aureus* к различным антибиотикам обуславливается как генами, приобретаемыми на мобильных генетических элементах, так и мутациями в собственных генах. Однако, описываются и принципиально новые механизмы, в частности, влияние высоких внутриклеточных концентраций циклического ди-аденозинмонофосфата (c-di-AMP) на устойчивость к антимикробным агентам, действующим на клеточную стенку. На повышение концентрации c-di-AMP влияет активность специфической фосфодиэстеразы GdpP (GGDEF domain protein containing phosphodiesterase), которая при нормальных условиях гидролизует молекулы c-di-AMP. Молекулярный механизм этого процесса остается неизученным.

В настоящее время выделяют моноклональную гетерорезистентность, при которой, клетки одной генетической линии характеризуются разной чувствительностью к антибиотикам. У *S. aureus* гетерорезистентность описана к разным антибиотикам – бета-лактамам, гликопептидам, даптомицину и гентамицину. Опасность распространения таких фенотипов заключается в неправильной оценке чувствительности к антибиотикам, которая может привести к назначению неадекватной антибиотикотерапии. При растущем интересе к проблеме гетерорезистентности остаются неизученными многие аспекты: триггерные факторы, приводящие к ее появлению, связь с генотипом и генетическими линиями, межклональные взаимодействия и проблема детекции фенотипов.

Третья стратегия уклонения от действия антимикробных препаратов, реализуемая *S. aureus* – это формирование толерантности, которая описана в отношении многих бактерицидных антибиотиков, в частности, бета-лактамов, даптомицина и цефтаролина. В основе толерантности лежит универсальное для микроорганизмов явление – увеличение периода времени, необходимого для эффективного киллинга бактериальной популяции. Данный механизм остается до конца не изученным, однако многие экспериментальные исследования показывают, что замедление роста и работы рибосом и, как следствие, снижение метаболической активности бактериальной клетки являются главными драйверами антибиотикотолерантности. Предсказание и моделирование траектории

эволюции устойчивости является важным фундаментальным научно-практическим направлением как для локальной, так и международной систем здравоохранения.

Популяционная структура MRSA клональна, и основной механизм распространения – также клональный, однако существует географическая и эпидемиологическая детерминированность. В Российской Федерации отмечается длительная циркуляция двух эпидемических клонов MRSA – ST8 и ST239, однако детальный анализ их популяционной структуры, связь с глобально циркулирующими генетическими линиями и аспекты их происхождения недостаточно изучены. Также почти полностью отсутствуют данные о циркуляции и популяционной структуре внебольничных MRSA (CA-MRSA) в Российской Федерации. В последнее десятилетие были проведены фундаментальные исследования, позволившие проследить эволюционную историю распространения наиболее успешных клонов *S. aureus*. Параллельный анализ локальной и глобальной геномной эволюции позволяет в значительной степени реконструировать историю появления успешных эпидемических клонов, а также выявить новые варианты. Прогнозирование клональных сдвигов и их траектории эволюции можно использовать в долгосрочной перспективе для оценки различных биологических рисков, связанных с появлением и распространением новых потенциально опасных клонов.

В этой связи анализ популяционной структуры и оценка направленности траекторий эволюции устойчивости к антимикробным препаратам *S. aureus* является актуальной научно-практической задачей.

**Цель работы** – Охарактеризовать популяционную структуру и траектории эволюции устойчивости к антимикробным препаратам у *S. aureus*.

**Научная новизна полученных результатов** заключается в том, что впервые предложены эволюционные модели, объясняющие появление эпидемических клонов ST8 и ST239 на территории Российской Федерации и предполагающие формирование MRSA задолго до внедрения метициллина в клиническую практику (1930 – 1950 гг.). Было установлено, что клоны ST8, длительно циркулирующие на всей территории России, имеют общее происхождение с европейскими клонами, но в настоящее время эволюционируют как отдельные генетические линии. Клоны ST239 представлены разными кластерами, что предполагает их многократный импорт. Описана популяционная структура циркулирующих CA-MRSA, впервые выявлены доминирующие клоны – ST22 «Газа клон» и ST59 «Восточно-Азиатского кластера». Выполненный филогенетический анализ послужил отправной точкой для молекулярно-эпидемиологического анализа клонов ST22, циркулирующих в других странах, что подтверждается цитирующими работами из других стран, где использовались предложенные автором алгоритмы оценки

