

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 08 апреля 2021 г. № 3
о присуждении Шлеевой Маргарите Олеговне, гражданство Российская Федерация,
ученой степени доктора биологических наук

Диссертация «Особенности биохимии покоящихся микобактерий» по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 11 ноября 2020 г. (протокол № 9) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет утвержден Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. № 74/нк и от 10.02.2014 г. № 55/нк и с учетом переименования Совета от 30.09.2015 г. № 1166/нк.

Соискатель

Шлеева Маргарита Олеговна, 1977 года рождения. В 1999 году Шлеева М.О. окончила Брянский государственный педагогический университет им. академика И.Г. Петровского с присуждением квалификации «учитель биологии и химии». С 2000 по 2003 год обучалась в очной аспирантуре Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. В 2004 году Шлеева М.О. защитила кандидатскую диссертацию «Покоящиеся формы бактерий рода *Mycobacterium*: получение, биохимические факторы реактивации» по специальности 03.01.04 Биохимия (диплом КТ № 144679) и продолжила работу в лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, где работает по настоящее время в должности старшего научного сотрудника.

Диссертационная работа Шлеевой Маргариты Олеговны «Особенности биохимии и физиологии покоящихся микобактерий» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия выполнена в лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Научный консультант

Капрельянц Арсений Сумбатович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии стрессов микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Габибов Александр Габирович, доктор химических наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, директор ИБХ РАН, лаборатория биокатализа, заведующий.

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», лаборатория бионанотехнологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов, заведующий.

Владимирский Михаил Александрович, доктор медицинских наук, профессор, НМИЦ фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний Минздрава РФ, лаборатория иммунопатологии и иммунодиагностики туберкулезной инфекции, заведующий.

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор химических наук, профессор, академик РАН Габибов Александр Габирович является одним из ведущих отечественных специалистов в области исследования активности ферментов и метаболических путей;

тем, что доктор биологических наук Игнатов Сергей Георгиевич является одним из ведущих специалистов в области физиологии патогенных бактерий в том числе возбудителя туберкулеза, а также в разработке антибактериальных препаратов, в частности против туберкулеза;

тем, что доктор медицинских наук, профессор Владимирский Михаил Александрович является одним из ведущих отечественных специалистов в области терапии и диагностики туберкулеза.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них значительного числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Все три официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Шлеевой М.О.

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации в своем положительном отзыве, составленном руководителем лаборатории биологически активных наноструктур (с группой биологического тестирования наноструктур на животных) НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, доктором биологических наук Луниным Владимиром Глебовичем и руководителем лаборатории трансляционной биомедицины кандидатом биологических наук Ткачуком Артемом Петровичем, и утвержденном заместителем директора по научной работе доктором биологических наук, профессором А.В. Прониным, указала, что диссертационная работа Шлеевой М. О. является законченной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к докторским диссертациям, а ее автор Шлеева М.О. заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи является признанным отечественным центром исследований молекулярной и медицинской микробиологии и инфекционной иммунологии, в котором лаборатория трансляционной медицины активно проводит изучение молекулярных механизмов лежащих в основе явления латентности и персистенции туберкулеза, и располагает значительным опытом исследований иммунного ответа человека при туберкулезной инфекции. Таким образом сотрудники указанной лаборатории являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования в тематике, непосредственно связанной с диссертационной работой Шлеевой М.О.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы Шлеевой Маргариты Олеговны изложены в 25 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых Web of Science, что соответствует требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. Trutneva K.A., **Shleeva M.O.**, Demina G.R., Vostroknutova G.N. and Kaprelyans A.S. (2020) One-Year Old Dormant, “Non-culturable” *Mycobacterium tuberculosis* Preserves Significantly Diverse Protein Profile. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:26.
2. Nikitushkin, V.D., Trenkamp, S., Demina, G.R., **Shleeva M.O.**, Kaprelyants A.S. (2020) Metabolic profiling of dormant *Mycobacterium smegmatis* cells’ reactivation reveals a gradual assembly of metabolic processes. *Metabolomics* 16(2):24.
3. **Шлеева М. О.**, Савицкий А. П., Никитушкин В. Д., Соловьев И. Д., Трутнева К. А., Керученко Я. С., Капрельянц А. С. (2020) Эффект фотодинамической инактивации в отношении покоящихся и активно растущих форм *Mycobacterium smegmatis*. *Прикладная биохимия и микробиология*, том 56, № 3, с. 1–8
4. **Shleeva, M.O.**, Savitsky, A.P., Nikitushkin, V.D., Solovyev I.D., Kazachkina N.I., Perevarov V.V., Kaprelyants A.S. (2019) Photoinactivation of dormant *Mycobacterium smegmatis* due to its endogenous porphyrins. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 9687–9695.
5. **Шлеева М. О.**, Кондратьева Т. К., Гончаренко А. В., Апт А. С., Капрельянц А. С. (2019) Зависимый от цАМФ транскрипционный фактор в *Mycobacterium tuberculosis*, кодируемый геном Rv3676, - возможная мишень для создания противотуберкулезных соединений. *Прикладная биохимия и микробиология*. Том: 55 Выпуск: 4 Стр.: 380-385.
6. Trutneva K.A, **Shleeva MO**, Nikitushkin VD, Demina GR, Kaprelyants AS. (2018) Protein composition of *Mycobacterium smegmatis* differs significantly between active cells and dormant cells with ovoid morphology. *Front. Microbiol.*, 9:2083.
7. Demina GR, Nikitushkin VD, **Shleeva MO**, Makarov VA, Riabova OB, Lepioshkin AY, Kaprelyants AS. (2017) Benzoylphenyl thiocyanates are new, effective inhibitors of the mycobacterial Resuscitation promoting factor B protein. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1):69.

