

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ГБУЗ «Московский городской
научно-практический центр борьбы с
туберкулезом Департамента
здравоохранения города Москвы»
доктор медицинских наук, профессор



Е.М. Богородская
2022 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации - Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» на диссертацию **Фурсова Михаила Васильевича** на тему: **«Молекулярно-генетическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия.

Актуальность темы диссертации

Туберкулез – одна из социально-значимых инфекций, которая связана с высоким уровнем смертности и находится на 13 месте среди основных причин смерти людей в мире в последние годы. По мнению экспертов Всемирной организации здравоохранения, из-за пандемии COVID-19 показатели заболеваемости туберкулезом возрастут в 2021-2022 гг. Особую опасность для людей представляет собой лекарственно-устойчивый туберкулез, устойчивый к изониазиду и/или к рифампицину, а также множественно лекарственно-устойчивый, туберкулез с пред-широкой лекарственной устойчивостью и с широкой лекарственной устойчивостью, доля которого в последние годы возрастает.

Mycobacterium tuberculosis, возбудитель туберкулеза, характеризуется генетическим разнообразием; в разных регионах мира циркулируют

характерные для этих регионов генетические линии. На территории Российской Федерации преобладают изоляты генотипов Beijing, Ural и LAM, среди которых доля генотипа Beijing составляет около половины и более в разных регионах страны. Штаммы данного генотипа характеризуются повышенной вирулентностью, которую некоторые авторы оценивают как гипервирулентность, способностью быстро адаптироваться к иммунной системе макроорганизма, выживать и размножаться в макрофагах, высоким уровнем лекарственной устойчивости и трансмиссивности.

В условиях распространения гипервирулентности и множественной резистентности возбудителя туберкулеза особую актуальность приобретает профилактика заболевания, в первую очередь – вакцинация разных категорий населения. В настоящее время большая часть населения мира привита вакциной БЦЖ, однако, ее эффективность сильно варьирует в разных регионах мира, поэтому актуальным является разработка БЦЖ-бустерных препаратов, направленных на усиление защитных свойств БЦЖ.

В связи с вышесказанным, диссертационная работа Фурсова Михаила Васильевича имеет несомненную актуальность, поскольку в ней представлена характеристика нескольких гипервирулентных штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от пациентов с тяжелыми формами туберкулеза, рассмотрены возможные механизмы противодействия возбудителя туберкулеза защитным факторам макроорганизма и представлены результаты испытания профилактических и терапевтических свойств нового БЦЖ-бустерного препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» на животных моделях острого и хронического туберкулеза.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Научная новизна диссертационного исследования не вызывает сомнений. Впервые по результатам исследования установлена принадлежность гипервирулентных клинических штаммов *M.tuberculosis* 120/26, Ростов и 267/47, выделенных от пациентов с тяжелыми формами туберкулеза, к широко распространенным в Российской Федерации генетическим кладам CAO и B0/W148 возбудителя туберкулеза генотипа Beijing; определены фенотипы резистентности этих штаммов как МЛУ, пред-

ШЛУ и ШЛУ, соответственно; в геномах штаммов выявлены мутации, ассоциированные с резистентностью к противотуберкулезным препаратам. Автором получены новые данные о изменении транскрипции генов цитокинов в тканях легких мышей линии C57BL/6, зараженных клиническими штаммами *M.tuberculosis* 120/26 и 267/47. Выявлен «ранний» ответ экспрессии генов мРНК *in vitro* на стрессы, моделирующие условия окружения клеток *M.tuberculosis* в фагосомах макрофагов организма-хозяина. Впервые 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 этого препарата на модели хронического туберкулеза у мышей линии C57BL/6. Полученные новые данные актуальны и соответствуют требованиям современной науки и практики.

Основные положения, выводы и рекомендации, сформулированные автором, обоснованы и соответствуют результатам проведенных исследований.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа Фурсова М.В. выполнена в отделе подготовки и усовершенствования специалистов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» в рамках НИР 069 (2018 – 2020) и 073 (2021-2022 гг.) отраслевой программы Роспотребнадзора (Регистрационные номера: АААА-Б21-221011890081-1 и 222020400117-7) и договора с Национальным исследовательским центром эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи №372-н/2018 от 17.05.18 г.

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации

Теоретическая значимость работы состоит в том, что на основании проведенного диссертационного исследования с использованием комплекса микробиологических, биоинформатических, гистологических и биологических методов автором получены новые данные, вносящие 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, преобладающих 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 мРНК; возможности эффективного использования БЦЖ-бустерных рекомбинантных вакцин для совершенствования схем профилактики и терапии туберкулеза.

