

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Черноусовой Ларисы Николаевны по диссертационной работе Фурсова Михаила Васильевича на тему «Молекулярно-генетическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук (специальности 1.5.11 Микробиология, 1.5.4. Биохимия)

### **Актуальность темы**

В настоящее время показатели заболеваемости и смертности от туберкулеза в РФ снижаются. Вместе с тем, в последние годы в РФ неуклонно регистрируется значительный рост больных туберкулезом с лекарственной устойчивостью возбудителя, а также с сочетанной ТБ/ВИЧ инфекцией, что оказывает существенное негативное влияние на эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу в целом. По мнению экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) из-за пандемии COVID-19 показатели заболеваемости туберкулезом в мире возрастут к 2022 году. Нарастание лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*) к противотуберкулезным препаратам и повсеместное распространение устойчивых штаммов в мире, в том числе в большинстве регионов РФ, является одной из главных проблем, осложняющих борьбу с туберкулезом. Изучению биологических свойств популяции микобактерий, циркулирующих в различных регионах мира, в том числе и в РФ, придается огромное значение. Расширение методических подходов и внедрение высокоэффективных технологий позволили разделить штаммы микобактерий туберкулеза не только по чувствительности к противотуберкулезным препаратам, но и по принадлежности к разным генетическим линиям. К настоящему времени уже описаны штаммы *M. tuberculosis* генетической линии Beijing, обладающие повышенной вирулентностью, высоким уровнем лекарственной устойчивости и трансмиссивности. Методами полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа выявлены точечные мутации и внутригеномные перестройки, ассоциированные с повышением вирулентных и резистентных свойств современных штаммов *M. tuberculosis*. Одним из интереснейших вопросов является способность микобактерий туберкулеза выживать в макрофагах, где подвергаются воздействию множества стрессов,

в том числе дефициту железа, недостатку питательных веществ, окислительному стрессу, низкому уровню рН и осмотическому шоку, и изучение преодоления стрессов изменением клеточного метаболизма посредством транскрипционных и посттранскрипционных механизмов, регулируемых и с помощью малых некодирующих РНК. Нерешенной остается и проблема создания противотуберкулезной вакцины с максимальным эффектом для групп риска (например, ВИЧ-позитивных пациентов), а также бустерной вакцины для усиления защитных свойств БЦЖ.

Одним из фундаментальных направлений в борьбе с туберкулезом является повышение эффективности вакцинации на основе поиска новых и модифицированных штаммов микобактерий. Для этого прежде всего, необходимо выбрать штаммы, максимально охарактеризовать их биологические свойства, изучить механизмы адаптации к иммунной системе макроорганизма и оценить возможность применения для вакцинации от туберкулеза.

Таким образом, тема диссертационного исследования Фурсова Михаила Васильевича «Молекулярно-генетическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*» является актуальной и очень своевременной в настоящих условиях.

Цель исследования «Молекулярно-генетическая, фенотипическая и биологическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*» сформулирована грамотно и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Задачи диссертации полностью соответствуют поставленной цели и включают целый комплекс исследований:

1. Охарактеризовать культурально-морфологические и молекулярно-генетические свойства клинических штаммов *M. tuberculosis* Ростов, 267/47 и 120/26, выделенных от больных людей с тяжелыми формами туберкулезной инфекции, проанализировать их геномы, определить их принадлежность к генетическим линиям туберкулезного микроба, идентифицировать фенотипы и генотипы устойчивости к противотуберкулезным препаратам, а также вирулентность на животных моделях.

2 Оценить транскрипционный ответ генов цитокинов мышей линии C57BL/6 на заражение клиническими штаммами *M. tuberculosis* 267/47 и 120/26.

3. Изучить изменение транскрипционной активности генов малых некодирующих РНК MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drrs, MTS2823/Ms1, B11/C6, Mpr5, Mcr3, Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18 *M. tuberculosis* в ответ на воздействие стрессов, моделирующих *in vitro* условия окружения клеток туберкулезного микроба в фагосомах макрофагов организма-хозяина.

