

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук **Ермолаевой Светланы Александровны** на диссертационную работу Гостева Владимира Валерьевича «Популяционная структура *Staphylococcus aureus* и траектории эволюции устойчивости к антимикробным препаратам» представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

АКТУАЛЬНОСТЬ

Грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* имеют важное клиническое и эпидемиологическое значение, способность поражать любые органы и ткани, и являются примером возбудителя с очень высокой степенью адаптации к существованию в макроорганизме. В то время как в течение длительного времени *S. aureus* рассматривался, скорее, как оппортунистический патоген – возбудитель, длительно персистирующий в организме и вызывающий инфекцию при значительном снижении иммунитета, - в настоящее время *S. aureus* рассматривается как патогенный микроорганизм, имеющий важное значение в структуре инфекционной патологии человека, вызывающий инфекции с высоким риском летальности. Такое изменение оценки роли *S. aureus* связано как со снижением уровня активности иммунитета в человеческой популяции, в целом, так и с распространением эпидемических клонов, характеризующихся, помимо полного набора факторов патогенности, множественной устойчивостью к антибиотикам различных групп. В большинстве экономически развитых стран мира реализуются программы отслеживания и фиксирования эволюционных изменений среди циркулирующих клинически значимых патогенов человека. Целью и результатом таких исследований является создание адекватных эволюционных моделей, которые позволяют не только фиксировать произошедшие изменения, но и предсказывать направления эволюции патогенных видов, что необходимо для контроля вызываемых ими инфекций. Вид *S. aureus*, имеющий строго клональную

структуру и характеризующийся периодической сменой доминирующих клонов, является одним из наиболее ярких представителей таких патогенов. Используемые в диссертационной работе Гостева В.В. подходы и методологическая основа позволили получить, на примере *S. aureus*, эволюционные модели формирования доминирующих генетических линий, что имеет важнейшее научно-практическое значение как для данного возбудителя, так и для систематизации контроля других патогенных бактерий, особенно характеризующихся множественной резистентностью. Тематика диссертационного исследования включает многие «горячие точки» в области изучения механизмов формирования устойчивости *S. aureus* к антибиотикам, которые охватывают наиболее «проблемные» и до конца не изученные вопросы микробиологии золотистого стафилококка. Все вышеперечисленное определяет актуальность рассматриваемой диссертации.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

По результатам диссертации выявлены и детально охарактеризованы новые доминирующие внебольничные клоны метициллин-резистентных штаммов *S. aureus* (CA-MRSA), циркулирующих на территории РФ – ST22 и ST59. Выявлены и охарактеризованы новые штаммы MRSA, связанные с ложной чувствительностью к оксациллину, и описаны механизмы, влияющие на формирование таких фенотипов. На основании результатов полногеномных исследований, биоинформатических и математических расчетов реконструирована филогения доминирующих генетических линий MRSA-ST8 и MRSA-ST239 - основных возбудителей стафилококковых ИСМП в России. Описан новый механизм устойчивости к бета-лактамам антибиотикам, связанный с появлением мутаций в гене *gdpP* системы метаболизма вторичного внутриклеточного мессенджера – циклического ди-аденозинмонофосфата (c-di-AMP). Сформулированы фенотипические и генотипические механизмы, лежащие в основе формирования стратегий уклонения от действия антимикробных препаратов, обозначенных как гетерорезистентность и антибиотикотолерантность.

СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ НАУЧНЫХ ПОЛОЖЕНИЙ, ЗАКЛЮЧЕНИЯ, ВЫВОДОВ

