

№ 170

« 12 » мая 2020 г.

### УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по научно-организационной работе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», д.б.н.

  
Т.Ю. Плешакова  
« 12 » мая 2020 года

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

#### Актуальность темы исследования

Клетки возбудителя туберкулеза бактерии *M. tuberculosis* способны длительный период персистировать в организме хозяина в состоянии латентной инфекции. По данным Всемирной организации здравоохранения, около 25% населения Земли инфицированы возбудителем туберкулеза в латентной форме, и в течение жизни под влиянием множества факторов примерно у 5% инфицированных происходит активация латентной инфекции и активное развитие заболевания. Основным фактором, способствующим реактивации туберкулеза, является снижение иммунитета, которое может происходить под воздействием лекарственных средств, в результате естественного старения организма и проч. Несмотря на недавний прогресс в области создания новых противотуберкулезных лекарственных препаратов бедаквила и деламанида, уже одобренных к применению в ряде стран, а также препарата макозинона, находящегося сейчас на второй фазе клинических испытаний, эти препараты оказались неэффективными в отношении латентной инфекции.

Представления о природе латентного состояния туберкулеза все еще недостаточно полны. Полагают, что латентная форма инфекции обусловлена способностью возбудителя *M. tuberculosis* переходить в состояние покоя в организме хозяина, сопровождающееся снижением уровня большинства обменных процессов, протекающих в бактериальной клетке, следствием чего является невосприимчивость патогена к антибактериальным препаратам, эффективным в отношении активной формы туберкулеза. Исследование транскриптома покоящихся клеток *M. tuberculosis* и клеток в состоянии реверсии в активное состояние позволит обнаружить метаболические реакции, ответственные за процессы поддержания жизнеспособности клетки в этих физиологических состояниях и выявить потенциальные молекулярные мишени лекарственных препаратов, специфичных для латентной инфекции, а, следовательно, позволит сформулировать подходы к поиску новых лекарственных соединений, эффективных против латентной формы туберкулезной инфекции. Таким образом, тема работы Салиной Елены Геннадьевны «Транскриптомика *Mycobacterium tuberculosis* в состоянии покоя и подходы к инактивации покоящихся клеток» является актуальной и имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

### **Структура диссертации**

Диссертационная работа построена 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. Работа изложена на 400 страницах, в конце диссертации приводятся результаты транскриптомного анализа клеток *M. tuberculosis* в процессе их перехода в состояние покоя и реактивации в состояние активного роста, и профили транскрипции *M. tuberculosis*, полученные в присутствии двух изучаемых в данной работе классов соединений: гидроксипиридинтионов и тиенопиримидинов.

Изложение литературных данных и результатов исследований хорошо структурировано, подразделы отражают порядок проведения исследований и логически связаны друг с другом.

В работе поставлены 5 основных задач, по которым сформулированы 5 положений, выносимых на защиту, полностью отражающих эти задачи.

По результатам диссертационной работы сформулированы 6 выводов, которые полностью правомерны, соответствуют цели и задачам исследования, подтверждаются его результатами и являются научно обоснованными и практически значимыми. Диссертация представляет собой законченную работу, автореферат диссертационной работы и

опубликованные автором научные труды в достаточной мере отражают содержание диссертации.

### **Содержание диссертации**

Во введении автор отмечает актуальность темы исследования и степень ее разработанности, формулирует цель, задачи, характеризует научную новизну, теоретическое и практическое значение, и приводит список положений, выносимых на защиту. Приводятся сведения об апробации работы на научных конференциях и печатных работах, опубликованных по теме диссертации.

Глава «Обзор литературы» начинается с описания явления латентности туберкулезной инфекции и форм *M. tuberculosis*, вызывающих ее, приведены основные характеристики покоящихся форм патогена и описаны особенности патогенеза латентного туберкулеза у человека. Отдельное внимание уделено конкретизации терминов «латентность», «персистенция» и «покоящееся состояние», которые обозначают отличные друг от друга явления, несмотря на то, что фенотипические их проявления могут быть сходны. Следующая часть литературного обзора посвящена описанию и сравнению известных моделей латентной формы туберкулеза, разработанных *in vivo* и *in vitro*, проведен их сравнительный анализ с описанием достоинств и недостатков. Далее приведена характеристика двух основных подходов к изучению транскриптомов – гибридизация на микрочипах и секвенирование РНК, где автор уделяет внимание этапам анализа транскриптомов для обоих методов и особенностям пробоподготовки анализируемых образцов, далее следует анализ возможных механизмов адаптации бактерии *M. tuberculosis* к пребыванию в фазе персистенции и транскрипционной регуляции латентного состояния инфекции. Следующая часть литературного обзора посвящена рассмотрению явления реактивации латентного туберкулеза и выявлению факторов, влияющих на успешное протекание этого процесса. В заключительной части литературного обзора подробно освещена проблема поиска эффективных ингибиторов персистирующих клеток *M. tuberculosis*, возникающая вследствие их существенной фенотипической устойчивости к стандартным противотуберкулезным препаратам, возникающей из-за низкой метаболической активности возбудителя в состоянии латентной инфекции. Подчеркивается, что причине того, что большинство перспективных мишеней лекарственных препаратов у патогена в состоянии латентной инфекции неактивны, мишень-ориентированный подход при поиске средств против латентного туберкулеза имеет очень ограниченное применение, и при поиске «антилатентных» противотуберкулезных соединений на первый план выходит полноклеточный их скрининг на покоящихся (персистирующих) клетках, полученных в моделях, максимально полно