4. Оценить профилактическую и терапевтическую эффективность препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак» на животных моделях острой и хронической туберкулезной инфекции.

Для решения поставленных задач автором была разработана адекватная методология с использованием комплекса новейших и традиционных методов: микробиологических, биологических, биохимических, молекулярно-генетических, биоинформационных и статистических методов. Такой подход позволил получить расширенную характеристику клинических гипервирулентных штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных тяжелыми формами туберкулеза легких, и оценить их влияние на модуляцию иммунного ответа у зараженных мышей в опытах *in vivo*, а в опытах *in vitro* показать механизм преодоления «стрессов», которым подвергаются клетки *M. tuberculosis* в фагосомах макрофагов организма-хозяина. Накопленный методический опыт в процессе выполнения диссертационного исследования позволил автору на заключительном этапе работы участвовать в проведении доклинических испытаний препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак».

**Научная новизна** выполненных исследований не вызывает сомнения, а достижение основной цели исследования - получение новых знаний о гипервирулентных штаммах микобактерий, имеет огромное практическое значение, способствующее повышению эффективности борьбы с туберкулезом.

Научная новизна диссертационного исследования доказывается тем, что впервые получена полная характеристика клинических гипервирулентных штаммов *M. tuberculosis* 120/26, Ростов и 267/47, выделенных от людей с

тяжелыми формами туберкулеза, что позволило депонировать штаммы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», геномы разместить в базе данных GenBank. Штаммы отнесены к широко распространенным в РФ генетическим кладам SAO 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 *M.tuberculosis* H37Rv.

Впервые 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 SAO и B0/W148, по сравнению с интактными мышами.

Изученный «ранний» ответ экспрессии 10 генов малых некодирующих РНК (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, показал, что каждый из 10 исследуемых генов мнРНК обладал уникальным спектром ответа на воздействие стрессов окружающей среды *in vitro*. Полученные данные согласуются с опубликованными ранее сведениями о том, что биологическая роль мнРНК MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drrs, MTS2823/Ms1 и B11/6C связана с их специфической активностью на разных стадиях роста *M. tuberculosis* и в экстремальных условиях окружающей среды внутри фагосом МФ. Новизной данной части работы является исследование «раннего» ответа экспрессии 6 генов мнРНК: Mpr5, Mcr3, Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18.

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.

Трудно переоценить **теоретическую и практическую значимость** полученных данных, которые 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 SAO генотипа Beijing, преобладающих на территории РФ; 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; в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» депонированы 3 штамма *M. tuberculosis* B-9343, B-9344 и B-9351; геномы штаммов *M. tuberculosis* Ростов, 267/47 и 120/26 размещены в базе данных GenBank [JAAMPG000000000.1, NZ\_CP071128.1 и NZ\_CP071127.1, соответственно]; разработан 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*); создан набор специфичных праймеров для детекции и определения уровней представленности транскриптов 10 мнРНК *M. tuberculosis*; зарегистрирована в Госреестре База данных «Гены вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*», Свидетельство № 2022621575 от 04.07.2022; доказана профилактическая и терапевтическая эффективность препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза ЛТБвак», разработанного НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Работа была 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.

Степень достоверности, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается объемом проведенных исследований и репрезентативностью выборки экспериментального материала, использованием стандартных методов, а также апробацией результатов в виде 5 публикаций в рецензируемых журналах уровня Scopus, 1 Базы данных «Гены вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*», и в представлении устных и постерных докладов на 8 конференциях.

### **Общая характеристика работы**

Диссертационная работа написана в классическом стиле, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, четыре главы собственных исследований, а также заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы, список работ, опубликованных по теме диссертации, два приложения. Изложена на 177 страницах. Диссертация иллюстрирована 21 таблицей и 61 рисунком.

