



**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

(ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

№ _____

Тел: 8 499-193-30-01
Факс: 8 499-193-61-83

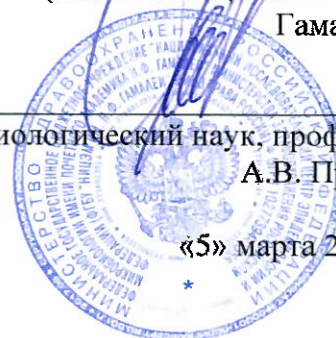
<http://www.gamaleya.org>
E-mail: info@gamaleya.org

“УТВЕРЖДАЮ”

Заместитель директора по научной работе
Федерального государственного
бюджетного учреждения «Национальный
исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика
Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения
Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф.
Гамалеи»)

доктор биологических наук, профессор
А.В. Пронин

«5» марта 2021 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

**Шлеевой Маргариты Олеговны на тему
«Особенности биохимии и физиологии покоящихся микобактерий»,
представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по научной
специальности 03.01.04 Биохимия**

Актуальность темы диссертационной работы

Микобактерии как туберкулезные, так и нетуберкулезные широко распространены в окружающей среде и способны вызывать у человека и других млекопитающих целый спектр связанных заболеваний. Туберкулез, безусловно, представляет в этом спектре одну из важнейших проблем здравоохранения. В Российской Федерации он входит в перечень социально значимых заболеваний, его профилактике и диагностике уделяется значительное внимание, активно ведутся разработки в сфере диагностики и противотуберкулезной вакцинации. При этом, помимо больных открытой формой туберкулеза, существенным резервуаром распространения заболевания являются группы высокого риска по инфекции *Micobacterium tuberculosis*, к которым относятся лица, постоянно или периодически контактирующие с инфицированными больными (ЛТИ-носители). ЛТИ - заболевание, не передающееся контактным путем, и протекает

асимптоматически, однако, потенциально способно развиться позже в активную форму, в перспективе месяцев и лет. По разным данным, общее количество ЛТИ-носителей в России, оценивается в 10-15% населения.

Значимый вклад вносят фундаментальные исследования метаболических изменений *M. tuberculosis*, позволяющих бактериям сохраняться и выживать длительное время в организме хозяина в виде покоящихся форм. Работа Шлеевой Маргариты Олеговны посвящена изучению процессов, происходящих в клетках микобактерий, включая возбудителя туберкулеза – *Mycobacterium tuberculosis*, при их переходе в состояние покоя и реактивации, а также потенциальных механизмов поддержания этого состояния. Для реализации поставленной цели соискателем Шлеевой М.О. был проведен всесторонний анализ клеток, включающий биохимическую характеристику, поиск факторов сохранения жизнеспособности микобактерий, а также изучение механизма реактивации из этого состояния на примере микобактерий *M. tuberculosis* и непатогенного быстрорастущего родственного вида *M. smegmatis*.

Представления о механизмах формирования латентного состояния туберкулеза на данный момент весьма фрагментарны, а значит, что работа Шлеевой Маргариты Олеговны «Особенности биохимии и физиологии покоящихся микобактерий» несомненно является актуальной и имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Научная новизна

Данная работа является передовой в области изучения механизмов, лежащих в основе способности микобактерий переходить в покоящееся состояние и реактивироваться из него. Впервые получена и охарактеризована *in vitro* модель образования длительно выживающих покоящихся микобактерий на основе адаптации клеток к условиям снижения рН внешней среды и микроаэрации, имитирующая условия, возникающие в макрофагах при захвате микобактерий. При этом, эффективность данной модели была подтверждена на животных моделях, показано что инфицирование мышей полученными формами Mtb приводило к развитию длительной хронической формы туберкулеза у животных, моделируя состояние ЛТИ. Данная модель безусловно будет востребована в исследованиях физиологии микобактерий как *in vitro*, так и *in vivo*, поскольку она наиболее близка к состоянию клеток, вызывающих латентную форму заболевания.

Крайне интересными представляются результаты по взаимосвязи накопления и гидролиза трегалозы в процессе перехода в состояние покоя и при реактивации покоящихся форм. Ранее считалось, что роль трегалозы в микобактериях сводится исключительно к синтезу клеточной стенки, однако соискателем показано, что трегалоза играет важную роль в выживании микобактерий в состоянии покоя. В данном случае трегалоза играет роль стрессового метаболита, что впервые позволяет провести параллель между спорами грибов и покоящимися формами микобактерий.

Кроме того, важны выводы автора о сохранении у клеток в состоянии покоя «остаточного» метаболизма, способствующего поддержанию жизнеспособности клетки в период длительного покоя. Приведенные в работе данные закладывают значимую базу для поиска молекулярных мишеней при разработке лекарственных средств и профилактических вакцин, а также средств дифференциальной диагностики латентных форм туберкулеза и других заболеваний, вызываемых микобактериями.

