

ОТЗЫВ

официального оппонента, д.м.н., профессора Владимирского Михаила Александровича на диссертационную работу М.О. Шлеевой на тему: «Особенности биохимии и физиологии покоящихся микобактерий», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04. – биохимия

Актуальность темы обоснована проблемой распространенности латентной туберкулезной инфекции, вызываемой микобактериями туберкулеза, находящимися в фазе персистенции или покоя. Латентная туберкулезная инфекция, по данным Всемирной организации здравоохранения, составляет примерно 25% населения Земли, т.е. 1,7 млрд человек поражены этой формой инфекции. В течение жизни, в зависимости от состояния иммунной системы человека, которая обусловлена многими социальными факторами и сопутствующими заболеваниями, среди которых наиболее социально значимой является ВИЧ инфекция, микобактерии туберкулеза могут перейти к состоянию активного метаболизма, что приводит к развитию активных форм туберкулеза с последующим распространением туберкулезной инфекции. Диссертационная работа посвящена изучению биохимических особенностей покоящихся форм микобактерий туберкулеза. Исследование биохимических и физиологических особенностей покоящихся микобактерий (МБ) и их реактивации имеет не только фундаментальный характер, но и прикладное значение поскольку глубокое биохимическое понимание состояния латентности МБ может открыть новые возможности диагностики латентной туберкулезной инфекции или предотвращения ее реактивации, что до сих пор остается малоизученным направлением.

Исследование состояния покоя или латентности МБ необходимо также для понимания клеточных и молекулярных механизмов иммунной защиты

макроорганизма, а механизмов реактивации МБ – для развития новых высокочувствительных методов определения активности или прогноза активности туберкулезной инфекции при обследовании пациентов с латентной туберкулезной инфекцией. Это особенно актуально в свете проведения химиопрофилактических курсов лечения туберкулеза пациентов с латентной туберкулезной инфекцией, поскольку соответствующие препараты являются гепато- и нефротоксичными.

Таким образом, тема рецензируемой диссертационной научной работы, является весьма актуальной как с фундаментальной точки зрения, так и с сугубо прикладной, медицинской точки зрения.

Целью работы являлось получение *in vitro* покоящихся микобактерий, которые сохраняют потенциал реактивации в течение длительного (1 год и более) времени и их биохимическая характеристика, включая сохранение факторов их жизнеспособности и установление механизмов их реактивации.

В соответствии с целью работы были построены выполняемые **задачи исследования**: 1) разработка методов получения длительно (не менее 1 года) выживающих «некультивируемых», т.е. не растущих в питательных средах форм микобактерий (*M. smegmatis* и *M. tuberculosis*), обладающих свойствами микобактерий, соответствующих свойствам персистирующих микобактерий в опытах *in vivo*; 2) биохимическая и микробиологическая характеристика экспериментально полученных покоящихся микобактерий (ПМ); 3) определение факторов, способствующих сохранению жизнеспособности ПМ; 4) исследование факторов инициации реактивации ПМ; 5) определение биохимических процессов реактивации микобактерий при выходе из состояния покоя.

Научная новизна диссертационного исследования.

Автором впервые разработана модель образования *in vitro* длительно выживающих покоящихся микобактерий *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* и *Corynebacterium jeikeium*, полученным в результате плавного понижения рН

внешней среды с последующим хранением в условиях пониженной аэрации, что имитирует условия, возникающие в макрофагах при захвате микобактерий. Было установлено, что ПМ обладают существенно сниженной формой метаболизма, овоидной формой клеток, утолщенной клеточной стенкой, устойчивостью к воздействию специфических антибиотиков и способностью сохраняться в жидких средах длительное время без потери жизнеспособности.

Впервые определены три стадии глубины покоя микобактерий, отражающие снижение метаболической активности, «некультивируемость» и способность к реактивации. Было установлено, что мыши, инфицированные полученными *in vitro* некультивируемыми формами микобактерий туберкулеза проявляли симптомы, характерные для латентной туберкулезной инфекции, которая через 18 месяцев трансформировалась в активную форму туберкулеза. И эта модель является единственной известной моделью, на базе которой можно экспериментально изучать латентную туберкулезную инфекцию.

