

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 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 BIOTEХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от 2 ноября 2023 г. № 21  
о присуждении Мартини Билли Александровне, гражданство Российская Федерация,  
ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «Малые некодирующие РНК DrrS и Mcr11 *Mycobacterium tuberculosis* – факторы взаимодействия “патоген-хозяин”» по специальности 1.5.4 Биохимия принята к защите 7 августа 2023 г. (протокол № 19) диссертационным советом 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет Утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16 ноября 2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 г. № 74/нк, от 10 февраля 2014 г. № 55/нк, от 30 сентября 2015 г. №1166/нк, от 13 марта 2019 г. № 222/нк, от 3 июня 2021 г. №561/нк и 22 марта 2023 г. №501/нк.

**Соискатель**

Мартини Билли Александровна (Острик Альбина Александровна, свидетельство о перемене имени 1 ИК №623181 от 5 ноября 2022), 1990 года рождения, в июне 2016 года окончила ГБОУ ВПО Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М. Сеченова Министерства Здравоохранения РФ с присуждением квалификации «Врач» по специальности 060104 Медико-профилактическое дело, в июне 2018 года окончила ординатуру ФГАОУ ВО Первого Московского Государственного Медицинского Университета имени И.М. Сеченова Министерства Здравоохранения РФ по специальности «Бактериология». С 2018 по 2022 год обучалась в очной аспирантуре

Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Диссертационную работу соискатель Мартини Б.А. выполняла в группе биохимии адаптации микроорганизмов Института биохимии им. А.Н.Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, где работает с 2018 года по настоящее время в должности младшего научного сотрудника.

**Научный руководитель:**

Салина Елена Геннадьевна, доктор биологических наук, руководитель группы биохимии адаптации микроорганизмов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

**Официальные оппоненты:**

Владимирский Михаил Александрович, доктор медицинских наук, профессор, зав. лабораторией иммунопатологии и иммунодиагностики туберкулёзной инфекции ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России;

Линге Ирина Андреевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза».

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор медицинских наук, профессор Владимирский Михаил Александрович является одним из ведущих отечественных специалистов в области изучения взаимодействия микобактерий туберкулеза и клеток инфицированного макроорганизма;

тем, что кандидат биологических наук Линге Ирина Андреевна является одним из ведущих отечественных специалистов в области изучения иммунного ответа организма при инфекции *M. tuberculosis*.

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

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Мартини Б.А.

**Ведущая организация:**

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора в своем положительном отзыве, подписанном Мокроусовым Игорем Владиславовичем, д.б.н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики и утвержденном директором ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора академиком РАН Тотоляном А.А, указала, что диссертационная работа Мартини Б.А. является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор Мартини Б.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности – 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора является признанным отечественным научным центром изучения генетического разнообразия и механизмов адаптации *M. tuberculosis*. Таким образом, сотрудники ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора и, в частности, лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики, являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Мартини Б.А.

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

#### **Публикации.**

Основные результаты диссертационной работы Мартини Билли Александровны изложены в 5 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842:

1. Martini B.A., Grigorov A.S., Skvortsova, Y.V., Bychenko, O.S., Salina, E.G., Azhikina, T.L. Small RNA MTS1338 Configures a Stress Resistance Signature in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 7928.



2. Острик А. А. (Мартини Б.А.), Григоров А. С., Бочарова И. В., Капрельянц А. С., Ажикина Т. Л., Салина Е. Г., Малые РНК Mcr11 и DrrS *Mycobacterium tuberculosis* как возможные регуляторы метаболизма глицерина. Прикладная биохимия и микробиология. – 2022, Т. 58, № 4, с. 360–365.

3. Острик А. А. (Мартини Б.А.), Ажикина Т. Л., Салина Е. Г. Малые некодирующие РНК и их роль в патогенезе *Mycobacterium tuberculosis*. Успехи биологической химии, Т. 61. – 2021. с. 229–252.

