

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 64.1.002.01

от 03.12.2021 г., Протокол № 31

по защите диссертации Цветковой Ирины Анатольевны

по специальности 1.5.11. Микробиология

Присутствовали:

№	Фамилия И. О.	Ученая степень, шифр специальности в совете
1.	Дятлов Иван Алексеевич (председатель совета)	академик РАН, д.м.н., профессор 1.5.6 (биологические науки)
2.	Анисимов Андрей Павлович (заместитель председателя совета)	д.м.н., профессор 1.5.11 (биологические науки)
3.	Шемякин Игорь Георгиевич (заместитель председателя совета)	д.б.н., профессор 1.5.6. (биологические науки)
4.	Хохлова Ольга Евгеньевна (ученый секретарь совета)	д.б.н., доцент 1.5.11 (биологические науки)
5.	Герасимов Владимир Николаевич	д.б.н. 1.5.11 (биологические науки)
6.	Дентовская Светлана Владимировна	д.м.н. 1.5.11 (биологические науки)
7.	Ипполитов Евгений Валерьевич	д.м.н., профессор 1.5.11 (биологические науки)
8.	Коломбет Любовь Васильевна	д.б.н. 1.5.6. (биологические науки)
9.	Меденцев Александр Григорьевич	д.б.н. 1.5.6. (биологические науки)
10.	Мокриевич Александр Николаевич	д.м.н. 1.5.6. (биологические науки)
11.	Павлов Виталий Михайлович	д.б.н. 1.5.11 (биологические науки)
12.	Потапов Василий Дмитриевич	д.б.н. 1.5.11 (биологические науки)
13.	Похиленко Виктор Данилович	д.т.н., с.н.с. 1.5.6. (биологические науки)
14.	Светоч Эдуард Арсеньевич	д.в.н., профессор 1.5.11 (биологические науки)
15.	Филонов Андрей Евгеньевич	д.б.н. 1.5.6. (биологические науки)
16.	Царёв Виктор Николаевич	д.м.н., профессор 1.5.11 (биологические науки)
17.	Шепелин Анатолий Прокопьевич	д.б.н. 1.5.6. (биологические науки)

Открыл заседание Председатель диссертационного совета, академик РАН, доктор мед. наук, профессор **Дятлов Иван Алексеевич**, который объявил о защите диссертации «Генотипическая характеристика *Streptococcus pneumoniae*, принадлежащих к эпидемическим генетическим линиям» соискателя Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» Цветковой Ирины Анатольевны, младшего научного сотрудника

научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология. Работа выполнена в научно-исследовательском отделе медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», принята в диссертационный совет 64.1.002.01 при ФБУН ГНЦ ПМБ 27.09.2021 г., протокол № 25.

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 (специальность 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, отдел молекулярной микробиологии, лаборатория функциональной геномики и протеомики микроорганизмов, 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.

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.

Председатель проинформировал, что состав совета 64.1.002.01 утвержден в количестве 23 человек; на основании явочного листа **присутствуют 17 человек** - кворум имеется. Присутствует требуемое количество докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология - 9 чел. **Совет правомочен принимать решения.**

За повестку дня голосовали открытым голосованием: единогласно.

Слово предоставляется ученому секретарю совета доктору биол. наук, доценту

Хохловой Ольге Евгеньевне для оглашения документов аттестационного дела соискателя. Ученый секретарь оглашает **документы, имеющиеся в аттестационном деле соискателя:** заявление соискателя; личный листок по учету кадров; заверенная в установленном порядке копия документа о высшем профессиональном образовании; удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов; список научных трудов; копии публикаций; заключение организации, где выполнялась диссертация; отзыв научного руководителя; письменные согласия ведущей организации и официальных оппонентов; выписка из протокола заседания диссертационного совета по назначению комиссии диссертационного совета 10.09.2021 г., протокол № 23, и принятию диссертации к защите 27.09.2021 г., протокол № 25; заявление о размещении диссертации на сайте ФБУН ГНЦ ПМБ от 02.09.2021 г., выписка о сдаче диссертации в библиотеку Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»; список организаций, в которые были разосланы авторефераты 03.11.2021 г.; копия объявления о защите диссертации, размещенного на сайте ВАК 28.09.2021 г. и на сайте ФБУН ГНЦ ПМБ 28.09.2021 г.; оригиналы отзывов ведущего учреждения, оппонентов, отзывов на автореферат; акт ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России от 15.02.2021 г. о внедрении результатов диссертационной работы, акт ФГБОУ ВО КрасГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого от 19.02.2021 г. о внедрении результатов диссертационной работы. Все представленные документы полностью соответствуют требованиям, предъявляемым ВАК России.

Председатель: Есть ли вопросы по личному делу соискателя? Нет вопросов. Спасибо. Слово для изложения основных положений диссертационной работы предоставляется Цветковой Ирине Анатольевне, у Вас 20 минут.

Слушали соискателя Цветкову Ирину Анатольевну, которая изложила и защитила основные положения диссертации:

Глубокоуважаемый председатель диссертационного совета, глубокоуважаемые члены диссертационного совета, уважаемые коллеги! Я представляю вашему вниманию доклад на тему «Генотипическая характеристика *Streptococcus pneumoniae*, принадлежащих к эпидемическим генетическим линиям».

Несмотря на применение антипневмококковых полисахаридных конъюгированных вакцин и антибиотиков, пневмококковая инфекция остается частой причиной заболеваемости и смертности во всем мире. Структура популяции пневмококков на глобальном и локальном уровнях крайне динамична, динамичность возрастает под прессингом массового применения полисахаридных и конъюгированных вакцин. Появляются данные о росте случаев пневмококковых инфекций, вызванных невакцинными серотипами. Для решения проблемы пневмококковых инфекций необходимо не только иметь полное представление об эпидемиологической ситуации в России и мире, но также понимать генетические процессы в популяции *Streptococcus pneumoniae*, а также механизмы, способствующие увеличению

вирулентности пневмококка.

Цель исследования: дать генотипическую характеристику изолятов *Streptococcus pneumoniae*, относящихся к эпидемическим генетическим линиям, циркулирующим в Российской Федерации.

Далее Цветкова Ирина Анатольевна сообщила, что задачи исследования представлены в автореферате и представила их на презентации:

Задачи исследования:

1. Оценить популяционную структуру и провести сравнительный биоинформатический анализ данных полногеномного секвенирования изолятов *S. pneumoniae*, относящихся к эпидемическим генетическим линиям.
2. Проанализировать детерминанты резистентности к антибиотикам изолятов *S. pneumoniae*, относящихся к эпидемическим генетическим линиям.
3. Охарактеризовать геномные локусы изолятов *S. pneumoniae* эпидемических генетических линий, детерминирующих серотиповую принадлежность и устойчивость к бета-лактамным антибиотикам.
4. Провести сравнительный биоинформатический анализ генов пенициллин-связывающих белков у изолятов *S. pneumoniae*, относящихся к эпидемическим генетическим линиям.
5. Провести сравнительный анализ генов вирулентности, выявить потенциальные мишени для создания белковой антипневмококковой вакцины.

На следующем слайде представлен общий план исследования. Филогенетический анализ был выполнен по фрагментам шести генов схемы MLST-типирования. Для этого была сформирована первичная выборка, которая включала 1058 изолятов, в том числе 515 изолятов из России, выделенных за период с 1980 по 2017 годы в различных городах, а также 543 референсных штамма, принадлежащих распространенным клонам. Вторичная выборка включала 495 изолятов первичной выборки, для которых были доступны данные полногеномного секвенирования. 126 изолятов пневмококка были выделены и типированы, а также для 45 изолятов было выполнено полногеномное секвенирование в Детском научно-клиническом центре инфекционных болезней ФМБА России.

Положения, выносимые на защиту, касающиеся структуры глобальной популяции пневмококка по результатам анализа конкатенатов последовательностей генов из схемы MLST:

Мировая популяция *Streptococcus pneumoniae* представлена тремя глобальными группами - А, В и В2. Кластеризация на три группы была известна по предыдущим работам, однако, механизмы, ответственные за эту кластеризацию, не были ранее изучены.

В настоящее время доминирует и распространяется генетически гетерогенная группа В, представители которой ассоциируются преимущественно с разными

серотипами, но тем не менее, имеют характерные общие метаболические особенности.

Группа B2 ассоциируется преимущественно с серотипами, не входящими в состав вакцины ПКВ7.

Наибольший вклад в деление на глобальные группы, по конкатенатам MLST, вносят гены, кодирующие сигнальную пептидазу I, глюкокиназу и глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназу.

Для выяснения филогенетических связей и выявления субпопуляций в популяции пневмококка были применены методы кластеризации, использующие данные множественного выравнивания последовательностей. На данном слайде показана кластеризация конкатенатов последовательностей генов MLST, доступных для 1058 изолятов, выполненная с использованием метода минимальной эволюции и метода ближайшего связывания (с помощью программы SplitsTree). Было выделено три крупных филогенетических клада, на основании ветвей дерева. Такое же дерево было построено для 14663 сиквенс-типов пневмококка, доступных в базе PubMLST на декабрь 2019 года.