Было обнаружено, что ПМ в процессе перехода в состояние покоя способны накапливать большие количества трегалозы, которая расходуется при их реактивации.

Впервые охарактеризован протеомный профиль ПМ. Показано, что в этих микобактериях содержится значительное разнообразие сохраненных белков, которые, однако, далеко не все выявляются в протеоме размножающихся микобактерий.

Впервые установлено, что фосфолипиды и свободные ненасыщенные жирные кислоты в низких концентрациях могут индуцировать реактивацию ПМ. Эти жирные кислоты активируют синтез реактивирующего микобактерии белка RpfA (resuscitation promoting factor), в результате ферментативной активности которого образуются фрагменты пептидогликана, стимулирующего реактивацию ПМ. Показано, что

нитрофенилтиоцианаты способны подавлять реактивацию ПМ из некультивируемого состояния как *in vitro*, так и *in vivo*, что имеет особо важное значение.

Автором диссертационного исследования обнаружено, что процесс реактивации ПМ включает гидролиз трегалозы, появление метаболической активности с биосинтетическими процессами и далее стадию деления клеток. Обнаружено, что ПМ содержат значительное количество свободных порфиринов, в связи с чем такие ПМ могут быть фотоинактивированы с помощью света.

Обнаружено также, что полидиалилламины обладают бактерицидным действием как на активные микобактерии, так и на ПМ.

Практическая значимость работы.

Предложенные модели образования ПМ, которые имитируют состояние *Mtb* при латентной форме туберкулезной инфекции являются новым важным инструментом для изучения механизмов образования и реактивации персистирующих микобактерий туберкулеза. Созданная модель латентной ТБ инфекции на животных может использоваться для исследований механизмов иммунного ответа и иммунной защиты организма хозяина при этой инфекции.

Полученные ПМ могут быть использованы для разработки новых противотуберкулезных лекарственных средств в отношении латентной ТБ инфекции, возможно также для развития новых средств специфической дезинфекции.

Диссертация М.О. Шлеевой изложена на 408 стр., и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы из 401 источника и Приложения.

Обзор литературы очень полноценный и состоит из наиболее важных разделов. В частности, представлена большая литература по покоящимся

формам бактерий, механизмам и условиям их образования, факторам воздействия внешней среды, изменениям физиологии и их морфологии; описана «некультивируемость» как частный случай «покоя» при сохранении метаболической активности; анализируются теории и факторы «некультивируемого» состояния с определением жизнеспособных некультивируемых клеток. Отдельно описываются понятия и условия покоя, персистенции и латентность микобактерий на примере *M. tuberculosis*. Латентность описывается как туберкулезная инфекция, сопровождаемая наличием иммунологических признаков специфической инфекции при отсутствии выявляемых микобактерий, что может быть связано с факторами иммунной защиты; состояние покоя микобактерий рассматривается как способность длительное время сохранять жизнеспособность без размножения. Персистенция микобактерий может означать их длительное переживание с устойчивостью к физико-химическим факторам и защитным механизмам иммунной системы. В обзоре описываются различные модели нерепликативного состояния *M. tuberculosis* in vitro с помощью ограничения питательных компонентов или воздействия различных стрессорных факторов, в том числе антибиотиков; описывается биохимия возбудителя туберкулеза в период нерепликативного состояния, связанного, в том числе, с гипоксией и низким уровнем рН. В обзоре описан протеомный профиль микобактерий в моделях нерепликативного состояния. Важный раздел обзора посвящен реактивации покоящихся форм микобактерий с описанием белков группы Rpf (resuscitation promoting factor).