4. Острик А. А. (Мартини Б.А.), Салина Е. Г., Скворцова Ю. В., Григоров А. С., Быченко О. С., Капрельянц А. С., Ажикина Т. Л. Малые РНК *Mycobacterium tuberculosis* в адаптации к стрессовым условиям, моделирующим инфекцию *in vitro*. Прикладная биохимия и микробиология. – 2020, Т. 56, № 4, с. 336–341.

5. Salina E.G., Grigоров A., Skvortsova Yu., Majorov K., Bychenko O., Ostrick A. (Martini B.), Logunova N., Ignatov D., Kaprelyants A., Apt A., Azhikina T. MTS1338, A Small *Mycobacterium tuberculosis* RNA, Regulates Transcriptional Shifts Consistent With Bacterial Adaptation for Entering Into Dormancy and Survival Within Host Macrophages. Front Cell Infect Microbiol. 2019, 9, 405.

Результаты были представлены в виде устных и стендовых докладов на 5 международных конгрессах и конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций): EMBO Workshop on Tuberculosis 2022 «From innovation to intervention» в Париже в 2022 году; VII Съезд биохимиков России и X Российский симпозиум «Белки и пептиды» в Сочи в 2022 году; XXXIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, в Москве в 2021 году; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020» в Москве в 2020 году; II Объединённый научный форум и VI съезд биохимиков России в Дагомьсе в 2019 году.

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

**На диссертацию поступили следующие отзывы:**

**Отзыв официального оппонента доктора медицинских наук, профессора, Владимирского Михаила Александровича (положительный), замечаний не содержит.**

**Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук Линге Ирины Андреевны (положительный).** Отзыв содержит следующие замечания:

1. В тексте, к сожалению, встречается довольно много опечаток.

2. Названия линий мышей в материалах и методах следует приводить полностью, чтобы можно было проследить, где линия поддерживалась. Так, линия мышей I/St из питомника ФГБНУ «ЦНИИТ» называется I/StSnEgYCit.

3. Кроме того, хочется пожелать, чтобы при описании тех или иных явлений и ссылаясь на данные статей, автор приводил наиболее значимые и/или свежие статьи. Так, например, при описании роли TNF- $\alpha$  при туберкулезе приведены ссылки на не столь значимые статьи 1999 и 2000, тогда как есть исследования в модели туберкулеза на мышцах с кондиционными нокаутами гена *tnfa* в Т-клетках и макрофагах с подробным описанием функций этого цитокина на разных стадиях течения инфекции (например Allie N, *et al.*, 2013).

4. В русскоязычном тексте принято писать не « $\gamma$ -ИФН» и «CD4+ Т-клетки», а «Т-клетки CD4<sup>+</sup>» и «ИФН- $\gamma$ ». Так, фраза «Преимущественно  $\gamma$ -ИФН синтезируется CD4+ Т-лимфоцитами» лучше звучит «Преимущественно ИФН- $\gamma$  синтезируется Т-лимфоцитами CD4<sup>+</sup>».

5. По анализу транскриптома штаммов  $\Delta$ Mst11 и  $\Delta$ DtrS сделаны сводные таблицы (Рис. 21 и 22), что позволяет наглядно оценить наиболее значимые изменения. К сожалению, подобного рисунка или таблицы не сделано для результатов анализа транскриптома штаммов с овер-экспрессией генов малых РНК. Приведена лишь таблица с общим числом ДЭГ.

Также отзыв содержит вопрос:

Показано, что штамм *M. tuberculosis* с овер-экспрессией малой РНК DtrS лучше выживает при инфицировании макрофагов линии THP-1 (Рис. 4), по сравнению с микобактериями дикого типа. При этом штаммы микобактерий с делециями генов малых РНК DtrS и/или Mst11 не отличались по выживаемости при инфекции клеток линии THP-1 (Рис. 19) и КММФ мышей (Рис. 27). Как это можно объяснить?