8. **Shleeva MO**, Kondratieva TK, Demina GR, Rubakova EI, Goncharenko AV, Apt AS, Kaprelyants AS. (2017) Overexpression of Adenylyl Cyclase Encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* Rv2212 Gene Confers Improved Fitness, Accelerated Recovery from Dormancy and Enhanced Virulence in Mice. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:370
9. **Shleeva MO**, Trutneva KA, Demina GR, Zinin AI, Sorokoumova GM, Laptinskaya PK, Shumkova ES, Kaprelyants AS. (2017) Free Trehalose Accumulation in Dormant *Mycobacterium smegmatis* Cells and Its Breakdown in Early Resuscitation Phase. *Front Microbiol.* 8:524
10. Nikitushkin VD, **Shleeva MO**, Zinin AI, Trutneva KA, Ostrovsky DN, Kaprelyants AS. (2016) The main pigment of the dormant *Mycobacterium smegmatis* is porphyrin. *FEMS Microbiol Lett.* т.363, fnw206
11. Nikitushkin VD, Demina GR, **Shleeva MO**, Guryanova SV, Ruggiero A, Berisio R, Kaprelyants AS. (2015) A product of Rpf and Rip joint enzymatic action promotes resuscitation of the dormant mycobacteria. *FEBS Journal*, 282 (13): 2500-11
12. Timofeeva LM, Kleshcheva NA, **Shleeva MO**, Filatova MP, Simonova YuA, Ermakov YuA, Kaprelyants AS. (2015) Nonquaternary poly(diallylammonium) polymers with different amine structure and their biocidal effect on *Mycobacteria tuberculosis* and *smegmatis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (6): 2557-71
13. **Shleeva M**, Kondratieva T, Rubakova E, Vostroknutova G, Kaprelyants A, Apt A. (2015) Reactivation of dormant “non-culturable” *Mycobacterium tuberculosis* developed in vitro after injection in mice: Both the dormancy depth and host genetics influence the outcome. *Microbial Pathogenesis*, 78, p. 63-66
14. **Shleeva M**, Goncharenko A, Kudykina Y, Young D, Young M, Kaprelyants A. (2013) Cyclic AMP-dependent resuscitation of dormant *Mycobacteria* by exogenous free fatty acids. *PLoS One*. 8(12): e82914.
15. Nikitushkin VD, Demina GR, **Shleeva MO**, Kaprelyants AS. (2013) Peptidoglycan fragments stimulate resuscitation of "non-culturable" mycobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 103 (1): 37-46.
16. Kaprelyants A.S., Mukamolova G.V., Ruggiero A., Makarov V.A., Demina G.R., **Shleeva M.O.**, Potapov V.D., Shramko P. A. (2012) Resuscitation promoting factor (RPF). In search of inhibitors. *Protein & Peptide Letters*, 19 (10), 1026-1034.
17. Арцатбанов В.Ю., Вострокнутова Г.Н., **Шлеева М.О.**, Гончаренко А.В., Зинин А.И., Островский Д.Н., Капрельянц А.С. (2012) Влияние окислительного и нитрозативного стрессов на накопление дифосфатных интермедиатов немевалонатного пути синтеза изопреноидов у корино- и микобактерий. *Биохимия*. 77(4), 461-473.
18. Назарова Е.В., **Шлеева М.О.**, Морозова Н.С., Кудыкина Ю.К., Вострокнутова Г.Н., Ружицкий А.О., Селищева А.А., Сорокоумова Г.М., Швец В.И., Капрельянц А.С.

