



УТВЕРЖДАЮ:

Ректор ФГБОУ ВО ИГМУ МЗ РФ

д. м. н., профессор

И. В. Малов

12

20 19 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Иркутского Государственного Медицинского Университета

Диссертация Борисенко Андрея Юрьевича «Молекулярно-генетический и биоинформационный скрининг вирулентных бактериофагов *Staphylococcus aureus* на основе анализа CRISPR/CAS-Системы бактерии» выполнена на базе НИИ БМТ Иркутского Государственного Медицинского Университета.

Научный руководитель – Злобин Владимир Игоревич, академик РАН, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО ИГМУ.

В 2018 году Борисенко Андрей Юрьевич окончил аспирантуру по направлению подготовки «Биологические науки» по специальности «Микробиология» и получил диплом с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь».

По итогам осуждения было принято следующее заключение:

1. Актуальность проблемы. Несмотря на большое число научных исследований, наличие отечественных и зарубежных антибиотических препаратов для профилактики и лечения бактериальных инфекций, в последние годы отмечается существенный рост заболеваемости, вызванной *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* способен вызывать широкий спектр заболеваний - от кожных инфекций до тяжелых септических состояний с возможным летальным исходом. Повальное и не всегда рациональное применение химиопрепаратов в клинической практике способствовало распространению устойчивых к их действию штаммов стафилококков.

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. Классическое определение чувствительности к бактериофагам - представляет собой длительный 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.

Несмотря на активное изучение этой системы в других геномах бактерий, наличие большого спектра современных биоинформационных программ поиска и анализа CRISPR-система *S. aureus* изучена недостаточно. Существующие данные анализа генома CRISPR *S. aureus* указывают на разное строение и даже отсутствие CRISPR-системы у этого вида. Основываясь на строении данной системы в уже изученных бактериях, предполагается, что наличие определенных спейсерных последовательностей в CRISPR-кассетах укажут на степень защиты бактерии от бактериофагов. Таким образом, уточнение имеющихся и получение новых данных о CRISPR-системе *Staphylococcus aureus* способствовало бы решению проблем антибиотикотерапии и созданию персонализированной фаговой терапии.

Работа выполнена на базе Научно-исследовательского института Биомедицинских технологий ФГБОУ ВО ИГМУ МЗ РФ и соответствует направлению исследований по теме: «Молекулярно-генетический и биоинформационный скрининг вирулентных бактериофагов *Staphylococcus aureus* на основе анализа CRISPR/CAS-Системы бактерии». Исследования поддержаны грантом по регистрационному проекту № 17-415-380005 «Разработка лабораторной технологии персонифицированной фаговой терапии на модели *Staphylococcus aureus*, посредством методов геномики, биоинформатики и CRISPR/Cas-технологии».

2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. При выполнении диссертационной работы Борисенко А. Ю. проявил себя как квалифицированный специалист, способный самостоятельно планировать и проводить научные исследования, анализировать полученные результаты. Требования п. 14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018) «О порядке присуждения ученых степеней» выполнены, соискатель лично участвовал в получении результатов работы, а также в подготовке к публикации и их представлении на научных конференциях.

3. Степень достоверности результатов проведенных исследований. Проверка первичной документации комиссией, созданной по приказу в составе председателя, д.м.н., профессора ФГБОУ ВО ИГМУ Семинского И.Ж. и членов комиссии д.м.н., проф. Игнатевой Л. П., д.м.н., доцента Куренковой Г. В. ФГБОУ ВО ИГМУ показала, что она полностью соответствует материалам исследований, представлена в полном объеме и признана достоверным материалом, который соответствует выполненной

работе. Степень достоверности результатов исследования основывается на общепризнанных апробированных биоинформационных методах поиска и анализа локусов CRISPR в геномных последовательностях из баз данных и полученных ДНК из клинического материала, применении современных компьютерных методов исследования, обработки информации, статистическом анализе.

Соискателем лично отобраны биоинформационные программы и сформированы в алгоритм поиска и анализа CRISPR-систем бактерий; разработаны и апробированы специфические праймеры для детекции *cas*-генов и фланкирования CRISPR-кассет *S. aureus*; обобщение полученных результатов; обработка данных секвенирования, интерпретация результатов исследований; анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме CRISPR-системе *S. aureus*; написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов работы в научных публикациях и докладах на конференциях.

4. Новизна и практическая значимость диссертации. Проведено изучение и анализ CRISPR-системы в геномах *S. aureus* из базы данных Genbank при помощи разработанного биоинформационного программного алгоритма. Установлена и продемонстрирована гетерогенность строения CRISPR-локусов у золотистого стафилококка. В результате, в геномах *S. aureus* идентифицировано 4 возможных типа CRISPR - IA, IIA, IIIA, IB. Также выявлено, участие плазмид *S. aureus* используемых в качестве дополнительных источников генов *cas* и CRISPR-кассет. Изучение степени защищенности бактерии позволило выявить CRISPR-касеты содержащих от 1 до 15 спейсеров разделенных разными повторяющимися последовательностями. При помощи биоинформационных программ установлено, что наибольшее генетическое влияние на анализируемые 409 штаммов *S. aureus* оказывали бактериофаги рода *Staphylococcus* - 70%, *Streptococcus* - 67%, *Mycobacterium* - 67%, *Bacillus* - 54%, *Gordonia* - 53%, *Arthrobacter* - 23%, *Streptomyces* - 12%.

