

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**  
**на диссертационную работу Трутневой Ксении Александровны**  
**«Особенности белкового состава и факторы поддержания жизнеспособности**  
**покоящихся форм микобактерий» по специальности 03.01.04 Биохимия на соискание**  
**ученой степени кандидата биологических наук.**

**Актуальность избранной темы**

Туберкулез, заболевание, вызванное бациллами *Mycobacterium tuberculosis*, находится на десятом месте среди всех причин смертности человека, а среди инфекционных заболеваний - на первом месте в мире (World health Organization. Global tuberculosis Report. Executive summary 2018.). Это обусловлено особенностями биологической природы возбудителя, благодаря которым клетки *M. tuberculosis* способны длительный период времени находиться в организме хозяина в латентном или персистентном состоянии покоя (замедление скорости метаболических процессов), что делает их фенотипически толерантными к воздействию факторов иммунитета и антибиотиков. В то же время, при благоприятных условиях, вызванных завершением цикла антибиотикотерапии или ослаблением иммунитета, клетки возбудителя способны реактивироваться, вызывая острую форму заболевания. Развитая сеть систем, ответственных за формирование состояния покоя, в силу особенности генетических, биохимических и физиологических свойств возбудителя туберкулеза, способствует его широкому распространению среди популяции людей и отбору генетически закрепленных антибиотикорезистентных форм. Исходя из этого, изучение биохимических процессов, лежащих в основе перехода микобактерий в латентное состояние и связанное с ним формирование персистенции и некультивируемости, представляет собой актуальную проблему, изучению которой посвящена представленная диссертационная работа. Ее основу составляют протеомные исследования, дающие представление о ключевых белках-ферментах и их активности, а также метаболических регуляторах, характерных для перечисленных состояний. Данное научное направление в настоящее время является одним из наиболее интенсивно разрабатываемых мировым сообществом исследователей в области молекулярной биологии, биохимии, микробиологии и фундаментальной медицины. Поэтому тема диссертационной работы Трутневой Ксении Александровны несомненно является актуальной для научно-технического развития России и соответствует тенденциям развития мировой науки в данной отрасли знаний.

**Достоверность и новизна исследований и полученных результатов**

Автором диссертации сделан подробный анализ *in vitro* и *in vivo* моделей персистенции и латентного состояния *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) и *Mycobacterium smegmatis* (Msm) с указанием их преимуществ и недостатков. На его основе проведено сравнение различных моделей по принципу специфичности воздействия различных антибиотиков на персистентные и покоящиеся клетки. Подчеркнуто, что ни одна из известных моделей *in vitro* не способна имитировать истинное состояние покоя (некультивируемость). То же касается моделей *in vivo*. Исходя из этого, в лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха была разработана собственная модель перехода Mtb и Msm в состояние покоя, основанная на постепенном закислении среды.

С целью проведения достоверного протеомного анализа с помощью данной модели удалось существенно продлить сроки наблюдения покоящихся состояний микобактерий *M. tuberculosis* до 4,5 месяцев (культура «D1») и 13 месяцев до достижения полной

«некультивируемости» (культура «D2»). Это значительно превосходит ранее проведенные исследования по длительности наблюдения состояния покоя, которые составляли от 20 дней (модель Вейна) до 6 недель (модель голодания Лебеля). С помощью разработанной модели на основе протеомных методов впервые проведен сравнительный анализ активных и покоящихся клеток микобактерий двух видов, *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*, которые обладали сниженной метаболической активностью после длительного периода хранения.

Впервые показано, что многие из белков покоящихся форм микобактерий не выявляются в протеоме активных клеток и являются энзиматически активными. Выявлено накопление покоящимися клетками *M. smegmatis* в значительных количествах известного стрессового метаболита – свободной трегалозы и установлена ее связь с возрастанием выживаемости покоящихся клеток и реактивацией микобактерий. Определена природа накапливаемого в значительных количествах и секретируемого покоящимися клетками Msm пигмента, относящегося к классу порфиринов.

