

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Доктора биологических наук Летарова Андрея Викторовича на работу Соловьевой Екатерины Владимировны «Капсулоспецифичные бактериофаги и их полисахарид-деградирующие ферменты, активные в отношении гипермукоидных штаммов *Klebsiella pneumoniae*», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Диссертационная работа, выполненная Соловьевой Екатериной Владимировной, является комплексным исследованием серии клинических изолятов *K. pneumoniae* и специфичных к ним бактериофагов. Исследование было направлено на выделение и характеристику фагов, специфически лизирующих определенные К-серотипы *K. pneumoniae*, получение рекомбинантных полисахарид-деполимераз, кодируемых этими вирусами, а также на изучение терапевтической эффективности полученных фагов и ферментов на мышинных моделях клебсиеллезной инфекции.

**Структура и содержание диссертации.** Диссертационная работа изложена на 120 страницах машинописного текста. Работа построена по классической схеме и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Практические рекомендации и Список использованных источников, который состоит из 265 литературного источника, включающего 24 работы отечественных авторов и 241 работу зарубежных авторов. Текст иллюстрирован 26 рисунками и 13 таблицами.

Стиль работы производит весьма благоприятное впечатление, автор очень хорошо владеет научным языком, избегая ненужного академизма и избыточного использования терминологии. Мысли сформулированы четко и последовательно. Количество опечаток незначительно. Среди немногочисленных стилистических погрешностей можно отметить следующие моменты:

- в работе используется цитирование литературы по номеру в списке, но иногда проскальзывают цитирования по системе автор-год (которая мне кажется более удобной для больших работ, таких как диссертации). Так, например, на стр. 19 имеется 16 ссылок, представленных номерами в списке и еще 4 по системе автор-год.

- Неудачное название пункта 1.2.5. обзора «Антимикробная устойчивость hvКр-штаммов». Словосочетание «антимикробная устойчивость» заставляет думать, что эти штаммы устойчивы к микробной инфекции, тогда как на самом деле речь идет об устойчивости к антимикробным химиопрепаратам.
- В таблице 3.3 на стр. 65. автор не использует стандартную форму представления малых величин, заставляя читателя считать с карандашом многочисленные нули после запятой. Там же используется выражение «штамм – хозяин» в значении, вероятно, «штамм, использованный для выделения (или для культивирования?)»
- Название п. 2.2.6 «Биоинформационный анализ...» не верно, общепринятая форма звучит как «биоинформатический анализ».

Во **Введении** диссертантом описаны актуальность и степень разработанности темы исследования, сформулирована цель исследования и поставленные для достижения этой цели конкретные задачи. Отражена теоретическая и практическая значимость. Положения, выносимые на защиту, охватывают основной материал диссертации. Также во введении отражены сведения об апробации результатов, подробно описано личное участие автора в получении результатов. По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, из которых 5 - в международных научных изданиях, индексируемых базами цитирования Web of Science и Scopus, и 13 тезисов, опубликованных в материалах Всероссийских и международных научных конференций.

**Обзор литературы** диссертации состоит из трех частей, посвященных эпидемиологии инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, Эпидемиологии гипервирулентных штаммов и особенностям патогенеза вызванных ими инфекций и характеристике бактериофагов и их применения для борьбы с бактериальными инфекциями, в том числе – вызванными *K. pneumoniae*.

Первые два раздела очень хорошо написаны, сообщают большое число интересных фактов и четко обозначают контекст диссертационного исследования. С моей точки зрения эти разделы обзора имело бы смысл опубликовать в виде статьи в научном журнале.

Третий раздел обзора, посвященный бактериофагом, так же написан ясным языком и хорошим стилем и, в целом, дает представление о предмете диссертационной работы. Однако в этом разделе имеются довольно многочисленные неточности и неудачный выражения:

стр. 29. Утверждается, что хвостатые фаги объединены двумя (всего лишь?) общими чертами (наличие хвоста и механизм упаковки ДНК). На самом деле общих черт у них гораздо больше (например, использование аналогичных по структуре белков для аналогичных функций. Так, каспидные белки всех изученных представителей Caudovirales, имеют НК97 фолд, трубки хвостов фолд типа gpV и т.д.).

стр. 30. Отмечено введение нового семейства Ackermannviridae, но не обсуждается, как оно соотносится с ранее сложившейся системой, что в контексте соответствующего абзаца выглядит странно.

