

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук заведующего лабораторией функциональной геномики и протеомики микроорганизмов отдела молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

Гончарова Артемия Евгеньевича на диссертационную работу Цветковой Ирины Анатольевны на тему «Генотипическая характеристика *Streptococcus pneumoniae*, принадлежащих к эпидемическим генетическим линиям», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Актуальность диссертационного исследования

По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), пневмококковая инфекция является распространенной причиной заболеваемости и смертности во всем мире. Проблемы эпидемиологического надзора и истинного уровня заболеваемости пневмококковыми инфекциями в России до сих пор являются актуальными.

Для определения эффективной стратегии сдерживания распространения пневмококков невакцинных серотипов на фоне проводимой вакцинации, включая инвазивные и антибиотикорезистентные штаммы, необходима информация о динамике генетической структуры популяции пневмококков, имеющих эпидемиологическое значение. В этой связи актуальность темы диссертационного исследования не вызывает сомнений. Полученные данные актуальны и соответствуют требованиям современной науки и практики.

Автором диссертационного исследования был проведен анализ штаммов *S. pneumoniae*, циркулирующих в Российской Федерации и ассоциированных с эпидемическими генетическими линиями в глобальной популяции пневмококка. В представленной работе методами биоинформационного анализа была изучена глобальная популяционная структура *Streptococcus pneumoniae*, в том числе чувствительных и устойчивых к бета-лактамам антибиотикам. Выделены

циркулирующие в России эпидемически значимые генетические линии и установлен клональный характер распространения резистентности.

Наиболее значимым, по нашему мнению, научным результатом проведенного Цветковой И.А. исследования является идентификация в структуре глобальной популяции *S. pneumoniae* быстро эволюционирующей генетической группы (В), представители которой ассоциируются с разными серотипами, но тем не менее, имеют общие метаболические особенности. Кроме того, автором выявлена тенденция к распространению после 2000 г. генетических линий, ассоциированных с инвазивностью (группа В2), что создает методологическую базу для эпидемиологического надзора за инвазивными формами пневмококковых инфекций в современный период.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, полнота опубликования результатов

Все результаты получены автором лично или при ее непосредственном участии, включая сбор и анализ данных литературы, формулирование актуальности, цели и задач, планирование и постановку экспериментов, обработку, анализ и интерпретацию результатов исследования, их оформление и публикацию.

Структура и объем диссертации

Работа оформлена, в основном, в соответствии с требованиями, предъявляемыми к рукописям диссертаций, диссертация изложена в двух томах. Первый том содержит 175 страниц машинописного текста и состоит из: общей характеристики работы; обзора литературы; главы, описывающей материалы и методы исследований; главы собственных исследований, содержащей обсуждение результатов; заключения, выводов; списка публикаций по теме диссертации; списка сокращений и списка использованной литературы. Список литературы включает 347 источников литературы. Том 2 содержит 254 страницы машинописного текста и состоит из 9 приложений. Работа иллюстрирована таблицами и рисунками. Содержание автореферата соответствует основным положениям полного текста диссертации.

В разделе «Общая характеристика работы» автор раскрывает актуальность проводимого исследования, описывает степень разработанности темы исследования, формулирует цель и задачи работы, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, описывает методы исследования, выдвигает положения, выносимые на защиту, приводит сведения по апробации результатов работы.

Обзор литературы («Глава 1») состоит из одиннадцати подразделов, в которых дана исчерпывающая характеристика *S. pneumoniae*: приведены данные об особенностях строения пневмококка и структуры его генома; способах типирования пневмококка; описаны факторы вирулентности и механизмы, обуславливающие резистентность к антибиотикам; дано представление о генетических процессах в популяции пневмококка, способствующих диверсификации и стабилизации генетических линий.

В главе «Материалы и методы исследования» (Глава 2) изложен подход, используемый для формирования выборки, данные об изучаемых и референсных штаммах *S. pneumoniae*. В работе было исследовано 515 штаммов пневмококка из России, выделенных в период с 1980 по 2017 гг. в различных городах страны. Выборка была дополнена референтными штаммами *S. pneumoniae* (n=543), в том числе принадлежащими распространенным эпидемически значимым клонам. Автором были использованы новейшие методы для генетической характеристики микроорганизмов, в том числе ПЦР-серотипирование, MLST-типирование и полногеномное секвенирование изолятов пневмококка. Автором были использованы современные методы и алгоритмы анализа данных.

