

ОТЗЫВ
**о диссертационной работе Салиной Елены Геннадиевны
«Транскриптомика *Mycobacterium tuberculosis* в
состоянии покоя и подходы к инактивации покоящихся
клеток», представленной на соискание ученой степени
доктора биологических наук.**

Конец 20 и начало 21 века ознаменовались ростом заболеваемости туберкулезом во всем мире, включая и высокоразвитые страны: каждый год регистрируют 8 млн. новых случаев этого тяжелого заболевания, около 3-х млн. человек каждый год умирает от туберкулеза. Изменился и характер течения болезни: с каждым годом наблюдается рост случаев первичного туберкулеза, вызванного штаммами, устойчивыми к нескольким антибактериальным препаратам. Лечение таких больных невозможно по обычным схемам антибиотикотерапии, инфекционный процесс протекает тяжело и скоротечно. Еще более высоким уровнем распространения характеризуется латентная форма ТБ: по данным ВОЗ, около 25% населения Земли латентно инфицированы возбудителем туберкулеза – бактерией *Mycobacterium tuberculosis*, живя с постоянным риском перехода латентной формы в активную. Активация латентной инфекции происходит в течение жизни примерно у 5% инфицированных, и связана, по всей вероятности, с возрастными и экзогенными нарушениями в работе иммунной системы. Несмотря на то, что исследования, связанные с изучением туберкулеза, будь то изучение инфекционного процесса, разработка вакцинных препаратов, или разработка молекулярно-генетических методов экспресс диагностики, определения лекарственной устойчивости и типирования штаммов микобактерий интенсивно развиваются и финансируются, они не теряют своей актуальности и по сей день.

Следует отметить значительный успех в разработке новых противотуберкулезных лекарственных препаратов, альтернативных антибиотикам, с оригинальными мишениями, разрабатываемым в разных

странах: однако препараты, высокоактивные в отношении вегетативных клеток *M. tuberculosis*, оказались неэффективными в отношении латентной инфекции.

В этой связи, представленная диссертационная работа Салиной Елены Геннадиевны по изучению форм и механизмов протекания латентной инфекции за счет образования покоящихся форм туберкулезного микробы и разработке на основе полученных данных принципа поиска лекарственных средств, эффективных против таких покоящихся форм с перспективой борьбы против латентной формы туберкулезной инфекции, является несомненно актуальной.

Надо сказать, что состояние покоя (образование некультивируемых форм (НФ) и персистеров) у микробов широко распространенный феномен, используемый бактериями для того, чтобы избежать стрессов окружающей среды, включая антибиотики. Такой интригующий механизм толерантности к антибиотикам привлекает особое внимание к роли покоящихся клеток бактерий в инфекционной патологии человека, особенно в отношении повторяющихся хронических инфекций. Но достаточно трудно при хронических инфекциях показать наличие некультивируемых форм. Способность к образованию НФ показана практически для всех видов патогенных и непатогенных микроорганизмов, но эти исследования выполнены или в лабораторных условиях или их существование обнаружено в окружающей среде. Единственным Примером на сегодняшний день наличия НФ *in vivo*, т.е. в макроорганизме, являются микобактерии. Латентный туберкулез – это результат плотных грануллем, содержащих микобактерии, находящиеся в некультивируемом состоянии (НС). Надо сказать, что оппонент, т.е. автор этого отзыва, 20 лет назад в течение 10 лет очень интенсивно занималась некультивируемыми формами бактерий и именно в это время состоялось наше знакомство с группой А.С. Капрельянца. Надо сказать, что мы испытывали достаточные трудности в работе с этим вновь открытым феноменом существования бактерий и самим

доказательством его существования. Поэтому, сейчас читая с большим интересом рецензируемую работу, я испытываю чувства, которые могут быть описаны одной фразой, а именно, названием известного фильма «Назад в будущее». Такие чувства связаны с тем, что 20 лет назад не было методической базы, используя которую, автору удалось проделать такую грандиозную работу и получить важные теоретические и практические результаты.

Диссертация Салиной Е.Г. построена по традиционному плану и состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов исследования», «Результатов и обсуждения», «Заключения», «Выводов», «Приложения» на 100 стр., где представлены полные транскриптомы микобактерий, находящихся в различных физиологических состояниях, и «Списка цитируемой литературы».

Во «Введении» достаточно полно определена проблематика исследований и четко сформулированы цель и задачи диссертационной работы. А целью работы автора было изучить механизм перехода клеток в некультивируемое состояние с тем, чтобы используя полученные данные, найти мишени воздействия на некультивируемые формы с целью предотвращения их перехода в активные формы, т.е. воздействия на 25% латентного и 5% активирующегося из него активного туберкулеза.