**Отзыв ведущей организации ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора (положительный).** Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. *M. tuberculosis* – гетерогенный биологический вид включающий по крайней мере 10 филогенетических линий, 4 из которых значимы для человека, с сильными различиями путей эволюции и ко-адаптации с *Homo sapiens*. Находки для одних

генотипов желательно проверять на других генотипах. Для получения мутантов автор использовала штамм H37Rv – классический и наиболее изученный референтный штамм, что в целом логично. Изначально штамм H37Rv был выделен в начале XX века от больного в Нью-Йорке, и сейчас в мире существует несколько вариантов этого штамма с некоторыми различиями в геноме. Нужно понимать, что H37Rv далеко не идеальный референс-штамм, он представляет сублинию L4.9 (в рамках Евро-Американской филогенетической линии) которая была распространена 100 лет назад, но сейчас она достаточно маргинальная (в плане своего распространения) и в будущем было бы интересно повторение данной работы на штаммах актуальных эпидемических генотипов, прежде всего относящихся к генотипам Beijing, LAM (Latin-American Mediterranean) и Ural.

2. Автор пишет, что «геномы мутантных штаммов депонированы в базе данных NCBI SRA и могут быть найдены по номеру: ID PRJNA701202». Возникает вопрос, депонированы ли также данные по транскриптомике в открытых базах данных?

3. В разделе 2.6 главы «Материалы и методы» не приведены последовательности праймеров, использованных для создания конструкции для комплементации делеции генов малых РНК.

#### **На автореферат поступили положительные отзывы от:**

**Зименкова Данилы Вадимовича**, кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории технологий молекулярной диагностики Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; замечаний нет.

**Бичучер Анны Мироновны**, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории коковых инфекций ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора; замечаний нет.

**Белодеда Андрея Васильевича**, кандидата биологических наук, доцента кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева; 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; замечаний нет.

**Кубаревой Елены Александровны**, доктора химических наук, профессора, главного научного сотрудника отдела химии нуклеиновых кислот Научно-



исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО МГУ им. Ломоносова. Отзыв содержит следующие замечания:

1. Было бы полезным представить в автореферате краткую характеристику малых РНК DtgS и Mcr11: их последовательность, предсказанную вторичную структуру, ее подтверждение экспериментальными данными (если таковые имеются). Сравнение структур этих РНК могло бы помочь в объяснении их различной функциональной роли в клетке.

2. В списке сокращений (стр. 8) не вполне корректным является термин фосфатно-буферный раствор. Следовало бы указать, какой именно буфер использовали – натрий- или калий-фосфатный и рН раствора.

3. На рис. 6 (стр. 20), на котором представлена динамика роста штаммов с восстановленной вирулентностью, отсутствуют погрешности экспериментов или хотя бы указание на то, сколько технических и биологических повторов было выполнено.

**С вопросами выступили:**

д.б.н. Юрина Н.П., д.б.н., проф. Звягильская Р.А., д.б.н. Мулюкин А.Л., д.б.н. Агафонов М.О., д.б.н. Шлеева М.О., д.б.н., проф. Левицкий Д.Н., д.х.н., проф., академик РАН Попов В.О.

**В обсуждении приняли участие:**

д.б.н. Ажикина Т.Л., д.б.н. Топунов А.Ф., д.б.н. Мулюкин А.Л.

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

1. Малая РНК DtgS участвует в формировании устойчивости клеток к стрессам *in vitro*, моделирующим условия пребывания *M. tuberculosis* в фагосоме при инфекции макроорганизма, и способствует сохранению жизнеспособности микобактерий в макрофагах.

2. В штамме с делецией DtgS наблюдается транскриптомный ответ, указывающий на снижение эффективности центральных метаболических процессов и запуск программы выживания *M. tuberculosis* в стрессовых условиях.

