

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу 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

Диссертационная работа Салиной Е.Г. посвящена исследованию механизмов жизнедеятельности патогенной бактерии *Mycobacterium tuberculosis* на разных этапах ее существования. Эта бактерия вызывает туберкулез, который занимает первое место среди инфекций человека по числу летальных исходов, что объясняется способностью *M. tuberculosis* длительный период времени находиться в организме хозяина в латентном состоянии. В этом случае *M. tuberculosis* невосприимчива к воздействию антибактериальных агентов. В благоприятных условиях клетки возбудителя могут «выстрелить», вызывая острую форму заболевания. Очевидно, что характеристика покоящихся форм *M. tuberculosis* и путей активации «затаившейся» инфекции, предпринятая Салиной Е.Г., представляет собой не только научную значимость. Такая информация необходима для поиска новых антибактериальных препаратов, эффективных именно против латентной формы туберкулеза, которые в настоящее время почти отсутствуют. Практическая значимость работы заключается в «скрининге» 10 классов органических соединений в попытке «нащупать» наиболее перспективные из них для решения этой задачи. Таким образом, тема диссертационной работы Салиной Елены Геннадьевны, несомненно, является актуальной для научно-технического развития в данной области знаний и соответствует тенденциям развития мировой науки.

Анализ структуры диссертационной работы Салиной Е.Г. «Транскриптомика *Mycobacterium tuberculosis* в состоянии покоя и подходы к инактивации покоящихся клеток» свидетельствует о том, что она написана в соответствии с традиционным планом и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе методов, результатов собственных исследований и обсуждения этих результатов, а также содержит обобщающее заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 327 источников. Работа изложена на 400 страницах печатного текста и проиллюстрирована 16 таблицами и 52 рисунками. В конце диссертации приводятся приложения в виде таблиц с описанием результатов полнотранскриптомного анализа клеток *M. tuberculosis* в

состоянии покоя и «некультивируемости», в процессе их реактивации в состояние роста и деления, а также транскриптомы *M. tuberculosis*, полученные при воздействии на клетки гидроксипиридинтионов и тиенопиримидинов – потенциальных антибактериальных препаратов.

Глава 1 «Введение» раскрывает актуальность выбранной темы, включает формулировку целей и задач исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, информацию о личном вкладе автора в представленную работу. В ней сформулированы нерешенные до данного исследования проблемы по созданию покоящихся и «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis*, характеристике процессов метаболизма, связанных с этим состоянием и выходом из него, поиску потенциальных мишеней для лекарственных препаратов.

В главе 2, посвященной обзору литературы по изучаемой проблеме, дан подробный сравнительный анализ существующих моделей покоя *M. tuberculosis*, разработанных *in vitro* и *in vivo*, отражены современные методы получения и анализа бактериальных транскриптомов, а также рассмотрены механизмы адаптации клеток микобактерий к состоянию персистенции и процессу реактивации покоящихся клеток в состояние роста и деления. Подчеркнуто, что ни одна из уже известных моделей состояния покоя *M. tuberculosis in vitro* не иллюстрирует состояние латентной инфекции в живом организме достаточно объективно, главным образом из-за отсутствия признака «некультивируемости». Исходя из этого, обосновывается целесообразность разработки новой модели покоящегося состояния *M. tuberculosis*. Такая модель необходима для поиска высокоактивных в отношении латентной инфекции антибактериальных препаратов.

В главе 3 «Методы исследования» приведена информация о способах культивирования штаммов *M. tuberculosis* в разных условиях, аналитических методах, использованных для характеристики скорости обменных процессов, протекающих в исследуемых клетках, приводится описание подходов к получению микобактериальных транскриптомов. Предложены оригинальные приемы сравнения данных транскриптомного анализа и оценки доли мРНК в транскриптоме исследуемых образцов, разработка которых потребовалась в связи с низким уровнем транскрипционной активности покоящихся клеток. Следует отметить широкий диапазон современных методов, использованных для установления механизма антибактериального действия в

отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis* двух классов органических соединений - гидроксипиридинтионов и тиенопиримидинов.

В главе 4 «Результаты и обсуждение» можно выделить следующие смысловые части: 1) создание модели покоящегося состояния *M. tuberculosis*; 2) анализ транскриптома клеток в состоянии покоя и в процессе реактивации; 3) поиск низкомолекулярных соединений, способных ингибировать латентную туберкулезную инфекцию.

На первом этапе работы Салиной Е.Г. предложено эlegantное и надежное решение получения покоящихся клеток *M. tuberculosis*, заключающееся в создании дефицита ионов калия в питательной среде. Однако, эта кажущаяся простота предложенного решения обусловлена наблюдательностью автора, и анализом большого количества литературных данных. Затем впервые были охарактеризованы РНК-транскрипты покоящихся клеток *M. tuberculosis* в состоянии «нулевой культивируемости». Обнаружено глобальное снижение количества транскриптов генов, кодирующих белки, ответственные за метаболизм клеток. С другой стороны, обнаружен пул стабильных во времени транскриптов, большинство из которых представляют собой малые некодирующие РНК. В настоящее время их важная роль в адаптации бактерий к стрессовым условиям широко обсуждается мировой научной общественностью. Салина Е.Г. убедительно продемонстрировала, что эти «запасенные транскрипты» нужны для выхода клеток *M. tuberculosis* из состояния покоя. В условиях *in vitro* изучены особенности транскриптомов «оживающих» клеток, детально охарактеризованы белки, вовлеченные во все стадии этого процесса. Показано, что характер активации транскрипции после переноса покоящихся клеток в свежую полноценную среду является лавинообразным. Следует отметить, что данные транскриптомного анализа характеризуются высокой воспроизводимостью. Коэффициент корреляции внутри биологических повторов превышал 85%.