В «Обзоре Литературы» подробно представлены современные данные о покоящемся состоянии клеток микобактерий, латентной туберкулезной инфекции и о ее реактивации, то есть о переходе в активную форму инфекции. Поскольку латентная форма инфекции имеет большое значение в патогенезе туберкулезной инфекции и интенсивно изучается, большая часть обзора посвящена обсуждению моделей латентного туберкулеза, разработанных как для экспериментов *in vitro*, так и *in vivo*. Автором тщательно анализируются условия этих моделей, их преимущества и недостатки. Адекватная модель покоящегося состояния *in vitro* – это основа получения достоверных результатов. Именно поэтому, на основании этого анализа и с учетом

недостатков описанных моделей автором была разработана собственная модель получения НФ микобактерий, в которой можно было проследить и экспериментально зафиксировать последовательные этапы начального, среднего и окончательного перехода бактерий в НС. Это большая удача автора и значительный результат работы.

Большой интерес обзора представляет и раздел «Методы изучения бактериальных транскриптомов». В этом разделе автором подробно описываются самые современные методы анализа генома, а именно, анализа иРНК, наличие которой определяет работу генов в желаемый для исследователя момент. Благодаря полному секвенированию геномов микроорганизмов в автоматическом режиме можно определить и наличие в культуре иРНК, которая определяется, если ген экспрессируется. В обзоре автором рассматриваются различные варианты этой методологии, так что его можно использовать как методическое пособие при выполнении таких работ. На самом деле РНК – это короткоживущие молекулы и работать с ними довольно сложно и требуется достаточно большое количество исследуемого материала. Надо отдать должное автору, которая использовала эти сложные и трудоемкие методы на ограниченном количестве материала, т.к. работала на покоящихся, некультивируемых формах, которые трудно получить в высокой концентрации. Часть обзора посвящена и процессу реактивации латентного туберкулеза как в лабораторных моделях так и на биологических моделях – мышах и приматах. Обзор написан очень подробно, профессионально, представляет большой интерес для широкого круга микробиологов и инфекционистов, поскольку патогенез туберкулеза остается невыясненным.

Список цитируемой литературы включает 327 ссылок, большая часть которых представлена работами последних лет – с 2012 по 2019 год. Очень приятно, что ссылки представлены в алфавитном порядке и цитируются в обзоре с указанием фамилий авторов, а не цифрами, как это делается часто в диссертациях. Это добавляет уважения к авторам работ, облегчает чтение обзора и знакомство с цитируемыми работами.

В разделе «Материалы и методы» содержится конкретное описание всего арсенала современных методов анализа транскриптомов, а также микробиологических и микроскопических методов визуализации разных стадий некультивируемого состояния и его количественного учета, биохимических методов определения активности АТФ и ДФИ-редуктаз, молекулярных методов ПЦР, клонирования и очистки белков, определение внутриклеточной активности различных соединений и метаболической трансформации испытываемых соединений в клетках микобактерий. Описание методов исследования занимает 18 страниц текста диссертации, что свидетельствует о тщательности автора и позволяет желающим воспроизвести описанные сложные методики.

Раздел «Результаты и обсуждение» начинается с описания разработки модели покоящего состояния *Mycobacterium tuberculosis*, благодаря которой автору и удалось проделать столь гигантскую работу. Несмотря на то, что самим автором в «Обзоре литературы» были описаны модели некультивируемого состояния, но, по мнению автора они имели определенные недостатки, для достижения поставленной цели, автором была разработана собственная модель. И, несмотря на кажущуюся легкость получения некультивируемых форм при недостатке калия в среде культивирования, автор затратила несколько лет на создание условий, отвечающих необходимым автору диссертации требованиям, а именно: свойства покоящихся клеток максимально приближены к свойствам возбудителя при латентной инфекции в организме; сниженная способность культивироваться на стандартных средах; низкий уровень метаболической активности, резистентность к противотуберкулезным препаратам, морфологические отличия от активных клеток; и самое главное – возможность относительно быстрой рекультивации таких клеток при восстановлении калия в среде. Основной претензией к моделям получения некультивируемых форм служит возможность сохранения в популяции минимального количества живых клеток, за счет которых затем и случается рекультивация. Должна сказать, что

здесь были сделаны все возможные подстраховки, включая использование минимальных концентраций антибиотиков, титрование культур методом конечных разведений и определением наиболее вероятного количества жизнеспособных, но некультивируемых клеток, чтобы быть уверенным в том, что получаемая популяция состоит только из некультивируемых клеток, сохранивших свой жизненный потенциал. Полученная модельная система характеризовалась хорошей воспроизводимостью и послужила залогом успешно выполненной Селиной Е.Г. гигантской работы по анализу транскрипционной активности культуры микобактерий в различных физиологических состояниях.