Работа имеет несомненно большую практическую значимость. Полученные новые сведения о разном вирулентном потенциале возбудителя туберкулеза различных генетических линий имеют важное значение для микробиологов, фтизиатров и эпидемиологов. В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» депонированы 3 штамма *M.tuberculosis* B-9343, B-9344 и B-9351 для проведения дальнейших фенотипических, молекулярно-генетических и биологических исследований. Размещенные в базе данных GenBank геномы штаммов *M.tuberculosis* Ростов, 267/47 и 120/26 могут быть использованы в качестве сравнения с разными генетическими линиями при молекулярно-генетическом мониторинге циркуляции и завоза на территорию РФ высоковирулентных и резистентных к антибактериальным препаратам штаммов с новыми или измененными свойствами. Разработанный автором набор праймеров для детекции и определения уровней представленности транскриптов 26 генов цитокинов мышей (*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*) может также быть использован при изучении иммунного ответа мышей при воздействии различных неспецифических инфекционных агентов и токсинов. Автором создан набор специфичных праймеров для детекции и определения уровней представленности транскриптов 10 малых некодирующих РНК *M.tuberculosis*, позволяющий проводить дальнейшие исследования в области изучения их роли при разных физиологических процессах возбудителя туберкулеза. Зарегистрирована в Госреестре База данных «Гены вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*». Свидетельство № 2022621575 от 04.07.2022.

Полученные автором результаты профилактической и терапевтической эффективности препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» на модели мышей и морских свинок могут быть использованы для проведения дальнейших клинических испытаний препарата.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных автором выводов не вызывает сомнения и подтверждается большим объемом исследований с использованием бактериологических, биохимических, молекулярно-генетических, биоинформатических, биологических, гистологических и статистических методов исследований. Работа выполнена на сертифицированном оборудовании с применением современных методов, в соответствии с международными рекомендациями.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на 8 международных и российских конференциях и симпозиумах. Полученные автором результаты исследований опубликованы в 16 печатных работах: 5 статей в изданиях, рекомендованных ВАК, 1 База данных, 2 статьи в прочих изданиях, 8 тезисов докладов в сборниках трудов конференций.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы в качестве научной основы при проведении дальнейших экспериментов по изучению ответа иммунной системы мышей на уровне изменения экспрессии генов цитокинов в ответ на разные типы воздействий (инфекции микроорганизмов, токсины и др.); изменения экспрессии генов мнРНК в клетках *M.tuberculosis* при разных физиологических процессах возбудителя туберкулеза. Размещенные в базе данных геномы штаммов *M.tuberculosis* могут быть использованы для сравнительного анализа геномов возбудителя туберкулеза разных генетических линий. Результаты тестирования препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» могут быть использованы на дальнейших этапах клинических испытаний препарата.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация изложена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов, рекомендаций по использованию результатов, перечня сокращений, списка использованной литературы, списка работ, опубликованных по теме диссертации и приложений.

Текст диссертации изложен на 177 страницах, иллюстрирован 61 рисунком и 21 таблицей. Список использованной литературы содержит 323 источника, в том числе 13 работ отечественных и 310 работ зарубежных авторов.

К несомненным достоинствам диссертации следует отнести грамотное изложение литературных данных и материалов собственных исследований, а также четкое изложение методических подходов для решения поставленных задач, что свидетельствует о том, что автор хорошо владеет методиками исследования и анализа. В разделе Заключение подведен итог значительной по объему проделанной работы, обобщены и проанализированы полученные данные. Выводы, сформулированные автором, полностью отражают результаты диссертационного исследования и соответствуют поставленным задачам. Текст диссертационной работы хорошо иллюстрирован. Общее впечатление о работе положительное.

Тема диссертационного исследования, основные положения и выводы, представленные автором, полностью соответствуют специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия.

Автореферат в полной мере отражает краткое содержание диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы Фурсова Михаила Васильевича нет. В процессе ознакомления с диссертацией и авторефератом возник ряд замечаний редакционного характера.

Заключение

Диссертационная работа Фурсова Михаил Васильевича на тему: «Молекулярно-генетическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, в

которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, связанной с молекулярно-генетической характеристикой гипервирулентных штаммов *M. tuberculosis*. Представленные на защиту положения диссертации можно квалифицировать как научное достижение современной микробиологической науки.

По актуальности, научной новизне, методическому уровню, практической значимости диссертация соответствует требованиям п. 9, 10, 11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., с изменениями, опубликованными в Постановлениях 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, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Фурсов Михаил Васильевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия.

Отзыв обсужден на заседании Ученого Совета Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» (протокол № 10 от 14.07. 2022 г.)

Научный руководитель ГБУЗ
«МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»
академик РАН, д.м.н., профессор



В.И. Литвинов

ведущий научный сотрудник
отдела проблем лабораторной диагностики
туберкулеза и патоморфологии
ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»
д.м.н.



Е.Ю. Носова

Подписи академика РАН, д.м.н., профессора Литвинова В.И и
д.м.н. Носовой Е.Ю заверяю:
Ученый секретарь ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»,
д.м.н.



Д.А. Иванова

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, дом 10, стр. 1.
Тел.: 8 (499) 268 00 05, факс: 8 (499) 785 20 82, e-mail: cbi@zdrav.mos.ru