

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Игнатова Сергея Георгиевича, на работу Трутневой Ксении Александровны «Особенности белкового состава и факторы поддержания жизнеспособности покоящихся форм микобактерий», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия

Актуальность темы диссертационного исследования

Работа Трутневой Ксении Александровны посвящена актуальной проблеме изучению белков жизнеспособности покоящихся форм микобактерий, что абсолютно необходимо для выработки стратегии борьбы с покоящимися формами патогенов. Высокую патогенность *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) возбудителя туберкулеза у человека связывают со способностью к размножению внутри клеток хозяина. В большинстве случаев после заражения иммунная система хозяина не способна подавить инфекцию и переводит ее в латентное состояние. Изредка латентная инфекция способна спонтанно переходить в активное состояние, в случае подавления иммунной системы (в результате заражения ВИЧ и старении). Термин персистенция описывает состояние бактерий, в котором клетки бактерий могут находиться после заражения, под воздействием стрессовых факторов. Для неспорулирующих бактерий состояние покоя описывается как сохранение жизнеспособности с низкой метаболической активностью. Термин «состояние покоя» часто используется для описания состояния бактерий в контексте *in vitro*, и подразумевает, что бактерии в этом состоянии прекращают репликацию, обладают сниженным метаболизмом, и становятся фенотипически нечувствительны к антибиотикам. Поскольку покоящиеся формы *Mtb*, вызывающие латентную форму инфекции не высеваются на плотных питательных средах, нечувствительны к бактериостатическим антибиотикам, считается, что истинные покоящиеся

клетки микобактерий должны быть «некультивируемы» и метаболически неактивны. При латентной форме инфекции переход *Mtb* в состояние покоя был спровоцирован иммунной системой, однако подобное состояние возможно имитировать, подвергая клетки различному стрессу. Вероятно, при латентной форме инфекции наблюдается гетерогенность популяции, содержащей как персистеры, так и истинные покоящиеся формы. Автором дается определение состояние покоя микобактерий как это обратимое состояние, характеризующееся сниженной метаболической активностью, невосприимчивостью к антибиотикам, морфологическим изменением формы клеток и неспособностью клеток образовывать колонии на плотных питательных средах.

Поэтому актуальность темы диссертационного исследования Трутневой К.А. не вызывает сомнения.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Трутневой К.А. выполнена на сертифицированном оборудовании, с продуманной схемой экспериментальных исследований, в работе применялись оригинальные методы исследования. В рамках данной диссертационной работы было опубликовано 5 статей в реферируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации материалов диссертационных исследований. Научные положения диссертации апробированы на 8 научных конференциях, материалы которых опубликованы в сборниках.

Большой охват зарубежных источников в обзоре литературы свидетельствует о высокой осведомленности автора в отношении данной проблемы в мировой научной литературе.

Степень обоснованности и достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, поскольку автором выполнен большой объем

исследований; выводы, научные положения и рекомендации, сформулированные в диссертации вполне обоснованы и логически вытекают из результатов исследований.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов

Соискатель впервые показал, что покоящиеся клетки бактерий сохраняют значительное количество белков в условиях длительного (до 13 месяцев) пребывания в состоянии покоя при сниженной метаболической активности, отсутствии деления и синтеза белков *de novo*, при снижении количества белков, участвующих в метаболизме нуклеиновых кислот, и других важных биомолекул (витаминов, кофакторов ферментов), а также транспортных белков.

При этом, в белках, покоящихся клеток, присутствуют потенциально активные ферменты центральных метаболических путей, что может обеспечивать процессы необходимые для поддержания длительного выживания или реактивации из состояния покоя.

Показано, что в протеомных профилях покоящихся клеток микобактерий значительно увеличивается представленность белков, участвующих в защите от окислительного стресса, агрегации белков и стабилизации нуклеиновых кислот.

Впервые установлено, что в покоящихся клетках *M. smegmatis* накапливаются в значительных количествах стабилизирующие молекулы: порфирины и трегалоза, а также ферменты их метаболизма по аналогии с истинными спорами грибов и дрожжей.

Практическая значимость полученных авторов результатов

Результаты выполненной диссертационной работы имеют большое практическое значение. Обнаруженные в ходе работы процессы,

происходящие в покоящихся клетках микобактерий важны для понимания явления латентности и реактивации туберкулеза. Белки, обнаруженные в ходе протеомного анализа покоящихся клеток *Mtb*, являются потенциальными мишенями для создания антитуберкулезных препаратов и могут быть использованы для диагностики латентного туберкулеза.

