

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Салиной Елены Геннадьевны «Транскриптомика *Mycobacterium tuberculosis* в состоянии покоя и подходы к инаktivации покоящихся клеток», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

Туберкулез входит в первую десятку медицинских причин, которые приводят к летальному исходу, является ведущей причиной смерти среди инфекционных заболеваний, главной причиной смерти от СПИДа, ежедневно уносит больше 4 тыс жизней, а ежегодно – 1,5 миллиона. В 2018 году в мире туберкулезом (ТБ) заболели около 10 млн человек, а у почти 500 000 развился лекарственно устойчивый туберкулез. Россия, являясь страной с высоким бременем ТБ, одобрила глобальную стратегию и цели ВОЗ по ликвидации эпидемии ТБ к 2030 году. Актуальность исследований, направленных на борьбу с ТБ, несомненна.

По современным представлениям около ¼ населения Земли инфицированы МБТ и являются носителями латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ), то есть персистирующего иммунного ответа на антигены МБТ при отсутствии клинических проявлений. Считается, что у лиц с ЛТИ микобактерии находятся преимущественно в дормантном, «дремлющем» состоянии, при котором деления бактерий не происходит и метаболическая активность в которых резко заторможена. Поскольку мишенями для практически всех, существующих на сегодня противотуберкулезных препаратов (ПТП), являются метаболические процессы микобактерий, дормантные формы МБТ фенотипически резистентны к ПТП. У 5-10% носителей ЛТИ в течение жизни возникает реактивация ЛТИ, то есть развитие заболевания. Генетические механизмы формирования дормантности и ресусцитации МБТ, будучи основой для регуляции фенотипа МБТ, к сожалению, изучены очень слабо. Поэтому часть диссертационного исследования Е.Г. Салиной, посвященная транскриптомной характеристике формирования дормантности и выхода из нее, придают рассматриваемой работе чрезвычайно высокую актуальность.

Согласно целому ряду больших когортных исследований и рекомендациям ВОЗ, людям с ЛТИ, находящимся в группах высокого риска, следует проводить превентивную химиотерапию, так как она многократно снижает риск заболеть, и тем самым, заболеваемость и распространение инфекции. Расчеты показывают, что достичь поставленных ВОЗ или руководством России целевых эпидемиологических показателей по туберкулезу, и, тем более, элиминации ТБ, занимаясь лишь лечением пациентов с активным заболеванием, невозможно при любых усилиях и затратах – медицинских, финансовых, организационных и пр. Решить проблему может только эрадикация МБТ у

лиц с ЛТИ. Вместе с тем, ПТП, достаточно эффективных в отношении dormantных МБТ, не существует, и поэтому превентивную химиотерапию приходится проводить длительно – от 3 до 9 месяцев – и при этом использовать весьма токсичные антибиотики. Разработка Е.Г. Салиной ПТП, эффективных в отношении dormantных форм, с эпидемиологической точки зрения особенно актуальна.

Цель работы, сформулированная автором, достаточно емко и конкретно определяет основное направление исследования. Поставленные в диссертационной работе задачи предполагают получение *in vitro* dormantных форм МБТ, изучение транскриптома МБТ при dormantности и при ресусцитации, поиск подходов к созданию соединений, эффективных в отношении dormantных МБТ, оценка эффективности и механизмов действия этих соединений. Используемые автором методы современны, высокотехнологичны и адекватны поставленным задачам.

Скрининг стрессовых факторов позволил Салиной Е.Г. разработать модель индукции dormantности и ресусцитации МБТ *in vitro*, основанной, соответственно, на депривации ионов калия и восполнении его содержания в синтетической питательной среде. При изучении профиля транскрипции клеток *M. tuberculosis* посредством полного транскриптомного секвенирования автор показала, что на стадии сформированной dormantности общий уровень мРНК и транскрипционная активность бактерий резко падают. Несомненным успехом работы стали результаты, полученные автором с помощью попарного сравнения транскриптомов МБТ, находящихся в различных стадиях трансформации в dormantное состояние: в этих экспериментах автору удалось выявить динамические адаптационные изменения активности генома бактерий. В стадии установившейся dormantности в бактериях обнаружен пул стабильных во времени транскриптов, сохраняющихся в отсутствие транскрипции *de novo*. Кроме того, в исследовании обнаружено, что по мере формирования dormantности в МБТ возрастает доля межгенных транскриптов (малых РНК и 5'- и 3'-нетранслируемых областей) и антисмысловых РНК-белок-кодирующих транскриптов. Методом количественной ОТ-ПЦР были выявлены транскрипты малых некодирующих РНК, составлявшие наибольшую долю некодирующего транскриптома покоящихся клеток *M. tuberculosis*, а именно РНК MTS0997, MTS1338 и MTS2823. Диссертант получила штаммы МБТ с гиперэкспрессией MTS0997 и MTS1338 и показала, что в таких штаммах замедление роста происходит наиболее выражено. Хотя делеция генов малых РНК Δ MTS0997 и Δ MTS1338 не вызвала ускорения роста микобактерий в полной среде, результаты с гиперэкспрессией позволили Е.Г. Салиной высказать обоснованное предположение о вероятной роли конкретных

малых некодирующих РНК в замедлении метаболизма МБТ и поддержании дормантности.

Изучение в диссертационной работе процесса ресусцитации продемонстрировало, что активация транскрипции происходит уже в первые часы после восстановления содержания калия в среде и далее нарастает лавинообразно, спустя какое-то время бактерии начинают размножаться и нарастает количество КОЕ в культуре. По мнению автора, высокая скорость отклика на восстановление среды, благоприятной для ресусцитации, свидетельствует об ограниченности традиционного, мишень-ориентированного подхода для поиска лекарственных средств против латентной ТБ инфекции.

