

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Борисенко Андрея Юрьевича «Молекулярно-генетический и биоинформационный скрининг вирулентных бактериофагов *Staphylococcus aureus* на основе анализа CRISPR/Cas-системы бактерии», представленную на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 03.02.03 Микробиология

### **Актуальность темы диссертации.**

Уже несколько десятилетий *Staphylococcus aureus* способен вызывать широкий спектр заболеваний - от кожных инфекций до тяжелых септических состояний с возможным летальным исходом. Применение химиопрепаратов в клинической практике способствовало распространению устойчивых к их действию штаммов. При этом сложилась ситуация, когда необходимо дозировано подбирать несколько разных типов антибиотиков, чтобы повлиять на бактериальную инфекцию, что в свою очередь создало условия для формирования и распространения штаммов с множественной устойчивостью к широко используемым антибиотикам и химиопрепаратам. Вопросы борьбы с возбудителем разработаны недостаточно, и единственным выходом из сложившейся ситуации является повышение доз и разработка новых поколений антибиотиков для лечения инфекций, вызванных *S. aureus*. На фоне этой проблемы вновь актуальной становится фаготерапия. Исследования показывают, что препараты бактериофагов - альтернатива антибиотикам по ряду причин: фаги уничтожают бактерию, не повреждая клетки организма; прием бактериофагов не вызывает аллергии, не снижает функции иммунной системы организма; производство препаратов бактериофагов – экологически чистый процесс. Современные геномные и биоинформационные технологии позволяют целенаправленно моделировать процесс отбора высокоспецифичных и вирулентных фагов против патогенных микроорганизмов на основе геномных структур CRISPR/Cas бактерий. CRISPR/Cas переводится как «короткие палиндромные повторы,



регулярно расположенные группами». Посредством CRISPR-системы бактерии распознают и эффективно расщепляют ДНК фагов, используя ферментную систему Cas. Поиски и манипуляции с генами при помощи биоинформационных компьютерных программ открывают новый путь к изучению молекулярных процессов в генах и геномах бактерий. Такой путь имеет дополнительное преимущество при работе с микроорганизмами: он снижает вероятность развития резистентности в ходе эксперимента. Биоинформационные технологии позволяют целенаправленно моделировать процесс отбора высокоспецифичных и вирулентных фагов против микроорганизмов на основе взаимодействия CRISPR-системы. Исходя из вышеизложенного, диссертационная работа Борисенко А.Ю. посвященная молекулярно-генетическому и биоинформационному скринингу вирулентных бактериофагов *Staphylococcus aureus* на основе анализа CRISPR/Cas-системы бактерии, несомненно актуальна.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе.**

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе Борисенко А.Ю., подтверждаются большим объемом согласованных данных теоретических и экспериментальных исследований, полученных с использованием современных методов исследования.

**Достоверность и новизна исследования и полученных результатов.**

Значительный объем изученной отечественной и зарубежной литературы, комплексный подход к исследованию и использование современных методов позволили диссертанту получить ряд новых данных. К важным положениям, определяющим очевидную новизну, следует отнести следующее. Установлена и продемонстрирована гетерогенность строения CRISPR-локусов у *S. aureus*. В результате, в геномах *S. aureus* обнаружены гены CRISPR-систем: I-A, II-A, III-A, IV-A, I-B. Также выявлено, участие плазмид *S. aureus* используемых в качестве дополнительных источников



генов *cas* и CRISPR-кассет. Изучение степени защищенности бактерии позволило выявить CRISPR-кассеты содержащих от 1 до 15 спейсеров разделенных разными повторяющимися последовательностями. При помощи биоинформационных программ установлено, что наибольшее генетическое влияние на анализируемые штаммы *S. aureus* оказывали бактериофаги рода *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Gordonia*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*. Обнаруженные CRISPR-кассеты и гены *cas* в геномах *S. aureus* послужили платформой для синтеза детектирующих и фланкирующих праймеров. В результате удалось выявить наличие генов *cas* и выделить 45 CRISPR-кассет с последующим их секвенированием и оценкой устойчивости штаммов *S. aureus* к препаратам бактериофагов. Выявлено, что одна спейсерная последовательность способна защищать бактерию от разных бактериофагов.

На достоверность результатов исследования указывает тот факт, что используемый биоинформационный алгоритм, позволил расширить представления о проблеме устройства CRISPR-системы *S. aureus* и возможности применения его для изучения CRISPR-систем в других бактериях с целью создания персонализированной фаговой терапии. Общеизвестные апробированные биоинформационные методы поиска и анализа локусов CRISPR в геномных последовательностях из баз данных позволили изучить локусы у *S. aureus* с применением микробиологических и молекулярно-генетических и методов исследования.