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

Основной целью представленной диссертационной работы является получение данных об особенностях метаболических путей, специфичных для состояния покоя (латентного состояния, персистенции и некультивируемости) в сравнении с активными клетками, а также клетками, находящимися в состоянии реактивации. Поэтому результаты работы могут стать основой для выбора ключевых метаболических факторов, которые представляют собой ценность как с точки зрения их использования в качестве критериев для оценки и прогноза развития инфекционного процесса, так и с точки зрения выбора действенных терапевтических стратегий. Таким образом, результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, наряду с их выраженным фундаментальным характером, имеют прикладной аспект применения не только для выбора эффективной стратегии лечения туберкулезных инфекций, но и с точки зрения поиска мишеней для разработки новых антимикобактериальных препаратов, нацеленных на ключевые звенья метаболизма покоящихся форм микобактерий, для искоренения латентных и хронических инфекций. Значимость работы для науки и практики подтверждается основными выводами, сделанными по результатам диссертационной работы, исходя из которых намечаются перспективы практических рекомендаций для разработки приемов подавления покоящихся форм микобактерий, которые могут быть реализованы путем воздействия на ключевые ферменты синтеза и распада трегалозы, порфиринов, белки антиоксидантной защиты, а также посредством подавления активности центральных метаболических путей.

### **Оценка содержания диссертации и ее завершенности**

Анализ структуры диссертационной работы Трутневой К.А. свидетельствует о том, что она написана в соответствии с традиционным планом 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, включающий 305 литературных источников, в том числе опубликованных за последние 5 лет. Работа изложена на 257 страницах и проиллюстрирована 4 таблицами и 28 рисунками. 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). В приложениях указаны детальные данные о генетической природе

белков, их количественном соотношении, локализации в клеточных компартментах и физиологическом состоянии клеток, где они обнаружены. Данные приложения имеют значение не только для обоснования и интерпретации результатов представленной диссертационной работы, но и могут быть использованы как источник ценной информации для исследователей, работающих в смежных областях.

Введение раскрывает актуальность выбранной темы, включает формулировку целей и задач исследований, научную новизну, практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, информацию о личном вкладе автора в представленную работу.

В главе 1., посвященной обзору литературы по изучаемой проблеме, дан подробный сравнительный анализ протеомных исследований для *M. tuberculosis* в различных моделях покоя *in vitro*, результаты которого приведены в виде компактной таблицы с характеристикой изменения консенсусных белков при переходе в состояние покоя. Подчеркнуто, что ни одна из известных моделей *in vitro* не способна имитировать истинное состояние покоя (некультивируемость). Исходя из этого, обосновывается целесообразность использования с этой целью собственной модели, основанной на постепенном закислении культуральной среды *in vitro*. Значительная часть обзора посвящена молекулярным механизмам адаптации микробактерий к различным видам стресса, их вкладу в формирование состояния покоя. В заключение автор указывает на то, что до сих пор нет единого понимания процессов происходящих в покоящихся клетках, чем обосновывается актуальность исследований, проводимых в данном направлении.

В главе 2. «Материалы и методы» изложены данные о штаммах, использованных в данной работе, способах их культивирования, в том числе, разработанных для моделирования состояния покоя, а также приводится описание аналитических методов, использованных для характеристики скорости обменных процессов, активности ферментов, измерения уровня метаболитов, количественного анализа ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией, двумерного электрофореза белков в сочетании с MALDI-TOF анализом. Обращает на себя внимание широкий диапазон и обоснованность использования самых современных методов, что убеждает в объективности и достоверности полученных экспериментальных данных.

Результаты исследований и их обсуждение, приведенные в главе 3, описывают физиологические, морфологические, биохимические, гено-экспрессионные изменения, происходящие с клетками *Mtb* и *Msm*, при переходе их в дормантное состояние, поддерживаемое в подобранных авторами условиях в течение 4,5 месяцев до наступления снижения метаболической активности (культура «D1»), и 13 месяцев до достижения полной «некультивируемости» (культура «D2»). С помощью двумерного электрофореза с последующим анализом MALDI-TOF обработан большой объем пептидных последовательностей и установлены когорты белков, уникальных как для D1, так и для покоящихся клеток D2, указывающие на сходство принципов ответа на стресс для клеток *Mtb* и *Msm*. Показано, что протеомный профиль покоящихся клеток содержит меньше белков, относящихся к категории «процессы клеточной стенки», но процент белков в категории «информационные процессы» при этом возрастает. Это свидетельствует о подавлении метаболических процессов, связанных с клеточной стенкой в покоящихся клетках, и активации регуляторных механизмов, обуславливающих переход в состояние покоя. Сравнение результатов диссертации с данными, полученными с помощью ранее известных моделей, показало 58 общих белков, типичных для состояния покоя, 11 из которых участвуют в защите от стресса и 14 – в центральных метаболических путях. Это подтверждает достоверность

результатов диссертационной работы и в то же время демонстрирует их уникальность в части доказательства стабильности белков в покоящихся микобактериях после длительного хранения и сохранения активности некоторых ферментов, что обеспечивается системами защиты, хорошо представленными в протеоме. Оригинальными являются данные, демонстрирующие накопление трегалозы в покоящихся клетках *Msm* и ее значение, наряду с порфиринами, для поддержания жизнеспособности и реактивации покоящихся клеток. Работу завершает раздел «Заключение», обобщающий полученные в работе данные, и выводы, объективно отражающие существо представленной диссертационной работы.

