

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Салиной Елены Геннадьевны
«Транскриптомика *Mycobacterium tuberculosis* в состоянии покоя и подходы к
инактивации покоящихся клеток», представленную на соискание ученой степени доктора
биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Актуальность темы

По данным Всемирной организации здравоохранения, туберкулез занимает первое место в мире по летальности среди инфекций человека и ежегодно уносит около двух миллионов человеческих жизней, кроме того, каждый год регистрируется свыше восьми миллионов новых случаев инфицирования туберкулезной инфекцией. Во многом это объясняется способностью возбудителя, бактерии *M. tuberculosis*, сохраняться в организме человека в виде латентной инфекции с постоянным риском ее активации. В настоящее время, как полагают, около 25% населения Земли латентно инфицированы *M. tuberculosis*, живя с постоянным риском перехода латентной формы в активную. Хотя список высокоактивных противотуберкулезных лекарственных средств за последние годы пополнился благодаря появлению и одобрению к применению в клинической практике таких препаратов как беклавитин и деламанид, эти препараты в отношении латентной формы инфекции являются неактивными. Несмотря на то, что окончательной ясности в понимании природы латентного туберкулеза пока не удалось достичь, известно, что латентная форма инфекции обусловлена способностью возбудителя *M. tuberculosis* переходить в организме хозяина в состояние покоя и «некультивируемости», сопровождающееся снижением уровня метаболической активности патогена, следствием чего является его выраженная толерантность к антибактериальным препаратам, эффективным в отношении активной формы туберкулеза.

Очевидно, что изучение транскриптома клеток *M. tuberculosis*, переходящих в состояние покоя и ревертирующих в метаболически активное состояние, позволит выявить метаболические реакции, ответственные за эти процессы и, таким образом, обнаружить потенциальные молекулярные мишени «антилатентных» лекарственных препаратов, что, в свою очередь, позволит сформулировать подходы к поиску новых лекарственных соединений, эффективных в отношении латентной формы туберкулезной инфекции. Таким образом, тема работы Салиной Е.Г. «Транскриптомика *Mycobacterium tuberculosis* в состоянии покоя и подходы к инактивации покоящихся клеток» является актуальной как с научной, так и с практической точек зрения.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Изложение литературных данных, методов и экспериментальных результатов в диссертационной работе Салиной Е.Г. хорошо структурировано, подразделы отражают порядок проведения исследований и логически связаны друг с другом.

Во введении автор отмечает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи исследования, описывает научную новизну, теоретическую и практическую ценность работы, приводит положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор диссертации посвящен описанию явления латентности туберкулезной инфекции и форм *M. tuberculosis*, вызывающих ее, приводятся основные характеристики покоящихся форм патогена, дано описание и сравнение моделей латентного туберкулеза, разработанных *in vivo* и *in vitro*, и описанных в научной литературе. Отдельное внимание уделено характеристике двух основных подходов к изучению транскриптомов – гибридизации на микрочипах (microarray) и секвенированию РНК (RNA-seq). Рассмотрено явление реактивации латентного туберкулеза и факторы, влияющие на успешное протекание этого процесса. В заключительной части литературного обзора подробно освещена проблема поиска эффективных лекарственных средств против латентной туберкулезной инфекции, обусловленная их существенной фенотипической устойчивостью к стандартным противотуберкулезным препаратам, возникающей из-за существенно сниженной метаболической активности возбудителя *M. tuberculosis*. Кроме того, автор указывает на необходимость разработки адекватной модели покоящегося состояния *M. tuberculosis in vitro*, которая преодолевала бы ограничения уже существующих моделей покоя, и служила бы надежным инструментом для тестирования лекарственных средств «антилатентной» направленности. Обзор написан хорошим языком, дает необходимую информацию, опираясь на последние литературные данные. По моему мнению, после небольшой переработки обзор может быть напечатан в одном из периодических изданий.

Глава «Материалы и методы» содержит полное описание арсенала методов, использованных в работе, изложенных достаточно подробно для воспроизведения результатов, представленных в главе «Результаты и обсуждение», которая посвящена собственным экспериментальным результатам.