(2011) «Роль липидных компонентов в процессах образования и реактивации «некультивируемых» форм *Mycobacterium smegmatis*». Биохимия, т. 76 № 6, с. 781-791.

19. **Shleeva MO**, Kudykina YuK, Vostroknutova GN, Suzina NE, Mulyukin AL, Kaprelyants AS. (2011) Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* formed in response to gradual external acidification. *Tuberculosis*, V. 91, № 2, p. 146-154.

20. Кудыкина Ю.К., **Шлеева М.О.**, Арцатбанов В.Ю., Сузина Н.Е., Капрельянц А.С. (2011) Образование покоящихся форм *Mycobacterium smegmatis* в пост-стационарной фазе при постепенном закислении среды, *Микробиология*, 80 (5), 625-636.

21. Мулюкин А.Л., Кудыкина Ю.К., **Шлеева М.О.**, Анучин А.М., Сузина Н.Е., Данилевич В.Н., Дуда В.И., Капрельянц А.С., Эль-Регистан Г.И. (2010) Внутривидовое разнообразие покоящихся форм *Mycobacterium smegmatis*. *Микробиология*, т. 79, № 4, с. 486-497

22. **Шлеева М.О.**, Салина Е.Г., Капрельянц А.С. Покоящиеся формы микобактерий. (2010) *Микробиология*. Т. 79. № 1. С. 3-15.

23. Demina GR, Makarov VA, Nikitushkin VD, Ryabova OB, Vostroknutova GN, Salina EG, **Shleeva MO**, Goncharenko AV, Kaprelyants AS. (2009) Finding of the low molecular weight inhibitors of resuscitation promoting factor enzymatic and resuscitation activity. *PLoS One*, 4(12):e8174.

24. Салина Е.Г., Вострокнутова Г.Н., **Шлеева М.О.**, Капрельянц А.С. (2006) Роль межклеточных взаимодействий при образовании и реактивации "некультивируемых" микобактерий. *Микробиология*. Т. 75. № 4. С. 502.

25. Downing KJ, Mischenko VV, **Shleeva MO**, Young DI, Young M, Kaprelyants AS, Apt AS, Mizrahi V. (2005) Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five *rpf*-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro. *Infect Immun*. 73(5):3038-43.

По результатам работы получен 1 патент:

Тимофеева Л.М., Клещева Н.А., Капрельянц А.С., **Шлеева М.О.** «Полидиаллиламмониевые соли в качестве микобактерицидного и туберкулоцидного дезинфицирующего средства». №2009137650 от 13 октября 2009 г, зарегистрирован в ГРИ РФ 10.04.2011.

Результаты работы также были представлены на 20 российских и международных конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций), в частности:

IV съезд микробиологов Узбекистана, Ташкент, 2008; IV международная молодежная школа-конференция, Москва, 2008; 3-й Европейский конгресс микробиологов (FEMS), Гётеборг, Швеция, 2009; Конференция Европейского общества молекулярных биологов

(EMBO), Барселона, Испания, 2010; 3-я Конференция Европейского общества молекулярных биологов (EMBO), Вена, Австрия, 2011; 18-ой международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых (г. Пушкино, 2014); VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld 2015 (Барселона, Испания, 2015); Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2016», (Москва, 2016); EMBO Conference Tuberculosis 2016 (Париж, Франция, 2016); Keystone Symposia Conference (Vancouver, Canada, 2017); 42nd FEBS Congress (Иерусалим, Израиль, 2017); 1-й Российский Микробиологический Конгресс (Пушино, Россия, 2017); 43rd FEBS Congress (Прага, Чехия, 2018); 44rd FEBS Congress (Краков, Польша, 2019); VI Съезд биофизиков России (Сочи, Россия, 2019).

