

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Фурсова Михаила Васильевича на тему: «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

Диссертационное исследование посвящено изучению культурально-морфологических и молекулярно-генетических свойств клинических штаммов *M. tuberculosis*, выявлению мутаций, ассоциированных с резистентностью к противотуберкулезным препаратам, изучению ответа иммунной системы мышей линии C57BL/6 на инфекцию, вызванную гипервирулентными штаммами *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26, оценке профилактической и терапевтической эффективности препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» на животных моделях.

Туберкулез является одной из основных причин смерти во всем мире. Все больше нарастает значимость туберкулезной инфекции, вызванной множественно-устойчивыми вариантами *Mycobacterium tuberculosis*, среди которых выявляют штаммы MDR/RR-TB – возбудители экстремально устойчивого туберкулеза (XDR-TB). По данным филогеографии туберкулеза, в Российской Федерации циркулируют несколько генотипов *M. tuberculosis*: доминантное семейство Beijing, характеризующееся высоким уровнем вирулентности и лекарственной устойчивости; Латино-Американско-Средиземноморское (LAM) семейство, второе по величине в Российской Федерации и ассоциированное с MDR-TB в некоторых регионах; Уральское семейство. Распространение штаммов, принадлежащих к генетической линии Beijing, является проблемой здравоохранения РФ, поскольку повышает напряженность эпидемиологической ситуации по туберкулезу, увеличивает риск роста заболеваемости и смертности в популяции населения.

Проблема нарастания множественной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза усугубляется устойчивостью данного патогена к действию иммунной системы макроорганизма. Известно, что некоторые MDR-TB штаммы вызывают патологический процесс, обладающий уникальными особенностями, а именно, отмечается отрицательное влияние на развитие иммунитета против туберкулезной инфекции.

Основным способом профилактики туберкулеза является вакцинация.

Однако эффективность вакцины БЦЖ варьирует от 0 до 80 % в разных регионах мира, также эта вакцина не рекомендована для профилактики туберкулеза у ВИЧ-позитивных пациентов.

Все вышесказанное указывает на необходимость изучения фено- и генотипа циркулирующих на территории РФ штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, разработки новых вакцинных препаратов, в том числе - бустерных вакцин, направленных на усиление защитных свойств БЦЖ, определяя несомненную актуальность исследований Фурсова М.В.

Целью диссертационного исследования была молекулярно-генетическая, фенотипическая и биологическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*.

Поставленные автором задачи адекватны и достаточны для достижения цели исследования. Задачи исследования раскрыты в основных положениях, выносимых на защиту, и выводах.

Автореферат диссертационной работы построен по традиционной схеме и включает все необходимые разделы. В автореферате четко показаны степень разработанности темы, научная новизна, практическая значимость работы, перспективы дальнейшей разработки темы. Как следует из анализа данных, представленных в автореферате, в ходе исследования автор описал фенотипические и молекулярно-генетические свойства клинических изолятов *M. tuberculosis* Ростов, 267/47 и 120/26, выделенных от больных людей с тяжелыми формами туберкулезной инфекции, что позволило определить их принадлежность к генетическим кладам CAO и B0/W148 возбудителя туберкулеза генотипа Beijing.

На основе анализа генома штамма *M. tuberculosis* Ростов выявлено 5 значимых мутаций, ассоциированных с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, на основе чего он был отнесен к пред-широкораспространенному фенотипу резистентности. Штамм *M. tuberculosis* 267/47 характеризовался широкой лекарственной устойчивостью, проявлял резистентность к пяти противотуберкулезным препаратам 1 ряда и 4 препаратам 2 ряда и был ассоциирован с наличием 6 точечных мутаций в генах, ассоциированных с антибиотикорезистентностью и 2 точечных мутаций в промоторных областях генов. Штамм *M. tuberculosis* 120/26 был отнесен к множественно-лекарственно устойчивому фенотипу, характеризовался устойчивостью к 4 противотуберкулезным препаратам 1 ряда и имел 4 точечных мутации в генах, ассоциированных с антибиотикорезистентностью.

