

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА НА ДИССЕРТАЦИЮ ШЛЕЕВОЙ МАРГАРИТЫ ОЛЕГОВНЫ «ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ ПОКОЯЩИХСЯ МИКОБАКТЕРИЙ», ПРЕДСТАВЛЕННУЮ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 03.01.04 «БИОХИМИЯ»

Исследование биохимических и физиологических механизмов, сопутствующих переходу покоящихся микроорганизмов в активную фазу находится на магистральном пути развития современной науки о жизни. К сожалению, особенностям развития бактерий, возбудителей социально-значимых заболеваний человека, характеризующихся «состоянием покоя» уделяется недостаточно внимания. В то же время именно в исследовании особенностей этого состояния зачастую заложена причина не диагностируемых вовремя «состояний перехода». Углубленному исследованию этих состояний и посвящена диссертационная работа Маргариты Олеговны Шлеевой. Необходимо отметить, что работ посвященных столь подробному и всестороннему изучению биохимических особенностей покоящихся форм (ПФ) микобактерий, в частности внутриклеточного патогена *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) до настоящего времени проведено не было. Принято считать, что патогенные медленно растущие микобактерии, такие, как *Mycobacterium leprae* или Mtb, сохраняют жизнеспособность *in vivo* весьма продолжительное время после начального заражения за счет перехода в покоящееся нерепликативное состояние. Покоящиеся формы Mtb могут находиться в течение многих лет в организме хозяина, обуславливая латентную форму туберкулеза (ТБ). Повторяю, что именно латентная форма и особенности ее перехода в активную фазу имеют непреходящее значение для фундаментальной и практической медицины, что и обосновывает представленное столь углубленное диссертационное исследование М.О.Шлеевой. Покоящиеся персистирующие клетки (ПК) микобактерий невозможно выделить из тканей и органов инфицированных людей поскольку их количество крайне мало. Следовательно, возникают существенные трудности в изучении механизмов перехода микобактерий в состояние покоя и для разработки новых подходов к борьбе с латентной формой инфекции. В этой связи во главу угла исследовательского процесса становится разработка адекватных моделей развития патологического процесса. Практически единственным подходом для изучения покоящихся форм Mtb является создание адекватных моделей *in vitro*, наиболее близко отражающих ситуацию носительства *in vivo*. При этом нельзя не упомянуть и развитие животных моделей,

развивающих заражение *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Несмотря на многочисленные попытки получить аналоги покоящихся микобактерий (ПМ) в лабораторных условиях, до сих пор не удавалось получить *in vitro* ПМ, обладающие необходимыми свойствами, наблюдаемыми при латентном ТБ, то есть не только остановкой метаболических процессов (например, синтеза макромолекул и активного дыхания), но и способностью к многолетнему выживанию без размножения и без потери вирулентности. Безусловно, развитие фундаментальных основ метаболомики *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) весьма востребовано и автор своим исследованием нацелился решить задачу распознавания особенностей состояния покоя *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Вышесказанное обосновывает безусловную актуальность работы, а оригинальность предложенного комплексного подхода с учетом биохимических физико-химических, протеомных исследований позволяет говорить о бесспорной новизне данной работы.

В работе автором были поставлены следующие задачи: В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработать подходы, позволяющие получить длительно выживающие (не меньше 1 года) в состоянии обратимого покоя и «некультивируемости» формы *M. smegmatis* и *M. tuberculosis in vitro*, обладающие свойствами, максимально приближенными к персистирующим микобактериям в ситуации *in vivo*. Оценить инфекционный потенциал полученных форм в экспериментах с животными.
2. Биохимическая и микробиологическая характеристика микобактерий, находящихся в состоянии длительного покоя.
3. Выявить факторы, обеспечивающие сохранение жизнеспособности покоящихся микобактерий в условиях длительного отсутствия деления.
4. Провести поиск инициаторов реактивации микобактерий из состояния покоя и изучить механизмы их действия.
5. Охарактеризовать биохимические процессы, происходящие при реактивации микобактерий из состояния покоя.