Глава «Результаты и обсуждение» (Глава 3) состоит из 5 подглав. В первой подглаве приведен анализ структуры популяции *S. pneumoniae*, циркулирующих в России. Установлено, что мировая популяция *S. pneumoniae* делится на три глобальные группы, которые ассоциируются преимущественно с разными серотипами. Выявлена тенденция к распространению после 2000 г., на фоне вакцинации ПКВ7, генетических линий, ассоциированных с инвазивностью (группа B2). Установлено, что на фоне вакцинации в мире вакцинами ПКВ7 и ПКВ13, в России происходило распространение инвазивных изолятов редких генетических

линий, многие из которых ассоциировались с невакцинными серотипами (6С, 8, 10А, 16F, 17F, 22В, 22F, 25F, 34). Дана детальная генотипическая характеристика изучаемых генетических линий пневмококка, в том числе: частота и особенности рекомбинационных событий, структура систем рестрикции-модификации ДНК, наличие профагов в геноме. Идентифицированы ключевые гены-маркеры, которые вносят основной вклад в диверсификацию популяции пневмококка на глобальные группы, генетические линии, серотипы, инвазивные штаммы и штаммы от носителей. Установлено, что *CiaH* двухкомпонентная регуляторная система, а также компоненты метаболических путей, отвечающих за синтез жирных кислот, регуляцию метаболизма углеводов и метаболизм пуринов, детерминируют деление популяции пневмококка на три глобальные группы. Установлено, расщепление популяции пневмококка по компонентам углеводного метаболизма (варианты генов *gnd*, *dexB*) коррелирует с расщеплением популяции по генам синтеза пептидогликана и регуляции экспрессии полисахаридной капсулы (варианты генов *wzg-wzh-wze*), а также с расщеплением по вариантам гена поверхностной гликозидазы *StrH*. То есть, особенности метаболизма углеводов детерминируют вирулентный потенциал пневмококка.

Вторая подглава третьей главы посвящена анализу циркулирующих в России генетических линий, ассоциирующихся с наличием резистентности к антибиотикам различных классов. Выполнен анализ детерминант устойчивости к антибиотикам по полногеномным данным. Проанализирована динамика распространения генетических линий пневмококка, ассоциирующихся с устойчивостью к антибиотикам, в России в различные периоды времени.

Третья подглава третьей главы посвящена анализу наличия полногеномных ассоциаций рекомбинаций с устойчивостью штаммов пневмококка к бета-лактамам антибиотикам. Установлено, что резистентные к бета-лактамам антибиотикам генетические линии ассоциируются с высокой частотой рекомбинаций, имеющих клональное предковое происхождение. Показано, что рекомбинации в генах, кодирующие первичные мишени бета-лактамов антибиотиков, *Pbp1A*, *Pbp2B* и *Pbp2X*, ассоциируются с множеством адаптивных рекомбинаций, в частности, в генах,

кодирующих белки клеточного деления и других. При этом ассоциация резистентности к бета-лактамам антибиотикам с серотипами может быть связана с высокой частотой рекомбинаций, отмеченной для серотипов 23F, 19F, 19A, 35B, 6A, 6E.

Четвертая подглава Главы 3 посвящена сравнительному анализу генов пенициллин-связывающих белков (*pbp2x*, *pbp2b* и *pbp1a*) пневмококков, принадлежащих эпидемическим генетическим линиям. Подтверждены данные предыдущих исследований о событиях рекомбинаций в областях, кодирующих транспептидазные домены, между *S. mitis* и *S. pneumoniae*.

В пятой подглаве Главы 3 обсуждаются гены вирулентности, продукты которых могут быть потенциальными мишенями для создания белковой антипневмококковой вакцины. Автор обсуждает связь вирулентности с метаболическим типом.

В разделе «Заключение и выводы» подведен итог работы, обобщены полученные данные. Выводы, сформулированные автором, обоснованы, отражают результаты диссертационного исследования и соответствуют поставленным задачам.

Степень обоснованности научных положений, выводов и заключений, сформулированных в диссертации.

Обоснованность положений, выносимых на защиту, и выводов по результатам исследования, подтверждена большим объемом анализируемых данных, репрезентативностью сформированной выборки изолятов *S. pneumoniae*, правильно проведенным теоретическим анализом и соответствием полученных результатов поставленным целям и задачам.

Диссертационная работа Цветковой И.А. представляет собой завершенное исследование, выполненное на высоком методическом уровне. В ходе работы впервые были получены сведения, отражающие состояние структуры популяции *S. pneumoniae* на момент начала антипневмококковой вакцинации в России.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и заключений.

Высокая степень достоверности, обоснованность полученных результатов и выводов диссертационной работы основаны на использовании большого объема

фактического материала, использованием современных методов и сертифицированного оборудования.

Научные положения диссертации представлены на научных конференциях, а также в статьях, опубликованных в Российских и международных изданиях. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 3 статьи – в российских и международных изданиях, индексируемых базами Scopus и Web of science, и 12 тезисов и статей, опубликованных в других изданиях, материалах всероссийских и международных научных конференций.

Установлено, что мировая популяция *S. pneumoniae* представлена тремя глобальными группами, и выявлены ключевые гены-маркеры, детерминирующие диверсификацию популяции пневмококка на глобальные группы.