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора химических наук, профессора, академика РАН **Габибова А. Г.** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. Литобзор написан хорошим языком, но мало иллюстрирован.
2. 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.
3. Методическая часть описана достаточно четко. Неясно почему автор предпочитал методы тонкослойной хроматографии методикам на основе ВЭЖХ.
4. Не вполне ясно почему автор воспользовался иммунохимическим тестом определения цАМР. Представляется, что тест с помощью измерения аденилатциклазы более точен.
5. Не вполне ясно, как автор контролировал отсутствие гидролиза АТФ при определении концентрации данного метаболита. АТФ легко разлагаемая молекула.
6. 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 мышечной ткани брались. Какова статистика.

7. Несколько удивительно звучит утверждение на стр.141 диссертационной работы «некоторые мышцы линии I/st проявляли первые признаки...» Столь нечеткие и неколичественные выводы об исследованиях *in vivo* нуждаются в детальном разъяснении в ходе защиты.

8. В дополнении скажу, что мышечные модели туберкулеза прекрасно изучены за рубежом и в России (в частности усилиями профессора А. С. Апта). В этой связи ссылки на классические работы в этом разделе были уместны.

9. 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 АТФ. Вместе с тем попыток сделать интересные выводы из наблюдаемых эффектов сделано не было.

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук **Игнатова С.Г.** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

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 деление, 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?

Отзыв официального оппонента доктора медицинских наук **Владимирского М.А.** (положительный). Замечаний нет.

Отзыв **ведущей организации** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (положительный). Отзыв содержит следующие замечания и вопросы:

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.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Никоненко Бориса Владимировича, доктора медицинских наук, ведущего сотрудника отдела иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», замечаний нет.

Симоновой Ольги Борисовны, доктора биологических наук, заведующей лабораторией молекулярно-генетических процессов развития Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. В отзыве есть следующее замечание: на рис. 6 перепутаны графики А и Б. хотелось бы уточнить, сколько мышей использовалось в экспериментах *in vivo* по индукции хронического туберкулеза и насколько воспроизводим результат?

Пучкова Е.О., доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, замечаний нет.

Апта Александра Соломоновича, доктора биологических наук, профессора, заведующего лабораторией иммуногенетики ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», замечаний нет.

Гулий Ольги Ивановны, доктора биологических наук, профессора, ведущего научного сотрудника лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, замечаний нет.

Мокроусова Игоря Владиславовича, доктора биологических наук, заведующего лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, замечаний нет.

Умпелевой Татьяны Валерьевны, кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника отдела микробиологии и доклинических исследований УНИИФ – филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, замечаний нет.

Ткаченко Александра Георгиевича, доктора медицинских наук, профессора, заведующего лабораторией адаптации микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН. В отзыве есть следующие замечания: хотелось бы услышать мнение автора о возможности формирования поверхностных биопленок при длительном выдерживании микобактерий в микроаэрофильных условиях, а формируемые биопленочные сообщества – как возможный дополнительный источник покоящихся форм. Не наблюдалось ли формирование белковых агрегатов по полюсам клетки в покоящихся микобактериях? Хотелось бы услышать мнение автора о возможности альтернативных путей, ведущих к накоплению трегалозы, например за счет расщепления трегалозодимиколата, который расщепляется в ответ на голодание и стресс.

Рууге Энно Куставича, доктора физико-математических наук, профессора, главного научного сотрудника НИИ экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, замечаний нет.

Тучина Валерия Викторовича, доктора физико-математических наук, профессора, чл.-корр. РАН, руководителя научного медицинского центра ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского», замечаний нет.

В дискуссии приняли участие:

профессор, д.б.н. Апт А.С., д.б.н. Мулюкин А.Л., профессор, д.х.н. Савицкий А.П., академик Попов В.О., д.б.н. Шумянцева В.В., к.б.н. Александров А., д.х.н. Дзантиев Б.Б., д.б.н. Крицкий М.С., д.б.н. Красновский А.А., д.б.н. Летаров А., академик Габибов А.Г.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

1. Постепенное закисление окружающей среды до 5.8 с последующим хранением в микроаэрофильных условиях приводит к образованию покоящихся форм *M. smegmatis*

и *M. tuberculosis*, способных к реактивации *in vitro*.

2. Заражение мышей покоящимися «некультивируемыми» клетками *M. tuberculosis* приводит к развитию хронической/латентной формы туберкулеза *in vivo*.