Перечисленные выше данные и ряд других материалов, рассматриваемых в диссертационной работе, позволяет сделать заключение о ее новизне и высокой научно-практической значимости.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 409 страницах и описана по традиционной схеме. Работа включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, представление результатов и их обсуждение, заключение и список цитируемой литературы, включающий 401 источник, а также 2 приложения, подтверждающие и раскрывающие суть исследования.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, проведен анализ доступных литературных источников по тематике изучаемой проблемы.

Обзор литературы (глава I) начинается с детального описания объекта исследования. Приведены основные характеристики состояния покоя неспорообразующих бактерий, в том числе микобактерий, как процесса, лежащего в основе латентной формы туберкулеза, подробно анализируются предлагаемые модели покоящегося состояния микобактерий *in vitro*. Автором детально проанализированы известные подходы, приведены сильные и слабые стороны каждого из них. Следующий раздел литературного обзора посвящен рассмотрению особенностей биохимии возбудителя туберкулеза в период нерепликативного состояния в условиях стресса. Обсуждаются стрессовые факторы и возможные стратегии выживания микобактерий в организме хозяина, а также некоторые особенности покоящегося состояния и процесса выхода из него.

Таким образом, материал, собранный и проанализированный автором в главе «Обзор литературы» непосредственно связан с проблематикой проводимого исследования и подтверждает актуальность выбранной темы диссертации.

Обзор литературы написан хорошим языком, современен и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно и подробно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования (глава II). В этой главе соискателем детально изложены методические особенности и приемы работы. Подробно описано оборудование и реактивы, использованные при выполнении работы. Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов с учетом специфики проводимых исследований. Представленная информация позволяет сделать заключение о достоверности полученных результатов, и дает обоснование для представления данной работы к защите по специальности 03.01.04 Биохимия.

Глава III посвящена изложению собственных результатов исследования и их обсуждению. Она включает три раздела, освещающие решение поставленных в исследовании задач. Экспериментальная часть исследования грамотно и логично спланирована, что позволило получить достоверные и значимые результаты в ходе исследования.

В первом разделе автором приводятся данные по разработке моделей покоящегося состояния микобактерий *in vitro*, имитирующих свойства возбудителя ТБ в период латентной формы заболевания и их валидация на животных инфекционных моделях с использованием различных линий инбредных мышей. В результате удалось получить покоящиеся микобактерии в количестве, необходимом для проведения дальнейших микробиологических и биохимических исследований. Основываясь на полученных данных, автор делает вывод, что микобактерии (как *M. tuberculosis*, так и *M. smegmatis*) в условиях плавного закисления ростовой среды *in vitro* в пост-стационарной фазе роста

культур способны формировать покоящиеся морфологически измененные «некультивируемые» клетки, устойчивые к антибиотикам и способные к длительному выживанию в состоянии покоя, а также к реактивации и реверсии ростовых процессов, при этом, инфицирование такими клетками животных имитирует сходную по характеристикам с латентным туберкулезом инфекцию.

Далее была проведена работа по исследованию покоящихся клеток микобактерий в части метаболических процессов и оценены способность к росту и активность метаболизма покоящихся «некультивируемых» микобактерий, их устойчивость к антибиотикам и повышенным температурам, проведена характеристика запасенных веществ покоящихся микобактерий, и изучены особенности протеомного профиля покоящихся форм. В ходе работы было показано, что переход микобактерий в покоящуюся форму характеризуется накоплением трегалозы и порфиринов (в случае *M. smegmatis*), при этом, последнее делает клетки чувствительными к фотодинамической инактивации. При анализе протеомов микобактерий автор высказывает мнение, что большая представленность ферментов, участвующих в деградации основных полимеров клетки, связана с катаболическими реакциями, протекающими в покоящихся клетках.

Третий раздел результатов посвящен изучению реактивации некультивируемых форм микобактерий. Основываясь на полученных данных, автор убедительно показывает, что реактивация микобактерий и реверсия ростовых процессов включает несколько стадий, при этом свободные ненасыщенные жирные кислоты, цАМФ, а также специфические фрагменты пептидогликанов стимулируют реактивацию покоящихся «некультивируемых» клеток, запуская цепь метаболических реакций и биосинтетических процессов, обеспечивающих начало клеточного деления. В разделах «Заключение» обобщены полученные экспериментальные данные, обоснованы основные положения работы.