На следующем слайде показана кластеризация, по данным конкатенатов последовательностей генов MLST, для 1058 изолятов, выполненная с помощью программы RaXML, использующей алгоритмы расчета генетической модели популяции с помощью метода максимального правдоподобия. Данный метод кластеризации позволил уточнить топологию кладов, при этом была получена сходная кластеризация. На основании выравнивания последовательностей были также идентифицированы «сиквенс-кластеры». На данном слайде сиквенс кластеры (то есть входящие в их состав изоляты пневмококка) отображены цветами на ветвях филогенетического дерева.

Сиквенс-кластеры не всегда отражают филогенетические данные. Сиквенс-кластеры – это группы, в которых аллели генов распределены случайным образом, все генетические линии одинаково распределены, отсутствует обмен генами с другими сиквенс-кластерами, не происходит никаких эволюционных изменений. Под понятием «генетическая линия» мы подразумевали распространенную монофилетическую группу близкородственных изолятов, принадлежащих одному или нескольким клональным комплексам, входящих в состав одной и той же клады филогенетического дерева. В ряде случаев генетическая линия соответствует конкретному сиквенс-кластеру.

Далее Цветкова Ирина Анатольевна сообщила, что положения, выносимые на защиту, касающиеся диверсификации генетических линий и их метаболических отличий, на основании сравнения полногеномных данных, представлены в автореферате и представила их на презентации:

Принадлежность к генетическим линиям определяется структурой базовых систем метаболизма:

- типа системы рестрикции-модификации ДНК;

- *CiaH* сенсорной гистидин-киназы (компонент двухкомпонентной сигнальной системы *CiaHR*, регулятор компетентности / вирулентности);

- *AccC* - ацетил-СоА-карбоксилазы (участвует в первых реакциях синтеза жирных кислот).

Возможно, АТФ-синтазный комплекс и компоненты фосфотрансферазной системы детерминируют формирование типов капсулы и метаболический тип *agaD-1* и *atpG-1* является оптимальным 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, фосфотрансферазные системы), может приводить к распространению генетических линий, характеризующихся большей вирулентностью.

Известно, что все пневмококки характеризуются наличием систем рестрикции-модификации I и II типа. Системы рестрикции-модификации II типа выполняют функцию поддержания барьера для обратного взаимного переноса генетического материала между генотипами пневмококка. До сих пор считалось, что цитозин-специфичные GATC-метилтрансферазы являются большой редкостью для пневмококков. Их связывали только с одной генетической линией пневмококка – сиквенс-типом ST81, который является самым успешным и самым распространенным клоном пневмококка за всю историю изучения данного микроорганизма. Цитозин-специфичная метил-трансфераз обеспечила данному клоану хорошую стабильность приобретенных полезных детерминант генома. Однако по результатам нашего исследования, ряд представителей группы B2 имеют пары метил-трансфераз системы рестрикции-модификации II типа, на 100% идентичные цитозин-специфичной метил-трансферазе, характерной для ST81. Это распространенные клональные комплексы CC505, CC191, CC66. Представители указанных сиквенс-типов могут иметь способность к стабилизации своего генома, характерную для ST81. Возможно, тенденция распространения группы B2 обусловлена типом системы рестрикции-модификации ее представителей.

Для поиска генов, по данным полного генома, влияющих на структуру популяции пневмококка, были использованы алгоритмы машинного обучения Random Forest («Случайный лес») и XGBoost. Для этого была использована таблица с вариантами генов корового генома, дополненная метаданными. Классификация изолятов по группам A, B1, B2, а также по сиквенс-кластерам, была правильной, ошибка предсказания была невысокой.

Наилучшими маркерами групп A, B1, B2, по данным сравнения полных геномов изолятов, были компоненты синтеза жирных кислот, а также двухкомпонентная регуляторная система *CiaRH*.

Наилучшими маркерами идентифицированных ранее сиквенс-кластеров, по данным сравнения полных геномов изолятов, были 125 значимых генов, являющихся компонентами

следующих метаболических путей: метаболизм углеводов, метаболизм пуринов, транскрипция генов рибосомальной РНК, трансляция, гомологичная рекомбинация, Cia-RN регуляторная система, синтез жирных кислот, синтез пептидогликана.

В формировании серотипов вносят вклад >1000 значимых генов, среди которых были: гены *cps*-локуса (на первом месте), компоненты АТФ-синтазного комплекса, гены метаболизма углеводов, гены метаболизма пуринов и пиримидинов, гены синтеза метионина, гены синтеза пептидогликана и клеточной стенки.

По идентифицированным значимым генам были построены филогенетические деревья, с целью валидации и интерпретации результатов, полученных с помощью алгоритмов машинного обучения.

На верхнем левом рисунке на данном слайде показано филогенетическое дерево по гену *accC*, кодирующему ацетил-СоА-карбоксилазу, участвующую в первых реакциях биосинтеза жирных кислот. Состав жирных кислот играет важную роль в адаптации бактериальных клеток к внешним изменениям. Ген *accC* высококонсервативен, однако, ветви филогенетического дерева, преимущественно, ассоциируются с группами А, В1 и В2.

На верхнем правом рисунке показано филогенетическое дерево по гену *ciaH*, кодирующему сенсорную гистидиновую киназу двухкомпонентной регуляторной системы CiaRH. Ветви филогенетического дерева также, преимущественно, ассоциируются с группами А, В1 и В2. Двухкомпонентная регуляторная система CiaRH вовлечена в различные процессы пневмококка: регуляцию естественной компетентности, аутолиз, продукцию бактериоцинов, колонизацию тканей хозяина, вирулентность. В литературе есть данные о том, что двухкомпонентная регуляторная система CiaRH вовлечена, скорее, в поддержание высокого уровня экспрессии генов в различных условиях, чем в ответ на какой-то определенный сигнал, поскольку была показана конститутивная экспрессия регулона CiaR пневмококком, независимо от ростовой среды. Единственный вариант гена *ciaH* был уникален для весьма гетерогенной группы «сиквэнс-кластер SC5», наиболее распространенной в группе В2. Возможно, что представители SC5 могут отличаться уровнем постоянной экспрессии генов.

Однако при более детальном анализе представителей SC5 обнаружилось, что они очень гетерогенны по гену *rpsC*. Ген *rpsC* кодирует белок S3 малой субъединицы 30S рибосомы. Белок S3 является одним из универсальных рибосомных белков (которые сохранили свою структуру и выполняемые функции и присутствуют у всех микроорганизмов). Белок S3 вместе, с по крайней мере, шестью белками малой 30S-субъединицы, осуществляет контроль перемещения матричной РНК по рибосоме. Почти вся популяция пневмококка высоко консервативна по гену *rpsC*. Возможно, данный факт отражает распространение генетических линий группы В2 на фоне вакцинации ПКВ7.

Что касается дифференциации популяции пневмококков на серотипы, то в топ-списке генов-маркеров серотипов с высоким уровнем значимости, были гены *cps*-локуса. Однако в

данном списке также был ген *agaD*, кодирующий компонент IID-N-ацетилгалактозамин-специфичной фосфотрансферазной системы. Ген *agaD* был отобран алгоритмом XGBoost по уникальному варианту для представителей серотипа 3. Кластеризация популяции по гену *agaD* выявила интересную особенность, заключающуюся в том, что вариант 1 гена *agaD* (и близкие к нему варианты) присутствовал у значительной части анализируемой выборки пневмококков, представленной различными генетическими линиями и серотипами 6A, 9A, 11A, 15B/C, 19A, 19F, 23F, 35B. Однако N-ацетилгалактозамин присутствует в структуре капсулы только у одного из серотипов данного клада - 35B. Однако известно, что роль данного углевода не ограничивается структурой капсулы – он может метаболизироваться в качестве энергетического субстрата. Также известно, что углевод-специфичная фосфотрансферазная система может выполнять регуляторную функцию. Генетические линии, представленные дивергентными кладами, часто ассоциировались с инвазивными изолятами, выделенными из крови. Подобный распространенный монофилетический клад, ассоциирующийся с разными серотипами, был характерен для гена *atpG*, кодирующего гамма-субъединицу АТФ-синтазы. Возможно, АТФ-синтазный комплекс и компоненты фосфотрансферазной системы также детерминируют формирование типов капсулы и метболический тип *agaD-1 / atpG-1* является оптимальным для роста и адаптации пневмококков. Серотип-специфичная вакцинация, приводящая к исключению из циркуляции распространенных генетических линий пневмококка, обладающих к большей способности к адаптации за счет энергообеспечивающих систем, может приводить к распространению генетических линий, характеризующихся большей вирулентностью.

