

## Отзыв

### на автореферат диссертационной работы Фурсова Михаила Васильевича «Молекулярно-генетическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия

Рецензируемый автореферат диссертационной работы на соискание ученой степени кандидата биологических наук оформлен в соответствии с требованиями, предъявляемыми к автореферату. В нем дана общая характеристика диссертации, изложено содержание работы, представлены выводы и список публикаций.

Диссертационная работа посвящена молекулярно-генетической, фенотипической и биологической характеристике гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, что представляет интерес как с точки зрения фундаментальных вопросов эволюции возбудителя социально значимой инфекции (туберкулеза), так и с точки зрения практической значимости для здравоохранения.

Цель работы несомненно актуальна и для ее достижения г-н Фурсов выполнил ряд задач, а именно: охарактеризованы культурально-морфологические и молекулярно-генетические свойства трех клинических штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных людей с тяжелыми формами туберкулезной инфекции, проанализированы их геномы, определена их принадлежность к генетическим линиям туберкулезного микроба, идентифицированы фенотипы и генотипы устойчивости к противотуберкулезным препаратам, а также вирулентность на животных моделях. Автором также проведена оценка транскрипционного ответа генов цитокинов мышей линии C57BL/6 на заражение изучаемыми клиническими штаммами *M. tuberculosis* и изменение транскрипционной активности 10 генов малых некодирующих РНК *M. tuberculosis* в ответ на воздействие стрессов, моделирующих *in vitro* условия окружения клеток туберкулезного микроба в фагосомах макрофагов организма-хозяина. Кроме того, представлены данные по оценке профилактической и терапевтической эффективности препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» на животных моделях острой и хронической туберкулезной инфекции.

**Научная новизна** работы заключается в том, что три клинических гипервирулентных штамма *M. tuberculosis*, выделенных от людей с тяжелыми формами туберкулеза, отнесены к генетическим кладам генотипа Beijing CAO (Central Asia Outbreak) (2 штамма) и B0/W148 (1 штамм), при этом все штаммы были мультирезистентными. Показано, что уровень вирулентности изучаемых штаммов для мышей линии C57BL/6 превышал таковой референс-штамма H37Rv. Показано, что 26 генов цитокинов (*Ifn-γ*, *Tnf-α*, *Il-1α*, *Il-1β*, *Il-6*, *Il-7*, *Il-10*, *Il-12(p35)*, *Il-12(p40)*, *Il-13*, *Il-15*, *Il-17*, *Mx1*, *IFI44*, *Cxcl2*, *Cxcl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl11*, *Csf1*, *Csf2* и *Vegf*) изменяют транскрипционную активность в тканях легких мышей линии C57BL/6, зараженных клиническими штаммами *M. tuberculosis*, принадлежащими к генетическим кладам CAO и B0/W148, по сравнению с интактными мышами. Выявлен «ранний» ответ экспрессии 10 генов малых некодирующих РНК туберкулезного микроба (MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drrs, MTS2823/Ms1, B11/C6, Mpr5, Mcr3, Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18) *in vitro* на стрессы («осмотический», «голодание», гипоксический, «кислотный», оксидативный), моделирующие условия окружения клеток *M. tuberculosis* в фагосомах макрофагов организма-хозяина. Продемонстрирована профилактическая и терапевтическая эффективность БЦЖ-бустерной рекомбинантной субъединичной вакцины «ЛТБвак» на животных моделях.

Представленные автором экспериментальные данные вносят вклад в понимание молекулярно-генетических механизмов гипервирулентности и широкой лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам у штаммов *M. tuberculosis* современных генетических клон В0/W148 и САО генотипа Beijing, преобладающих на территории Российской Федерации, расширяют представление о влиянии туберкулезной инфекции на экспрессию генов цитокинов в тканях организма-хозяина и о механизмах адаптации патогена к стрессовым условиям окружающей среды внутри фагосом макрофагов.

**Практическая значимость** работы подтверждается представленной в автореферате информацией о депонированных в Государственной коллекции штаммах возбудителя туберкулеза, размещенных геномах в международной базе GenBank, разработанных методах детекции и определения уровней транскрипционной активности 26 генов цитокинов мышей и 10 генов малых некодирующих РНК *M. tuberculosis*, зарегистрированной в Госреестре Базе данных, а также проведенных на животных моделях испытаниях препарата «ЛТБвак».

Оценивая работу в целом крайне положительно, хочу сформулировать **ряд вопросов и замечаний**:

(1) Дизайн исследования. Выбор мышей линии C57BL/6 зараженных внутривенно в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/животное. Почему не BALB/c? Почему внутривенно и почему такая доза (а не больше)?

(2) Автор пишет про изученные штаммы, что «определена их принадлежность к широко распространенным в РФ генетическим клонам САО и В0/W148».

Генотип САО – однозначно значим, но в РФ еще НЕ широко распространен, а весьма незначительно, по крайней мере в европейской части России.

(3) Автор пишет «В геномах штаммов *M. tuberculosis* 120/26, Ростов и 267/47 идентифицированы мутации, ассоциированные с фенотипами множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), пред-широкой лекарственной устойчивости (пред-ШЛУ) и широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ), соответственно.»

«пред-ШЛУ. В геноме штамма идентифицированы 5 значимых мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду *katG* (C944G, Ser315Thr), рифампины *rpoB* (C1349T, Ser450Leu), стрептомицину *rpsL* (A128G, Lys43Arg), этамбутолу *embB* (A916G, Met306Val), амикацину, канамицину и капреомицину *rrs* (A1401G), ...»

Очевидно, что определение ШЛУ дано согласно устаревшей терминологии.

По новой классификации ВОЗ, которой уже полтора года (январь 2021 г.), устойчивость к амикацину, канамицину и капреомицину во внимание не принимается. Roelens M, et al. Evidence-based Definition for Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2021 Sep 15;204(6):713-722. doi: 10.1164/rccm.202009-3527OC.

(4) По списку публикаций. У Скопуса не IF (Impact Factor), а свой собственный индекс SJR (SCImago Journal Rank), который рассчитывают иначе. Т.е. нужно писать не Scopus IF = 0,544, а Scopus SJR = 0,544.

Высказанные замечания не снижают ценности работы.

В целом, на основании автореферата, можно сделать вывод о том, что диссертационной работа Фурсова Михаила Васильевича «Молекулярно-генетическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*» по актуальности, новизне,

объему проведенных исследований, научной ценности и практической значимости полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., в редакции постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, и отвечает требованиям, предъявляемым к диссертационным работам, и автор, несомненно, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия.

Мокроусов Игорь Владиславович, д.б.н.  
зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики  
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера  
Ул. Мира 14, Санкт-Петербург 197101 Россия  
Тел.: (812) 2332149  
E. mail: imokrousov@mail.ru

Подпись Мокроусова заверяю  
Начальник отдела кадров:

*(И. В. Митяков)*

19.08.2022