популяционной структуры ST22. Впервые на территории РФ описаны фенотипы OS-MRSA, характеризующиеся мутациями в промоторе гена *mecA*, низкой его экспрессией, а также фенотипической гетерорезистентностью к оксациллину. Установлено, что OS-MRSA способны быстро трансформироваться в MRSA за счет хромосомных мутаций, влияющих на формирование устойчивости к бета-лактамам антибиотикам, независимо от *mecA*. Основная опасность OS-MRSA – это сложность корректной лабораторной детекции данного фенотипа, которая может привести к назначению неадекватной антибактериальной терапии. В диссертационной работе экспериментально установлено, что к одному фенотипическому проявлению устойчивости могут приводить мутационные события, затрагивающие различные метаболические пути. Полученные данные свидетельствуют о том, что формирование устойчивости у *S. aureus* проходит по различным траекториям через этап формирования в популяции минорных клонов, которые либо элиминируются, либо начинают доминировать, эти результаты имеют фундаментальное значение. Помимо этого, в работе описаны и экспериментально подтверждены принципиально новые механизмы резистентности, в частности подтверждена роль высоких концентраций c-di-AMP, посредством через мутаций в гене *gdrP*, в формировании устойчивости к бета-лактамам. В диссертационной работе было показано, что приобретение устойчивости сопровождалось снижением скорости роста бактериальных культур, наиболее значимые изменения были выявлены при формировании устойчивости к даптомицину. Это позволяет прогнозировать длительный процесс эволюции устойчивости к препаратам, действующим на цитоплазматическую мембрану, что может являться вектором для будущих разработок антибактериальных препаратов.

Полученные научные результаты могут быть использованы в практической медицине, в частности, в диагностическом процессе, фармакологии (корректировка существующих схем антибактериальной терапии), а также при разработке лабораторных диагностических платформ. Приоритетность проведенных исследований подтверждена 5 патентами – RU2798788C1, RU2802895C1, RU2802896C1, RU2809847C1, RU2809538C1. Изобретения относятся к медицинской микробиологии и могут быть использованы для разработки диагностических платформ. Предложенные модели эволюции доминирующих генетических линий могут быть использованы в эпидемиологическом мониторинге за эволюцией MRSA на территории РФ. Данные по эволюции устойчивости *in vitro* могут быть использованы при разработке и поиске новых антибактериальных препаратов. Полученные результаты подчеркивают риски появления ассоциированной и перекрестной устойчивости на фоне воздействия бета-лактамами и гликопептидными антибиотиками,


что важно учитывать при использовании этих препаратов в клинической практике для лечения стафилококковых инфекций.

Результаты диссертационного исследования внедрены в бактериологических лабораториях медицинских учреждениях Санкт-Петербурга и Москвы, а также используются в лекционном материале и на практических занятиях по медицинской микробиологии в медицинских ВУЗах Санкт-Петербурга, Красноярска.

На основании анализа поступившей работы комиссия пришла к заключению о возможности защиты докторской диссертации Гостева Владимира Валерьевича на тему: «Популяционная структура *Staphylococcus aureus* и траектории эволюции устойчивости к антимикробным препаратам» в диссертационном совете 64.1.002.01 при ФБУН ГНЦ ПМБ.

Члены комиссии:

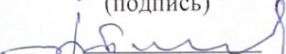
доктор мед. наук Дентовская Светлана Владимировна (председатель)

  
(подпись)

доктор биол. наук Павлов Виталий Михайлович

  
(подпись)

доктор биол. наук Герасимов Владимир Николаевич

  
(подпись)

Председатель диссертационного совета  
64.1.002.01 академик РАН, д-р мед. наук, проф.

  
Дятлов И.А.

Ученый секретарь диссертационного  
совета 64.1.002.01, канд. биол. наук

  
Фурсова Н.К.