Выносимые на защиту научные положения, заключения и выводы сформулированы на основе экспериментальных и теоретических исследований, проведенных как на материале изучения представительной коллекции госпитальных и внебольничных штаммов *S. aureus*, выделенных на территории Российской Федерации, так и на оригинальных экспериментальных моделях микроэволюции формирования антибиотикоустойчивости под воздействием давления разных доз и способов внесения антибиотиков. Для проведения перечисленных исследований использованы высокотехнологичные экспериментальные методы, такие как полногеномное секвенирование, оценка экспрессии генов, методы молекулярно-генетического типирования, в комплексе с современными биоинформационными методами, такими как сборка геномов *de novo*, пангеномный и кластерный анализы и т.д. Все эксперименты проводили в нескольких повторностях, а достоверность полученных результатов оценивали статистическими методами с пороговой оценкой достоверности не менее 0,05, что обеспечивает достоверность полученных результатов. Обоснованность и достоверность результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых журналах первого и второго квартиля по оценке отечественных и зарубежных библиографических баз, цитируемостью опубликованных работ и получением положительных рецензий при выполнении грантов, результаты которых включены в диссертацию. Таким образом, положения, выносимые на защиту, заключения и выводы имеют высокую степень научной обоснованности.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

В результате выполнения работы Гостевым В.В. получен ряд фундаментальных результатов теоретического характера, описывающих закономерности формирования антибиотикорезистентности среди штаммов *S. aureus* за пределами стандартной модели распространения кассеты *tes* среди MRSA изолятов. В частности, показано, что наличие кассеты *tes* может быть завуалировано мутациями, уменьшающими эффективность экспрессии детерминант устойчивости, что, с одной стороны, приводит к неправильной

трактовке потенциальной опасности штамма, а с другой - способствует отбору дополнительных хромосомных мутаций в альтернативных локусах, обеспечивающих повышенный уровень антибиотикоустойчивости; охарактеризована роль вторичного мессенджера с-ди-АМФ в формировании устойчивости к бета-лактамам; описана роль мутаций в пептидил-тРНК-гидролазе в формировании кросс-толерантности к ряду антибиотиков. Сформулирован ряд понятийных определений, связанных с разными механизмами и уровнем устойчивости внутри клональных линий, таких как моноклональная гетерорезистентность и толерантность; описаны основные направления эволюционных событий, ведущих от гетерорезистентности к гомо(абсолютной)резистентности. Разработанный комплекс понятий, подходов и методов внедрен в ряде медицинских учреждений, занимающихся проблемами, связанными с распространением резистентности среди патогенных бактерий, что подтверждено соответствующими актами внедрения. Последнее определяет практическую значимость работы, которая также определяется возможностью распространения разработанных моделей и выводов не только для изученной модели золотистого стафилококка, но и для других возбудителей инфекционных заболеваний.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Автор принимал личное участие в осуществлении всех этапов исследования, включая как экспериментальное получение первичных данных, касающихся фенотипической и молекулярно-генетической характеристики штаммов, проведения типирования и геномного секвенирования, экспериментов по микроэволюции резистентности, так и проведение биоинформатического анализа полученных данных и написания статей. Часть проведенных работ была осуществлена в сотрудничестве с коллегами, перечисленными в автореферате и выступающими соавторами в публикациях.

ПУБЛИКАЦИИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ

Все изложенные в диссертации результаты опубликованы в рецензируемых изданиях. Всего о теме диссертации опубликовано 24 работы, из них 15 в отечественных изданиях и 9 в ведущих международных изданиях по

вопросам общей и медицинской микробиологии. Получено 5 патентов на изобретения, в которых предложены детально охарактеризованные и секвенированные штаммы *S. aureus*, проявляющие устойчивость и толерантность к разным антибиотикам. Данные штаммы возможно использовать как эталонные при постановке определения чувствительности к действию антибиотиков. Результаты были доложены и обсуждены на многочисленных Всероссийских и международных конференциях, в том числе на такой авторитетной международной площадке как ECCMID. Таким образом, количество публикаций и апробация результатов соответствует требованиям ВАК к докторским диссертациям.

СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Диссертация состоит из введения, основной части и приложений, текст написан на 333 страницах, имеет 38 таблиц и проиллюстрирован 54 рисунками. Список использованной литературы содержит 506 источников, преимущественно, из международных изданий.

Введение состоит из актуальности, цели и задач, обоснования новизны полученных результатов, описания теоретической и практической значимости, методологии, положений, выносимых на защиту, степени разработанности темы диссертационного исследования, личного вклада диссертанта в получении результатов и описания, где были опубликованы результаты, и где проводилась апробация.