3. По данным транскриптомного анализа, в штамме с делецией Mcr11 происходит активация процессов ремоделирования клеточной стенки и подавления биосинтеза факторов вирулентности *M. tuberculosis*.

4. Инфекция костномозговых макрофагов мыши штаммами *M. tuberculosis* с делецией малых РНК DrrS и Mcr11 вызывает дисбаланс иммунных реакций макроорганизма, особенно выраженный при инфекции штаммом с делецией двух малых РНК  $\Delta\Delta DrrS\_Mcr11$ .

5. Инфекция мышей штаммом *M. tuberculosis*  $\Delta DrrS$  приводит к увеличению времени жизни животных, а штаммом  $\Delta Mcr11$  и  $\Delta\Delta DrrS\_Mcr11$  – к сокращению времени жизни животных по сравнению с их временем жизни при инфекции штаммом дикого типа.

6. Малые РНК DrrS и Mcr11 являются регуляторами метаболической адаптации патогена при инфекции, влияя на его жизнеспособность и модулируя иммунный ответ организма-хозяина.

**Теоретическая значимость исследования** заключается в том, что в ходе работы установлены метаболические пути *M. tuberculosis*, в регуляции которых принимают участие малые РНК Mcr11 и DrrS. Доказана связь малых РНК Mcr11 и DrrS с экспрессией генов патогенности, а также других генов, отвечающих за взаимодействие *M. tuberculosis* и организма хозяина. Данный результат указывает на то, что малые РНК Mcr11 и DrrS могут являться факторами вирулентности *M. tuberculosis*, участвуя в регуляции бактериального метаболизма и персистенции микобактерий в иммунных клетках хозяина в целом. Полученные результаты имеют фундаментальное значение для понимания механизмов взаимодействия *M. tuberculosis* с инфицированным организмом и способности бактерий к длительному выживанию в стрессовых условиях.

**Практическая значимость работы** заключается в том, что были получены штаммы *M. tuberculosis* с делециями малых РНК DrrS и Mcr11, обладающие иными вирулентными свойствами, чем исходный штамм *M. tuberculosis* H37Rv, которые могут быть использованы для дальнейшего исследования процессов взаимодействия патогена и инфицированного организма в моделях экспериментального туберкулеза с использованием лабораторных животных, и изучения стратегий адаптации *M. tuberculosis* к иммунной защите млекопитающих, что является критически важным для разработки новых терапевтических подходов в борьбе с туберкулезом, включая иммунотерапию. Кроме того, оценка уровней экспрессии малых РНК Mcr11 и DrrS также может являться диагностическим маркером форм туберкулеза, связанных с длительным персистенцированием микобактерий в организме.



### **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 получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

### **Заключение**

Диссертация Мартини Б.А. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием значительного арсенала современных методов, адекватных поставленным задачам, существенным объемом проведенных исследований, их научной новизной. Выводы и положения диссертации, выносимые на защиту, вполне обоснованы и логически вытекают из представленных результатов, и подкреплены публикациями в рецензируемых журналах (5 статей). Таким образом, работа Мартини Б.А. выполнена на высоком методическом уровне, является актуальной для научно-технического развития в области биохимии и медицинской биологии, и устанавливает функциональную роль малых некодирующих РНК DrrS и Mcr11 как факторов взаимодействия патогена *M. tuberculosis* и инфицированного организма.

На заседании 2 ноября 2023 года диссертационный совет принял решение присудить Мартини Билли Александровне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 12 докторов биологических наук, 6 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета 24.1.233.01.

«За» присуждение ученой степени – 19 ,

«Против» – нет ,

Недействительных бюллетеней – нет.

Председатель

диссертационного совета

ФИЦ биотехнологии РАН

д.х.н., профессор, академик РАН



В.О. Попов

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ биотехнологии РАН

кандидат биологических наук



А.Ф. Орловский

«2» ноября 2023 г.

