

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 03.12.2021 г. № 31
о присуждении Цветковой Ирине Анатольевне, гражданину РФ, ученой степени
кандидата биологических наук.

Диссертация «Генотипическая характеристика *Streptococcus pneumoniae*,
принадлежащих к эпидемическим генетическим линиям» по специальности
1.5.11. Микробиология принята к защите 27.09.2021 г., протокол № 25,
диссертационным советом 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного
учреждения науки «Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации,
142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А»,
д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Цветкова Ирина Анатольевна, 1978 г. рождения. В 2001 г.
соискатель окончила Российский государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации (ныне Федеральное
государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации),
присвоена квалификация врача-биохимика по специальности «Медицинская
биохимия». В 2020 г. окончила аспирантуру Федерального государственного
бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных
болезней Федерального медико-биологического агентства», работает младшим
научным сотрудником в Федеральном государственном бюджетном учреждении

«Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства».

Диссертация выполнена в научно-исследовательском отделе медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства».

Научный руководитель – доктор медицинских наук (специальность: 1.5.11. Микробиология), профессор Сидоренко Сергей Владимирович, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», научно-исследовательский отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, руководитель отдела.

Официальные оппоненты:

Гончаров Артемий Евгеньевич, доктор медицинских наук (специальности 3.2.2. Эпидемиология и 1.5.11. Микробиология), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, лаборатория функциональной геномики и протеомики микроорганизмов отдела молекулярной микробиологии, заведующий лабораторией,

Мавзютов Айрат Радикович, доктор медицинских наук (специальность 1.5.11. Микробиология), профессор, заслуженный деятель науки Республики Башкортостан, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Уфа, кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, заведующий кафедрой,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» Министерства науки и

высшего образования Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, в своем положительном заключении, подписанном Кошель Еленой Ивановной, кандидатом биологических наук, доцентом, научным сотрудником химико-биологического кластера, указала, что диссертация Цветковой Ирины Анатольевны «Генотипическая характеристика *Streptococcus pneumoniae*, принадлежащих к эпидемическим генетическим линиям» является завершенной, выполненной на высоком методическом уровне научно-квалификационной работой. Полученные данные вносят несомненный вклад в углубленное изучение закономерностей эпидемического процесса пневмококковых инфекций и пневмококкового носительства. Охарактеризованы штаммы *S. pneumoniae*, циркулирующие в Российской Федерации и ассоциированные с эпидемическими генетическими линиями в глобальной популяции пневмококка. Работа обобщает накопленные представления о генетических и метаболических особенностях пневмококка, его возможностях адаптации и дополняет их новыми данными. Полученные сведения будут способствовать разработке новых антипневмококковых вакцин и антибиотиков в будущем.

Соискатель имеет **10** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **4** работы, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **3** работы. Общий объем работ – 4,25 п. л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Цветкова, И.А.** SNP-полиморфизм в геномах изолятов *Streptococcus pneumoniae* СС320, устойчивых к бета-лактамам антибиотикам. / **И.А. Цветкова**, М.О. Волкова, О.С. Калиногорская, С.С. Беланов, В.В. Гостев, С.В. Сидоренко. // **Антибиот. Химиотер.** - 2016. - Т. 61, № 11-12. - С. 11-12. **Scopus** (ИФ РИНЦ – 0,585).

2. **Цветкова, И.А.** Клональная структура популяции изолятов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в России с 1980 по 2017 гг. / **И.А. Цветкова**, С.С. Беланов, В.В. Гостев, О.С. Калиногорская, М.О. Волкова, А.С. Мохов, Е.В. Никитина, Е.Л. Калисникова, К.А. Иванова, А.А. Володина, С.В. Сидоренко. // **Антибиот. Химиотер.** - 2019. - Т. 64, № 5-6. - С. 22-31. **Scopus** (ИФ РИНЦ – 0,585).

3. Sidorenko, S. Multicenter study of serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children in the Russian Federation after introduction of PCV13 into the National Vaccination Calendar. / S. Sidorenko, W. Rennert, Y. Lobzin, N. Briko, R. Kozlov, L. Namazova-Baranova, **I. Tsvetkova**, V. Ageevets, E. Nikitina, A. Ardysheva, A. Bikmieva, E. Bolgarova, M. Volkova, I. Verentsova, A. Girina, N. Gordeeva, I. Demko, A. Dushchenko, G. Evseeva, L. Zharkova, T. Yelistratova, J. Zakharova, N. Ivakhnishina, E. Zubova, O. Kalinogorskaya, A. Klimashina, T. Kozeeva, A. Kraposhina, O. Krechikova, M. Mamaeva, E. Nagovitsyna, I. Protasova, V. Semerikov, N. Sokolova, I. Soloveva, N. Strelnikova, R. Telepneva, I. Feldblum, G. Kholodok, A. Chagaryan, N. Sheglinkova. // **Diagn. Microbiol. Inf. Dis.** - 2020. V. 96, №1. - P. 114914. (Web of Sci) IF JCR=2.499.