На той же странице упоминаются о геномы хвостатых фагов, которые могут принимать кольцевую форму. Не ясно, идет ли речь о ситуации в инфицированной клетке (если так, то разнообразие топологий ДНК фагов шире) или в составе вирионов? В последнем случае требуется привести ссылки (на сколько мне известно, хвостатых фагов с кольцевым геномом в составе вирионов не существует).

В том же абзаце говорится, что капсиды фагов изометричны, хотя на рис 1.7 на той же странице имеется пример фага с вытянутым капсидом.

В следующем абзаце имеется непонятное утверждение, что порядок Caudovirales «больше не способен объединять» огромное разнообразие данной группы. Что имеет в виду автор? Целесообразность повышения статуса Caudovirales до, допустим, филы и ли сомнения в монофилитичности данного таксона?

стр 31. «Гены, кодирующие структурные элементы хвостового отростка, являются наиболее вариабельной частью фагового генома» - очевидная ошибка. Во-первых, далеко не все такие гены вариабельны, во-вторых, у большинства фагов имеются участки генома заметно более плачтинные даже по сравнению с генами рецептор-узнающих белков и фибрилл.

стр. 32. «Для преодоления углеводного барьера бактерий фаги выделяют полисахарид-деградирующие ферменты» - вряд ли термин «выделяют» адекватно описывает происходящее.

стр.33 Мысль автора о расширении активного сайта за счет конфигурации фаговых шипов типа бета-призмы непонятна и нуждается в пояснении.

стр 34. «Общая структура ПС-деполимераз включает три домена...» - на самом деле обычно больше. На изображенных структурах имеется как минимум четыре.

на той же странице упоминаются «волоknистые структуры коннектора». Что имеется в виду? Воротничковые нити? У каких фагов?

там же. «Некоторые ПС-деполимеразы являются растворимыми белками» - в каком смысле?

на стр. 36. упоминается «Международный центр им. Г. Элиавы». Насколько я понимаю, имеется в виду George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology.

Раздел «Материалы и методы» включает достаточно подробное и четкое описание весьма многочисленных экспериментальных методов, использованных диссертантом, в целом достаточное для воспроизведения опытов. При этом, однако, диссертант отводит много места детальному описанию общеизвестных методов и не всегда уделяет достаточное внимание методам, специфическим для данной области. Так, например, на стр. 44 упоминается метод Кербера для расчета LD<sub>50</sub>, на который приводится ссылка. Было бы уместно дать хотя бы краткое изложение (формулу) в тексте.

В разделе «**Результаты и обсуждение**» приводится детальное описание проведенных исследований и полученных результатов. Обращает на себя внимание, что работа построена по единому плану, и представляет собой практически всеобъемлющее исследование в рамках сформулированных задач.

Производит большое впечатление объем экспериментальной работы, выполненной соискателем. Так, для 27 штаммов *K. pneumoniae* были определены LD<sub>50</sub> для мышей. В соответствии с методическим разделом это потребовало провести инъекции  $30 \times 5 \times 27 = 4050$  мышам, не считая использованных в предварительном скрининге, а также провести микробиологическое исследование павших животных. Определены и аннотированы последовательности 13 бактериофагов, проведены трудоемкие эксперименты по оценке терапевтической эффективности фагов и рекомбинантных ферментов.

Полученные результаты несомненно представляют существенный научный и практический интерес. Хочется особо отметить, что помимо возможного использования полученных бактериофагов и ферментов для диагностики и терапии, эти системы, подробно охарактеризованные и освоенные автором могут представлять собой ценный арсенал инструментов для более глубокого изучения взаимодействия бактериофагов с клетками, защищенными капсульным полисахаридом.

Вместе с тем обращает на себя внимание, что выполняя запланированные исследования автор проигнорировала все наблюдаемые явления, которые выходят за рамки исходных гипотез проекта. Так, судя по данным табл. 3.3. наиболее широким спектром хозяев обладает фаг KpV477 который относится к группе фагов, родственных T-четным. Этот вирус лишен очевидных ПС-деполимераз, и, исходя из общеизвестной

парадигмы адсорбции Т-четных фагов, должен быть способным достигать рецепторов, расположенных непосредственно на поверхности клетки.

