

## **Отзыв официального оппонента**

на диссертационную работу Замахаева Михаила Владимировича «Роль токсин-антитоксिनных систем VarBC и MazEF в формировании фенотипической устойчивости *Mycobacterium smegmatis* к антибиотикам», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

### **Актуальность темы исследования**

Актуальность диссертационного исследования, представленного М.В. Замахаевым, обусловлена высокой распространенностью бактериальной толерантности к антибиотикам, связанной не только с генетической резистентностью, но и с формированием фенотипически устойчивых субпопуляций бактерий. Такие физиологические состояния бактерий, как покой и персистенция, значительно осложняют антибактериальную терапию. Особое значение это имеет для борьбы с туберкулезом, поскольку способность возбудителя данного заболевания – *Mycobacterium tuberculosis* – переходить в покоящееся состояние напрямую влияет на длительность терапии и вероятность реактивации инфекции. В частности, для микобактерий важную роль в формировании подобных состояний могут играть токсин-антитоксिनные (ТА) системы.

Исследование токсин-антитоксिनных систем VarBC и MazEF является востребованным, поскольку данные системы широко представлены у микобактерий и предположительно участвуют в регуляции метаболизма, стрессового ответа и устойчивости к антибиотикам. Однако молекулярные механизмы их функционирования остаются недостаточно изученными.

В связи с этим диссертационная работа М.В. Замахаева, направленная на выяснение механизмов действия ТА-систем VarBC и MazEF у *Mycobacterium smegmatis* (адекватной модельной системы для изучения физиологии возбудителя туберкулеза), является безусловно актуальной и имеет как фундаментальное, так и прикладное значение для совершенствования методов борьбы с персистирующими бактериальными инфекциями.

### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы**

В ходе выполнения работы автором получен ряд результатов, обладающих несомненной научной новизной:

Впервые раскрыт конкретный молекулярный механизм действия токсина VarC *M. smegmatis*, показано, что он является сайт-специфичной эндорибонуклеазой, расщепляющей 23S рРНК в области сарцин-рициновой петли между нуклеотидами U2880 и A2881. Этот сайт практически совпадает

с мишенью токсина VarC20 у *M. tuberculosis*, что указывает на эволюционную консервативность механизма.

Впервые методами количественного протеомного анализа показано, что гиперэкспрессия VarC приводит к глобальной перестройке белкового профиля в клетках *M. smegmatis*: особенно значимым результатом является обнаружение увеличения представленности рибосомальных белков в мембранной фракции белкового профиля, сопровождающееся снижением уровня аминоксил-тРНК-синтетаз и факторов элонгации трансляции, а также активации альтернативных метаболических путей (таких, как, например, глиоксилатный шунт и шунт гамма-аминомасляной кислоты).

Кроме того, обнаружены косвенные данные, указывающие на перекрёстный характер взаимодействия ГА-систем VarBC и MazEF: показано, что делеция локуса *varBC* повышает чувствительность к тетрациклину, однако введение дополнительной делеции по локусу *mazEF* возвращает фенотип клеток к дикому типу, что свидетельствует о сложной регуляции взаимодействия внутриклеточных токсинов и антитоксинов.

Также впервые продемонстрирована функциональная активность гетерологичного токсина VarC *M. smegmatis* в клетках *M. tuberculosis*, что подтверждает общность механизмов действия токсинов VarC-семейства у этих видов микобактерий.

Теоретическая значимость работы заключается в создании модели формирования фенотипической устойчивости, согласно которой активация токсина VarC в клетках *M. smegmatis* вызывает инактивацию рибосом через расщепление 23S рРНК, их ассоциацию с цитоплазматической мембраной и последующее перепрограммирование метаболизма, что в итоге обеспечивает выживание субпопуляции клеток при действии антибиотиков, ингибирующих трансляцию, показанное на примере тетрациклина.

Результаты диссертации имеют практическое значение для разработки новых подходов к антибактериальной терапии. В частности, предложенный механизм инактивации рибосом через расщепление рРНК может служить мишенью для создания соединений, предотвращающих развитие клетками микобактерий фенотипической устойчивости к антибиотикам.

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертация изложена на 225 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов (глава 2), результатов и их обсуждения (глава 3), заключения, выводов, списка литературы (390 источников) и трёх приложений. Работа иллюстрирована 23 рисунками и 8 таблицами.

Введение убедительно обосновывает актуальность, цели и задачи, а также степень разработанности темы.

**Обзор литературы (глава 1)** написан хорошим академическим языком, охватывает современные данные о классификации ТА-систем, их физиологических ролях и участии в формировании бактериальной персистенции, а также о ТА-системах как мишенях в новых стратегиях борьбы с бактериальными инфекциями.

**Материалы и методы (глава 2)** содержат подробное изложение применяемых в работе методов и подходов, соответствующих современному уровню: описаны методы генной инженерии (в частности, конструирование рекомбинантных штаммов), протеомное профилирование (ЖХ-МС/МС-анализ), молекулярно-генетические методы (ОТ-ПЦР-анализ, РНК-секвенирование, анализ методом удлинения праймера). Объём использованных подходов адекватен поставленным задачам.