Результаты диссертационного исследования представлены в главах 3 – 6, при этом в главах 3 – 5 описаны результаты оценки чувствительности к антибиотикам, молекулярного типирования, полногеномного секвенирования и филогенетического анализа. Большая глава 6 посвящена механизмам формирования устойчивости через образование мутаций в модельных опытах при многократном воздействии антибиотиков.

В главе 1 представлен обзор литературы о микробиологических особенностях золотистого стафилококка, его резистентности и вирулентности, спектре вызываемых заболеваний. Описаны результаты исследований последних

лет об эпидемиологии, популяционной структуре, глобально циркулирующих эпидемически значимых генетических линиях.

В главе 2 подробно описаны используемые подходы и методы исследования. Описана коллекция бактериальных культур, популяционный анализ, различные варианты селекции устойчивости *in vitro*, оценка кинетики отмирания роста под воздействием антибиотиков, оценка индуцированной аутолитической активности, оценка скорости роста золотистого стафилококка, методы молекулярного типирования, NGS секвенирование, биоинформатические и статистические методы.

В главе 3 представлено описание коллекции изолятов MRSA, результаты оценки чувствительности к бета-лактамам антибиотикам, оценки чувствительности к ванкомицину, даптомицину и липогликопептидным антибиотикам, проведен анализ ассоциированной устойчивости и профилей резистентности. В конце главы представлено краткое заключение, где приводится сравнение полученных результатов оценки чувствительности к антибиотикам у штаммов MRSA с другими подобными исследованиями, которые проводились как в РФ, так и за рубежом.

В главе 4 представлено сравнение уровней чувствительности к антимикробным препаратам между различными клонами золотистого стафилококка. Очень подробно описаны фенотипические и генотипические особенности OS-MRSA штаммов с описанием механизмов, приводящих к появлению чувствительности к бета-лактамам. Также в конце главы предоставлено заключение, где суммированы полученные результаты с обсуждением проблемы корректного выявления ложной чувствительности к оксациллину, цефокситину среди клинических штаммов MRSA.

В главе 5 описаны результаты анализа глобальной и локальной популяционной структур доминирующих генетических линий MRSA, циркулирующих в России. Проведен детальный сравнительный биоинформатический анализ, включающий оценку эволюционных взаимоотношений, оценку пангеномов, мутационных и генных резистомов у клонов ST8, ST239, ST22 и ST59. При этом, в главу включены отдельные

подразделы, – заключение по каждому из сиквенс-типов, в которых лаконично изложены ключевые особенности этих клонов с указанием уникальных особенностей именно российской популяции.

В главе 6 описаны результаты, полученные при селекции устойчивости *in vitro*. Представлены фенотипические изменения при формировании устойчивости MRSA к цефтаролину, даптомицину и ванкомицину, описаны мутационные события. Отдельно выделен эксперимент по сайт-направленному мутагенезу, в ходе которого был получен модельный штамм, несущий делецию в гене *gdpP*. Описаны результаты влияния полученной делеции на уровень экспрессии пенициллинсвязывающих белков. Традиционный авторский подраздел, резюмирующий полученные результаты, где отмечается важность *tes*-независимых механизмов устойчивости к цефтаролину и другим бета-лактамным антибиотикам. В эксперименты по селекции устойчивости были также включены штаммы MSSA. Для этой группы была проведена селекция устойчивости к оксациллину, меропенему и цефтаролину с последующей оценкой фенотипических изменений и поиском значимых мутаций в геномах. В данной главе также описывается гетерорезистентность как на уровне фенотипа, так и генотипа, особенно при формировании устойчивости к ванкомицину. Отмечено изменение индуцированной аутолитической активности у штаммов после селекции устойчивости *in vitro*. На основании экспериментов при воздействии шоковых концентраций антибиотиков дана оценка роли мутаций в пептидил-тРНК-гидролазе в формировании универсальной толерантности к действию бактерицидных антибиотиков.

Глава 7 представлена в виде обсуждения, в котором описываются траектории эволюции устойчивости золотистого стафилококка.

