



федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

(ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Тел: 8 499-193-30-01

Факс: 8 499-193-61-83

№ _____

<http://www.gamaleya.org>

E-mail: info@gamaleya.org

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения «Национальный
исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика
Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения
Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф.
Гамалеи»)



академик РАН, доктор биологический
наук, профессор
А.Л. Гинцбург

«6» февраля 2020 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Трутневой Ксении Александровны на тему
«**Особенности белкового состава и факторы поддержания жизнеспособности
покоящихся форм микобактерий**», представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по научной специальности 03.01.04 Биохимия

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Трутневой Ксении Александровны посвящена изучению процессов, происходящих в клетках возбудителя туберкулеза – *Mycobacterium tuberculosis* при его переходе в состояние покоя, а также потенциальных механизмов поддержания этого состояния.

Туберкулез остается одной из важнейших проблем здравоохранения во всем мире. В Российской Федерации он входит в перечень социально значимых заболеваний, его профилактике и диагностике уделяется значительное внимание, активно ведутся разработки в сфере диагностики и противотуберкулезной вакцинации. Не малую роль в этом играют фундаментальные исследования проблемы и жизненного цикла *M. tuberculosis*. В частности, уникальной особенностью клеток является их способность сохраняться и выживать длительное время в организме хозяина в виде покоящихся форм. Такие покоящиеся формы могут пребывать в организме хозяина в течение десятилетий,

при этом развивается латентная форма туберкулеза, которая может переходить в активную фазу заболевания под влиянием различных факторов.

Исследование покоящихся форм *M. tuberculosis*, вызывающих латентную форму туберкулеза, является одним из приоритетных направлений исследований в данной области. Современный этап развития биохимии располагает различными методами и технологиями, позволяющими выявить возможные биохимические процессы, происходящие в клетках, среди наиболее значимых методов — методы протеомного анализа. С целью изучения механизмов, лежащих в основе способности микобактерий переходить в покоящееся состояние, соискателем Трутневой К.А. был проведен анализ протеомных профилей метаболически активных клеток микобактерий и их покоящихся форм у *M. tuberculosis*, а также его непатогенного быстрорастущего родственного вида *M. smegmatis*.

При этом, основными задачами диссертанта являлись сравнительный анализ протеомных профилей активных и покоящихся клеток *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*, изучение метаболических процессов, сопровождающих эти состояния, а также характеристика процессов, участвующие в защите и стабилизации покоящихся форм микобактерий при воздействии стрессовых факторов внешней среды. Таким образом, диссертационная работа охватывает широкий круг вопросов и представляет собой актуальное исследование, результаты которого могут востребованы в биомедицинской отрасли.

Научная новизна

Данная работа является первой в своем роде произведенной с использованием покоящихся форм *M. tuberculosis* хранившихся после образования в течение 13 месяцев, и перешедших в состояние полной некультивируемости, но способных к реактивации. Протеомный анализ данной культуры *M. tuberculosis* показал, что в покоящихся формах сохраняется значительное разнообразие белков, несмотря на длительное пребывание в состоянии, в котором отсутствуют синтезы. По сравнению с другими подобными моделями латентного туберкулеза *in vitro* выбранная соискателем модель для исследования наиболее значимая, поскольку только она наиболее близка к состоянию клеток, вызывающих латентную форму заболевания.

Также был проведен сравнительный анализ активных и покоящихся клеток *M. smegmatis* — быстрорастущего, непатогенного родственника *M. tuberculosis*. В результате протеомного анализа было обнаружено накопление фермента трегалозосинтетазы, и накопление трегалозы покоящимися формами *M. smegmatis* доказано экспериментально. Ранее считалось, что роль трегалозы в микобактериях сводится исключительно к синтезу клеточной стенки, однако соискателем показано, что трегалоза играет важную роль в выживании микобактерий в состоянии покоя. В данном случае трегалоза играет роль стрессового метаболита, что впервые позволяет провести параллель между спорами грибов и покоящимися формами микобактерий. Перечисленные выше данные и ряд других материалов, рассматриваемых в диссертационной работе, позволяет сделать заключение о ее новизне и высокой научно-практической значимости.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 257 страницах и описана по традиционной схеме. Работа включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, представление результатов и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 305 источника, а также 2 приложения, подтверждающие и раскрывающие суть исследования.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, проведен анализ доступных литературных источников по тематике изучаемой проблемы.