Получены сведения о высокой комплексной резистентности и приспособляемости *S. aureus* к антибиотикам и фагам у штаммов выделенных за 2015 - 2016 гг. из различных биотопов пациентов, обратившихся за медицинской помощью в лечебные учреждения г. Иркутска.

Обнаруженные CRISPR-касеты и *cas*-гены в геномах *S. aureus* из базы данных при помощи биоинформационного программного алгоритма послужили платформой для синтеза детектирующих и фланкирующих праймеров. В результате удалось выявить наличие *cas*-генов и выделить 45

CRISPR-кассет с последующим их секвенированием и оценкой устойчивости штаммов *S. aureus* к препаратам бактериофагов.

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.

Настоящее исследование имеет выраженное прикладное значение, направленное на разработку современных методов и способов борьбы с *S. aureus*, вызывающего заболевания различной этиологии. Практическая значимость представляемого научного исследования заключена в предлагаемом методе выделения CRISPR-кассет с целью скрининга антибактериальных вирулентных фагов, которые могут стать основой создания новых высокоспецифичных и патогенных фаговых препаратов нового поколения для фаготерапии, заменив во многих случаях антибиотикотерапию в медицинской практике.

5. Ценность научных работ соискателя. Полученные результаты вносят вклад в решение актуальной фундаментальной проблемы, связанной с пониманием устройства и принципов работы CRISPR. 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.

6. Специальность, которой соответствует диссертация. Диссертационная работа соответствует п. 3 «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» паспорта специальности 03.02.03 «Микробиология», отрасль науки – биология.

7. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. По теме диссертации опубликовано 48 научных работ, из них 10 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации:

1. Борисенко А.Ю. Использование биоинформационных программных методов для поиска CRISPR/CAS систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus* / А.Ю. Борисенко, Ю.П. Джигоев, А.И. Парамонов, Ю.С. Букин, Л.А. Степаненко, О.В. Колбасеева, В.И. Злобин // Сибирский медицинский журнал. – 2015. – Т. 133, №2. – С. 71-74.

2. Борисенко А.Ю. Биоинформационный поиск и анализ структур CRISPR/Cas-систем в геноме штамма *Staphylococcus aureus* и оценка профилей фаговых рас, детектируемых через CRISPR-кассету бактерий / А.Ю.

Борисенко, Ю.П. Джигоев, Н.П. Перетолчина, Л.А. Степаненко, В.А. Кузьмина, Л.А. Кокорина, Ю.М. Землянская, Н.А. Арефьева, В.И. Злобин // Acta Biomedica Scientifica. – 2018. – Т. 3, № 5.– С. 49-53.

3. Борисенко А.Ю. Сравнительный анализ структур CRISPR/CAS-систем у штаммов *Staphylococcus aureus* и детектируемых ими фаговых рас методами биоинформатики / А.Ю. Борисенко, Н.А. Арефьева, Ю.П. Джигоев, Л.А. Степаненко, Н.П. Перетолчина, Ю.С. Букин, В.И. Чемерилова, О.Ф. Вятчина, О.А. Секерина, В.П. Саловарова, А.А. Приставка, В.И. Злобин // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. -2020. -Т. 31. [в печати].

4. Борисенко А.Ю. Биоинформационные алгоритмы поиска и анализа CRISPR/Cas систем и фаговых профилей в геноме штамма *Staphylococcus aureus* M1216 / А.Ю. Борисенко, Ю.П. Джигоев, Н.П. Перетолчина, В.И. Злобин, Е.А. Воскресенская, Л.А. Степаненко, Н.Е. Зелинская, О.В. Колбасеева, Н.В. Шмидт, И.В. Малов // Материалы IV конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням. Санкт-Петербург, 18-20 мая 2016. Журнал Инфектологии. - 2016. – Т. 8, №8. - С. 27-28.

5. Борисенко А.Ю. Поиск и анализ CRISPR/CAS- систем и фаговых ассоциаций через спейсеры CRISPR- кассет в геномах *Staphylococcus aureus* методами биоинформатики/ А.Ю. Борисенко, Ю.П. Джигоев, В.И. Злобин, Н.П. Перетолчина, А.И. Парамонов, Л.А. Степаненко, О.В. Колбасеева, Н.Е. Гарашенко, К.А. Гусевская, В.А. Кузьмина // Журнал инфектологии. -2017. -Т. 9, № S2. - С. 33.