**Результаты и обсуждение (глава 3)** – ключевая часть работы. Материал изложен последовательно, логично и хорошо проиллюстрирован. Особого внимания заслуживает комплексный анализ, сочетающий физиологические эксперименты (оценка выживаемости штаммов *M. smegmatis* при антибиотическом стрессе в условиях гиперэкспрессии целевых токсинов, а также при делеции исследуемых ТА-локусов), протеомное профилирование и точное картирование сайта расщепления 23S рРНК, вызванное активностью токсина VarC. Выводы, представленные в конце главы, обоснованы и вытекают из полученных данных.

Заключение и выводы сформулированы чётко, соответствуют цели и задачам работы. Всего сделано 6 выводов, каждый из которых подтверждён экспериментально.

Приложения (списки дифференциальных и уникальных белков, идентифицированных по результатам количественного протеомного анализа) имеют большую ценность для исследователей, работающих в данной области.

### **Степень обоснованности и достоверности результатов и выводов диссертационной работы**

Степень обоснованности и достоверности результатов, представленных в диссертационной работе М.В. Замахаева, представляется высокой и подтверждается рядом факторов. Прежде всего, достоверность полученных данных обеспечивается использованием современных и адекватных поставленным задачам методов исследования. Обоснованность результатов подтверждается корректной постановкой экспериментов, включением необходимых контролей (например, штамма с пустым вектором в

экспериментах с использованием рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* с гиперэкспрессией целевых токсинов); все эксперименты выполнены в трёх и более биологических повторах, результаты обработаны с применением корректных методов статистической обработки. Особое значение для достоверности выводов имеет использование количественных методов анализа, включающих измерение уровней экспрессии генов, оценку выживаемости клеток в условиях действия антибиотиков, а также количественный протеомный анализ. Полученные результаты согласуются между собой и демонстрируют логическую взаимосвязь между активностью токсина *VarC*, изменениями на уровне трансляционного аппарата и формированием стрессового ответа клетки.

Кроме того, следует отметить, что результаты диссертационного исследования М.В. Замахаева в полном объёме представлены в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus; материалы диссертации также представлялись на всероссийских и международных конференциях, по итогам которых было опубликовано 5 тезисов докладов.

### **Замечания и вопросы по диссертационной работе**

В целом, работа прекрасно и аргументировано написана, практически не содержит стилистических неточностей, каждый результат имеет логичное обсуждение, так что замечаний как к стилю, так и к содержанию работы практически нет. Единственным замечанием к стилистике работы является довольно странное расположение подписей к некоторым рисункам, где номер рисунка и его название следует не до, а после текста, описывающего содержание рисунка. Также при чтении диссертации возникло несколько вопросов, связанных, скорее со сложностью рассматриваемых взаимодействий, чем с самими результатами.

1. На рисунке 13 приводится число КОЕ в присутствии ингибирующей концентрации тетрациклина 5 мкг/мл, показывающее, что при такой концентрации гиперэкспрессия *VarC* не вызывает уменьшения КОЕ по сравнению с контролем. В этой связи возникает вопрос, высокие концентрации тетрациклина не стимулируют продукцию токсинов?
2. При высоких концентрациях тетрациклина делеция *varBC* приводит к уменьшению КОЕ, если только одновременно с *varBC* не происходит делеция *mazEF*. Автор предполагает, что это связано с потенциальным прямым взаимодействием между токсином *MazE* и антитоксином другой пары *VarB*. А есть какие-то альтернативные гипотезы?

Однако данные вопросы имеют скорее фундаментальный характер и никак не влияют на высокую оценку материалов диссертации.

### **Заключение**

Диссертационная работа Замахаева Михаила Владимировича «Роль токсин-антитоксिनных систем VarBC и MazEF в формировании фенотипической устойчивости *Mycobacterium smegmatis* к антибиотикам» является завершённым, самостоятельным научным исследованием, содержащим решение актуальной задачи – установления молекулярного механизма формирования фенотипической устойчивости микобактерий через VarC-опосредованное расщепление 23S рРНК и инактивацию рибосом.

По актуальности, научной новизне, объёму и методическому уровню, теоретической и практической значимости представленная работа полностью соответствует требованиям п. 9–14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор работы, Замахаев Михаил Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

### **Официальный оппонент**

заведующая лабораторией экологии возбудителей инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор биологических наук по специальностям 03.02.03. Микробиология, 03.02.07. Генетика

«28» 04 \_\_\_\_\_ 2026 г.



С.А. Ермолаева

Адрес:

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 18

телефон: 8(499)190-4375

электронная почта: drermolaeva@mail.ru

Я, Ермолаева Светлана Александровна, даю согласие на размещение моих персональных данных на официальном сайте ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН» и в Федеральной информационной системе государственной научной аттестации, включение их в аттестационное дело

соискателя и дальнейшую обработку.

«28» 04 \_\_\_\_\_ 2026 г.

С.А. Ермолаева

Подпись д.б.н. С.А. Ермолаевой заверяю  
Ученый секретарь  
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи  
Минздрава России,  
кандидат биологических наук

«28» 04 \_\_\_\_\_ 2026 г.



Е.В. Сысоятина