На диссертацию и автореферат поступило **6** положительных отзывов без замечаний от: **(1)** д-ра мед. наук **Миронова Константина Олеговича**, руководителя научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва – без замечаний; **(2)** д-ра биол. наук **Каюмова Айрата Рашитовича**, доцента кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Высшей школы биологии Центра биологии и педагогического образования Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань – содержал вопрос «Можно ли сделать вывод, что в последнее время большее распространение получили резистентные штаммы пневмококка, что, на фоне снижения общего количества заболеваний должно привести к более тяжелому течению болезни?»; **(3)** д-ра мед. наук **Кузнецовой Марины Валентиновны**, ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярной биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук - филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь – без замечаний; **(4)** д-ра биол. наук профессора **Чернова Владислава Моисеевича**, руководителя Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», г. Казань – содержал вопрос «Какие могут быть

дальнейшие рекомендации по антипневмококковой вакцинации с учетом представленных данных?»); **(5)** канд. хим. наук **Икрянниковой Ларисы Николаевны**, старшего научного сотрудника Института молекулярной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова. Минздрава РФ, г. Москва – без замечаний; **(6)** д-ра мед. наук профессора **Гриценко Виктора Александровича**, главного научного сотрудника лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург – без замечаний.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор мед. наук **Гончаров Артемий Евгеньевич** является признанным специалистом в области микробиологии, генетики и эпидемиологии патогенных микроорганизмов, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Цветковой И.А. (**Инф. Иммуно.** – 2021. – Т. 11. – №2. – С. 365-370; **2020.** – Т. 10. – №4. – С. 747-754; **Якутск. Мед. Журн.** – **2020.** – №2(70). – С. 47-49; **Профилактик. Клини. Мед.** – **2019.** – №4(73). – С. 30-34; **2017.** – №4(65). – С. 20-24; **Фундамент. Клини. Мед.** – **2019.** – Т. 4. – №2. – С. 58-65; **Пермск. Мед. Журн.** – **2017.** – Т. 34. – №4. – С. 54-59; **Quater. Int.** – **2017.** – V. 445. – PP. 89-103; **Viruses.** – **2017.** – V. 9. – №7. - P. 188; **Genome Announc.** – **2017.** – V. 5. – №10. – P. e01764-16);

доктор мед. наук, профессор **Мавзютов Айрат Радикович** является специалистом в области фундаментальной и прикладной микробиологии и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Цветковой И.А. (**Int. J. Antimicrob. Agents.** – **2020.** – Vol. 56 – No. 1 – P. 105983; **Microbiol.** – **2020.** – Vol. 89 – No. 1 – P. 13-27; **Клини. Лаб. Диагностика.** – **2020.** – Т. 65 - № 1 – С. 55-60; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – **2018.** - № 4. – С. 56-62; **Мол. Генет. Микробиол. Вирусол.** – **2017.** – Т. 35. - № 3. – С. 103-108; **Пародонтол.** – **2017.** – Т. 22. - № 1 (82). – С. 70-73).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области фундаментальной биологии (в том числе микробиологии) и биотехнологий, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Цветковой И.А. (**Int. J. Mol. Sci.** –

2021. – V. 22. – No. 12. – P. 6187; **Microorganisms.** – 2020 – V. 8 – No. 10 – P. 1545; **Chem. Mater.** – 2020. – V. 32. – No. 23. – P. 10066-10075; **Antibiotics.** – 2020. – V. 9 – No. 11. – P. 742; **Int. J. Med. Microbiol.** – 2020. – V. 310. – No. 4. – P. 151425; **Ther. Deliv.** – 2019. – V. 10. – No. 4. – P. 241-250; **ACS Appl. Bio Mater.** – 2019. – V. 2. – No. 10. – P. 4427-4435; **Bioconjug. Chem.** – 2018. – V. 29. – No. 11. – P. 3793-3799; **J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.** – 2017. – V. 332. – P. 122–130; **Mol. Phylogenet. Evolut.** – 2017. – V. 116. – pp. 87-96; **Bioconjug. Chem.** – 2017. – V. 28. – No. 2. – pp. 426-437), а также наличием ученых, являющихся безусловными специалистами по теме диссертации Цветковой И.А.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана научная концепция структуры глобальной (мировой) популяции *Streptococcus pneumoniae*, которая основана на положениях о том, что мировая популяция *Streptococcus pneumoniae* представлена тремя глобальными группами А, В1 и В2, различающимися, в первую очередь, генами, кодирующими сигнальную пептидазу 1, глюкокиназу и глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназу; глобальные группы мировой популяции *S. pneumoniae* ассоциируются с различными доминирующими серотипами (23F, 19F, 14 и 23А в группе А; 11А, 19F, 19А, 1 и 9N в группе В1; 6А/В/Е, 3, 19А, 7F и 5 в группе В2); группа В2 ассоциируется преимущественно с серотипами, не входящими в состав вакцины ПКВ7; принадлежность *S. pneumoniae* к генетическим линиям определяется структурой базовых систем метаболизма (системы рестрикции-модификации ДНК; CiaH сенсорной гистидин-киназы; АссС - ацетил-СоА-карбоксилазы;