#### **Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций.**

На основании проведенных исследований Борисенко А.Ю. получены экспериментальные данные, которые вносят вклад в решение актуальной фундаментальной проблемы, связанной с изучением персонализированной фаготерапии против возбудителя *Staphylococcus aureus*. Вклад также отражается в регистрации базы данных «Спейсерные последовательности CRISPR-Cas систем штаммов *Staphylococcus aureus*», а также депонирование



последовательностей CRISPR-кассет в международный компьютерный банк данных NCBI (Center for Biotechnology Information).

Создание новых высокоспецифичных и патогенных фаговых препаратов нового поколения для фаготерапии, при разработке технологического алгоритма скрининга антибактериальных вирулентных фагов, могут иметь практическое значение в замене антибиотикотерапии в медицинской практике.

**Содержание диссертации, ее завершенность, публикации автора в научной печати.**

Задачи диссертационной работы четко сформулированы и соответствуют поставленной цели. На защиту выносятся 4 положения, последовательно раскрывающих содержание работы, основанной на большом объеме данных, полученных в ходе собственных исследований диссертанта. Диссертационная работа безупречно логически структурирована, изложена понятно, четко и грамотно. Последовательность предоставленного материала создает целостное представление о содержании работы. Текст диссертации изложен на 151 странице машинописного текста и иллюстрирована 17 рисунками и 14 таблицами. Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, глав «Обзор данных литературы», «Материалы и методы исследования», 3-х глав «Результаты собственных исследований», «Заключения», «Выводы», списка сокращений, списка литературы. «Выводы» кратко отражают выполненные задачи и основные положения диссертации, выдвинутые на защиту, и соответствуют результатам, полученным автором.

Анализ изученного материала позволил диссертанту представить достаточно объективные и развернутые научные данные о состоянии изучаемой темы. Комплексное применение микробиологических и молекулярно-генетических методов исследования позволило выполнить диссертационную работу весьма на высоком уровне. Несомненным достоинством работы является разработанный биоинформационный



алгоритм, который расширяет представления о проблеме устройства CRISPR-системы *S. aureus* и может служить платформой для создания персонафицированной фаготерапии стафилококковых и других видов возбудителей бактериальных инфекций.

Список литературы содержит 373 источника, из них отечественных – 48, зарубежных – 325. Краткое содержание глав диссертационной работы, основные результаты и выводы соответственно изложены в автореферате диссертации, содержание которого соответствует содержанию диссертации.

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, изложены в 48 научных работ, из них 10 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

#### **Замечания и вопросы.**

Несмотря на вышеизложенные достоинства диссертационной работы, есть вопросы уточняющего характера:

1. С чем связано малое содержание спейсеров у *S. aureus*?
2. Целесообразно ли использовать данную модель алгоритма для других видов бактерий? Осуществляли ли поиск?
3. Почему не проводилось полногеномное секвенирование штаммов?
4. В главе 6. не до конца раскрыт вопрос о выделении CRISPR-кассет, т.е. секвенирование фрагментов осуществлялось после постановки гель-электрофореза? Каким образом?

#### **Заключение.**

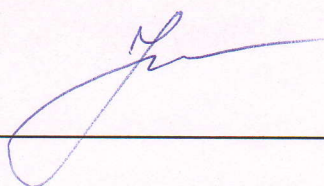
Диссертационная работа Борисенко А.Ю., предоставленная на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 03.02.03 Микробиология, является научно-квалифицированной работой, в которой содержится решение задачи возможности использования биоинформационных программ с целью создания персонафицированной фаговой терапии бактериальных заболеваний. По своей актуальности, научной новизне, практической значимости и уровню проведенных



исследований диссертационная работа в полной мере соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.13 г. №842. А ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Официальный оппонент,


доктор медицинских наук по специальности 03.00.07 – Микробиология  
профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии,  
начальник отделения препаратов бактериотерапии филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «“Биомед»



Несчисляев Валерий Александрович

« 23 » ноября 2021 г.

Лично подписать Несчисляев Валерий Александрович  
заверено, Гл. специалистом по персоналу Фир Фирмина ОА



Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским и иммунобиологическим препаратам «Микроген» филиал в г. Пермь «Пермское научно-производственное объединение «Биомед», 614089, г. Пермь, ул. Братская, д. 177, тел. (342)281-94-96, e.mail: neschislavew@gmail.com