6. Арефьева Н.А. Детекция и анализ CRISPR-CAS-систем в геноме плазмиды PYS-1 из штамма *BACILLUS THURINGIENSIS* YC-10 / Н.А. Арефьева, Ю.П. Джигоев, А.Ю. Борисенко, Л.А. Степаненко, Н.П. Перетолчина, Ю.С. Букин, В.И. Чемерилова, О.Ф. Вятчина, О.А. Секерина, Ю.А. Маркова, Г.В. Юринова, В.П. Саловарова, А.А. Приставка, В.А. Кузьмина, А.С. Мартынова, В.И. Злобин // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. -2018. -Т. 26. -С. 3-17.

7. Арефьева Н.А. Биоинформационный поиск структур CRISPR/CAS-системы в геноме плазмиды PCT281 штамма *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *CHINENSIS* CT-43 / Н.А. Арефьева, Ю.П. Джигоев, А.Ю. Борисенко, В.И. Чемерилова, О.Ф. Вятчина, О.А. Секерина, Л.А. Степаненко, Ю.А. Маркова, Г.В. Юринова, В.П. Саловарова, А.А. Приставка, В.А. Кузьмина, О.Н. Рева, В.И. Злобин // Acta Biomedica Scientifica. -2018. - Т. 3, № 5. -С. 33-38.

8. Перетолчина Н.П. Сравнительный анализ CRISPR- систем штаммов *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* IP32953 И IP31758 / Н.П. Перетолчина, А.Ю. Борисенко, Ю.П. Джигоев, В.И. Злобин // Acta Biomedica Scientifica. -2018. -Т. 3, № 5. -С. 54-59.

9. Перетолчина Н.П. Биоинформационный анализ CRISPR/CAS системы штамма *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* IP32953 / Н.П. Перетолчина, Ю.П. Джигоев, А.Ю. Борисенко, Е.А. Воскресенская, А.И. Парамонов, Л.А. Степаненко, О.В. Колбасеева, В.И. Злобин // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. -2016. -Т. 1, № 5 (111). - С. 64-67.

10. Перетолчина Н.П. Биоинформационный поиск и скрининг фагов и плазмид через спейсерные сайты CRISPR/CAS- системы штамма *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* YPIII / Н.П. Перетолчина, Ю.П. Джигоев, А.Ю. Борисенко, А.И. Парамонов, Е.А. Воскресенская, Л.А. Степаненко, Н.Е. Зелинская, О.В. Колбасеева, Н.В. Шмидт, В.И. Злобин // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). -2015. -Т. 138, № 7. -С. 63-68.

Публикации в журналах, индексируемых в Scopus, Web of Science:

11. Иванова Е.И. Поиск и анализ CRISPR-CAS системы в штамме *ESCHERICHIA COLI* HS и детектируемых спейсерами CRISPR- кассеты фаговых рас методами биоинформатики / Е.И. Иванова, Ю.П. Джигоев, А.Ю. Борисенко, Н.П. Перетолчина, Л.А. Степаненко, А.И. Парамонов, Е.В. Григорова, У.М. Немченко, Т.В. Туник, Е.А. Кунгурцева // Вестник Российского государственного медицинского университета. - 2018.- № 2. - С. 28-34. (Scopus, РИНЦ).

12. Ivanova E.I. The search and analysis of a CRISPR-Cas system in *Escherichia coli* HS with subsequent scanning for the corresponding phage races based on the spacers of the detected CRISPR array using bioinformatic methods / E.I. Ivanova, Yu.P. Dzhigoev, A.Yu. Borisenko, N.P. Peretolchina, L.A. Stepanenko, A.I. Paramonov, E.V. Grigorova, U.M. Nemchenko, T.V. Tunik, E.A. Kungurtseva // Bulletin of Russian State Medical University. - 2018. - № 2. С. 26-31. (Web of Science).

Диссертация Борисенко Андрея Юрьевича «Молекулярно-генетический и биоинформационный скрининг вирулентных бактериофагов *Staphylococcus aureus* на основе анализа CRISPR/CAS-Системы бактерии» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Заключение принято на заседании Проблемной комиссии ФГБОУ ВО ИГМУ по специальности 03.02.03 Микробиология.

Присутствовали на заседании члены комиссии: д.м.н., акад. Злобин В.И., д.м.н., проф. Симонова Е.В., к.м.н., доц. Куприянова Н.Ю., к.б.н., ст. научн. сотр. Джиоев Ю.П., д.м.н., доц. Шугаева С.Н., к.м.н., доц. Орлова Л.С., к.м.н., доц. Бурданова Т.М., к.м.н., доц. Баянова Т.А., д.м.н., проф. Аитов К.А..

Результаты голосования «ЗА» - 10 человек , «против» - 0 чел., «воздержались» - 0 чел., протокол № 3 от «17» декабря 2019 г.

Председатель проблемной комиссии, д.м.н., профессор, зав. каф. Эпидемиология ФГБОУ ВО ИГМУ МЗ РФ

Ботвинкин А. Д.

Ученый секретарь, д.м.н., проф., зав. каф. Патологической физиологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ИГМУ МЗ РФ

Семинский И.Ж.



Семинский И. Ж.
Подпись *Ботвинкина А. Д.* Достоверяю
Специалист по кадровой работе *Вилерова И. П.*
" 19 " 12 20 19 г.