Первая часть главы «Результаты и обсуждение» содержит описание собственной экспериментальной модели перехода *M. tuberculosis* в покоящееся состояние в условиях недостатка калия *in vitro* и характеристику полученных покоящихся клеток. Приведена оценка степени адекватности клеток, полученных в данной модельной системе, клеткам *M.*

tuberculosis, персистирующим в макроорганизме. Следует отметить, что предложенная клеточная система достаточно хорошо моделирует покоящееся состояние *M. tuberculosis*, однако было бы упрощением сводить переход из активного состояния в латентное только за счет изменений концентраций ионов калия. Надо полагать, что в условиях инфекции организма *M. tuberculosis* этот переход должен осуществляться в результате целого каскада событий, в который вовлечены факторы как микобактерии, так и организма-хозяина. Таким образом созданная модель, безусловно очень удачная и удобная, отражает этот процесс только в общих чертах.

Вторая и третья части раскрывают особенности профиля транскрипции клеток на различных этапах их перехода в состояние покоя и «некультивируемости», и реверсии к состоянию роста и активного деления, соответственно. Вводятся понятия «запасенные транскрипты» для обозначения немногочисленных стабильных транскриптов, сохраняющихся в покоящихся клетках и, вероятно, используемых далее в процессе реактивации в метаболически активное состояние, и «транскрипционный взрыв» – для обозначения явления бурной активации транскрипции в клетках *M. tuberculosis*, происходящей немедленно после переноса клеток в сбалансированную питательную среду, что дополнительно подчеркивает глубину и степень транскрипционной и метаболической инертности покоящихся клеток микобактерий, получаемых в разработанной системе *in vitro*. Четвертый раздел данной главы содержит данные по сравнительному анализу устойчивости покоящихся клеток, получаемых в различных моделях *in vitro*, к применяющимся в клинической практике противотуберкулезным препаратам. Показано преимущество покоящихся «некультивируемых» клеток, получаемых в модели дефицита калия и разработанной в ходе настоящей работы, перед покоящимися клетками, получаемыми в моделях *in vitro*, опубликованных ранее. Пятый, шестой и седьмой разделы главы «Результаты и обсуждение» посвящены изучению бактерицидной активности производных нитротиазолов, тиазолидинов и триазеноиндолов в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis*. Показано, что соединения, относящиеся к данным классам, характеризуются выраженной бактерицидной активностью в отношении покоящихся *M. tuberculosis*, уничтожая не менее 90% популяции.

Восьмой и девятый разделы данной главы посвящены изучению двух классов оригинальных химических соединений с неизвестным механизмом действия, обнаруженных в ходе данной работы и проявляющих высокую бактерицидную активность в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis*: 1-гидрокси-5-R-пиридин-2(1H)тионов и тиенопиримидинов. Обнаружено, что 1-гидрокси-5-R-пиридин-2(1H)тионы способны аккумулировать ионы Cu^{2+} в клетках *M. tuberculosis* за счет образования стабильных

комплексов с ними и их транспорта в клетку с дальнейшим высвобождением Cu^{2+} , обладающих неселективным антибактериальным действием. Установлено, что производные класса тиенопиримидинов являются пролекарствами и подвергаются метаболической трансформации в клетках патогена с образованием оксида азота NO и метаболита с высокореактивной $-\text{SH}$ группой, также способных неселективно ингибировать широкий спектр мишеней.

Все результаты диссертационной работы получены с применением надежных и эффективных экспериментальных методов. Выводы, сформулированные в диссертации, логично вытекают из результатов проведенных исследований и являются в полной мере обоснованными. Таким образом, 5 положений, сформулированные диссертантом по результатам диссертационной работы и выносимых на защиту, полностью обоснованы и подтверждены экспериментальными результатами.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Проведенные экспериментальные исследования полностью оригинальны, достоверность результатов подтверждена подробным изложением надежных и эффективных экспериментальных методов, достаточным для воспроизведения полученных результатов. Выводы, сформулированные в диссертации, соответствуют цели и задачам исследования, подтверждаются его результатами и являются научно обоснованными и практически значимыми. Результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых международных и российских журналах.