Содержание диссертации, ее завершённость

Диссертационная работа Трутневой К.А. представляет собой законченный, логически выстроенный научный труд и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов, результатов собственных исследований и обсуждения этих результатов, а также содержит обобщающее заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащего 305 литературных источников. Диссертация изложена на 257 страницах машинописного текста, содержит 28 рисунков и 4 таблицы. В конце диссертации приводятся обширные приложения в виде таблиц с описанием белков, обнаруженных в протеомном профиле покоящихся (151 образец) и активных (154 образца) клеток *M. smegmatis* (приложение 1) и *M.tuberculosis* (приложение 2).

Во введении обоснована актуальность проведения исследований по выбранному направлению. Во введении представлена научная и практическая значимость выполненной работы; апробация работы; личное участие автора в получении результатов исследований, положения, выносимые на защиту.

В главе 1 «Обзор литературы») приведен обзор литературы, на основании которого формируются цели и задачи исследования. В обзоре представлен анализ литературных данных, описывающих существующие модели латентного туберкулеза и протеомные исследования этих моделей как с использованием метода двумерного электрофореза, так и с помощью более современных методов; описаны молекулярные механизмы, лежащие в

основе явления латентности и персистенции, а также принципы ответа микобактерий на стресс.

В главе 2 «Материалы и методы» подробно приведены основные материалы и методы использованные в работе.

В главе 3 «Результаты и обсуждения» представлена экспериментальная часть работы, в которой приведены результаты экспериментов по сравнительному протеомному анализу активнорастущих и покоящихся клеток микобактерий с использованием моделей покоя полученных как на возбудителя туберкулеза, так и на его непатогенном родственнике *Msm*. Также представлены результаты экспериментальной проверки некоторых процессов, обнаруженных в ходе протеомного анализа. В Заключении автор привел логичный анализ результатов, полученных на всех этапах работы.

Основные положения, выносимые на защиту, и Выводы диссертационной работы соответствуют сформулированным целям и задачам работы, полностью отражают суть проведенных экспериментов, обоснованы достаточным фактическим материалом и являются логическим завершением представленной диссертационной работы. По результатам исследования опубликовано 13 работ, в том числе 5 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ. Материалы работы достаточно полно представлены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях.

Диссертационная работа оформлена в соответствии с существующими требованиями, достаточно иллюстрирована рисунками и таблицами, написана понятным литературным языком. Содержание автореферата в краткой форме отражает содержание диссертационной работы, демонстрирует ее основные положения и выводы.

Основные замечания носят редакционный характер:

1. В разделе «Методы исследования» есть вставка с другими параметрами шрифтов.

2. В разделе сокращений отсутствует расшифровка ЦТК, АФК и СРМ (рис. 3 автореферата).
3. В табл. 1 автореферата отсутствует продольное деление, поэтому трудно ее анализировать

В процессе ознакомления с работой возникли некоторые вопросы:

1. В подразделе «научная новизна», во втором пункте прошу объяснить термин для белков «потенциально энзиматически активны»
2. Покоящиеся клетки *M. smegmatis* сходны с дрожжевыми и грибными спорами. А в сравнении с бактериальными спорами?
3. Образуют ли биопленки покоящиеся клетки?

Возникшие в процессе изучения диссертации замечания и вопросы носили редакционный характер, не являлись принципиальными и ни в коем мере не снижали научную и практическую значимость результатов представленной работы, а также не влияли на общую положительную оценку диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Трутневой Ксении Александровны «Особенности белкового состава и факторы поддержания жизнеспособности покоящихся форм микобактерий», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи биохимии – изучение особенностей белкового состава в состоянии покоя и выходе из этого состояния.

Диссертация Трутневой К.А. соответствует по актуальности, научной и практической значимости полученных результатов требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации № 335 от

21.04.2016), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

28 января 2020 г.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук

Игнатов Сергей Георгиевич

Заведующий лабораторией Нанобиотехнологии
отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов,
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и
биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека Российской Федерации
(адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховской р-н, п. Оболенск)
Тел. 8(4967) 36-07-73 факс 8(4967) 36-00-10
ignatov@obolensk.org

Подпись

Игнатова С.Г. удостоверяю.

Ученый секретарь

Д.б. н.

Коломбет Л.В