Положения, выносимые на защиту, заключающиеся в том, что общий генетический фон штаммов *Streptococcus pneumoniae* определяет устойчивость к антибиотикам и вирулентность:

Особенности метаболизма углеводов и ароматических аминокислот детерминируют регуляцию клеточных процессов пневмококка и фенотипические особенности, в том числе устойчивость к антибиотикам и вирулентность.

С целью выяснения взаимодействий метаболических путей, имеющих отношение к идентифицированным ранее генам, участвующим в диверсификации популяции, был проведен сравнительный анализ филогенетических деревьев, построенных по данным генам. Вывод о взаимодействии генов был сделан на основании схожести топологии и состава кластеров филогенетических деревьев. Данный анализ позволила сделать программа TreeCmp, которая вычисляет расстояния между филогенетическими деревьями по параметрам: соответствие дистанций расщепление, соответствие кластеров. На рисунке справа (на слайде) показана схема взаимодействия между ключевыми генами. Ген *aroE*, являющийся ключевым компонентом синтеза ароматических аминокислот, а также ген поверхностной 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы, взаимодействующей с глюкозами хозяина, и ген глюкозан-1,6-

альфа-глюкозидазы, гидролизующей 1,6-альфа-D-глюканы и изомальтосахариды, детерминируют регуляцию всех клеточных процессов пневмококка, в том числе синтез полисахаридной капсулы, поверхностные гликозидазы и устойчивость к бета-лактамам антибиотикам. Прямо или опосредованно, все гены, входящие в данную систему, взаимодействуют. Изменение одного компонента повлечет за собой изменение всей системы.

Положения, выносимые на защиту:

Белок StrH (экзо-β-D-N-ацетилглюкозаминидаза) оказывается на стыке метаболических путей и вариабельность гена *strH*, кодирующего экспрессируемую на поверхности клеточной стенки экзо-β-D-N-ацетилглюкозаминидазу, ассоциируется с инвазивностью и источником выделения (кровь, ликвор, жидкость среднего уха, носоглотка). С источником выделения «кровь» ассоциируется ограниченное число вариантов гена *strH* и генетических линий. Белок StrH может быть кандидатом в мишени для белковой антипневмококковой вакцины, позволяющей элиминировать из популяции пневмококка наиболее вирулентные генетические линии.

Ген *strH* был наилучшим маркером инвазивных штаммов и штаммов от носителей, согласно предсказанию с помощью алгоритма Random Forest. Помимо *strH*, в топ-список генов, кодирующих поверхностные и мембранные белки, входили гены, кодирующие: нейраминидазу А; белок Е пневмококковой гистидинозой триады; нейраминидазу В; пермеазу OprB - компонент ABC-транспортера олигопептидов; поверхностный холин-связывающий белок PcpA; олигосахарид-зависимую полимеразу.

Проанализированы детерминанты резистентности изолятов *Streptococcus pneumoniae* анализируемой выборки.

Наличие резистентности к антибиотикам различных классов ассоциируется с принадлежностью изолята к генетической линии и серотипу.

Резистентные к бета-лактамам антибиотикам изоляты ассоциируются с серотипами, отличающимися высокой эффективностью рекомбинаций. В нашем исследовании высокая частота рекомбинаций ассоциировалась с серотипами 6АЕ, 19F, 23F, 35В, 14, 19А.

Резистентность к макролидам и тетрациклинам обусловлена наличием конъюгативных транспозонов семейств Tn916 и Tn5253, варианты которых ассоциируются с генетическими линиями.

В пневмококковой популяции в России на протяжении длительного времени циркулируют мультирезистентные генетические линии CC236, CC271 и CC320 (и их однолокусные и двухлокусные варианты), представители которых несут Tn2010, распространенный преимущественно в России, странах Азии и в Канаде.

Первичные мишени антибиотиков (ПСБ-белки), функционируют на стыке регулируемых метаболических путей, поэтому развитие резистентности к антибиотикам часто связано со множеством механизмов адаптации. Помимо генов, кодирующих белки Pbp1A,

Pbp2B и Pbp2X, для развития резистентности критичны мутации в генах, отвечающих за синтез пептидогликана (*mraW* и *mraY*), клеточное деление (*ftsL*, *gpsB*), кодирующих шапероны (*clpL*, *clpX*), а также обеспечивающих процесс генетической рекомбинации (*recU*).

На слайде показаны ассоциации распространенных транспозонов семейства Tn916 с географическими регионами.

Проведен сравнительный анализ генов пенициллинсвязывающих белков у *S. pneumoniae*, относящихся к эпидемическим генетическим линиям.

Полученные результаты подтвердили данные предыдущих исследований о событиях рекомбинации между другими стрептококками (*S. mitis*) и *S. pneumoniae* в области транспептидазных доменов генов *pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x*.

Изоляты генетической линии CC236/CC271/CC320 имеют также следы независимых рекомбинаций в гене *pbp1a*.

Изоляты генетической линии CC90 имеют следы независимых рекомбинаций в гене *pbp2x*.

Далее Цветкова Ирина Анатольевна сообщила, что заключение о теоретической и практической значимости работы, а также выводы, представлены в автореферате и представила их на презентации:

Теоретическая и практическая значимость работы:

- полученные данные дополняют и уточняют существующие представления об эволюции *S. pneumoniae*, его метаболических особенностях и возможностях адаптации;
- получена так называемая «точка отсчета», отражающая состояние структуры популяции *S. pneumoniae* на момент начала антипневмококковой вакцинации в России. Полученные результаты позволят в дальнейшем получить информацию об изменениях, касающихся как эпидемиологической ситуации в России, так и генетических процессов, детерминирующих ответ популяции пневмококка на методы профилактики и лечения;
- используемые в исследовании биоинформатические методы филогенетического анализа клинических штаммов бактерий были внедрены в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России;
- результаты использования предложенной методики исследования используются при чтении лекций и проведении практических занятий в ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.
- последовательности секвенированных геномов *S. pneumoniae* депонированы в GenBank.

Выводы:

1. Мировая популяция *S. pneumoniae* представлена тремя глобальными группами А, В1 и В2. Группа В2 ассоциируется преимущественно с серотипами, не входящими в состав вакцины ПКВ7. Наибольший вклад в деление на глобальные группы вносят гены, кодирующие: сигнальную пептидазу I, глюкокиназу и глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназу.

Принадлежность к генетическим линиям определяется структурой базовых систем метаболизма: типа системы рестрикции-модификации ДНК; CiaH сенсорной гистидинкиназы; AccC - ацетил-СоА-карбоксилазы.

2. Происходившие в 2000 – 2010 гг. изменения в структуре популяции пневмококков, циркулировавших в Российской Федерации, были обусловлены изменениями в структуре глобальной популяции в ответ на массовую вакцинацию ПКВ7 в различных регионах мира (глобальное распространение серотипа 19А, не входящего в состав ПКВ7).
3. Возможно, АТФ-синтазный комплекс и компоненты фосфотрансферазной системы детерминируют формирование типов капсулы и метаболический тип *agaD-1* и *atpG-1* является оптимальным 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, фосфотрансферазные системы), может приводить к распространению генетических линий, характеризующихся большей вирулентностью.
4. Резистентные к бета-лактамам антибиотикам изоляты ассоциируются с серотипами, отличающимися высокой эффективностью рекомбинаций. Рекомбинации в генах, кодирующих первичные мишени бета-лактамов антибиотиков, *Pbp1A*, *Pbp2B* и *Pbp2X*, ассоциируются с множеством адаптивных рекомбинаций ядерного генома, в частности, в генах, кодирующих белки клеточного деления. Мультирезистентные изоляты (к пенициллину и эритромицину) составляют 75,45% резистентных к пенициллину изолятов. Возможно, интеграция транспозонов Tn916 и Tn5253, обуславливающих резистентность к макролидам, так же как и рекомбинации, была более эффективной на этапе стабилизации генетических линий, у пневмококков, ассоциирующихся с серотипами 6А, 6Е, 23F, 19F, 14, 19А. Донорами для рекомбинаций в генах *pbp1a* и *pbp2x* являлись представители других стрептококков (*S. mitis* и *S. oralis*). Изоляты, принадлежащие к клонам CC236/CC271/CC320, в гене *pbp1a* имеют также следы независимых рекомбинаций. Изоляты CC90 в гене *pbp2x* имеют также следы независимых рекомбинаций. Для гена *pbp2b* сложно сделать предположение о том, кто выступал возможным донором.
5. Особенности метаболизма углеводов и ароматических аминокислот детерминируют регуляцию клеточных процессов пневмококка и фенотипические особенности, в том числе устойчивость к антибиотикам и вирулентность. Расщепление популяции по вариантам гена *strH* коррелирует с кластеризацией по компонентам углеводного метаболизма (*gnd*, *dexB*), путям синтеза ароматических аминокислот (*aroE*), регуляторному гену *relA* (ГТФ-пирофосфокиназа), генам синтеза пептидогликана и клеточного деления (*murD*, *pbp1A*), регуляторным генам экспрессии полисахаридной капсулы (*wzg-wzh-wze*). Белок StrH, кодирующий экспрессируемую на поверхности клеточной стенки экзо-β-D-N-

ацетилглюкозаминидазу, оказывается на стыке метаболических путей и может быть использован как мишень для белковой вакцины. Возможно, это позволит модулировать вирулентный потенциал пневмококка.