Установлено, 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 19А, не входящего в состав ПКВ7.

Выявлена глобальная тенденция к распространению после 2000 г. генетических линий, ассоциированных с инвазивностью (группа В2).

Установлено, что особенности метаболизма углеводов и ароматических аминокислот детерминируют регуляцию клеточных процессов пневмококка и фенотипические особенности, в том числе вирулентный потенциал пневмококка. Серотип-специфичная вакцинация, приводящая к исключению из циркуляции распространенных генетических линий пневмококка, обладающих большей способностью к адаптации за счет энерго-обеспечивающих систем, может приводить к распространению генетических линий, характеризующихся большей вирулентностью.

Показана ассоциация вариабельности гена *strH*, кодирующего экспрессируемую на поверхности клеточной стенки экзо-β-D-N-ацетилглюкозаминидазу, с инвазивностью.

Практическая значимость результатов.

Практическая значимость диссертационной работы Цветковой И.А. заключается в получении научных данных, дополняющих и уточняющих существующие представления об эволюции *S. pneumoniae*, его метаболических особенностях и возможностях адаптации.

Полученные Цветковой И.А. данные отражают состояние структуры популяции *S. pneumoniae* на момент начала антипневмококковой вакцинации в России и позволят в дальнейшем оценивать изменения, касающиеся как эпидемиологической ситуации в России, так и генетических процессов, детерминирующих ответ популяции пневмококка на методы профилактики и лечения.

В международную базу GenBank депонировано 45 геномов *S. pneumoniae*, циркулирующих в России, которые могут быть использованы в дальнейших работах по изучению особенностей эпидемически значимых генетических пневмококка.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертационной работы, мнение о научной работе в целом.

Тема диссертационного исследования «Генотипическая характеристика *Streptococcus pneumoniae*, принадлежащих к эпидемическим генетическим линиям», основные положения и выводы, представленные Цветковой И.А., полностью соответствуют специальности 1.5.11 – «микробиология». Представленная Цветковой И.А. диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук имеет очевидную научную и практическую ценность, автор проявила себя в качестве состоявшегося квалифицированного исследователя. Теоретический и методический уровень, на котором выполнена работа, большой объем данных и комплексный анализ полученных результатов делают научные положения, сформулированные в диссертации, обоснованными и аргументированными.

Аннотация дает полное представление о содержании диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы Цветковой И.А. нет.

В порядке дискуссии хотелось бы узнать, как автор представляет дальнейшую стратегию выбора мишеней для создания пневмококковых вакцин?

В процессе прочтения работы возникло замечание относительно филогенетического анализа – выполнение 100 бутстрэп реплик представляется недостаточно надежным (обычно используют 500-1000 случайных деревьев).

Сделанные замечания не меняют мнения о принципиально положительной оценке выполненной диссертационной работы Цветковой И.А.

Заключение

Диссертационная работа Цветковой Ирины Анатольевны на тему «Генотипическая характеристика *Streptococcus pneumoniae*, принадлежащих к эпидемическим генетическим линиям», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – «микробиология», является завершенной научно-квалификационной работой. Соответствие специальности 1.5.11 обосновано целью, задачами, методическими подходами, полученными результатами, положениями, выносимыми на защиту и выводами исследования.

Диссертационная работа Цветковой Ирины Анатольевны вносит вклад в углубленное изучение закономерностей эпидемического процесса пневмококковых инфекций и пневмококкового носительства, что обуславливает практическую значимость данной работы. Полученные данные могут быть основой для разработки алгоритмов дальнейшего мониторинга динамики популяции пневмококка, алгоритмов генотипической характеристики эпидемически значимых штаммов, что необходимо для оптимизации стратегии профилактики пневмококковых заболеваний в будущем. Работа также обобщает накопленные научные представления о генетических и метаболических особенностях пневмококка, его возможностях адаптации и дополняет их новыми данными. Полученные теоретические сведения будут способствовать разработке новых антипневмококковых вакцин и антибиотиков в будущем, что также имеет важное практическое значение.

По актуальности, объему, научной новизне, методическому уровню и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Цветковой И.А. соответствует 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 24.04.2016 г. №355, от 02.06.2016 г. №748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. №1024, от 01.10.2018 г. №1168, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Цветкова Ирина Анатольевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – «микробиология».

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОППОНЕНТ

доктор медицинских наук заведующий
лабораторией функциональной геномики и
протеомики микроорганизмов отдела
молекулярной микробиологии Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения «Институт экспериментальной
медицины»


09.11.2021 г.
Гончаров Артемий Евгеньевич

197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12
Тел.: +7(812)234-68-68
e-mail: iem@iemspb.ru

Подпись Гончарова А.Е. заверяю

Начальник



О.В. Касарова