На модели экспериментальной инфекции описаны изменения транскрипции 26 генов цитокинов в тканях легких мышей линии C57BL/6, зараженных изучаемыми клиническими штаммами *M. tuberculosis*, по сравнению с интактными мышами. Оценен транскрипционный ответ генов цитокинов мышей линии C57BL/6 на заражение клиническими штаммами *M. tuberculosis* 267/47, описан ответ экспрессии 10 генов мнРНК (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. Полученные данные дают возможность предположить роль мнРНК в обеспечении адаптационных возможностей возбудителя туберкулеза в стрессовых для бактерии условиях.

Показана профилактическая эффективность кандидатной БЦЖ-бустерной рекомбинантной субъединичной вакцины «ЛТБвак» на моделях острой туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6 и морских свинок альбиносов и терапевтическая эффективность препарата «ЛТБвак» на модели хронического туберкулеза у мышей линии C57BL/6.

Высокой оценки заслуживают **теоретическая и практическая значимость** работы. Полученные автором данные вносят вклад в понимание молекулярно-генетических механизмов гипервирулентности и широкой лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам у штаммов современных генетических клон *M. tuberculosis* B0/W148 и CAO генотипа Beijing, встречающихся на территории Российской Федерации; влияния туберкулезной инфекции на экспрессию генов цитокинов в тканях организма-хозяина на мышинной модели; механизмов адаптации патогена к стрессовым условиям окружающей среды внутри фагосом макрофагов, за счет изменения уровней экспрессии мнРНК; возможности эффективного использования БЦЖ-бустерных рекомбинантных вакцин для совершенствования схем профилактики и терапии туберкулеза.

Геномы штаммов *M. tuberculosis* Ростов, 267/47 и 120/26 размещены в международной базе данных GenBank. В Госреестре зарегистрирована база данных «Гены вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*». Штаммы *M. tuberculosis* В-9343, В-9344 и В-9351 депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск».

Разработаны наборы праймеров для детекции и определения уровней представленности транскриптов 26 генов цитокинов мышей; 10 малых

некодирующих РНК *M. tuberculosis*, что может быть использовано для оценки иммунного ответа лабораторных мышей на различные патогены, определения степени модуляции иммунной системы при испытании новых препаратов.

Доказана профилактическая и терапевтическая эффективность препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак», разработанного НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи.

Достоверность результатов исследования обусловлена значительным объемом экспериментальных данных, полученных с применением сертифицированного оборудования и использованием методов, соответствующих современным требованиям и стандартам.

Выводы диссертации аргументированы, соответствуют поставленной цели, задачам исследования и полностью отражают суть выполненной работы.

Объем проведенных исследований и высокий **методический уровень** диссертационной работы дают основание считать работу завершенной. Цель исследования полностью достигнута.

Основные материалы и результаты диссертации **М.В. Фурсова** в полном объеме доложены автором и обсуждены на 8 международных и российских конференциях и симпозиумах. По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 5 статей в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации». Получено свидетельство на базу данных.

Заключение. Анализируя автореферат диссертации **Фурсова Михаила Васильевича** на тему: «Молекулярно-генетическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. – Микробиология и 1.5.4. – Биохимия, является законченным самостоятельным исследованием, результаты которого имеют теоретическое и практическое значение. По своей актуальности, научной новизне, практической значимости результатов и объёму проведённых исследований диссертационная работа **Фурсова Михаила Васильевича** отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановлений Правительства РФ № 723 от 30.07.2014г., № 335 от 21.04.2016г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., № 426

от 20.03.2021, № 1539 от 11.09.2021 г, с изменениями, внесёнными Постановлением Правительства РФ № 751 от 26.05.2020 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор, **Фурсов Михаил Васильевич**, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. – Микробиология и 1.5.4. – Биохимия.

Заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Оренбургский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации;
460014, Российская Федерация, Оренбургская область,
г.Оренбург, улица Советская, 6,
тел.+7 (3532) 500606 доб.205
e-mail:lELEnaalekseevna@yandex.ru

доктор биологических наук
(03.02.03-микробиология), доцент



Елена Алексеевна Михайлова

Подпись доктора биологических наук, доцента Михайловой Елены Алексеевны заверяю:

И.О. Начальника отдела кадров федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования

«Оренбургский государственный
медицинский университет»

Министерства здравоохранения
Российской Федерации

460014, Российская Федерация

Оренбургская область,

г.Оренбург,

улица Советская, 6,

« » _____ 2022 г.



Шишканов Дмитрий Геннадьевич