Анализируя работу в целом, необходимо отметить, что она является законченным исследованием по специальности «биохимия» и при этом содержит разностороннюю информацию о структурно-морфологических и культуральных особенностях использованных микробиологических объектов исследования. Автор демонстрирует высокую квалификацию в изложении результатов и своих достижений в микробиологических исследованиях, а также в изучении сравнительных биохимических и протеомных характеристик клеток *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* при переходе в состояние покоя.

Наряду с несомненно позитивным впечатлением от представленной на оппонирование диссертационной работы и высокой положительной оценкой, которую заслуживает эта разносторонняя и многоплановая работа, в процессе ознакомления с ней возникли некоторые вопросы:

1. По какому метаболическому пути синтезировалась глюкоза, как предшественник трегалозы, покоящимися клетками *Msm* в условиях модифицированной среды Сотона, содержащей глицерин, цитрат и аспарагин? Обнаружена ли активность фосфоенолпируват-карбоксикиназы в этих условиях?
2. Чем можно объяснить, что при отсутствии активности изоцитратлиазы в покоящихся клетках обнаружена активность второго ключевого фермента глиоксилатного пути, малатсинтазы, для которой субстратом является продукт первой - глиоксилат?
3. В представленной работе цАМФ рассматривается как фактор, ответственный за поддержание высокой колониеобразующей активности микобактерий, а его снижение в покоящихся клетках приводит к формированию состояния некультивируемости (Табл. 1, Табл. 2). Как это соотносится с данными Noshu et al. (2018) о том, что в бактериальных клетках, в частности *E. coli*, цАМФ, наоборот, участвует в формировании состояния некультивируемости в стрессовых ситуациях, отрицательно регулируя колониеобразующую активность?
4. Какие функции выполняют белки, обладающие «крайне высокой стабильностью» в покоящихся клетках D2, чем определяется их стабильность и существуют ли данные о скоростях деградации и возможности ресинтеза таких белков?
5. Как изменяется содержание Rel белка в клетках микобактерий при длительном поддержании состояния покоя и изменяется ли его функциональная активность в этих условиях?
6. В качестве незначительного замечания по оформлению работы следует указать, что в списке использованной литературы ссылки (№№ 106, 283) на статьи, опубликованные в отечественном журнале «Микробиология», приведены в англоязычной транскрипции.

#### **Результаты диссертации, опубликованные в научной печати**

По теме диссертации опубликовано 5 статей в российских и международных научных журналах и 8 тезисов конференций.

### Соответствие автореферата диссертации

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Министерства образования Российской Федерации и полностью отражают основные положения диссертации.

### Заключение

Диссертационная работа Трутневой Ксении Александровны «Особенности белкового состава и факторы поддержания жизнеспособности покоящихся форм микобактерий», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является научно-квалификационной работой, в которой содержится информация об особенностях белкового состава покоящихся клеток микобактерий для выявления процессов, участвующих в образовании, длительном поддержании в состоянии покоя и выходе из этого состояния, имеющей важное значение для развития биохимической и микробиологической отраслей научного знания, что полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842. Автор диссертации Трутнева К.А. заслуживает присвоение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

«16» 01 2020 г.

Официальный оппонент,  
зав. лаборатории адаптации  
«ИЭГМ УрО РАН» ПФИЦ УрО РАН,  
профессор кафедры  
микробиологии и иммунологии  
ПГНИУ

доктор мед. наук по специальностям  
03.01.04 Биохимия, 03.02.03 Микробиология,  
профессор

 Ткаченко Александр Георгиевич

### Контактные данные официального оппонента:

*Почтовый адрес:* 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии Наук» - филиал Федерального государственного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

*Контактный телефон:* 8(342) 2122159

*Адрес электронной почты:* [agtkachenko@iegm.ru](mailto:agtkachenko@iegm.ru)

Подпись Ткаченко А.Г. удостоверяю:  
Директор «ИЭГМ УрО РАН», чл.-корр. РАН



В.А. Демаков