отображающих свойства клеток возбудителя *M. tuberculosis* при латентной инфекции. Автор указывает на необходимость разработки такой модели покоящегося состояния *in vitro*, которая максимально полно иллюстрировала состояние латентной инфекции в живых организмах, и могла бы быть адекватным инструментом для тестирования лекарственных средств с предполагаемой эффективных в отношении латентной инфекции.

Глава «Материалы и методы» содержит полное описание арсенала методов, использованных для получения покоящихся и «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis*, а также их реверсии в состояние активного деления, получения транскрипционных профилей микобактерий туберкулеза в различных физиологических состояниях и их анализа, разработки системы тестирования соединений-кандидатов в «антилатентные» препараты, установления механизма действия оригинальных химических соединений на клетку микобактерий. Приведенные описания методов работы изложены достаточно подробно для воспроизведения результатов, приведенных в главе «Результаты и обсуждение».

Глава «Результаты и обсуждение» посвящена собственным результатам, полученным Салиной Е.Г., и разделена на 9 частей. Первая часть содержит описание собственной экспериментальной модели перехода *M. tuberculosis* в покоящееся состояние в условиях отсутствия калия *in vitro* и характеристику полученных покоящихся клеток, проводится оценка степени адекватности клеток патогена, полученных в данной модельной системе, клеткам *M. tuberculosis*, персистирующим в макроорганизме.

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 интенсивной активации транскрипции в клетках *M. tuberculosis*, происходящей немедленно после переноса клеток в сбалансированную питательную среду. Высказана идея, что, принимая во внимание метаболическую неактивность покоящихся клеток *M. tuberculosis*, для поиска лекарственных средств против латентной ТБ инфекции традиционный, мишень-ориентированный подход будет неэффективен, и поиск веществ, уничтожающих покоящиеся клетки бактерий или ингибирующих их прорастание, должен вестись среди соединений, обладающих способностью к неселективному ингибированию множественных мишеней патогена.

Четвертый раздел данной главы содержит данные по сравнительному анализу устойчивости покоящихся клеток, получаемых в различных моделях *in vitro*, к противотуберкулезным препаратам. Выявлена существенная устойчивость покоящихся «некультивируемых» клеток, получаемых в модели дефицита калия в среде культивирования, разработанной в ходе настоящей работы, по сравнению с покоящимися клетками, получаемыми в разработанных ранее моделях. Таким образом, разработанная в ходе настоящей работы модель покоящегося состояния *M. tuberculosis in vitro* может служить модельной системой для поиска эффективных лекарственных средств против латентного туберкулеза.

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, характеризовались выраженной бактерицидной активностью в отношении покоящихся *M. tuberculosis*, снижая их жизнеспособность не менее чем в 10 раз.

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  $\text{Cu}^{2+}$  в клетках *M. tuberculosis* за счет образования стабильных комплексов с ними и их транспорта в клетку с высвобождением  $\text{Cu}^{2+}$ , обладающих неселективным антибактериальным действием. Установлено, что производные класса тиенопиримидинов являются пролекарствами и метаболизируются в клетках патогена с образованием оксида азота NO и метаболита с высокореактивной –SH группой, также способных неселективно ингибировать широкий спектр мишеней.

Таким образом, предложенная стратегия уничтожения персистирующих клеток микобактерий, заключающаяся в неселективном ингибировании у них множественных мишеней антибактериальных агентов и/или необратимой химической модификации соединений с образованием токсичных для бактериальной клетки продуктов была подтверждена экспериментально.

Все экспериментальные результаты диссертационной работы получены с применением известных, надежных и эффективных экспериментальных методов. Выводы, сформулированные в диссертации, логично вытекают из результатов проведенных

исследований и являются в полной мере обоснованными. Результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых международных и российских журналах.