Замечательным достижением автора стало открытие двух новых классов перспективных бактерицидных соединений, эффективных в отношении дормантных МБТ – гидроксипиридинтионов и тиенопиримидинов. Целенаправленная модификация синтезируемых структурных производных гидроксипиридинтионов и скрининг их антимикобактериальной активности позволил Салиной Е.Г. обнаружить высокоактивные молекулы, подавляющие рост МБТ при концентрации 50 нг/мл. При этом цитотоксичность данных молекул в отношении соматических клеток оказалась невелика, что позволяет надеяться на появление в будущем новых классов ПТП. Были созданы стабильные производные таких молекул и изучены механизмы их бактерицидного действия. Методом высокопроизводительного секвенирования в диссертационном исследовании было продемонстрировано, что транскрипционный профиль МБТ, инкубировавшихся с изучаемым стабильным производным, аналогичен эффектам двухвалентных ионов меди, и обусловлен энергозависимой селективной интрабактериальной аккумуляцией этих ионов в бактерицидных концентрациях за счет хелатных свойств данного производного по отношению к Cu^{2+} . Исключительно важно, что полученное Cu-связывающее соединение проявляло высокую бактерицидность в отношении дормантных форм. Автором было найдено еще одно соединение – из класса тиенопиримидинов – активное в отношении и вегетативных, и дормантных форм. Полногеномное секвенирование ДНК резистентного клона, полученного под действием найденного соединения, привело к выявлению мутантного гена, кодирующего белок Rv2466с. Далее большой серией элегантных экспериментов было показано, что белок Rv2466с необходим для внутрибактериальной активации соединения, а именно, высвобождения из него бактерицидных концентраций оксида азота и образования метаболита со свободной меркаптогруппой $-\text{SH}$, способной ковалентно связываться с $-\text{SH}$ группами ферментов и других биомолекул, инактивируя их. Таким образом, Е.Г.

Салиной получен блестящий результат по созданию новых ПТП, эффективных в отношении активных и dormantных форм МБТ, и выявлены ключевые механизмы их действия.

Объем проведенных исследований свидетельствуют о том, что результаты работы получены на огромном фактическом материале и достаточны для выполнения поставленных задач. Полученные данные обладают высокой научной новизной. Выводы и положения диссертации, выносимые на защиту, главным содержанием которых являются найденные закономерности динамики транскриптома МБТ при формировании dormantного состояния и выхода из него и поиск перспективных химиопрепаратов, способных оказывать бактерицидное действие на dormantные формы, вполне обоснованы и логически вытекают из представленных результатов. Структура автореферата отражает логику решения поставленных задач. Табличные и графические материалы наглядно иллюстрируют содержание текста. По теме диссертации опубликовано достаточное количество работ.

Принципиальных замечаний к работе нет. Однако есть замечания, касающиеся некоторых формулировок. Первое касается задачи 1, из формулировки которой следует, что используемая модель с депривацией калия будет «адекватно отражать состояние латентной ТБ инфекции в живых организмах». Представляется, что формулировку следует смягчить, так как а) все модели dormantности МБТ *in vitro* отражают ситуацию *in vivo* весьма приближенно, б) дефицит калия при ЛТИ не описан, и степень адекватности данной модели пока не верифицирована, существует множество моделей dormantности МБТ *in vitro*, и все они имеют свою специфику. Более того, существует много линий доказательств, указывающих на то, что при ЛТИ в ситуации *in vivo* популяция МБТ гетерогенна, и в ней присутствуют как клетки, находящиеся в разных стадиях dormantности, так и размножающиеся микобактерии с активным метаболизмом. Второе замечание вызвано утверждением о том, что для элиминации dormantных МБТ наиболее подходят агенты с неселективным действием, направленным на множественные мишени бактерий. Тем не менее, представляется, что перспективы поиска антибактериальных соединений узкой направленности по-прежнему существуют и актуальны, при том, что неселективный подход создает риск разработки соединений с повышенной токсичностью. Наконец, гипотеза о роли «запасенных транскриптов» в реактивации требует большей доказательности.

Оценивая работу Е.Г. Салиной в целом, следует сказать, что она сделана на самом высоком научном уровне и вносит исключительно серьезный, уникальный вклад в

понимание механизмов формирования дормантности и ресусцитации микобактерий и в поиск соединений, способных элиминировать дормантные формы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Автореферат диссертации Салиной Елены Геннадьевны «Транскриптомика *Mycobacterium tuberculosis* в состоянии покоя и подходы к инаktivации покоящихся клеток» отвечает пункту 25 Положения о присуждении ученых степеней. Изложенные в автореферате материалы позволяют заключить, что диссертация Салиной Елены Геннадьевны является законченным научно-квалификационным трудом, который содержит решение важной медико-биологической проблемы и может быть квалифицирован, как крупное научное достижение – создание химиопрепаратов для эрадикации дормантных форм микобактерий на основе выявления фундаментальных молекулярно-биологических закономерностей формирования дормантности; данная работа соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

Заместитель директора по науке

ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук

E-mail: yshschwartz@mail.ru

+7(383) 203-83-58

Яков Шмульевич Шварц

31 марта 2020

Подпись Шварца Якова Шмульевича заверяю

Ученый секретарь

ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулеза» Минздрава России

к.б.н.

Нина Николаевна Курунова



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 630040, г. Новосибирск, ул. Охотская, 81а, Тел.: 7(383) 203-78-25,

e-mail: info@nsk-niit.ru