предложена гипотеза о том, что АТФ-синтазный комплекс и компоненты фосфотрансферазной системы *S. pneumoniae* детерминируют формирование типов капсулы и метаболический тип, оптимальный для роста и адаптации большинства пневмококков. Серотип-специфичная вакцинация, приводящая к исключению из циркуляции распространенных генетических линий пневмококка, обладающих большей способностью к адаптации за счет энергообеспечивающих систем (АТФ, НАДФН и фосфотрансферазных систем), может

приводить к распространению генетических линий, характеризующихся большей вирулентностью;

доказано наличие закономерности, в соответствии с которой особенности метаболизма углеводов и ароматических аминокислот *S. pneumoniae* детерминируют регуляцию клеточных процессов пневмококка и его фенотипические особенности, в том числе - устойчивость к антибиотикам и вирулентность. Расщепление популяции по вариантам гена *strH* коррелирует с кластеризацией по детерминантам углеводного метаболизма *gnd*, *dexB*, путям синтеза ароматических аминокислот (*aroE*), регуляторному гену *relA*, генам синтеза пептидогликана и клеточного деления (*murD*, *pbp1A*), регуляторным генам экспрессии полисахаридной капсулы *wzg-wzh-wze*;

введены основы дальнейшего изучения патогенного потенциала, антибиотикорезистентности и адаптивных возможностей популяции *S. pneumoniae*, на фоне проводимой в России вакцинации против пневмококковой инфекции.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано на достаточной выборке штаммов (515 штаммов, выделенных в период с 1980 по 2017 гг. в различных городах России), что происходившие в 2000–2010 гг. изменения в структуре популяции пневмококков, циркулирующих в Российской Федерации, были обусловлены изменениями в структуре глобальной популяции в ответ на массовую вакцинацию ПКВ7 в различных регионах мира. Происходивший в этот период рост устойчивости к бета-лактамам и макролидным антибиотикам связан с преимущественным глобальным распространением серотипа 19A, не входящего в состав ПКВ7. Полученные научные данные дополняют и расширяют существующие представления о закономерностях эпидемического процесса пневмококковых инфекций и пневмококкового носительства;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: молекулярно-генетических (выделение нуклеиновых кислот, амплификация в реальном времени, MLST-типирование секвенированием по Сэнгеру, полногеномное секвенирование), биоинформатических (сборка геномов *de novo*;

аннотация; идентификация консервативной части геномов с помощью программ parsnp и GenomeComparator; филогенетический анализ с помощью программ RaxML и SplitsTree; сравнение геномов по вариантам всех генов с помощью программы GenomeComparator; анализ сайтов рекомбинаций в геномах с помощью программы Gubbins; анализ рекомбинаций в генах пенициллин-связывающих белков с помощью программы BratNextGen; идентификация и аннотация значимых полиморфизмов в геномах резистентных к пенициллину изолятов с помощью программ samtools и SnpEff; анализ наличия систем рестрикции-модификации, профагов, транспозонов и генов резистентности к макролидным антибиотикам с помощью программы blastall), а также методов статистической обработки данных (множественный анализ соответствий; классификация изолятов пневмококка с помощью метода «Случайного леса» (Random Forest); предсказание генов, формирующих анализируемые группы, с помощью алгоритма XGBoost);

изложены доказательства закономерностей диверсификации популяции пневмококка на глобальные группы и успешные генетические линии; по результатам предсказания генов-маркеров (на основании варибельности аллелей) сделано предположение о метаболическом типе пневмококка (*agaD-1* и *atpG-1*), обеспечивающем наибольший адаптивный потенциал к бессимптомному носительству, за счет энергообеспечивающих систем (АТФ, НАДФН и фосфотрансферазные системы);