3. Покоящиеся формы микобактерий характеризуются измененной морфологией, «некультивируемостью» на плотных средах, низким уровнем метаболизма и повышенной устойчивостью к стрессовым воздействиям (антибиотики, температура), а также способностью к длительному выживанию (несколько лет).

4. В состоянии длительного покоя клетки микобактерий содержат значительное количество неповрежденных белков, включая ферменты центрального метаболизма (гликолиз, цикл трикарбоновых кислот, пентозофосфатный путь); белки, защищающие от окислительного стресса, образования белковых агрегатов и стабилизирующие нуклеиновые кислоты; а также ферменты деградации белков, липидов и нуклеиновых кислот.

5. В покоящихся клетках *M. smegmatis*, а также *M. tuberculosis* в присутствии 5-аминолевулиновой кислоты, происходит значительное накопление эндогенных порфиринов (~ 300 нг/мг влажного веса клеток для *Msm* и 17 нг/мг влажного веса клеток для *Mtb*), что приводит к фоточувствительности покоящихся микобактерий.

6. Покоящиеся клетки микобактерий содержат значительное количество трегалозы (6.5 ± 0.4 мкг/мг влажного веса клеток для *Msm* и 2.2 ± 0.3 мкг/мг влажного веса клеток для *Mtb*), уровень которой определяет жизнеспособность клеток в период длительного выживания в нереплицирующем состоянии. АТФ ингибирует активность трегалазы (гидролизующей трегалозу до глюкозы) в покоящихся клетках *M. smegmatis*, что позволяет регулировать уровень АТФ по механизму обратной связи.

7. Свободные ненасыщенные жирные кислоты и цАМФ стимулируют реактивацию покоящихся «некультивируемых» клеток *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. Делеция гена MSMEG_4279, кодирующего аденилатциклазу *M. smegmatis* предотвращает подобную реактивацию.

8. Повышенная экспрессия аденилатциклазы Rv2212, а также цАМФ-зависимого транскрипционного фактора Rv3676, приводит к стимулированию роста *M. tuberculosis* в неблагоприятных условиях, более быстрой реактивации бактерий из покоящегося состояния и к их повышенной вирулентности для мышей.

9. Совместное действие белков RipA и Rpf приводит к гидролизу пептидогликана клеточных стенок микобактерий с образованием N-ацетилглюкозаминил- $\beta(1 \rightarrow 4)$ -N-ацетил-1,6-ангидромурамоил-L-аланил-D-изоглутамата (ангидроГМДП), который обладает реактивирующей активностью по отношению к покоящимся формам

микобактерий.

10. Предложена схема реактивации покоящихся микобактерий, включающая метаболизм трегалозы и цАМФ-зависимый синтез белка RpfA.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что проведенные исследования являются важными для понимания явлений латентности и реактивации туберкулеза и особенностей биохимии и физиологии покоящихся микобактерий (ПМ). Впервые создана модель образования длительно выживающих покоящихся бактерий на основе адаптации микобактерий к условиям плавного понижения pH внешней среды и последующего хранения культур в микроаэрофильных условиях, имитирующая условия, возникающие в макрофагах при захвате микобактерий. С помощью этой модели впервые было установлено, что покоящиеся микобактерии характеризуются овоидной формой клеток, утолщенной клеточной стенкой, существенно сниженной активностью метаболизма, устойчивостью к воздействию антибиотиков/стрессовых факторов и способностью сохраняться без размножения в жидких средах длительное время без существенной потери жизнеспособности. Важно, что полученные *in vitro* в условиях pH-индукции покоящимися формы *Mtb* вызывали туберкулезную инфекцию, сходную с активацией латентного туберкулеза, при инфицировании ими мышей.

Впервые установлено, что в период длительного выживания без размножения в покоящихся бактериях сохраняется значительное разнообразие неповрежденных белков, в том числе ферментов центрального метаболизма (гликолиз, цикл Кребса). В механизмах стабилизации ПМ участвует как низкомолекулярные соединения (трегалоза и свободные порфирины), так и белки, принимающих участие в защите бактериальной клетки от действия стрессовых факторов. Особенности накопления и превращения трегалозы как в процессе перехода в состояние покоя, так и при реактивации, позволили выявить общую черту между покоящимися микобактериями и истинными спорами актиномицетов и аскомицетовых дрожжей.