Спасибо за внимание!

Председатель: Спасибо, Ирина Анатольевна! Уважаемые коллеги, кто хотел бы задать вопросы соискателю?

Соискателю заданы следующие **вопросы в устной форме:**

Вопрос 1. Шепелин Анатолий Прокопьевич, д.б.н., зам. директора по научной и производственной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Уважаемая Ирина Анатольевна, правильно ли я понял, что в работе изучены 530 изолятов, которые были выделены за 20 лет в России и около 530 изолятов, описанных в мире, т.е. суммарно, проведена генетическая характеристика около 1000 изолятов, и в России есть какие-то различия по отношению к мировым тенденциям? А внутри России есть какие-то отличия в региональных популяциях - Москва, Санкт-Петербург, Сибирь?

Ответ: Уважаемый Анатолий Прокопьевич, спасибо за вопрос. Что касается географического распределения изолятов по городам России, оно было достаточно переменчивым - были регионы, из которых было доступно совсем немного изолятов, но, тем не менее, число изолятов из европейской и азиатской частей России было сопоставимым. Анализируемая выборка была также разделена на четыре временные периода - для российских изолятов не было замечено региональных изменений для соответствующего временного периода. Анализируемая выборка была также разделена на периоды: период до введения массовой антипневмококковой вакцинации в мире (до 2001 г.), период повсеместного введения антипневмококковой вакцинации в мире (период с 2001 до 2010 гг. – введение семивалентной вакцины ПКВ7), период с 2011 до 2014 гг. – был выделен небольшой период, он отличался от всех других временной протяженностью и был выделен для анализа изменений в России на фоне внедрения антипневмококковой вакцинации в России. Действительно, мы наблюдали суммарные (по регионам) изменения в России, в зависимости от временного периода. Изоляты из европейской части России были получены, в основном, из Москвы и Санкт-Петербурга (достаточное число изолятов). Для азиатской части России была примерно сопоставимая выборка, но распределение изолятов по городам отличалось. По городам было сложно строить какие-то выводы.

Вопрос 2. Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Ирина, Анатольевна, Вы говорите про вакцины (в автореферате есть информация о перекрывании штаммов 23-валентной полисахаридной и 13-валентной конъюгированной вакциной) – Вы подразумеваете вакцины производства Пфайзер? Насколько структура вакцин соответствует циркулирующим у нас клональным комплексам? Использованы ли Ваши данные для разработки региональных вакцин? Например, компания

«Гритвак» сделала 23-валентную полисахаридную вакцину полностью на основе наших штаммов, Сергей Владимирович предоставлял им свою коллекцию штаммов. Сейчас эта компания пытается сделать конъюгированную вакцину. Насколько Вы с ними взаимодействуете по данной разработке? Например, вакцина компании Пфайзер содержит четыре или пять карибских штаммов - но они в России совершенно не нужны. Какое Ваше отношение к формированию иммунитета к собственным клональным линиям? Какая тактика? Ваши данные участвуют в этих разработках?

Ответ: Уважаемый Иван Алексеевич, спасибо за вопрос. Правильно ли я понимаю, что вопрос касается пневмококковых полисахаридных конъюгированных вакцин, не белковых? Мы проводили скрининг пневмококковой популяции у детей младшего возраста (до 5 лет) после внедрения 13-валентной полисахаридной конъюгированной антипневмококковой вакцины в России. На тот момент прошло очень мало времени после внедрения вакцины и были замечены некоторые тенденции в распространении в России невакцинных серотипов пневмококка, в частности, серотипов 11А и 15В/С. Но такого резкого снижения циркуляции вакцинных серотипов, как, например, наблюдалось в Европе или в Соединенных Штатах Америки (на фоне повсеместного использования антипневмококковых полисахаридных вакцин) – такого резкого снижения вакцинных серотипов пневмококка не произошло.

Вопрос 3. Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Вы же знаете штаммы и серотипы, которые используются для зарубежных вакцин? И какие циркулируют у нас – они совпадают?

Ответ: Все-таки, циркуляция серотипов отличается в регионах России.

Вопрос 4. Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Тогда нам нужна своя вакцина?

Ответ: Самый лучший вариант – это, конечно же, своя вакцина из своих штаммов.

Вопрос 5. Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Зачем нужны тогда все эти генетические данные? Они уточняют существующие представления об эволюции – хорошо, это теоретические, фундаментальные вещи.

Ответ: Мы отвечаем на вопрос – как популяция пневмококка реагирует на давление вакцинами. Сколько бы серотипов мы ни добавляли в наши поливалентные полисахаридные вакцины, конъюгированные или нет - популяция всегда будет отвечать изменениями. Весьма вероятно, что новые штаммы займут место прежних распространенных адаптированных клонов, новые клоны будут отличаться большей вирулентностью. Мы получили картину – срез на текущий момент, момент раннего периода после внедрения антипневмококковой вакцинации. Эти данные важны, чтобы потом – после внедрения нашей вакцины, или разработки других стратегий профилактики – оценивать и прогнозировать эффекты. И, все-таки, разработка универсальной белковой вакцины, которая, возможно, будет более

эффективна, имеет большое значение.

Вопрос 6 Шемякин Игорь Георгиевич, д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Ирина Анатольевна, скажите, пожалуйста, Вы кластеризовали свои линии на основе какого-то количества точечных или других мутаций на достаточно большом объеме генов, кодирующих факторы вирулентности? Как меняется активность ферментов при возникновении новых мутаций? Меняется ли вообще его активность? А если меняется – то что значит одна нуклеотидная замена, по которой Вы кластеризуете? Если меняется – то как? Надо выделять белок и измерять *in vitro* его активность. Для чего тогда эта кластеризация? Это был первый вопрос. Второй вопрос – Вы связываете наличие того или другого изменения с каким-то продвижением генетических линий. На основании чего?

Ответ: Уважаемый Игорь Георгиевич, спасибо за вопрос. Конечно, это предварительный скрининг. Конечно, мы не отвечаем сейчас на вопрос о функциональных изменениях ферментов. Все это невозможно сделать в рамках одной работы. Конечно, прежде, чем кем-либо будут разработаны белковые антипневмококковые вакцины - для лучшего выбора мишеней необходимо тщательно изучить изменения свойств белков. Но чтобы изучить изменение свойств – нужно выбрать эти белки. Эти белки были выбраны – наилучшие, на которые можно воздействовать. В любом случае, информация об идентифицированных белках расширяет представление о механизмах вирулентности пневмококка.

Вопрос 7 Шемякин Игорь Георгиевич, д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Для каких из данных белков есть данные рентгеноструктурного анализа? Для каких белков доступна третичная структура и где находятся мутации, о которых Вы рассказываете?

Ответ: Это пока еще не было сделано, но это будет следующим этапом нашей работы.

Вопрос 8 Шемякин Игорь Георгиевич, д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: А Вы знаете, какие реальные структуры уже есть?

Ответ: Для большинства белков реальные структуры уже есть.

Вопрос 9 Шемякин Игорь Георгиевич, д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск): Вы говорите, что анализируемая выборка представлена штаммами, выделенными с 1980 г. Но это очень выборочно. Обычно считается, что из одного Центра необходимо, хотя бы за один год, выбрать все штаммы, вызвавшие заболевание. Тогда эти результаты можно переносить на молекулярную эпидемиологию. Вопрос следующий - после 1980 г. и до самых современных штаммов - Вы на основании своих данных можете показать какую-то эволюцию? Вы можете сказать, что был предшественник и существует потомок, и так далее, исходя из 500 штаммов из Российской Федерации, с 1980 г.?

Ответ: Что касается формирования выборки – конечно, российских изолятов было немного, и охватываемый период – с 1980 года. Период с 1980 по 2000 гг. (за 20 лет) включал

очень мало изолятов из России. Полногеномных данных секвенирования таких изолятов немного, и все доступные данные были использованы, все доступные данные участвовали в анализе. Для изолятов из России в период 1980-2000 гг. были, тем не менее, отмечены закономерности – данные генетические линии были распространены и в мире в тот период, не сейчас. Что касается вопроса относительно предшественника и происходящих изменений - пневмококковая популяция имеет панмиктичную структуру, и выделить предшественника в ней практически невозможно. В нашем исследовании мы использовали группу *Streptococcus mitis* (несколько штаммов) - для того, чтобы попытаться лучше установить филогенетическую картину. Можно сказать, что успешный клон сиквенс-типа ST81, который появился на этапе массового использования пенициллинов, распространился из Испании по всему миру, захватил весь мир и пришел, все-таки к нам (с 2001 г., возможно, когда уже были открыты границы). Данный клон циркулировал в России в то время, когда он был распространен в мире, до внедрения семивалентной вакцины ПКВ7. До этого в России не циркулировал данный клон.