Заключительную часть главы 4 можно отнести к развитию прикладных аспектов исследования бактерии *M. tuberculosis*, так как она направлена на поиск антибактериальных препаратов. Важно подчеркнуть, что эти препараты должны обладать эффективностью в отношении покоящихся форм *M. tuberculosis*, у которых мишени действия антибиотиков находятся в неактивном состоянии. Салина Е.Г. предложила новую стратегию поиска «антилатентных» соединений. Такие соединения должны неспецифично ингибировать одновременно несколько мишеней патогена. На основании этой стратегии, автором было протестировано два класса химических соединений

(гидроксипиридинтионы и тиенопиримидины), не представленных в библиотеках или базах данных. Показано, что они характеризуются значительной антибактериальной активностью против покоящихся клеток *M. tuberculosis*. Обнаружено, что механизм действия производных класса гидроксипиридинтионов основан на их способности аккумулировать и транспортировать в микробную клетку ионы меди, антибактериальные свойства которых реализуются за счет неселективной модификации биомолекул патогена. Известно, что комплексные соединения с ионами меди, особенно в микромолярных концентрациях, вызывают существенную деградацию ДНК. Тем не менее, основываясь на данных литературы, автор предполагает и наличие других мишеней. Производные класса тиенопиримидинов подвергаются превращениям в клетке бактерии с образованием оксида азота и реакционноспособных тиольных групп.

Работу завершает раздел «Заключение», обобщающий все полученные данные. Выводы объективно отражают суть представленных исследований и соответствуют поставленным экспериментальным задачам.

К диссертационной работе имеется ряд замечаний.

- 1) В главе 3 «Методы исследования» следовало указать, где и какими силами выполнялся транскриптомный анализ и обработка полученных данных. Эта составляющая работы является очень трудоемкой и должна была найти отражение в главе 3. При описании экспериментов, связанных с методом ПЦР, не приводятся последовательности используемых праймеров (только в одном случае дается ссылка на литературный источник). Вместе с тем, эта информация необходима для воспроизведения полученных результатов в других научных группах.
- 2) В главе 4 «Результаты и обсуждение» (разделы 4.1) было бы уместным указать насколько «физиологична» модель покоя *M. tuberculosis*, вызванная дефицитом ионов калия в питательной среде. Другими словами, может ли встречаться дефицит ионов калия у персистирующих клеток *M. tuberculosis in vivo*. Также в тексте раздела 4.2 отсутствует информация, касающаяся анализа транскрипционных изменений, вызываемых дефицитом ионов калия в клетках *M. tuberculosis* логарифмической и стационарной фазы роста.
- 3) В главе 4 (раздел 4.7) на рис. 32 (стр. 186) содержатся ошибки в приведенных структурных формулах соединений (отсутствуют три линейно расположенных атома азота).
- 4) В главе 4 (раздел 4.8) Салина Е.Г. исследует серию предложенных ей для работы д.фарм.н. Макаровым В.А. производных гидроксипиридинтионов с различными

заместителями в положении 5 пиридинового кольца. Автор пишет, что «введение таких заместителей, как Н и галогены, а также заместителей алифатического ряда в это положение, приводит к снижению или полному отсутствию активности соединений в отношении *M. tuberculosis*, тогда как наличие в этом положении электроноакцепторных заместителей, таких как этоксикарбонил, трифторметил и т.д., наоборот, обуславливает ее увеличение». Поскольку далее предлагаются возможные химические превращения изучаемых соединений, то хотелось бы понять, влияет ли природа заместителя в положении 5 пиридинового кольца на эффективность образования ими комплекса с ионами двухвалентной меди в культуральной среде (рис. 39, стр. 202), или это влияние ограничивается стадией отщепления имидокарбаматного фрагмента в положении 2 пиридинового кольца (рис. 35, стр. 193).

5) Имеется ряд мелких недочетов (в тексте вместо ионов калия и меди часто фигурируют химические элементы, на рис. 5 (панель А) в автореферате и соответствующем ему рис. 9 в диссертации не указано, чему соответствуют дорожки геля, имеются орфографические ошибки, не совсем удачно форматирование диссертации, увеличивающее ее объем).

Высказанные замечания не снижают общий чрезвычайно высокий уровень представленной работы и в большой степени свидетельствуют о сложности выбранного объекта изучения. Салиной Е.Г. создано новое направление исследований, заключающееся в детальной биохимической характеристике молекулярного аппарата патогенных бактерий, находящихся в различных состояниях в зависимости от условий окружающей среды. Полученные автором результаты могут быть использованы для развития работ в этой области в Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки: Институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте биологии гена РАН, ФГУП «ГосНИИгенетика», Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ и в ряде других научно-исследовательских институтов биохимического и молекулярно-биологического профиля.

По теме диссертации опубликовано 18 статей в международных и российских научных рецензируемых журналах и более 20 тезисов докладов конференций и статей в сборниках.

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

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 своему содержанию, уровню проведенных исследований, актуальности выбранной темы, 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.

Главный научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот
Научно-исследовательского института физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
доктор химических наук, профессор

Кубарева Елена Александровна



119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 40

Телефон: +7(495)939-54-11

Электронная почта: kubareva@belozersky.msu.ru

Подпись Кубаревой Е.А. удостоверяю.

Директор Научно-исследовательского института физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
академик РАН



«12» мая 2020 г.