

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

комиссии диссертационного совета 64.1.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора по кандидатской диссертации Фурсова Михаила Васильевича на тему: «Молекулярно-генетическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*», выполненной в отделе подготовки и усовершенствования специалистов на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия

Соответствие соискателя ученой степени требованиям, необходимым для допуска к защите. Фурсов М.В. соответствует требованиям, изложенным в п. 3 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г.: имеет высшее образование, подтвержденное дипломом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности «Почвоведение» со специализацией «Генезис и эволюция почв», выполнил диссертационную работу на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, давшего положительное заключение по данной диссертации; сдал кандидатские экзамены, о чем предоставлена справка.

Соответствие диссертации специальности, по которой совету предоставлено право защиты. Диссертация Фурсова М.В. выполнена под руководством доктора биологических наук Потапова Василия Дмитриевича (специальность 1.5.11. Микробиология) и академика РАН, доктора медицинских наук (специальность 1.5.11. Микробиология), профессора Дятлова Ивана Алексеевича на современном научно-методическом уровне с использованием микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических, биоинформатических, биологических, гистологических и статистических методов исследования. Члены комиссии считают, что диссертация Фурсова М.В. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, отрасли науки «Биологические науки», паспортам специальностей 1.5.11. Микробиология по пунктам 1 - «Проблемы эволюции микроорганизмов, установление их филогенетического положения», 2 — «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов» и 9

— «Участие микроорганизмов в круговороте веществ» и 1.5.4. Биохимия по пунктам 10 - «Теоретические и прикладные проблемы природы и закономерностей химических превращений в живых организмах, молекулярных механизмов интеграции клеточного метаболизма, связей биохимических процессов с деятельностью органов и тканей, с жизнедеятельностью организма для решения задач сохранения здоровья человека, животных и растений, выяснения причин различных болезней и изыскания путей их эффективного лечения. Развитие методов генодиагностики, энзимодиагностики и научных принципов генотерапии и энзимотерапии» и 14 - «Исследования молекулярных механизмов реагирования клеточных компонентов и живых организмов на проникающую радиацию, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, электромагнитные поля, механические, холодовые, тепловые, химические, токсические и другие экстремальные воздействия. Биохимические исследования по созданию протективных средств на эти воздействия. Изучение роли активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления и свободнорадикальных продуктов в нарушениях и регулировании метаболических процессов в биосистемах».

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных автором. Выполнение требований к публикации основных научных результатов диссертации. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, из них 5 статей в журналах, входящих в базы данных международных индексов научного цитирования Scopus и в российских журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, 1 База данных, 2 статьи в прочих изданиях и 8 тезисов докладов в сборниках трудов конференций, что является вполне достаточным для проведения защиты.

Личное участие соискателя заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, выполнении микробиологических, молекулярногенетических, биохимических, биологических экспериментов и анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и постерных докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с сотр. ФБУН ГНЦ ПМБ д.б.н. Потаповым В.Д., к.б.н. Комбаровым Т.И., к.б.н. Ганиной Е.А., к.х.н. Домотенко Л.В., к.б.н. Богуном А.Г., н.с. Грищенко Н.С., н.с. Рудницкой Т.И. и м.н.с. Колупаевой Н.В.; сотр. ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА к.б.н. Шитиковым Е.А.; сотр. НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи к.б.н. Васиной Д.В., к.б.н. Ткачуком А.П., к.б.н. Гуциным В. А.

Присвоения авторства чужого научного труда (плагиата), результатом которого может быть нарушение авторско-правового и патентного законодательства, в данной диссертации не обнаружено.

Диссертационная работа изложена на 178 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: оглавление, введение, обзор литературы, основную часть, в которой изложены описание материалов и методов исследования, результаты экспериментальных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Список литературы включает 323 источника.

Актуальность выбранной темы определяется тем, что туберкулез (ТБ) – одна из основных причин смертности во всем мире. Хотя в последнее десятилетие в мире в целом отмечается постепенное снижение заболеваемости ТБ, около 95 % смертей от туберкулеза зафиксировано в слабо- и среднеразвитых странах. По мнению экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), из-за пандемии COVID-19 показатели заболеваемости ТБ возрастут в 2021-2022 гг. Наибольшую проблему для здравоохранения представляет собой лекарственно-устойчивый ТБ, устойчивый к изониазиду и/или к рифампицину, а также множественно лекарственно-устойчивый (МЛУ), ТБ с пред-широкой лекарственной устойчивостью (пред-ШЛУ) и с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ). Доля лекарственно-устойчивого ТБ в последние годы возрастает: в 2018 г. она составила 50 %, в 2019 г. – 61 %, в 2020 г. 71 %.