Забегаая вперед, можно с уверенностью сказать, что они были решены диссертантом в полном объеме.

Диссертация построена по классической схеме: введения, обзора литературы, методической части, главы «результаты и обсуждение», заключения, выводов, списка цитируемой литературы.

Во введении автор достаточно четко описал место предлагаемого исследования в существующей мировой литературе и поставил задачи работы. Литобзор написан хорошим языком, но мало иллюстрирован. Автор заканчивает свою работу

гипотетической схемой биохимических процессов, проходящих в покоящейся клетке *Mycobacterium tuberculosis*. Данная схема достаточно информативна и ярка. Хотелось бы видеть также сравнительные графические репрезентации, описывающие работы других авторов. Методическая часть описана достаточно четко. Неясно почему автор предпочитал методы тонкослойной хроматографии методикам на основе ВЭЖХ. Не вполне ясно почему автор воспользовался иммунохимическим тестом определения цАМР. Представляется, что тест с помощью измерения аденилатциклазы более точен. Не вполне ясно, как автор контролировал отсутствие гидролиза АТР при определении концентрации данного метаболита. АТР легко разлагаемая молекула.

Раздел «Результаты и обсуждение» выглядит весьма солидно. Раздел 3.1. «Создание моделей покоящихся форм микобактерий *in vitro*, имитирующих свойства патогена в период латентной формы туберкулеза» хорошо иллюстрирован и четко описывает особенности созданной модели. Раздел 3.2. «Модель хронического туберкулеза *in vivo* на основе покоящихся форм микобактерий, полученных *in vitro*» написан неплохо, однако при внимательном его прочтении возникают вопросы. Автор не утруждал себя детальным описанием опытов с животными. Более того абсолютно неясно (или это осталось незамеченным для оппонента) какие точно группы мышей брались. Какова статистика. Несколько удивительно звучит утверждение на стр.141 диссертационной работы «некоторые мыши линии I/st проявляли первые признаки...» Столь нечеткие и неколичественные выводы об исследованиях *in vivo* нуждаются в детальном разъяснении в ходе защиты. В дополнении скажу, что мышинные модели туберкулеза прекрасно изучены за рубежом и в России (в частности усилиями профессора Апта). В этой связи ссылки на классические работы в этом разделе были уместны. Раздел 3.3.

«Характеристика покоящихся микобактерий» заслуживает серьезного внимания. Автор дает хорошую биохимическую картину происходящего. Вместе с тем и здесь не обошлось без изъяна. Автор нашел отклонения в концентрации циклического нуклеотида и АТР. Вместе с тем попыток сделать интересные выводы из наблюдаемых эффектов сделано не было. Остальные разделы диссертационной работы выполнены на высоком методическом уровне. Масс-спектрометрические данные и данные 2D-электрофореза внушают доверие.

Диссертационная работа Шлеевой Маргариты Олеговны «Особенности биохимии покоящихся микобактерий» является самостоятельной, завершенной научно-квалификационной работой, по которой опубликовано 25 статей, в том числе в ведущих по данной теме международных изданиях (10 публикаций в журналах Q1). По актуальности темы, методологии, объему и новизне экспериментальных данных, их научно-практической значимости, публикациям, диссертационная работа Шлеевой М.О.

полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Доктор химических наук по специальности 03.01.03 Молекулярная биология, профессор, академик РАН, директор ИБХ РАН,

14.03.2021

Габибов Александр Габибович

Подпись профессора Александра Габибовича Габибова заверяю
Ученый секретарь ИБХ РАН доктор физико-математических наук



Владимир Александрович Олейников

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук (ИБХ РАН)

117997, Москва, ул. Миклухо Маклая 16/10

+74957273860

gabibov@mx.ibch.ru