

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Игнатова Сергея Георгиевича, на работу Шлеевой Маргариты Олеговны «**Особенности биохимии и физиологии покоящихся микобактерий**», представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия

Актуальность темы диссертационного исследования

Работа Шлеевой Маргариты Олеговны посвящена фундаментальной проблеме анабиоза организмов при положительных температурах. Известно, что патогенные медленно растущие микобактерии сохраняют жизнеспособность *in vivo* длительное время в клетках хозяина за счет перехода в покоящееся нерепликативное состояние – особую форму анабиоза. Покоящиеся формы внутриклеточного патогена *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) могут находиться в течение многих лет в организме хозяина, обуславливая латентную форму туберкулеза (ТБ). Предполагается, что почти четверть населения планеты латентно инфицирована возбудителем ТБ. Высокую патогенность *Mtb* возбудителя туберкулеза у человека связывают со способностью к размножению внутри клеток хозяина. В большинстве случаев после заражения иммунная система хозяина не способна подавить инфекцию и переводит ее в латентное состояние. Изредка латентная инфекция способна спонтанно переходить в активное состояние, в случае подавления иммунной системы (в результате заражения ВИЧ и старении). Термин «покоящиеся формы» описывает состояние бактерий, в котором клетки бактерий могут находиться после заражения, под воздействием стрессовых факторов. Для неспорулирующих бактерий состояние покоя описывается как сохранение жизнеспособности с низкой метаболической активностью. Термин «состояние покоя» часто используется для описания состояния бактерий в контексте *in vitro*, и подразумевает, что бактерии в этом состоянии прекращают репликацию, обладают сниженным метаболизмом, и становятся фенотипически нечувствительны к

антибиотикам. Поскольку покоящиеся формы *Mtb*, вызывающие латентную форму инфекции не высеваются на плотных питательных средах, нечувствительны к бактериостатическим антибиотикам, считается, что истинные покоящиеся клетки микобактерий должны быть «некультивируемы» и метаболически неактивны. При латентной форме инфекции переход *Mtb* в состояние покоя был спровоцирован иммунной системой, однако подобное состояние возможно имитировать, подвергая клетки различному стрессу. Вероятно, при латентной форме инфекции наблюдается гетерогенность популяции, содержащей как персистеры, так и истинные покоящиеся формы.

Поэтому актуальность темы диссертационного исследования Шлеевой М.О. не вызывает сомнения.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Шлеевой М.О. выполнена на сертифицированном оборудовании, с продуманной схемой экспериментальных исследований, в работе применялись оригинальные методы исследования. В рамках данной диссертационной работы было опубликовано 46 работ, в том числе 25 статей в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК Минобрнауки России. Получен 1 патент на изобретение. Научные положения диссертации апробированы на 20 научных конференциях, материалы которых опубликованы в сборниках.

Большой охват российских и зарубежных источников (401 ссылка) в обзоре литературы свидетельствует о высокой осведомленности автора в отношении данной проблемы в мировой научной литературе.

Степень достоверности полученных результатов не вызывает сомнений, поскольку автором выполнен большой объем исследований; выводы,

научные положения и рекомендации, сформулированные в диссертации вполне обоснованы и логически вытекают из результатов исследований.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов

В рамках данного исследования систематизирован биохимический анализ покоящихся форм бактерий. Была разработана модель переживания микобактерий в макрофагах на основе их адаптации к условиям плавного понижения рН внешней среды, с последующим хранением культур в микроаэрофильных условиях. Впервые были охарактеризованы биохимически и микробиологически стадии покоя и реактивации микобактерий. Впервые была разработана модель носительства возбудителей туберкулеза *in vivo* у животных для изучения латентной формы ТБ. Впервые установлено, что в покоящихся микобактериях (ПМ) накапливаются в значительных количествах стабилизирующие молекулы: порфирины и трегалоза, а также ферменты их метаболизма по аналогии с истинными спорами грибов и дрожжей. Впервые охарактеризован протеомный профиль ПМ. Наблюдается значительное разнообразие белков в период длительного покоя бактерий, причем почти половина которых не выявляется в протеоме активно размножающихся микобактерий. Обнаружены некоторые ферменты центрального метаболизма (гликолиз, цикл Кребса), сохраняющие потенциальную активность, а также большое число белков, участвующих в защите бактериальной клетки от действия стрессорных факторов. Впервые показано, что фосфолипиды и свободные ненасыщенные жирные кислоты в низких концентрациях могут индуцировать реактивацию покоящихся микобактерий. Описана биохимия данного процесса. Установлено, что нитрофенилтиоцианаты ингибируют энзиматическую активность белков Rpf (семейство секретлируемых белков Rpf (resuscitation promoting factors), участвующих в процессе реактивации «некультивируемых» покоящихся клеток) и способны подавлять реактивацию бактерий *in vitro* и *in vivo*.

Показано, что процесс реактивации ПМ является многостадийным процессом - истинная лаг-фаза (включающая гидролиз трегалозы) и метаболическая реактивация (включающая начало биосинтетических процессов и начальная стадия деления клеток). Показан процесс фотоинактивации ПМ за счет свободных порфиринов бактерий. Обнаружено, что полидиаллиламины обладают бактерицидным действием как на активные, так и на покоящиеся микобактерии, благодаря их способности связываться с мембранами бактерий и формировать комплексы с нуклеиновыми кислотами.