Вопрос 10 Шемякин Игорь Георгиевич, д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Какие изменения при этом происходят в пневмококковой популяции?

Ответ: Изменения в пневмококковой популяции происходят значительные, обусловленные таким процессом как гомологичная рекомбинация и естественная трансформация. Пневмококки обмениваются между собой генетическим материалом с помощью этого механизма. Большинство адаптивных изменений связаны с рекомбинациями, в частности, приобретение детерминант резистентности к антибиотикам. Что касается установления предшественника. Мы не можем утверждать, что какая-то генетическая линия пневмококка является предшественником той генетической линии, которая циркулирует сейчас. Как может происходить замещение генетических линий в популяции пневмококка - та, генетическая линия, которая распространяется в популяции после какого-то воздействия, например, внедрения вакцины - она могла существовать и раньше, но быть минорной частью популяции. И, скорее всего, это так, потому что никаких доказательств на сегодняшний день, кроме каких-то предположений, относительно предшественников штаммов, нет.

Вопрос 11. Светоч Эдуард Арсеньевич, д.в.н., профессор, главный науч. сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Ирина Анатольевна, пожалуйста, назовите самые успешные генетические линии (или клональные комплексы) пневмококка, которые циркулируют сейчас в России? Особенно хотелось бы услышать про связь их с патологиями, вызываемыми пневмококками. Чем отличаются генетические линии, вызывающие разные нозологические группы заболеваний?

Ответ: Уважаемый Эдуард Арсеньевич, спасибо за вопрос. Циркулирующие в настоящее время в России генетические линии представлены на данном слайде. В частности, это близкие друг другу клональные комплексы CC236, CC271, CC320 (показывает на слайде).

Они имеют азиатское происхождение, но у нас они циркулировали давно и продолжают циркулировать по всей территории России. Зеленым цветом (на слайде) показаны генетические линии, которые распространены также в Европе. Среди наиболее распространенных у нас европейских генетических линий – распространенные в Чехословакии (CC505). Также у нас циркулируют повсеместно распространенные генетические линии, но таких у нас сейчас стало немного. Что касается связи с заболеваниями - мы наблюдали тенденцию распределения инвазивных изолятов по данной группе В2, по сиквенс-кластеру SC5 (показывает на слайде). Здесь наибольшее число инвазивных изолятов, выделенных из крови.

Вопрос 12. Светоч Эдуард Арсеньевич, д.в.н., профессор, главный науч. сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: По набору факторов вирулентности и генов вирулентности данные клональные комплексы отличаются?

Ответ: Любой изолят пневмококка несет в себе большое число факторов вирулентности. Весь геном пневмококка устроен так, что практически все пневмококки несут около 300 факторов вирулентности, которые относятся либо к ферментам метаболизма, либо к поверхностным белкам. В принципе, пневмококк - это патоген, который, априори, является вирулентным. Конечно, есть отличия, и, скорее всего, эти отличия касаются метаболических особенностей, потому что почти все пневмококки имеют поверхностные гликозидазы (десятки), которые могут отличаться уровнем экспрессии, в зависимости от метаболизма. Это сложный вопрос. Что касается поверхностных белков, то все пневмококки несут на своей поверхности гликозидазы, холин-связывающие белки, белки гистидиновой триады, адгезины.

Председатель: Ирина Анатольевна, отвечайте, пожалуйста, конкретнее на вопрос, если есть ли данные о связи клональной линии с уровнем вирулентности или вызываемыми заболеваниями. Еще есть вопросы?

Вопрос 13. Журина Марина Владимировна, к.б.н., старший научной сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии», Москва): Ирина Анатольевна, Вы смотрели детерминанты резистентности у большого количества штаммов, были ли штаммы пневмококка, которые несут детерминанты устойчивости ко всем антибиотикам, которые Вы посмотрели? И, если были, то какие?

Ответ: Уважаемая Марина Владимировна, спасибо за вопрос. В популяции пневмококка есть генетические линии, ассоциирующиеся с мультирезистентностью, представители которых устойчивы к бета-лактамам, макролидам, фторхинолонам, тетрациклинам. Если рассматривать популяцию устойчивых к бета-лактамам пневмококков, то 80 % из них устойчивы также к макролидам. Мультирезистентная генетическая линия, которая распространена в России, включает три клональных комплекса: CC236, CC271 и CC320. Причем клональные комплексы CC271 и CC320 стали

распространяться позднее, и среди них уже практически не встречается чувствительных изолятов к бета-лактамам и макролидам, в отличие от изолятов CC236. Наличие детерминант резистентности к бета-лактамам и макролидам валидировали вручную. Наличие детерминант резистентности к тетрациклинам и фторхинолонам было установлено с помощью автоматической аннотации RAST-сервером. Многие изоляты генетической линии C271/CC320 – также устойчивы к фторхинолонам и, практически все – к тетрациклину. Ранее повсеместно распространенная генетическая линия CC81 была устойчива к пяти классам антибиотиков. Сейчас, на фоне повсеместного внедрения вакцинации в мире, генетическая линия CC81 (показывает на слайде) ушла из популяции отовсюду в мире и даже у нас, а C271/CC320 (показывает на слайде) распространилась теперь везде. Она изначально была азиатская (исначально, наверное, и наша), но сейчас она распространяется по всему миру.

Председатель: Пожалуйста, коллеги, у кого-нибудь есть ещё вопросы? Нет? Спасибо, Ирина Анатольевна, присаживайтесь.

Слово предоставляется **научному руководителю соискателя д.м.н. профессору Сидоренко Сергею Владимировичу**, руководителю научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», для характеристики личности соискателя:

Глубокоуважаемые Иван Алексеевич, глубокоуважаемые члены диссертационного совета! Ирина Анатольевна пришла в наш отдел через несколько лет после его образования, в 2009 г. Одним из наших направлений всегда были пневмококковые инфекции, Ирина Анатольевна заинтересовалась этой группой микроорганизмов, достаточно быстро наладила «мокрую работу» (экспериментальную). Судя по докладу, создается впечатление, что она чистый биоинформатик. Но ее начало было связано с «мокрой работой». Более того, с ее приходом я немного успокоился за качество работ – степень педантизма Ирины Анатольевны при выполнении экспериментальных и лабораторных работ мало кому достижима. Когда у нас появилась возможность делать полногеномный сиквенс (Ирина Анатольевна этим и занималась) – у нее резко проснулся интерес к биоинформатике. Мы знаем биоинформатиков, которые не представляют себе, что такое лабораторный стол и что такое экспериментальная работа. Ирина Анатольевна – интересный гибрид перехода лабораторного человека в биоинформатического. Здесь Ирина Анатольевна проявила изрядную настойчивость и упорство. Изначально я думал, что все биоинформатические работы уйдут у нас на аутсорсинг, но на сегодняшний день она выполняет не только простые вещи, например, сборку генома, но и занимается биоинформатической поддержкой многих других проектов, связанных с микробиотой. Здесь конкретный интерес – клональная структура. Характеризуя другие личные свойства, прежде всего, хотелось бы отметить настойчивость и убежденность.

Переубедить Ирину Анатольевну бывает сложно, надо найти серьезные аргументы. Еще одно ее важное свойство – Ирина Анатольевна полностью привержена здоровому образу жизни и зеленым технологиям, занимается выхаживанием больных животных. Отношение к братьям меньшим и к окружающей среде хорошо характеризует человека.

Слово для оглашения **Заключения организации, где выполнялась диссертационная работа, Отзыва ведущей (оппонирующей) организации и Отзывов на автореферат** предоставляется ученому секретарю диссертационного совета Хохловой Ольге Евгеньевне:

Заключение организации, в которой была выполнена диссертационная работа (полный текст прилагается), Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» утверждено 30 августа 2021 года, подписано директором д.м.н., доцентом Александром Николаевичем Усковым. Заключение подробно рассматривает работу, соискателя и его соответствие на получение ученой степени кандидата биологических наук, подтверждает, что выполненная работа имеет достаточно высокую оценку, автор внес значительный личный вклад в проведенные исследования, включенные в эту работу результаты имеют высокую степень достоверности, не вызывает сомнения научная новизна исследования, практическая значимость, данная работа соответствует специальности 1.5.11 (Микробиология). Работа изложена достаточно полно, имеется список работ, опубликованных по теме в должном количестве. В данном Заключении есть вывод о том, что диссертация Цветковой Ирины Анатольевны «Генотипическая характеристика *Streptococcus pneumoniae*, принадлежащих к эпидемическим генетическим линиям» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология и может быть рекомендована к защите в диссертационный совет. Заключение подписано старшим научным сотрудником данной организации Железовой Л.И. и ученым секретарем Волжаниным В.М. Имеется выписка с протоколом о заседании Ученого совета данной организации, на этом заседании присутствовало 17 человек, все единогласно проголосовали «за» данную работу, «против» – нет, «воздержалось» – нет. Печати имеются, подписи имеются.