Возбудитель ТБ *M. tuberculosis* подразделяется на разные генетические линии, циркулирующие в различных регионах мира. На территории Российской Федерации (РФ) преобладают изоляты сполиготипов Beijing, Ural и LAM, среди которых доля генотипа Beijing достигает 47-72 % в разных регионах страны. Штаммы данного генотипа характеризуются повышенной вирулентностью, способностью быстро адаптироваться к иммунной системе макроорганизма, выживать и размножаться в макрофагах (МФ), высоким уровнем лекарственной устойчивости и трансмиссивности. Методами полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа выявлены точечные мутации и внутригеномные перестройки, ассоциированные с повышением вирулентных и антибиотикорезистентных свойств современных штаммов *M. tuberculosis*.

Способность клеток *M. tuberculosis* выживать в МФ связана с наличием у них специфических механизмов изменения клеточного метаболизма. В МФ микобактерии подвергаются воздействию множества стрессов, в том числе дефициту железа, недостатку питательных веществ, окислительному стрессу, низкому уровню pH и осмотическому шоку. Установлено, что микобактерии приспосабливаются к такого рода стрессам

посредством транскрипционных и посттранскрипционных механизмов, регулируемых в том числе с помощью малых некодирующих РНК.

Основным способом профилактики ТБ является вакцинация. В настоящее время вакциной БЦЖ привиты около 90 % населения мира, но несмотря на это каждый день от ТБ умирает ~ 3500 человек. Эффективность вакцины БЦЖ варьирует от 0 до 80 % защиты от легочного ТБ, данная вакцина предотвращает только 5 % смертей, которые можно было бы предотвратить с помощью вакцинации. Вакцина БЦЖ наименее эффективна именно в регионах мира с высоким уровнем заболеваемости ТБ и не рекомендована для профилактики ТБ у ВИЧ-позитивных пациентов. Вышесказанное указывает на необходимость разработки новых вакцинных препаратов в отношении ТБ, в том числе - бустерных вакцин, направленных на усиление защитных свойств БЦЖ. Для борьбы с туберкулезом как глобальной угрозой здравоохранения разработаны несколько вариантов новых рекомбинантных противотуберкулезных вакцин на основе новых и модифицированных штаммов микобактерий, комбинаций антигенов туберкулезного микроба и адьювантов, которые находятся на стадии доклинических испытаний.

Цель работы – молекулярно-генетическая, фенотипическая и биологическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*.

Научная новизна полученных результатов заключается в том, что клинические штаммы *M. tuberculosis* 120/26, Ростов и 267/47, выделенные от людей с тяжелыми формами туберкулеза, отнесены к широко распространенным в РФ генетическим кладам CAO и B0/W148 возбудителя туберкулеза генотипа Beijing. Фенотипы резистентности этих штаммов идентифицированы как МЛУ, пред-ШЛУ и ШЛУ, соответственно. В геномах штаммов выявлены мутации, ассоциированные с резистентностью к противотуберкулезным препаратам. Показано, что уровень вирулентности изучаемых штаммов для мышей линии C57BL/6 превышал таковой референс-штамма H37Rv.

Описаны изменения транскрипции 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*) в тканях легких мышей линии C57BL/6, зараженных клиническими штаммами *M. tuberculosis* 120/26 и 267/47, принадлежащими к генетическим кладам CAO и B0/W148, по сравнению с интактными мышами.

Выявлен «ранний» ответ экспрессии 10 генов мнРНК (MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drgs, 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.

Показана профилактическая эффективность препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» на моделях острой туберкулезной инфекции у мышей линии C57BL/6 и морских свинок альбиносов, а также терапевтическая эффективность на модели хронического туберкулеза у мышей линии C57BL/6.

На основании анализа поступившей работы комиссия пришла к заключению о возможности защиты кандидатской диссертации Фурсова Михаила Васильевича на тему: «Молекулярно-генетическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*» в диссертационном совете 64.1.002.01 при ФБУН ГНЦ ПМБ.

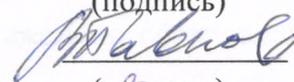
Члены комиссии:

доктор мед. наук Дентовская Светлана Владимировна (председатель)



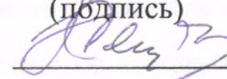
(подпись)

доктор биол. наук Павлов Виталий Михайлович



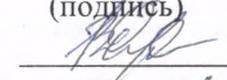
(подпись)

доктор вет. наук, проф. Светоч Эдуард Арсеньевич



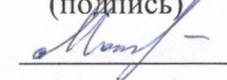
(подпись)

доктор биол. наук Фирстова Виктория Валерьевна



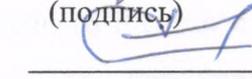
(подпись)

доктор мед. наук Мокриевич Александр Николаевич



(подпись)

доктор биол. наук Игнатов Сергей Георгиевич



(подпись)

Председатель диссертационного совета
64.1.002.01 академик РАН, д-р мед. наук, проф.



Дятлов И.А.

Ученый секретарь диссертационного
совета 64.1.002.01, канд. биол. наук



Фурсова Н.К.