Обзор литературы (глава I) начинается с детального описания объекта исследования. Приведены основные характеристика покоящихся форм патогена и их локализация в организме хозяина-носителя. Далее, в обзоре описываются и сравниваются

известные модели латентной формы туберкулеза как *in vivo*, так и *in vitro*. Автором детально проанализированы известные подходы, приведены сильные и слабые стороны каждого из них. Следующий раздел литературного обзора посвящен характеристике основных известных на данный момент молекулярных механизмов ответа на стрессовые воздействия у микобактерий, которые в результате приводят к снижению метаболизма и переходу в состояние покоя. Заключительная часть литературного обзора содержит сведения о проведенных протеомных исследованиях при моделировании состояния покоя *in vitro*. В заключительной части обзора приведены обобщающие данные в виде таблицы с белки, которые потенциально вовлечены в процесс перехода в состояние покоя у микобактерий согласно литературным данным. Таким образом, материал, собранный и проанализированный автором в главе «Обзор литературы» непосредственно связан с проблематикой проводимого исследования и подтверждает актуальность выбранной темы диссертации.

Обзор литературы написан хорошим языком, современен и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно и подробно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования (глава II). В этой главе соискателем детально изложены методические особенности и приемы работы. Подробно описано оборудование и реактивы, использованные при выполнении работы. Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов с учетом специфики проводимых исследований. Представленная информация позволяет сделать заключение о достоверности полученных результатов, и дает обоснование для представления данной работы к защите по специальности 03.01.04 Биохимия.

Глава III посвящена изложению собственных результатов исследования и их обсуждению. Она включает три раздела, каждый из которых посвящен отдельной задаче исследования. Экспериментальная часть хорошо спланирована, что позволило решить поставленные в ходе работы задачи.

В первом разделе автором приводится качественный и количественный анализ белковых профилей активнорастущих и покоящихся клеток *M. tuberculosis*, а также его модельного объекта *M. smegmatis*. Результаты протеомного анализа позволили предположить, какие биохимические пути остаются функциональными при переходе и нахождении клеток в состоянии покоя. Эта гипотеза подтверждается биохимическими методами на клетках *M. smegmatis*. Основываясь на полученных данных, автор делает вывод, что выявленные белки потенциально активны, и могут участвовать в поддержании жизнеспособности клеток в течение длительного времени. Сравнительный анализ протеомных профилей в динамике показал, что у покоящихся форм *M. smegmatis* увеличивается представленность белков участвующих в синтезе трегалозы и порфирина. Автор экспериментально показывает возрастание количества этих метаболитов при переходе клеток *M. smegmatis* в состояние покоя, а также корреляцию между содержанием внутриклеточной трегалозы и выживанием покоящихся форм микобактерий в течение длительного времени на примере штамма *M. smegmatis* с гиперэкспрессией трегалазы. В ходе работы было показано, что трегалоза, накопленная в процессе перехода в состояние покоя, используется в процессах реактивации как источник глюкозы. Ранее данный механизм был подробно исследован при прорастании грибных спор. Для второго метаболита - порфирина, конкретную роль установить не удалось, однако литературные данные позволяют предположить, что порфирин может выполнять в покоящихся клетках микобактерий защитную функцию.

В разделах «Заключение» и «Выводы» обобщены полученные экспериментальные данные, обоснованы основные положения работы.

Научная и практическая значимость результатов

Диссертационная работа Трутневой Ксении Александровны совмещает в себе фундаментальность исследований и их практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о процессах, происходящих в покоящихся клетках микобактерий. Эти знания необходимы для понимания явления латентности и реактивации туберкулеза. При этом, выявленные белки могут послужить маркерными молекулами для разработки дифференциальных диагностических систем и потенциальными мишенями при создании противотуберкулезных препаратов.

Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации

Использование для исследований репрезентативной выборки образцов, применение классических микробиологических, биохимических и современных молекулярно-генетических и физико-химических методов, подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе К.А. Трутневой, а также выносимых на защиту выводов и положений.

Результаты диссертации рекомендуются для использования в научно-исследовательских учреждениях биотехнологического и образовательного профиля, занимающихся изучением микобактерий, процессов развития туберкулезной инфекции, разработкой профилактических и терапевтических вакцин и противотуберкулезных препаратов, диагностики туберкулеза.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты диссертационной работы отражены в автореферате и публикациях автора. Всего по теме диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, 3 из которых индексируются в базе данных Web of Science, и 7 тезисов докладов российских и зарубежных конференций. Рукопись автореферата соответствует содержанию диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

При критическом рассмотрении диссертационной работы возник ряд вопросов и замечаний:

1. В приложениях 1 и 2 диссертационной работы приведены значения «Score» для идентифицированных белков микобактерий, однако в материалах и методах не указано, при каких значениях скоров идентификация белков считалась надежной/возможной. Кроме того, заглавия таблицы приведены на английском языке, стоило их перевести на русский.
2. Согласно приведенным в приложениях 1 и 2 данным, многие белки были идентифицированы сразу в нескольких белковых образцах (пятнах). При этом, в зависимости от изучаемого состояния клеток количество, а также представленность конкретного белкового пятна может сильно варьировать. Автор не обсуждает в диссертации возможные причины этого явления. В то же время, такие результаты могут быть связаны как с методическими особенностями пробоподготовки (модификации белков при их экстракции или в процессе проведения 2DE), так и с особенностями самих белков (посттрансляционные модификации, изоформы). Для отдельных, наиболее интересных образцов в данном случае целесообразно было бы провести MS/MS идентификацию, такой сравнительный анализ может быть интересным и информативным для понимания процессов, происходящих в клетках.
3. Интересно, что автор использует в исследовании сразу два вида микобактерий, отличающихся между собой скоростью роста и патогенностью для человека. К сожалению, несмотря на то, что белковые профили были получены для обоих видов, многие биохимические параметры (энзиматическая активность и тд.) изучены только на примере *M. smegmatis*. В то же время, автор показывает, что в состояние истинного покоя переходил только *M. tuberculosis*. В связи с этим, аппроксимацию полученных

данных по изменению метаболизма у микобактерий стоит делать с очень большой осторожностью. Кроме того, в рамках работы было бы интересно провести сравнение белковых профилей *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* между собой. В том числе, это позволило бы более полно охарактеризовать разработанную модель.

Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует


Результаты представленной к защите диссертации свидетельствуют о высокой квалификации ее автора – Трутневой Ксении Александровны. Все части исследования изложены в последовательности, отражающей логику реализации конечной цели всей работы – изучить основные факторы, позволяющие микобактериям поддерживать жизнеспособность покоящихся форм. Диссертантом использованы современные и классические методы биохимии, микробиологии и молекулярной биологии. Следует отметить корректность выбранной стратегии исследования и высокий уровень исполнения, что положительно характеризует самого исследователя. Все вышеизложенное свидетельствует о соответствии соискателя К.А. Трутневой ученой степени, на которую она претендует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Трутневой Ксении Александровны на тему «Особенности белкового состава и факторы поддержания жизнеспособности покоящихся форм микобактерий» является законченной научно-исследовательской работой, имеющей научно-практическое значение, выполненной на высоком научно-методическом уровне. Диссертационная работа удовлетворяет требованиям п.9-14 Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства РФ от 24.09.13 №842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Трутнева К. А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории трансляционной биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи») от «23» января 2020 г., протокол № 1.

Отзыв составил
Руководитель лаборатории
трансляционной биомедицины
НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи,
кандидат биологических наук

 Ткачук Артём Петрович

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18.
Тел. 8(499)193-30-01,
email: artem.p.tkachuk@gmail.com

Подпись достоверно!
Начальник отдела кадров.
Н.В. Секушова

6 февраля 2020 г.