Отзыв ведущей (оппонирующей) организации (полный текст прилагается) – Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации – утверждено 11 ноября 2021 г. доктором технических наук, профессором, проректором по научной работе Владимиром Олеговичем Никифоровым. В данном отзыве подробно описана актуальность темы выполненной работы, научная новизна полученных результатов, сформулированных в диссертации, значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации, обоснованность и

достоверность научных выводов и заключений, присутствуют рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы, общая характеристика диссертационной работы описана подробно. В заключении сказано, что диссертационная работа Цветковой Ирины Анатольевны на тему «Генотипическая характеристика *Streptococcus pneumoniae*, принадлежащих к эпидемическим генетическим линиям», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решения актуальной научно-практической задачи, связанной с генотипической характеристикой штаммов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в Российской Федерации и ассоциированных с эпидемическими генетическими линиями в глобальной популяции пневмококка. Представленные на защиту положения диссертации можно квалифицировать как научные достижения в современной микробиологии. По актуальности, научной новизне, методическому уровню, практической значимости диссертация соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями и дополнениями), предъявляемым 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. Отзыв ведущей организации составлен и подписан Кошель Еленой Ивановной, доцентом химико-биологического кластера. Подпись имеется, печати в наличии.

Также поступило **6 положительных отзывов на автореферат диссертации**. Первый отзыв представлен д-ром мед. наук **Мироновым Константином Олеговичем**, руководителем научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва, без замечаний. Второй отзыв на автореферат - д-ра биол. наук **Каюмова Айрата Рашитовича**, доцента кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Высшей школы биологии Центра биологии и педагогического образования Казанского федерального университета, г. Казань, содержит в себе 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?» Третий отзыв на автореферат - 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. Четвертый отзыв на автореферат - 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, содержит в себе вопрос: «Какие могут быть дальнейшие рекомендации по антипневмококковой вакцинации с учетом представленных данных?». Пятый отзыв - 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. Шестой отзыв на автореферат - д-ра мед. наук профессора **Гриценко Виктора Александровича**, главного научного сотрудника лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, без замечаний. Все отзывы подписаны, положительные, печати имеются.

Председатель: Спасибо, Ольга Евгеньевна. Ирина Анатольевна, Вам предоставляется слово для ответа на замечания, содержащиеся в отзывах.

Ответ: Спасибо за вопросы. По вопросу о повышении резистентности к антибиотикам среди распространяющихся невакцинных серотипов пневмококка могу ответить, что это действительно происходит. Среди инвазивных изолятов, обычно ассоциирующихся с чувствительностью к антибиотикам, это также происходит. Примером могут служить генетические линии CC180 и CC505, которые значительно ассоциируются с инвазивными штаммами, и они приобретают детерминанты резистентности к бета-лактамам антибиотикам. Это действительно происходит, и может быть получена опасная комбинация резистентных к антибиотикам и инвазивных штаммов. Что касается второго вопроса относительно дальнейших рекомендаций антипневмококковой профилактики, то, с нашей точки зрения, наилучшим следующим шагом будет создание химерной мультивалентной белковой вакцины. Мы также собираемся работать в этом направлении, будем использовать метод обратной вакцинологии, проводить скрининг белков пневмококка – поверхностных и мембранных, оценивать их антигенный потенциал и подбирать их наиболее оптимальные эпитопы, взаимодействующие с Т- и В-лимфоцитами, и также использовать методы молекулярной динамики для того, чтобы описать, как отличаются ферменты у инвазивных штаммов и у штаммов, выделенных от носителей.

Председатель: Спасибо. Слово предоставляется **официальному оппоненту доктору медицинских наук Гончарову Артемию Евгеньевичу** (полный текст отзыва прилагается):

Глубокоуважаемый Иван Алексеевич, глубокоуважаемые члены диссертационного совета, прежде всего позвольте выразить слова благодарности за удовольствие находиться в этом прославленном Научном центре. Переходя, непосредственно, к диссертации, которую мне посчастливилось оппонировать, мне хотелось бы сказать такую вещь: сейчас мы с вами живем в эпоху тяжелой пандемии COVID19, каждый из нас понимает, насколько важны

геномные данные, насколько важны данные об изменчивости генетической структуры возбудителя - это касается и вопроса принятия управленческих решений, и вопроса состава вакцин, которые применяются. В этой связи, работа Ирины Анатольевны Цветковой, которая сфокусирована на актуальнейшем респираторном патогене (надо сказать, что по мировым данным, по данным ВОЗ – это бактериальный патоген, который является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности детей младшего возраста), содержит данные о том, как глобальная структура пневмококковой популяции реагирует на повсеместное применение пневмококковых вакцин. Мне кажется очень знаменательным, важным, что красной нитью в этой работе проходит мысль о том, что массовая вакцинация, массовая иммунопрофилактика является, своего рода, эволюционным фактором - это не просто изменение клональной структуры, но и геномные преобразования, которые выливаются в изменения метаболизма, изменения инвазивных свойств и так далее. Теперь, позвольте, я перейду к формальным разделам отзыва.

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы нет. Однако возникло некоторое замечание, которое связано с методологией выполнения филогенетического анализа, в частности, выполнение 100 бутстреп-реплик представляется недостаточно надежным для анализа топологии дендрограммы. В порядке дискуссии хотелось бы узнать, как автор представляет дальнейшую стратегию выбора мишеней для создания антипневмококковых вакцин? Сделанные замечания не меняют мнения о принципиально положительной оценке выполненной диссертационной работы Ирины Анатольевны Цветковой. Таким образом, 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. Работа вносит вклад в углубленное изучение закономерностей эпидемического процесса пневмококковых инфекций и пневмококкового носительства. 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 дальнейшими изменениями, 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». Спасибо.

Председатель: Спасибо, Артемий Евгеньевич. Слово предоставляется Ирине Анатольевне для ответа на замечания официального оппонента:

Ответ Цветковой И.А. официальному оппоненту Гончарову Артемию

Евгеньевичу:

Глубокоуважаемый Артемий Евгеньевич, спасибо за вопросы. Что касается вопроса о количестве бутстреп-реплик для филогенетического анализа - оно было менее рекомендуемого обычно числа бутстреп-реплик для анализа полногеномных данных. Мы использовали для филогенетического анализа достаточно небольшие последовательности, представленные шестью генами схемы MLST, и также использовали несколько филогенетических методов и при их использовании результаты топологии и кластеризации совпали. Поэтому данные результаты, по нашему мнению, являются достаточно надежными. Что касается вопроса по поводу дальнейших рекомендаций относительно создания антипневмококковых вакцин, перспективным является метод обратной вакцинологии (похожий вопрос уже звучал). Удачным примером использования данного метода является антименингококковая вакцина, которая содержит четыре мишени (детерминанты четырех белков и охватывает приблизительно 90 % популяции менингококков). Применяя такие же принципы, анализируя изменение функций белков, мы планируем внести вклад в эти разработки.

Председатель: Спасибо. Так как **официальный оппонент Айрат Радикович Мавзютов** отсутствует по уважительной причине, попросим Ольгу Евгеньевну Хохлову зачитать основные положения его отзыва:

Секретарь диссертационного совета: Официальный оппонент заслуженный деятель науки РБ, д.м.н., профессор Мавзютов Айрат Радикович, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, подробно описывает актуальность диссертационной работы, теоретическую и практическую значимость исследования, краткую характеристику основного содержания диссертации, краткую характеристику соответствия специальности работы Цветковой Ирины Анатольевны (полный текст прилагается). Замечаний по данной диссертационной работе нет. В отзыве имеются вопросы, первый вопрос: какой вклад интегративных конъюгативных элементов в патогенность изучаемых генетических линий пневмококка в России? Второй вопрос: насколько отличаются анализируемые генетические линии пневмококка в России по содержанию профагов в геномах? Есть ли вклад профагов в патогенность изучаемых российских штаммов пневмококка? В заключении данного отзыва показано, что 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 законченной научно-квалификационной работой, по актуальности, объёму, новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке

присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., с изменениями, 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. Подпись, печать – имеются. Благодарю за внимание.