На начальном этапе исследования транскрипционной активности покоящихся НК клеток *M. tuberculosis*, полученных в условиях дефицита калия (то есть в условиях модели), был применен метод гибридизации РНК на микрочипах (microarray technique). Транскрипционный профиль клеток *M. tuberculosis* в состоянии покоя автор изучала в точке с минимальной культивируемостью 10^3 кл/мл, достигнутой после 41-дневной инкубации их в условиях дефицита ионов K^+ *in vitro*, и сравнивали с транскрипционным профилем клеток логарифмической фазы роста (4 дня культивирования), выращенными на среде Сотона нормального состава. Это позволяло провести исследование с большей достоверностью, т.к. масса некультивируемых клеток невелика.

В результате этого сравнения в покоящихся НК клетках *M. tuberculosis* было обнаружено 830 генов с повышенной экспрессией и 864 гена со сниженной экспрессией. 100 наиболее и 100 наименее экспрессирующихся в состоянии покоя генов представлены в *приложении 1*. В ходе анализа дифференциально экспрессирующихся генов, выявленных в состоянии покоя («некультивируемости»), было обнаружено, что в покоящихся НК бактериях *M. tuberculosis* оказалась существенно подавленной транскрипция ферментов-участников центральных метаболических путей, в том числе, гликолиза и глюконеогенеза. В частности, был снижен уровень транскрипции

таких генов как: *pgi*, кодирующего глюкозо-6-фосфат изомеразу, *fba* кодирующего фруктозо-бифосфатальдолазу, *tpi* – триозофосфатизомеразу и еще 860 генов. Надо сказать, что 20 лет назад при слабой попытке из-за отсутствия методической базы и метода ОТ-ПЦР изучить дифференциальную экспрессию генов в некультивируемых формах сальмонелл мы также обнаружили снижение уровня экспрессии гена *pgi*, в некультивируемых формах, что говорит о том, что энергетический метаболизм клетки в состоянии покоя находится на экономном низком уровне. В результате этого раздела работы, автор сделала вывод, что в состоянии минимальной культивируемости (10^3 кл/мл) покоящиеся клетки *M. tuberculosis* сохраняют ограниченный набор активных метаболических процессов. Этот «минимальный метаболизм», вероятно, обеспечивает сохранение жизнеспособности клеток в покое и их дальнейшую реактивацию в метаболически активное состояние при наступлении благоприятных условий, давая тем самым возможность обнаружения возможных молекулярных мишеней *M. tuberculosis* и воздействия на них для уничтожения клеток в состоянии покоя.

Далее, автор приступика к выполнению грандиозной работы по транскриптомному анализу популяции покоящихся НФ микобактерий с полной утратой способности к образованию колоний. Несмотря на 100% «некультивируемость» полученной популяции, автором ранее было доказано, что жизнеспособные и готовые к реактивации клетки в данной популяции также были представлены в значительной концентрации (около 10^7 кл/мл), что составляло не менее 30% от исходной популяции клеток до начала их перехода в покой. Несмотря на это, автору в подготовке к каждому эксперименту по изучению транскриптомов разных состояний культуры – начальной стадии (10 суток культивирования), средней стадии(25 суток культивирования) и конечной стадии(35суток культивирования) перехода в состояние покоя приходилось долго ждать и работать с большими объемами для достоверного выхода РНК. Для этого анализа был применен метод

высокопроизводительного секвенирования (RNA-seq) в динамике. Метод RNA-seq обладает рядом преимуществ по сравнению с гибридизацией на чипах и преодолевает ряд ограничений этого метода: он позволяет определить границы транскриптов с точностью до одного нуклеотида, а также дифференцировать собственно транскрипты и некодирующие РНК, включая антисмыловые транскрипты и малые РНК, давая более корректное отображение профиля транскрипции. Несмотря на название, в методе RNA-seq секвенируется, конечно, не сама РНК, а кДНК, построенная по матрице РНК. Для амплификации кДНК проводят ПЦР с праймерами к адаптерам на концах фрагментов. Секвенирование было проведено на секвенаторе NovaSeq 6000 (Illumina). Результаты этой работы представлены на 100 страницах 5-ти приложений и подробно проанализированы диссертантом.

Надо сказать, что в результате этой колоссальной работы тем не менее не было выявлено каких-то генов, а лучше было бы одного гена, характер экспрессии которого мог бы указывать на его главенствующую триггерную роль в запуске либо процесса перехода бактерий в некультивируемое либо, наоборот, процесса рекультивации и перехода в активное состояние. Вот почему так сложно найти какие-либо специфические средства ингибирования этих процессов. Именно поэтому, автор диссертации Салина Е.Г пришла к заключению, что из-за метаболической инертности покоящихся форм и неактивного состояния в них молекулярных мишней действия антибиотиков и даже микобактериальных бактериофагов, традиционный, мишень-ориентированный подход для поиска лекарственных средств против латентной ТБ инфекции будет неэффективен. Поэтому, поиск веществ, убивающих покоящиеся клетки бактерий или ингибирующих их прорастание, должен вестись среди соединений, обладающих свойствами энергонезависимого транспорта в клетку и неселективного ингибирования множественных мишней, вызывающего их необратимую модификацию. Поиску таких соединений автор и посвятила следующий раздел работы. С присущей автору тщательностью выполнен и этот большой раздел работы с

всесторонним исследованием влияния выбранных веществ на некультивируемые клетки микобактерий.