Заключение основывается на всех полученных результатах и соответствует поставленной цели и задачам.

Выводы представлены кратко, соответствуют задачам и отражают проведенный объем работы.

Практические рекомендации ориентированы для бактериологических лабораторий, а также клиницистов, занимающихся терапией стафилококковых инфекций.

В приложениях представлены дополнительные материалы к разным разделам диссертации.

СООТВЕТСТВИЕ АВТОРЕФЕРАТА ОСНОВНЫМ ПОЛОЖЕНИЯМ ДИССЕРТАЦИИ

Автореферат полностью отражает основные результаты и содержание диссертации.

СООТВЕТСТВИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИАЛЬНОСТИ 1.5.11. МИКРОБИОЛОГИЯ

Объект изучения, поставленные цель и задачи исследования, изучаемые явления, применяемые методы и экспериментальные подходы, результаты, выводы и положения, вносимые на защиту, полностью соответствуют паспорту специальности 1.5.11. Микробиология, в частности – пунктам: 2. Эволюция микроорганизмов, 3. Биологическое разнообразие микроорганизмов, включая разнообразие типов энергетического обмена и источников углерода, 11. Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ, 12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности.

ВОПРОСЫ И ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ

В целом, рецензируемая работа написана понятно и хорошим языком, хотя, в ряде случаев, автор увлекается англицизмами, которых можно было бы избежать. Так, например, такие выражения как «эффективный киллинг бактериальной популяции», «главные драйверы антибиотикотолерантности» вполне можно сформулировать и на русском языке.

Некоторое неприятие вызывала также формулировка 2 пункта положений, выносимых на защиту, где под «особенностями воздействия антибиотиков на микроорганизм» понимаются «серийные пассажи в присутствии возрастающих концентраций антибиотиков или кратковременное воздействие шокowymi концентрациями», что, скорее, можно обозначить как способ и дозы внесения антибиотика, действительно влияющие на накопление исследуемых мутаций. В

то же время, безусловно, особенности воздействия антибиотиков на микроорганизм, поняты как механизм, через который антибиотик влияет на жизнеспособность бактерий, также значимы для процесса микроэволюции.

При чтении диссертации у рецензента возникло несколько вопросов, в основном касающихся раздела по экспериментальному моделированию микроэволюционных событий под давлением антибиотиков. В частности, интересно мнение автора по поводу роли среды и доступности в ней питательных веществ на наблюдаемый мутационный процесс. Насколько использованные автором экспериментальные модели подходят для оценки потенциальной изменчивости возбудителя в организме и во внешней среде, где доступность питательных веществ, соответственно, достаточно высокая и относительно низкая? Второй вопрос касается продемонстрированной автором связи между уровнем с-ди-АМФ и транскрипцией генов, кодирующих пенициллин-связывающие белки: есть ли какие-то указания на прямую роль этого мессенджера в регуляции активности каких-то факторов транскрипции, прямо или косвенно влияющих на активность данных генов, или это какие-то более сложные взаимодействия? В целом, возникновение этих вопросов никак не влияет на высокую оценку представленной диссертации, а имеет чисто академический характер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Гостева В.В. на тему: «Популяционная структура *Staphylococcus aureus* и траектории эволюции устойчивости к антимикробным препаратам», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой разработаны теоретические положения о принципиально новых эволюционных стратегиях, приводящих к формированию резистентности золотистого стафилококка к действию антибиотиков. Совокупность представленных положений можно квалифицировать как научное достижение в микробиологии, и в области изучения *S. aureus*, в частности. Диссертационная работа соответствует всем

требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 30.07.2014г. №723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. №101, от 18.03.2023 г. №415, от 26.10.2023 г. №1768, от 25.01.2024 г. №62, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Гостев Владимир Валерьевич, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент

Руководитель лаборатории экологии
возбудителей инфекций
Федерального государственного
бюджетного учреждения
Национальный исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор биологических наук

Ермолаева Светлана Александровна

Подпись С.А. Ермолаевой заверяю:

Ученый секретарь
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
к.б.н.



Сысолятина Елена Владимировна