Практическая значимость полученных автором результатов

Результаты выполненной диссертационной работы имеют большое практическое значение. Разработанные модели *in vitro* и *in vivo* образования ПМ являются перспективным направлением для изучения механизмов образования и реактивации длительно выживающих и сохраняющих вирулентность патогенов на основе биохимии перехода бактерий в покоящееся состояние и выхода из него. Данные модели могут применяться для изучения взаимодействия ПМ и иммунной системы хозяина в период латентной инфекции. Модель хронического (латентного) ТБ *in vivo* может быть применена для исследования ответа иммунной системы хозяина на эту форму возбудителя туберкулеза. Полученные результаты могут быть использованы для разработки и тестирования новых методов и антибактериальных средств, эффективных в отношении как покоящихся, так и реактивирующихся микобактерий. Перспективным направлением является метод фотодинамической инактивации микобактерий. Полученные результаты могут так же быть использованы для разработки новых методов диагностики латентного ТБ. Белки, обнаруженные при анализе протеомного профиля покоящихся форм *Mtb*, могут быть использованы для выявления потенциальных мишеней для создания противотуберкулезных препаратов, а также для разработки новых подходов к диагностике латентного туберкулеза.

Содержание диссертации, ее завершённость

Диссертационная работа Шлеевой М.О. представляет собой законченный, логически выстроенный научный труд и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов, результатов собственных исследований и обсуждения этих результатов, а также содержит обобщающее заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащего 401 литературный источник, двух приложений и раздела благодарностей. Диссертация изложена на 409 страницах машинописного текста, содержит 108 рисунков и 14 таблиц. В конце диссертации приводятся обширные приложения в виде таблиц с описанием белков, обнаруженных в протеомном профиле вегетативных и покоящихся клеток *Mycobacterium smegmatis* (приложение 1) и вегетативных и покоящихся клеток *M. tuberculosis* (приложение 2).

Во введении обоснована актуальность проведения исследований по выбранному направлению. Далее следуют цели и задачи работы. Затем следует описание научной новизны и практической значимости работы. Описывается личное участие автора в получении результатов, апробация работы, публикации, место проведения работы, объем и структура диссертации, сокращения в тексте и положения, выносимые на защиту.

В главе 1 «Обзор литературы» приведен обзор литературы, на основании которого формируются цели и задачи исследования. В обзоре представлен анализ литературных данных, описывающих характеристики явления покоя неспорообразующих бактерий, в том числе микобактерий, как процесса, лежащего в основе латентной формы туберкулеза. Подробно анализируются модели покоящегося состояния микобактерий *in vitro*. Обсуждаются стрессовые факторы и возможные стратегии выживания *Mtb* в

организме хозяина, а также некоторые особенности покоящегося состояния и процесса выхода из него. Делается акцент на особенностях биохимии возбудителя туберкулеза в период нерепликативного состояния в условиях стресса. Рассматриваются адаптивные механизмы выживания *Mtb* внутри макрофагов хозяина при первичном заражении.

В главе 2 «Материалы и методы» подробно приведены материалы и современные методы, использованные в работе.

В главе 3 «Основные результаты и их обсуждение» представлена экспериментальная часть работы, в которой приведены результаты экспериментов по созданию моделей покоящихся форм микобактерий *in vitro*, имитирующих свойства микобактерий в период латентной формы туберкулеза. Далее описывается модель хронического туберкулеза *in vivo* на основе покоящихся форм микобактерий, полученных *in vitro*. Большая часть работы посвящена биохимическим характеристикам покоящихся микобактерий и реактивация покоящихся «некультивируемых» микобактерий.

В Заключение автор привел логичный анализ результатов, полученных на всех этапах работы.

Основные положения, выносимые на защиту, и Выводы диссертационной работы соответствуют сформулированным целям и задачам работы, полностью отражают суть проведенных экспериментов, обоснованы достаточным фактическим материалом и являются логическим завершением представленной диссертационной работы. По результатам исследования опубликовано 46 работ, в том числе 25 статей в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК РФ. Получен 1 патент на изобретение. Материалы работы достаточно полно представлены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях (20 тезисов).

Диссертационная работа оформлена в соответствии с существующими требованиями, достаточно иллюстрирована рисунками и таблицами, написана понятным литературным языком. Содержание автореферата в краткой форме отражает содержание диссертационной работы, демонстрирует ее основные положения и выводы.

Основные замечания носят редакционный характер:

1. Стр. 11 диссертации и страница 3 автореферата - выражение «извлечь из тканей» будет выглядеть более корректно, если слово «извлечь» заменить на слово «выделить».
2. В разделе сокращений отсутствует расшифровка ЦТК, ТСХ, ЯМР и, НФТ.
3. В табл. 4 автореферата отсутствует продольное разделение, что немного затрудняет её анализ.

В процессе ознакомления с работой возникли некоторые вопросы дискуссионного характера:

1. Могут ли покоящиеся клетки образовывать биопленки?
2. Можно ли рассматривать порфирины как триггер для выхода из покоящегося состояния клетки?

Возникшие в процессе изучения диссертации замечания и вопросы носили редакционный характер, не являлись принципиальными и ни в коей мере не снижали научную и практическую значимость результатов представленной работы, а также не влияли на общую положительную оценку диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Шлеевой Маргариты Олеговны «Особенности биохимии и физиологии покоящихся микобактерий», представленная на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи

биохимии – изучение особенностей биохимии покоящихся микобактерий и выходе из этого состояния.

Диссертация Шлеевой М.О. соответствует по актуальности, научной и практической значимости полученных результатов требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук по специальности
Микробиология 03.02.03


Игнатов Сергей Георгиевич

ГНС, Заведующий лабораторией Нанобиотехнологии
отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов,
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и
биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека Российской Федерации
(адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховской р-н, п. Оболенск)
Тел. 8(4967) 36-07-73 факс 8(4967) 36-00-10

ignatov@obolensk.org

Подпись

Игнатова С.Г. удостоверяю
Зав. Отделом кадров




Алексеева Н.В.

17.03.21