Раздел диссертации «материалы и методы» также является очень полноценным. Описаны микробиологические методы, оценка жизнеспособности микобактерий, определение метаболической активности микобактерий, в том числе с помощью включения меченого по тритию урацила, определение потребления кислорода; определение чувствительности к антибиотикам с определением минимальных

ингибирующих концентраций, устойчивости к повышенной температуре и реактивация микобактерий в жидкой питательной среде в присутствии супернатантов активно растущих культур микобактерий. Описаны биохимические и генно-инженерные методы с получением рекомбинантных Rpf белков ПЦР в реальном времени, ЯМР, масс-спектрометрия с исследованием протеомного профиля, высокоэффективная жидкостная хроматография.

В разделе «результаты и обсуждение» представлены основные исследования.

Представлено уменьшение числа КОЕ *M.smegmatis* и *M.tuberculosis* в жидкой питательной среде при снижении рН среды; изменение морфологии микобактерий с появлением овоидных клеток, анализированных с помощью фазово-контрастной микроскопии, электронной и атомно-силовой микроскопии выразалось в уменьшении размеров микобактерий, возникновении утолщенной слоистой клеточной стенки и повышении устойчивости к термообработке при 70⁰ и 80⁰С. Покоящиеся микобактерии были более устойчивы к воздействию гигромицина и рифампицина. Представлена модель хронического туберкулеза при инфицировании мышей покоящимися формами Mtb в опытах, в которых рост КОЕ Mtb отмечали лишь через 8 и 12 месяцев после заражения. Покоящиеся формы микобактерий демонстрировали многократное снижение включения меченых по тритию тимидина и урацила и снижение внутриклеточной АТФ в культуре. С помощью ТСХ и ЯМР было показано значительное увеличение трегалозы в покоящихся клетках Mtb. Протеомный анализ вегетативных и покоящихся микобактерий, проведенный с помощью MALDI масспектрологии выявил в покоящихся клетках значительное снижение различных белков, однако показано наличие все же более 100 различных белков в длительно хранившихся покоящихся микобактериях, а также энзимов, участвующих в инактивации активных форм кислорода и

шаперонов, защищающих белки от действия активных форм кислорода. Установленный значительный рост трегалозы в покоящихся клетках в процессе реактивации резко снижался. Была показана реактивация метаболизма покоящихся микобактерий при внесении в среду фосфолипидов, в частности фосфатидилхолина (лецитина). Были изучены механизмы реактивации покоящихся микобактерий с помощью белков Rpf на основе гидролитического действия на пептидогликаны и показано ингибирующее на нее влияние нитрофенилтиоцианатов в концентрациях, которые не влияли на рост активно растущих клеток. В работе выстроена гипотетическая схема реактивации покоящихся микобактерий.

Раздел «Заключение» кратко подводит основные итоги изученных механизмов образования покоящихся микобактерий, поддержания их жизнеспособности длительное время без репликации и их реактивации, что является безусловно важным как для фундаментальной, так и для медицинской микробиологии.

Результаты исследований отражены в 10 выводах, которые полностью отражают полученные результаты.

По теме диссертации опубликованы 46 работ, в том числе 25 статей в отечественной и зарубежной печати, выполнено изобретение, а также 20 публикаций по материалам докладов на международных и всероссийского уровня конференциях.

Заключение

Диссертация М.О. Шлеевой, на соискание ученой степени доктора биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой отражены результаты исследований, имеющих значение мирового уровня по своему объему, разработанности основных концепций, безусловной научной новизне и практическому значению для применения существенно важных новых знаний, в том числе в практическом здравоохранении, обладает всеми необходимыми характеристиками, соответствующими требованиями,

предъявляемыми к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 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»), а её автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

Официальный оппонент:

зав. лабораторией иммунопатологии и
иммунодиагностики туберкулёзной инфекции
доктор медицинских наук, профессор,
специальность 14.03.07 – Химиотерапия и антибиотики,
14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Владимирский М.А.

16.03.2021

Подпись Владимирского М. А. заверяю:

Первый заместитель директора ФГБУ «НМИЦ ФПИ»
Минздрава России
доктор медицинских наук



Самойлова А.Г.