Кроме этого в табл. 3.3. приведены значения эффективности посева (автор называет эту величину эффективностью бляшкообразования ЭБ) некоторых фагов на разных штаммах в диапазоне от  $10^{-6}$  до 1. При этом в работе не предпринято никаких усилий с целью разобраться в причинах таких различий ЭБ. Можно предположить, что бляшки, растущие с ЭБ около  $10^{-6}$  представлены мутантами. Очистка и секвенирование этих мутантов могло бы не только позволить получить фаги, растущие на соответствующих штаммах эффективно, но и дать подсказки для более тонкой расшифровки логики взаимодействия фаг-клетка при инфекции.

Приведённое в работе «**Заключение**» обобщает результаты исследований. Выводы обоснованы и соответствуют поставленным задачам и основным положениям, выносимым на защиту.

**Выводы**, сделанные на основании проведенного исследования подкреплены экспериментальными данными и соответствуют основному содержанию диссертационного исследования. Формулировка вывода №4 кажется не вполне удачной: упомянутые ПС-деполимеразы оказывают действие на более широкий спектр штаммов, чем соответствующие фаги, то есть обладают меньшей, а не большей специфичностью (высокая специфичность = узкий спектр хозяев или субстратов). Было бы точнее сказать, что спектр активности этих ферментов более точно соответствует К-серотипу, чем спектр хозяев соответствующих фагов.

**Общее впечатление** от работы Соловьевой Е.В. весьма и весьма благоприятное. Результаты работы описаны полно, объем выполненных исследований более чем достаточен для диссертации на соискание степени кандидата биологических наук.

В целом работа выполнена на современном методическом уровне, с использованием сертифицированного современного оборудования, что подтверждает **достоверность полученных результатов**. Стоит отметить, что на всех этапах исследования Соловьева Е.В. проводила сравнение полученных экспериментальных данных с описанными ранее в литературе.

Работа содержит принципиально новую, ценную научную информацию.

Основные результаты диссертации отражены в опубликованных в рецензируемых международных журналах научных статьях. Автореферат адекватно отражает содержание диссертационной работы.

**Научная новизна** диссертационного исследования заключается: в выявлении частоты встречаемости гипермукоидных изолятов *K. pneumoniae* среди госпитальных изолятов в крупных клиниках г. Москвы, в получении и детальной характеристике новых бактериофагов, в том числе К-специфичных фагов, в получении новых рекомбинантных ПС-деполимераз, идентификации продуктов деградации ими капсульных полисахаридов, а также в демонстрации антивирулентной активности одной из деполимераз *in vivo*.

**Практическая значимость работы** заключается в создании коллекции штаммов *K. pneumoniae* и бактериофагов, активных в отношении этих штаммов, пригодных для целей фаговой терапии и диагностики. Полученные продуценты ПС-деполимераз могут быть использованы для создания лечебных и диагностических препаратов на основе этих белков.

#### **Внедрение результатов диссертационной работы.**

Полученные Соловьевой Е.В. бактериофаги и ПС-деполимеразы внедрены в клинической лаборатории для типирования К-серотипов *K. pneumoniae*.

Содержание диссертации соответствует специальности 03.02.03 – «микробиология», по которой представляется к защите. Автореферат отражает сущность диссертационной работы.

Все сделанные замечания и рекомендации не влияют на общую положительную оценку работы.

Таким образом, диссертационная работа Соловьевой Екатерины Владимировны на тему «Капсулоспецифичные бактериофаги и их полисахарид-деградирующие ферменты, активные в отношении гипермукоидных штаммов *Klebsiella pneumoniae*», по актуальности, объёму, новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» ВАК РФ (Постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., в редакции Постановления Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к

кандидатским диссертациям, а её автор Соловьева Екатерина Владимировна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «микробиология».

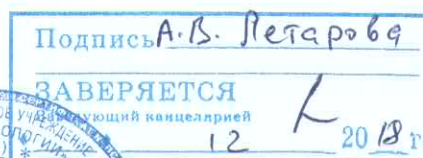
Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,  
заведующий лабораторией вирусов  
микроорганизмов ФИЦ  
Биотехнологии РАН,  
профессор каф. вирусологии  
МГУ им. М.В. Ломоносова

Летаров Андрей Викторович

Подпись А.В. Летарова заверяю.

\_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_ (« \_\_\_\_\_ » декабря 2018 г.)



Федеральное государственное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»  
г. Москва, ,  
125212, Ленинский проспект д.33.  
Телефон: +7 (495) 954-52-83  
Факс (495) 954-27-32  
E-mail: info@fbras.ru