Научная и практическая значимость полученных результатов

В работе Салиной Е.Г. впервые методом RNA-seq был проанализирован транскриптом покоящихся клеток *M. tuberculosis*, обладающих свойством обратимой «некультивируемости», обнаружена глобальная репрессия транскрипции в клетках патогена в этом состоянии. При этом в покоящихся «некультивируемых» клетках найдены немногочисленные стабильные транскрипты, названные автором «запасенными транскриптами». При изучении профиля транскрипции клеток *M. tuberculosis*, реактивирующих из состояния покоя в состояние активного роста и деления, обнаружено явление «транскрипционного взрыва» – лавинообразной активации транскрипции десятков генов, в первую очередь, кодирующих ферменты репарации поврежденных структур клетки *M. tuberculosis* и биосинтеза жирных кислот. На основании полученных результатов

Салиной Е.Г. предложена стратегия уничтожения персистирующих клеток патогена путем неселективного ингибирования множественных мишеней антимикробных агентов, в соответствии с предложенной стратегией в ходе работы обнаружены и охарактеризованы производные классов 1-гидрокси-5-R-пиридин-2(1H)тионов и тиенопиримидинов, обладающие бактерицидной активностью в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis* и являющиеся оригинальными химическими соединениями, не присутствующими в базах данных и библиотеках соединений. Изучен механизм их действия, показано, что производные 1-гидрокси-5-R-пиридин-2(1H)тионов обеспечивают аккумуляцию в клетках *M. tuberculosis* ионов Cu^{2+} , проявляющих антимикробные свойства; производные класса тиенопиримидинов, являющиеся пролекарствами, претерпевают метаболические превращения в клетке с выделением оксида азота NO и образованием –SH групп, взаимодействующих с широким спектром ферментов микобактерий туберкулеза. Предложенная Салиной Е.Г. стратегия поиска соединений, эффективных в отношении латентной инфекции, подтверждена экспериментально и может быть использована не только для разработки эффективных лекарственных средств против латентного туберкулеза, но и против других микробных патогенов в состоянии метаболической инертности.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Разработанная автором стратегия поиска лекарственных соединений, активных в отношении латентной ТБ инфекции, основанная на их способности к неселективному ингибированию множественных мишеней патогена, приводящему к высокой антимикробной активности, может являться основой для разработки эффективных лекарственных средств против латентного туберкулеза и других персистирующих инфекций.

Содержание диссертации и ее завершенность

Объем рукописи диссертации адекватен проведенному диссертантом исследованию и составляет 400 страниц. Материал диссертации изложен по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов, результатов собственных исследований и обсуждения этих результатов, содержит заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 327 литературных источников. В конце диссертации в виде приложений приведены результаты транскриптомного анализа клеток *M. tuberculosis* в процессе их перехода в состояние покоя,

при реактивации в состояние активного роста, а также анализ профилей транскрипции клеток *M. tuberculosis*, полученных в присутствии двух изучаемых в данной работе оригинальных классов соединений: 1-гидрокси-5-*R*-пиридин-2(1*H*)тионов и тиенопиримидинов. В обзоре литературы использованы как основополагающие, так и недавние публикации, в подавляющем большинстве – зарубежных авторов. Описываемое в работе Салиной Е.Г. научное исследование является полностью завершенным, автореферат диссертации и опубликованные печатные работы полностью отражают содержание диссертации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом

В целом диссертация Е.Г. Салиной представляет собой первоклассный научный труд, подводящий итоги многолетней работы автора. Работа открывает новые подходы к исследованиям биохимических основ взаимопревращений активной и латентной форм туберкулеза. Предложенная модель покоящихся клеток, безусловно, найдет самое широкое применение как в исследованиях биохимии молекулярных механизмов этих взаимопревращений, так и при скрининге препаратов, действующих на покоящиеся формы микобактерий, что имеет огромное практическое значение. Недостатки работы сводятся к мелким небрежностям в оформлении и совершенно меркнут пред ее достоинствами.

Заключение

Диссертационная работа Салиной Елены Геннадьевны «Транскриптомика *Mycobacterium tuberculosis* в состоянии покоя и подходы к инаktivации покоящихся клеток», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия по своему содержанию, актуальности выбранной темы, уровню проведенных исследований, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их научной и практической значимости в полной мере соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, Салина Е.Г, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
доктор химических наук по специальности 03.01.03 Молекулярная биология, профессор,
академик РАН

Кочетков С. Н.

119991 г. Москва, ул. Вавилова,

Телефон: 8(499)135-05-90

Электронная почта: snk1952@gmail.com

Подпись Кочеткова С.Н. заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
к.в.н.



Бочаров А.А.

«12» мая 2020 г.