Таким образом, в ходе проведенного исследования выявлены новые механизмы образования покоящихся форм микобактерий, поддержания их жизнеспособности длительное время без репликации и их реактивации, и предложена обобщающая схема процессов, происходящих при реактивации покоящихся микобактерий, что является логичным завершением работы.

Научная и практическая значимость результатов

Диссертационная работа Маргариты Олеговны Шлеевой совмещает в себе фундаментальность исследований и их практическую значимость. Основными задачами диссертанта являлись изучение биохимических и физиологических закономерностей перехода активных клеток *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*, в покоящееся состояние, изучение метаболических процессов, сопровождающих эти переходы, а также характеристика процессов, участвующие в защите и стабилизации покоящихся форм микобактерий при воздействии стрессовых факторов внешней среды. Таким образом, диссертационная работа охватывает широкий круг вопросов и представляет собой актуальное исследование, результаты которого могут востребованы в биомедицинской отрасли. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о процессах, происходящих в покоящихся клетках микобактерий. Эти знания необходимы для понимания явления латентности и реактивации туберкулеза. При этом, выявленные белки могут послужить маркерными молекулами для разработки дифференциальных диагностических систем и потенциальными мишенями при создании противотуберкулезных препаратов.

Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации

Использование для исследований репрезентативной выборки образцов, применение классических микробиологических, биохимических и современных молекулярно-генетических и физико-химических методов, подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе М.О. Шлеевой, а также выносимых на защиту выводов и положений.

Результаты диссертации рекомендуются для использования в научно-исследовательских учреждениях биотехнологического и образовательного профиля, занимающихся изучением микобактерий, процессов развития туберкулезной инфекции, разработкой профилактических и терапевтических вакцин и противотуберкулезных препаратов, диагностики туберкулеза.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты диссертационной работы отражены в автореферате и публикациях автора. Всего по теме диссертационной работы опубликовано 46 научных работ, в том числе 25 статей в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, и 20 тезисов в материалах конференций. Кроме того, по результатам работы получен 1 патент на изобретение. Рукопись автореферата соответствует содержанию диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

При критическом рассмотрении диссертационной работы возник ряд вопросов и замечаний:

1. Что, по мнению автора, может являться триггером активации трегалазы и сигналом к началу реактивации покоящихся микобактериальных клеток в организме? Поскольку, в работе показано влияние фосфолипидов и СНЖК на реактивацию, может ли инициация быть связана с экзогенным или эндогенным накоплением специфических метаболитов в окружающей клетку среде?
2. Интересно мнение автора о перспективе применения выявленного эффекта фотодинамической инактивации покоящихся форм. В каком формате возможно использование упомянутых в работе методов фотодинамической терапии с учетом особенностей их локализации в организме носителя?
3. Несколько спорным кажется утверждение, что «в состоянии подавления биосинтетических процессов сохраняющиеся ферменты и белки могут быть рассмотрены также в качестве запасенных и необходимых для быстрого запуска процесса реактивации при наступлении благоприятных для роста условий», поскольку под действием внутриклеточных протеаз сохранение активных ферментов в длительной перспективе представляется маловероятным.

Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Результаты представленной к защите диссертации свидетельствуют о высокой квалификации ее автора. Все части исследования изложены в последовательности,

отражающей логику реализации конечной цели всей работы – изучить основные закономерности перехода микобактерий в состояние покоя, а также механизмы их реактивации. Диссертантом использованы современные и классические методы биохимии, микробиологии и молекулярной биологии. Следует отметить корректность выбранной стратегии исследования и высокий уровень исполнения, что положительно характеризует самого исследователя. Все вышеизложенное свидетельствует о соответствии соискателя М.О. Шлеевой ученой степени, на которую она претендует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Шлеевой Маргариты Олеговны на тему «Особенности биохимии и физиологии покоящихся микобактерий» является законченной научно-исследовательской работой, имеющей научно-практическое значение, выполненной на высоком научно-методическом уровне. Диссертационная работа удовлетворяет требованиям п.9-14 Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства РФ от 24.09.13 №842), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Шлеева М.О. заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории трансляционной биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи») от «23» января 2021 г., протокол № 1.

Отзыв составили

Руководитель лаборатории
биологически активных наноструктур
(с группой биологического тестирования
наноструктур на животных)
НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи,
доктор биологических наук

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18.
Тел. 8(499)193-30-01,
e-mail: lunin1955@gmail.com

Руководитель отдела
природноочаговых инфекций
НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи,
кандидат биологических наук

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18.
Тел. 8(499)193-30-01,
e-mail: artem.p.tkachuk@gmail.com

5 марта 2021 г.

Лунин Владимир Глебович



Ткачук Артём Петрович



НАЧАЛЬНИК
ОТДЕЛА КАДРОВ
Сekuноva
Наталья Владимировна