### **Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов**

Салиной Е.Г. впервые методом RNA-seq был проведен полнотранскриптомный анализ покоящихся клеток *M. tuberculosis*, в результате которого обнаружено глобальная репрессия транскрипции в покоящихся клетках *M. tuberculosis* с сохранением у них немногочисленных стабильных транскриптов, названных автором «запасенными транскриптами». Впервые показано, что для клеток *M. tuberculosis*, реактивирующихся из состояния покоя в метаболически активное состояние, характерно явление «транскрипционного взрыва» – быстрой активации транскрипции ряда генов, кодирующих ферменты репарации поврежденных структур и биосинтеза жирных кислот микобактерий. На основании полученных результатов Салиной Е.Г. предложена стратегия уничтожения персистирующих клеток патогена путем неселективного ингибирования множественных мишеней антимикробных агентов и/или их модификации с образованием продуктов, токсичных для бактериальной клетки. Салиной Е.Г. обнаружены и охарактеризованы оригинальные производные классов гидрокситиопиридинтионов и тиенопиримидинов, обладающие бактерицидной активностью в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis*. Изучен механизм их действия, показано, что производные гидрокситиопиридинтионов обеспечивают аккумуляцию ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в клетках *M. tuberculosis*, 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.

### **Практическая значимость работы**

На основе полученных в ходе работы результатов автором Салиной Е.Г. предложен новый подход к поиску лекарственных соединений, направленных против латентной ТБ инфекции, заключающийся в неселективном ингибировании множественных мишеней патогена, приводящем к антибактериальному эффекту. Обнаружены оригинальные химические соединения с высокой бактерицидной активностью в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis*, обладающие предсказанным механизмом действия. Направленный скрининг соединений, способных неселективно ингибировать многие мишени антимикробных агентов в клетке патогена, является основой для разработки эффективных лекарственных средств против латентного туберкулеза и других персистирующих инфекций.

## **Апробация диссертации**

Основные научные результаты диссертационной работы Салиной Елены Геннадьевны «Транскриптомика *Mycobacterium tuberculosis* в состоянии покоя и подходы к инактивации покоящихся клеток» в течение последних десяти лет были неоднократно представлены на международных и российских конференциях: Tuberculosis: Biology, Pathogenesis, Intervention Strategies (Париж, Франция, 2012), Первой российской конференции по медицинской химии (Москва, 2013), 18<sup>th</sup> Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (Иокогама, Япония, 2013), Keystone Symposium: Novel Therapeutic Approaches to Tuberculosis (Кистоун, США, 2014), Towards Therapies of the Future (Москва, 2014), 26<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Амстердам, Нидерланды, 2016), Современные инновационные технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей (Москва, 2018), 20<sup>th</sup> International Research Conference on Tuberculosis (Лондон, Великобритания, 2018).

## **Замечания по работе**

Диссертация написана хорошим литературным языком и практически не содержит опечаток, однако к ней могут быть высказаны следующие замечания:

1. При установлении степени корреляции между образцами, исследуемыми методом RNA-seq, были вычислены коэффициенты корреляции Спирмена (табл. 2). Показано, что культуры DM и DL, соответствующие физиологическому состоянию *M. tuberculosis* КОЕ = 0 были максимально близки между собой по своим транскрипционным профилям ( $R = 0,89$ ), культуры DE и DM также показали хорошую корреляцию друг с другом ( $R = 0,81$ ), корреляция для культур Log и DE характеризовалась значением  $R = 0,75$ . Однако автор не указывает, сколько конкретно генов в образцах Log, DE, DM и DL было идентифицировано при анализе соответствующих транскриптомов.

2. Транскриптом покоящегося состояния *M. tuberculosis* в условиях дефицита калия в среде был получен методами RNA-seq и гибридизации на микрочипах. Однако информация, касающаяся сравнения транскрипционных профилей покоящихся клеток, полученных этими двумя методами, в тексте не представлена.

Сделанные замечания не затрагивают основного содержания рассматриваемой диссертации и не влияют на общую высокую оценку научного уровня и выполненной диссертантом работы.

## **Заключение**

Диссертация Салиной Е.Г. «Транскриптомика *Mycobacterium tuberculosis* в состоянии покоя и подходы к инактивации покоящихся клеток» является работой, в которой, на основании выполненных автором исследований, предложена стратегия поиска

соединений, активных в отношении покоящихся форм бактерий основанная на неселективном ингибировании множественных мишеней патогена и/или их необратимой химической модификации с образованием токсичных для бактериальной клетки продуктов.

Таким образом, 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, является завершенной научно-квалификационной работой, полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Правительством РФ (Постановление № 842 от 24.09.2013 г.), предъявляемым к докторским диссертациям и заслуживает высокой оценки, а автор диссертации Салина Елена Геннадьевна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Отзыв на диссертацию Салиной Елены Геннадьевны обсужден и одобрен на межлабораторном семинаре Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» 12 марта 2020 года (протокол заседания № 3).

Главный научный сотрудник, заведующий отделом биоинформатики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук

В.В. Поройков

Подпись Поройков В.В.  
заверяю  
Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карпова Е.А.