раскрыта проблема возможного замещения в популяции *S. pneumoniae* пневмококков, обладающих метаболическим типом, который обеспечивает их наибольшим адаптивным потенциалом к бессимптомному носительству, пневмококками, характеризующимися более специализированным метаболическим типом (специфичным для конкретного серотипа) и большим инвазивным потенциалом (за счет особенностей углеводного метаболизма и синтеза поверхностных гликозидаз), на фоне проводимой вакцинации против пневмококка конъюгированными полисахаридными вакцинами;

изучены взаимосвязи происходивших в 2000 – 2010 гг. изменений в структуре популяции пневмококков, циркулировавших в Российской Федерации до внедрения вакцинации против пневмококка в нашей стране, с изменениями в

структуре глобальной популяции в ответ на массовую вакцинацию ПКВ7 в различных регионах мира. В этот период в России происходил рост устойчивости к бета-лактамам и макролидным антибиотикам, который был связан с преимущественным глобальным распространением серотипа 19А, не входящего в состав ПКВ7;

проведен анализ на основе стратифицированной по генотипу случайной выборки штаммов *S. pneumoniae*, который позволяет экстраполировать полученные результаты на генеральную совокупность (глобальную популяцию пневмококка).

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены используемые в исследовании биоинформатические методы филогенетического анализа клинических штаммов бактерий в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» и в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (Акты внедрения от 19.02.2021 г.) - учрежденческий и межучрежденческий уровни внедрения;

определена так называемая «точка отсчета», отражающая состояние структуры популяции *S. pneumoniae* на момент начала вакцинации против пневмококка в России; полученные результаты позволят в дальнейшем получить информацию о генетических процессах, определяющих ответ популяции пневмококка на методы профилактики и лечения;

создана основа для разработки алгоритмов дальнейшего мониторинга динамики популяции пневмококка, алгоритмов генотипической характеристики эпидемически значимых штаммов, что необходимо для оптимизации стратегии профилактики пневмококковых заболеваний в России в будущем;

представлены гипотетические мишени для новой белковой антипневмококковой вакцины: мембранные и поверхностные белки StrH, NanA, Phts, NanB, OppC, PcpA и Wzd.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты экспериментальных работ получены на сертифицированном оборудовании, воспроизводимость результатов проверена в различных условиях с необходимым количеством повторов;

теория согласуется с опубликованными данными по теме диссертации;

идея диссертационного исследования о генотипической характеристике изолятов *S. pneumoniae*, относящихся к эпидемическим генетическим линиям, циркулирующим в Российской Федерации, опирается на анализ имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, обобщении опыта ведущих исследовательских групп по изучению популяции, физиологии и генетики пневмококка;

использованы 543 референсных штамма пневмококка с описанными метаданными, принадлежащие распространенным эпидемически значимым генетическим линиям;

установлена частичная корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными независимых зарубежных авторов, касающихся высокой эффективности рекомбинаций генетических линий пневмококков, ассоциирующихся с серотипами 23F, 19F, 6A и 14;

использованы современные методы получения и обработки информации в рамках систем сбора, обработки и визуализации данных: сборка *de novo* и аннотация геномов (программы FastQC, Trimmomatic, SPAdes, Quast, RAST сервер), филогенетический анализ (SplitsTree и RaxML), анализ сайтов рекомбинаций (Gubbins и BratNextGen), визуализация и аннотация филогенетических деревьев (Phandango и iTOL), статистический анализ (множественный анализ соответствий - R-пакет FactoMineR, метод классификации «Случайного леса» - Random Forest, R-пакет bigrf), предсказание генов, формирующих анализируемые группы (алгоритм XGBoost на основе приложения Hermes2, H2O).

Личный вклад соискателя состоит в:

проведении автором лично следующих этапов работы: анализ научной литературы, планирование экспериментов, формирование выборки, состоящей

из российских и референсных штаммов пневмококка, циркулирующих в России с 1980 по 2017 годы, все этапы экспериментальной работы (ПЦР-серотипирование, MLST-сиквенс-типирование, полногеномное секвенирование, биоинформатический анализ данных), при личном участии в апробации результатов исследования, обработке, оформлении и публикации результатов.

На заседании 03.12.2021 г. диссертационный совет принял решение за решение научной задачи по углубленному изучению закономерностей эпидемического процесса пневмококковых инфекций и пневмококкового носительства, а также генетических и метаболических особенностей пневмококка, его возможностей адаптации, имеющей значение для развития медицинской микробиологии и разработки новых вакцин и антибиотиков против пневмококковой инфекции в будущем присудить Цветковой И.А. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **17** человек, из них **9** докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология, участвовавших в заседании, из **23** человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **17**, против **0**, недействительных бюллетеней **нет**.

Председатель

диссертационного совета

академик РАН, д.м.н., профессор

(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.б.н., доцент

(Хохлова Ольга Евгеньевна)

Дата оформления Заключения — 03.12.2021 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.