Председатель: Спасибо, Ольга Евгеньевна. Ирина Анатольевна, Вам слово для ответа на замечания официального оппонента:

Ответ Цветковой И.А. официальному оппоненту Мавзютову Айрату Радиковичу:

Уважаемые коллеги, по первому вопросу относительно вклада интегративных конъюгативных элементов в популяцию пневмококков, циркулирующих в России, могу пояснить, что интегративные конъюгативные элементы, ассоциированные с генетическими линиями CC236, CC271, CC320, несут детерминанты резистентности к макролидам и тетрациклинам. Что касается ответа на вопрос по поводу вклада профагов в инвазивность пневмококка, то нами был выполнен анализ наличия профагов в геномах анализируемых изолятов. Геномы всех анализируемых изолятов нашей выборки содержали интактные или дефективные профаги (которые можно идентифицировать), либо остатки профагов, локусы которых несут гены факторов вирулентности либо системы рестрикции. Число профагов в геномах варьирует от 1 до 7 и коррелирует с сиквенс-типом, вне зависимости от года получения изолята и региона распространения штамма. Основные идентифицированные профаги относились к стрептококковым умеренным фагам. Все анализируемые изоляты содержали гены вирулентности, привнесенные фагами – гены, кодирующие белки PblA и PblB, которые являются адгезинами и участвуют в адгезии пневмококков к тромбоцитам.

Председатель: Спасибо. Уважаемые коллеги, мы можем открыть дискуссию по этой работе. Кто хотел бы выступить в качестве неофициального оппонента?

Объявлена дискуссия, в которой приняли участие присутствующие на защите.

Доктор ветеринарных наук, профессор Светоч Эдуард Арсеньевич (главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск): Уважаемые коллеги! Меня очень впечатлила диссертация Ирины Анатольевны. Я внимательно прочитал автореферат. Такой объем работы, конечно, соответствует не одной диссертации, а видимо, двум-трем диссертациям. Два тома, которые представлены на наш совет – тоже впечатляют. Тут много говорилось о работе. Я хотел бы только два вопроса поднять. Первый - мне показалось, что Ирина Анатольевна несколько скромничает, когда отвечает на вопрос Ивана Алексеевича о том, какая вакцина нужна для России). Вы пишете в своем автореферате, что большинство генетических линий, клональных комплексов отличаются от тех, которые циркулируют в западной Европе, в Азии, и так далее. Ясно, что нужна своя отечественная вакцина, если верить Вашим работам. Второе – все понимают, что опыт применения вакцин против *Streptococcus pneumoniae* (7-ми, 13-ти и более валентные),

говорит о том, что нужна своя региональная вакцина. Конечно, сейчас нужно думать о создании вакцины на основе белков, с применением метода обратной вакцинологии, о котором Вы говорили. Потому что такое обилие циркулирующих в мире серотипов, а также влияние глобальной пневмококковой популяции на структуру российской популяции – тоже говорят о том, что нужна другая вакцина. Работа заслуживает внимательного прочтения, особенно молодыми сотрудниками, поскольку используются современные методы биоинформатического анализа. Я буду голосовать «за», спасибо.

Председатель: Спасибо. Слово Анатолию Прокопьевичу Шепелину, доктору биологических наук:

Доктор биологических наук Шепелин Анатолий Прокопьевич (зам. директора по научной и производственной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск): Уважаемые коллеги, поскольку эта часть выступлений называется «дискуссия», то в качестве дискуссии я позволю себе не согласиться с некоторыми положениями, которые высказал Эдуард Арсеньевич, высказываясь о работе в сторону вакцины. Я с этим не соглашусь, поскольку работа носит другой фундаментальный характер, и связан он с медицинской микробиологией. Более того, работа выполнена. Это уникальная на сегодняшний день работа, с точки зрения развития медицинской микробиологии в России. Я думаю, вы знаете, что недавно Министерством Здравоохранения принята новая специальность, которая называется «медицинский микробиолог». Есть Профессиональный стандарт в этой области, назначен Главный внештатный специалист по медицинской микробиологии. Есть примерно 3-4 тысячи медицинских микробиологов, которые ждут таких исследований. Я думаю, что те исследования на молекулярно-генетическом уровне, которые мы сегодня заслушали, действительно, носят яркий фундаментальный характер, и которые сегодня практические работники ждут. Игорь Георгиевич задавал вопросы практической направленности. Я думаю, что сегодня мы увидели базу того, что можно прийти в практическую лабораторию медицинской микробиологии и на основании того, что мы выделили возбудителя пневмококковой инфекции, на молекулярно-генетическом уровне смотреть детерминанты резистентности, устойчивости, отслеживать эпидемиологию. Работа уникальная, только ей бы, на каком-то уровне, придать практический результат. Я думаю, данная работа получит достойнейшее развитие и будет базой развития медицинской микробиологии в нашей стране. Спасибо.

Доктор мед. наук, профессор Анисимов Андрей Павлович (зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск): Предыдущие выступающие пели дифирамбы, я добавлю ложку дегтя. Что мне не понравилось - и в положениях, выносимых на защиту, и в выводах многие предложения начинаются со слов «Возможно...», «может приводить...». Я привык, что, если уж выводы – что-то доказала, написала. А здесь предположения. Чтобы такого не случалось, на примере возможного предложения факторов вирулентности – прежде

чем их предлагать, надо провести достаточно простую работу. Получить нокаут по тому гену, который, как Вы подразумеваете, влияет на вирулентность, комплементировать эту мутацию, и потом проверить три штамма – исходный, мутантный, комплементарный. И тогда Вы будете точно знать – надо Вам с этим возиться, или нет. И даже, если окажется, что этот ген действительно влияет на вирулентность, никто не гарантирует, что белок будет вызывать протективный иммунный ответ. Потому что, на самом деле, получение вакцин до сих пор - это искусство, а не наука. И здесь нужна большая доля везения. Но голосовать я буду «за», потому что работа хорошая.

Председатель: Спасибо. Есть еще противоположные мнения? Слово профессору Шемякину Игорю Георгиевичу.

Доктор биологических наук, профессор Шемякин Игорь Георгиевич (заместитель директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск): Коллеги! Большинство не заметило главного, чтобы мне здесь понравилось. На руках есть 45 сиквенсов, начиная с 1980 г. Это о чем говорит: если человек умеет работать в базах данных, то он может выбрать все поверхностные белки и посмотреть степень их консервативности. Это к вопросу о том, как выбирать белковую вакцину. Очень просто. Я же не зря спрашивал все время про эволюцию. Эволюция смотрится вот так: если консерватизм доходит до 96 % и это поверхностный белок – он анализируется в базе данных, и вот вам большинство ответов. Берите 50 белков, выберите самые консервативные, самые часто встречающиеся на поверхности мембраны. Сделайте коктейль, посадите на гидроокись. С точки зрения подходов, основной недостаток этой работы – это малый охват штаммами. С другой стороны, может быть, она и не могла больше проанализировать. Но говорить о современном положении в Российской Федерации, имея 500 штаммов за 40 лет – как-то это преждевременно. Помимо динамики самих популяций тех или других серотипов – понятно, что массовая вакцинация приводит к превалярованию другого серотипа. Еще один вопрос: отнести данный штамм к тому или другому серотипу. Это было бы интересно, не надо ничего строить. Сиквенс делается в течение одного дня. Анализируется еще пару дней. Поэтому, в принципе, работа носит неплохой, но какой-то половинчатый характер. Мне было интересно совсем другое, потому что эти дендрограммы, которые не связаны ни с чем - что это дает, это не дает ни эволюции, ни чего-либо еще. Так вот они сегодня различаются, почему так – никто не знает. Я уверен, что когда-то был один древний штамм, от которого пошла эволюция. Понятно, что он по-разному будет эволюционировать. Каким образом - ответа на вопрос нет. Кто за кем появился. Понятно, что они появляются в ответ на вакцинацию случайным образом или на иммунную прослойку. Я думаю, что для кандидатской диссертации такие вопросы, наверное, преждевременны. Но, в принципе, направление движения правильное, методология современная, на кандидатскую диссертацию набирается.