В соответствии с предложенной стратегией выявлены два класса оригинальных химических соединений, проявляющих высокую бактерицидную активность в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis*: гидроксопиридинтионы и тиенопиримидины. Производные класса гидроксопиридинтионов обеспечивают аккумуляцию в клетках ионов меди, обладающих неселективным антибактериальным действием, за счет образования стабильных комплексов с Cu^{2+} , их транспорта в клетку и распада комплекса с высвобождением и накоплением Cu^{2+} в клетке в токсичных концентрациях. Производные класса тиенопиримидинов метаболизируются в клетках *M. tuberculosis* с выделением оксида азота NO и образованием метаболита с высокореактивной $-SH$ группой, которые неселективно взаимодействуют с широким спектром биомолекул. При этом надо отметить, что действие выбранных веществ на некультивируемые формы бактерий проводилось не только в экспериментальной модели, разработанной автором, но во всех известных, описанных в литературе и воспроизведенных автором, моделях индукции некультивируемого состояния. Механизм действия выбранных соединений был определен экспериментально, в биохимических экспериментах, которые по достоинству оценят мои коллеги-оппоненты.

К выполненной работе и к диссертанту у меня есть один, на мой взгляд принципиальный вопрос или замечание. Ни в литературном обзоре, ни в исследовании транскрипционной активности я не обнаружила ни одного упоминания о факторах вирулентности микобактерий – ни о специфических белках, ни о генах, их кодирующих, ничего кроме генов жирового обмена. Почему – об этом ничего не известно, и поэтому осуществляется поиск ингибиторов, не селективно влияющих на гибель некультивируемых форм?

И еще – относительно текста диссертации. Конечно, на 400стах страницах текста можно найти и опечатки и несогласования, но даже неудобно делать такие замечания, читая такой гигантский труд. Ради смеха,

можно отметить лишь одно: есть в русском языке такое сложное для написания слово – меченый, меченный -которое в разных контекстах пишется то с одним, то с двумя «н». Автор так старательно относилась к написанию диссертации, что в нескольких местах я обнаружила это слово с тремя «н». Но это, как говорится, не снижает ценности диссертации и не отражается на ее профессионализме и качестве.

Таким образом, можно считать, что представленная автором диссертация открывает новое направление и предлагает новую стратегию поиска средств борьбы с возбудителями особо значимых инфекционных заболеваний, к которым принадлежит туберкулез – стратегию, основанную на знании экспрессии генов, возможность воздействовать на которые или на их продукты, может привести к ингибированию возбудителя. Работа содержит новое решение актуальных научных задач, выполненных с использованием самых современных методов исследования. Результаты, полученные автором, имеют теоретическое и в перспективе практическое значение. Автором на основании изучения транскриптомов покоящихся клеток микобактерий выявлено и изучено два класса соединений, проявляющих значительную неселективную бактерицидную активность в отношении покоящихся некультивируемых клеток микобактерий. Ясно, что процесс доведения полученных результатов до практического использования очень тяжел, но хочется пожелать автору дойти в своем тернистом пути хотя бы до доклинических исследований.

Работа хорошо написана, достаточно полно иллюстрирована, в приложениях (на 100 стр.) суммированы результаты транскриптомных исследований возбудителя туберкулеза в различных состояния – активном и последовательных стадиях перехода в некультивируемое или латентное состояние. Эти данные могут быть использованы для различных целей другими исследователями, работающими с туберкулезной инфекцией, патогенез которой до конца остается невыясненным. Результаты работы Селиной Е.Г. широко опубликованы и доложены на конференциях

различного уровня. В целом, представленная Салиной Е.Г. диссертационная работа вполне соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. №842 (с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства РФ от 21.04.2016г. №335, от 01.10.2018 №1168 «о внесении изменений в Положение о присуждении степеней»).

Автор работы, Салина Елена Геннадиевна заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности «биохимия».

Ведущий научный сотрудник

ФБГУ «Национальный Исследовательский Центр

Эпидемиологии и Микробиологии

им. Н.Ф.Гамалеи Минздрава РФ,

доктор биологических наук, профессор

специальность 03.02.03.»микробиология»

Романова Ю.М./



Подпись Романовой Ю.М. подтверждаю.

Зам. Директора Центра, д.б.н., проф.

/Пронин А.В./

14 мая 2020 г.