В диссертационной работе охарактеризованы механизмы, связанные с реактивацией ПМ. Впервые установлено, что свободные ненасыщенные жирные кислоты (СНЖК) в низких концентрациях могут индуцировать реактивацию ПМ путем активации аденилатциклаз MSMEG_4279 и Rv2212, а также цАМФ – зависимого транскрипционного фактора Rv3676, который положительно регулирует синтез белка RpfA (белка, промотирующего реактивацию актинобактерий), продукт ферментативной активности которого (ангидроГМДП) стимулирует реактивацию ПМ.

На основании проведенных исследований было сделано заключение, что

микобактерия в состоянии покоя представляет собой закрытую систему, в которой поддерживается структурная стабильность за счет эндогенных стабилизаторов различной природы и ферментативных систем защиты от повреждающих факторов внешней среды и, возможно, протекание отдельных метаболических реакций. Реактивация покоящихся микобактерий состоит из нескольких разнесенных во времени стадий, включающих катаболические реакции, цАМФ-зависимую активацию метаболизма и подготовку к размножению клеток. Полученные результаты имеют фундаментальное значение для понимания молекулярных механизмов образования покоящихся микобактерий, их длительного выживания в состоянии покоя в период латентной фазы туберкулеза и перехода покоящихся микобактерий в активно-размножающееся состояние при рецидиве этого заболевания.

Практическая значимость работы заключается в том, что предложенные модели *in vitro* и *in vivo*, имитирующие состояние возбудителя в период латентного ТБ, являются новым инструментом для изучения механизмов образования и реактивации покоящихся форм возбудителя ТБ и оценки вклада разных путей метаболизма, вовлеченных в процесс перехода микобактерий в покоящееся состояние и выхода из него, а также для выявления особенностей функционирования иммунной системы хозяина в период латентной инфекции. Созданная модель хронического/латентного ТБ *in vivo*, может быть применена для исследования ответа иммунной системы хозяина на эту форму возбудителя заболевания.

Полученные покоящиеся клетки микобактерий могут быть использованы для разработки и тестирования новых методов и средств с антибактериальной активностью, эффективных в отношении как покоящихся, так и реактивирующих микобактерий, персистирующих в организме хозяина. Полученные в ходе работы знания могут быть использованы в разработке новых методов диагностики латентного ТБ и борьбы с этой формой инфекции, в частности, методов дезинфекции и подходов к фотодинамической инактивации микобактерий. Белки, обнаруженные при анализе протеомного профиля покоящихся форм *Mtb*, являются потенциальными мишенями для создания противотуберкулезных препаратов, а также могут быть использованы для диагностики латентного туберкулеза.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;

- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит:

в планировании и проведении исследований, разработке новых экспериментальных подходов, анализе полученных результатов, подготовке материала к публикациям. В работах, выполненных в соавторстве, вклад соискателя состоял в непосредственном участии в определенных или всех этапах исследования – от постановки задач и проведения экспериментов до обсуждения полученных данных и подготовки их к опубликованию.

Заключение

Диссертация Шлеевой М. О. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием значительного арсенала современных высокотехнологичных методов, адекватных поставленным задачам, существенным объемом проведенных исследований, и их значительной научной новизной. Выводы и положения диссертации, выносимые на защиту, вполне обоснованы и логически вытекают из представленных результатов, и подкреплены публикациями в рецензируемых журналах (25 статей, 10 из которых в журналах уровня Q1). Таким образом, данная работа выполнена на высоком методическом уровне, является актуальной для научно-технического развития в области биохимии и соответствует тенденциям развития мировой науки. Диссертация Шлеевой М.О. направлена на решение важной медико-биологической проблемы и может быть квалифицирована как научное достижение – на основе выявления фундаментальных молекулярно-биологических закономерностей формулирование стратегии в разработке новых методов диагностики латентного ТБ и борьбы с этой формой инфекции, в частности, методов дезинфекции и подходов к фотодинамической инактивации микобактерий.

На заседании 08 апреля 2021 года Диссертационный совет принял решение присудить Шлеевой Маргарите Олеговне ученую степень доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 10 докторов биологических наук, 8 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в

состав совета Д 002.247.01.

«За» присуждение ученой степени - 19,

«Против» - нет,

Недействительных бюллетеней - нет.

Председатель диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

доктор химических наук, профессор, академик РАН



В. О. Попов

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

кандидат биологических наук

А. Ф. Орловский

« 8 » апреля 2021 г.