Председатель: Спасибо. Если нет других мнений, я также скажу несколько слов, с точки зрения медицинской, как врача. Все работы, которые мы в нашем совете оцениваем, все-

таки, основаны на трех китах – что это дает диагностике, профилактике и лечению. Что касается диагностики - продемонстрирована молекулярная диагностика, высокого уровня идентификация. И в наш национальный интерактивный каталог, который мы создаем, наверняка такие данные должны войти. Сиквенсы основных типовых штаммов, с которыми можно потом оперировать для разных целей. Собранные *de novo* геномы основных циркулирующих штаммов именно этого микроба. Что касается профилактики – все говорят сейчас, что надо уходить от полисахаридных вакцин на белковые. Могу вам сказать, что это дело не одной лаборатории, это целый комплекс работ, которые должны очень хорошо финансироваться. Мы сейчас в рамках Геномного центра, который хорошо финансируется, делаем пять вакцин, четыре из них – белковые. Очень сложное дело, для опасных инфекций – особенно, потому что очень много надо перебирать вариантов, создавать новые адъюванты. Конечно, хотелось бы создать универсальную вакцину, но не будут ли белки так же переменчивы, как полисахарид - тоже непонятно. Что касается лечения – у пневмококка нет таких проблем с лечением, как у ESKAPE-патогенов - резистентных клинических штаммов – у которых возникает уже пан-резистентность, в клиниках лечить нечем. Все-таки, пневмококк лечится достаточно неплохо, и пока есть препараты, к которым пневмококк достаточно чувствителен. Поэтому, представленная работа - огромная работа, даже если посмотреть Приложения – проделан колоссальный труд, чтобы составить такие таблицы. Тем более, если вручную делались тесты на резистентность (не на приборах, а на дисках, как я понимаю). Колоссальная экспериментальная работа по резистентности, хотя эти данные не звучат в выводах. Но такие работы должны быть, они показывают высокий уровень нашей микробиологии, которая основана сейчас на молекулярно-биологических исследованиях, к чему мы все и стремимся. Но, все-таки, выходы нужно было более четко очертить – что это дает, куда это должно быть направлено, как создавать вакцины, как делать диагностику, какие препараты сейчас нужны для того, чтобы купировать распространение именно этой инфекции, которая сейчас, кстати, присоединяется к COVID19, и у новобранцев тоже большая проблема, в связи с перемещением по регионам. Масса проблем с пневмококками возникает и, думаю, такие работы позволяют разобраться в том, что происходит. Буду голосовать «за».

Председатель: Есть ещё мнения? Пожалуйста, Сергей Владимирович.

Д.м.н., профессор Сидоренко Сергей Владимирович (руководитель отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»): Уважаемый Иван Алексеевич! Ирина Анатольевна, наверное, на некоторые вопросы не ответила, учитывая, что это коммерческая тайна. Я могу позволить себе сказать, что это работа всего отдела, опыт которой используется в разработке вакцин, которые делают Ваши соседи в «Гритваке». Ирина Анатольевна не ответила четко на этот вопрос, поскольку это труд всего отдела.

Председатель: Тогда надо было оформить наше собрание как тайное коммерческое общество. Это не аргумент, Сергей Владимирович. Вы боитесь, что на основе этих данных кто-то сделает вакцину быстрее Вас – не будет этого. Вот данные распространенности российских штаммов – какие мажорные, которые больше всего вызывают заболевания, и какие меньше – для структуры вакцины, да, этим можно воспользоваться.

Д.м.н., профессор Сидоренко Сергей Владимирович: Может быть, Ирина Анатольевна просто меньше участвовала непосредственно в работе с коллегами из «Гритвак».

Председатель: Хорошо, мы это учтем при голосовании. Спасибо. Если нет других мнений, тогда заключительное слово соискателю, чтобы она поблагодарила, кого хочет или ответила на вопросы, которые были изложены в ходе дискуссии неофициальными оппонентами.

Цветкова Ирина Анатольевна: Глубокоуважаемые коллеги, большое спасибо за то, что выслушали мой доклад и за ценные замечания. Мне бы хотелось все-таки прокомментировать одно из замечаний относительно филогенетических деревьев. Было создано много филогенетических деревьев, первые два – это структура популяции, а потом, на основании алгоритмов машинного обучения, были выявлены гены, ассоциированные, например, с инвазивными штаммами или с какими-то другими группами пневмококка. И по этим генам тоже были построены филогенетические деревья. Суммарное число таких интересных генов составило 200 штук. Среди них идентифицированы ферменты метаболизма, поверхностные белки, другие. Все 200 деревьев проанализировать и понять, есть ли закономерности и взаимосвязи в кластеризациях – достаточно сложно. Поэтому мы использовали алгоритмы (программу), которые позволили сравнить топологию этих деревьев. На основании сравнения топологии этих деревьев была построена схема взаимодействующих генов и метаболических путей. В этом был смысл «рисунков Кандинского».

Доктор биологических наук, профессор Шемякин Игорь Георгиевич (заместитель директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск): Вот первый человек, который нашел смысл в рисунках Кандинского.

Цветкова Ирина Анатольевна:

Разрешите поблагодарить моего руководителя, профессора Сергея Владимировича Сидоренко. Он помогал все эти годы. У него можно многому учиться, у него всегда очень много интересных идей. Я благодарна моим коллегам, которые внесли большой вклад в эту работу. Предварительный анализ был сделан на основании анализа музейной коллекции пневмококков, содержащей более тысячи изолятов, полученных за более короткое время, за несколько лет. Конечно, геномы всех этих пневмококков не были секвенированы. Но распределение серотипов по большой выборке мы делали, и картину такую имеем. Я хочу поблагодарить мою семью, моих близких. Они многие годы поддерживали меня и принимали мои идеи. Спасибо вам большое.

Председатель: Спасибо. Уважаемые коллеги, нам для оценки этой диссертации необходимо избрать счетную комиссию. Есть предложение избрать **счетную комиссию** в следующем составе: д.м.н. Ипполитов Евгений Валерьевич (председатель), д.б.н. Коломбет Любовь Васильевна и д.б.н. Филонов Андрей Евгеньевич.

Будут ли возражения? Нет? Кто за данный состав счетной комиссии - прошу проголосовать. **Единогласно.**

Членам совета с правом решающего голоса предлагаю получить бюллетени для голосования под роспись. **Объявляется перерыв для проведения тайного голосования.**

Счетная комиссия выдала под расписку заготовленные заранее бюллетени по соответствующей форме. Голосующие члены диссертационного совета вычеркнули ненужное из графы «Результаты голосования» и опустили бюллетени в опечатанную урну. Члены счетной комиссии вскрыли урну, подсчитали бюллетени и составили по итогам голосования протокол счетной комиссии по соответствующей форме. После оформления протокола счетной комиссии по результатам голосования счетная комиссия опечатала все бюллетени и приложила их к своему протоколу.

Председатель: Для оглашения результатов тайного голосования слово предоставляется **председателю счетной комиссии** д.м.н. Ипполитову Евгению Валерьевичу:

Уважаемый Председатель, уважаемые члены диссертационного совета, коллеги! По вопросу присуждения ученой степени кандидата биологических наук Цветковой Ирине Анатольевне была избрана комиссия в составе: д.м.н. Ипполитов Евгений Валерьевич (председатель), д.б.н. Коломбет Любовь Васильевна и д.б.н. Филонов Андрей Евгеньевич. Протокол № 1 заседания счетной комиссии диссертационного совета 64.1.002.01 от 03.12.2021 г. Комиссия избрана для подсчета голосов при тайном голосовании о присуждении Цветковой Ирине Анатольевне ученой степени кандидата биологических наук. Состав диссертационного совета утвержден в количестве **23** человек на период действия номенклатуры специальности научных сотрудников, утвержденной приказом Минобрнауки России от 24.02.2021 г. № 118. В составе диссертационного совета нет дополнительно введенных членов совета. Присутствовало на заседании **17** членов совета, в том числе докторов наук по профилю рассматриваемой диссертации – **9**. Роздано бюллетеней – **17**, осталось не розданных бюллетеней – **6**. Оказалось в урне бюллетеней – **17**. Результаты голосования по вопросу о присуждении ученой степени кандидата биологических наук Цветковой Ирине Анатольевне: за – **17**, против – **нет**, недействительных - **нет**.

Диссертационный совет утвердил протокол счетной комиссии.

Голосовали открытым голосованием: единогласно.

Слово для оглашения Заключения диссертационного совета по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук предоставляется ученому секретарю диссертационного совета д.б.н. Хохловой О.Е.:

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01,
СОЗДАННОГО 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
о присуждении Цветковой Ирине Анатольевне ученой степени кандидата
биологических наук:

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 гистидинкиназы; 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 антипневмококковой вакцинации.

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 *SnEff*; 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, обеспечивающим наибольший адаптивный потенциал 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 антипневмококковой вакцинации конъюгированными полисахаридными вакцинами;

изучены связи происходивших в 2000 – 2010 гг. изменений в структуре популяции пневмококков, циркулировавших в Российской Федерации до внедрения антипневмококковой вакцинации 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 антипневмококковой вакцинации в России; полученные результаты позволят в дальнейшем получить информацию о генетических процессах, детерминирующих 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, Wzd. Использование детерминант белка StrH, ассоциирующихся с инвазивностью пневмококка, возможно, позволит модулировать его вирулентный потенциал.

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.

Председатель предложил голосовать за принятие Заключения.


Голосовали открытым голосованием: единогласно.

Председатель диссертационного совета академик РАН, д.м.н, профессор **Дятлов Иван Алексеевич**, объявил соискателю Цветковой Ирине Анатольевне **результат защиты:**

Разрешите от имени членов совета и присутствующих поздравить Цветкову Ирину Анатольевну с успешной защитой диссертации, присвоением ей ученой степени кандидата биологических наук и пожелать успехов в дальнейшей работе.

Заседание диссертационного совета объявляется закрытым.

Председатель диссертационного совета
академик РАН, доктор мед. наук, профессор



И. А. Дятлов

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, доцент



О.Е. Хохлова