Во **Введении** автор показывает актуальность проведенного исследования, грамотно связывает с целью и задачами и в связи с этим обосновывает методологию и перечень необходимых методов, четко обозначает научную новизну, теоретическую и практическую значимость, формулирует положения, выносимые на защиту, которые конкретно и понятно отражают суть полученных результатов.

**Глава 1** представляет Обзор литературы, включающий 47 страниц печатного текста, разделенного на 4 части, где достаточно полно подняты и обсуждены основные проблемы фтизиатрии и данные по биологии возбудителя туберкулеза, включая модели активной и латентной туберкулезной инфекции, в последней части обзора перечислены все имеющиеся на данный момент противотуберкулезные профилактические и терапевтические вакцины. Обзор вызывает огромный интерес, написан хорошим языком, очень четко, с привлечением данных 310 зарубежных источников и 13 источников отечественной литературы.

В главе 2 описаны методы, которые были использованы в работе: микробиологические, биологические, биохимические, молекулярно-генетические, биоинформатические и статистические. Поражает комплекс общенаучных, а также специфических методик, разнообразие которых позволило решать сформулированные в диссертации задачи, в частности, использование статистической обработки данных с помощью программы GraphPad Prism версии 8.0.1, метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  и математического моделирования для относительной количественной оценки представленности транскриптов.

Раздел «**Результаты и обсуждение**» состоит из четырех глав, в которых приведены основные результаты проведенных исследований.

Глава 3 посвящена молекулярно-генетической и фенотипической характеристике гипервирулентного штамма *M. tuberculosis* Ростов, культурально-морфологическим и биохимическим свойствам, чувствительности к противотуберкулезным препаратам, генотипированию штамма, вирулентности штамма *M. tuberculosis* Ростов для мышей линии C57BL/6. Особенно значимы результаты по тестированию вирулентности штаммов, которые на основании анализа гибели мышей, внешнего вида животных и морфологии внутренних органов, а также показателей обсемененности паренхиматозных органов мышей микобактериями и гистологической картины срезов внутренних органов, показавшие высокий уровень вирулентности, превышающий уровень лабораторного вирулентного референс-штамма *M. tuberculosis* H37Rv.

Эти данные, в свою очередь, предопределили использование охарактеризованных гипервирулентных штаммов для изучения в Главе 4 феномена взаимодействия патоген-хозяин для оценки модуляции иммунной системы в тканях легких мышей инбредной линии C57BL/6, со средней чувствительностью к туберкулезу, при заражении клиническими штаммами *M. tuberculosis* 120/26 и 267/47, принадлежащими к генетическимкладам CAO и B0/W148. Впервые была показана вариативность изменения уровней 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* у зараженных клиническими штаммами мышей по сравнению с интактными мышами. Различия в динамике изменений уровней транскрипции этих генов, по-видимому,

свидетельствовали о различиях в механизмах вирулентности как клинических штаммов генетических клон В0/W148 и САО между собой, так и в сравнении с таковыми референсного вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37Rv. Данный набор праймеров может быть использован для оценки иммунного ответа лабораторных мышей не только на *M. tuberculosis*, но и на другие патогены, а также для определения степени модуляции иммунной системы при испытании новых профилактических и терапевтических препаратов.

**Глава 5**, «Ранний» ответ экспрессии генов малых некодирующих РНК *M. tuberculosis* на изменение окружающей среды культивирования *in vitro* посвящена одному из механизмов выживания микобактерий в условиях персистенции в живом организме. Были проведены модельные эксперименты *in vitro*, с созданием стрессовых факторов в фагосомах макрофагов («осмотический», «голодание», гипоксический, «кислотный», оксидативный). Важно, что автором предварительно был проведен анализ структуры и возможных мишеней мнРНК *in silico*. А затем показано, что экспрессия генов 10 мнРНК MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drrs, MTS2823/Ms1, B11/C6, Mpr5, Mcr3, Mcr15, Mcr7, Mpr11, Mpr18 в клетках *M. tuberculosis* уникальным образом изменялась под воздействием стрессовых факторов. Полученные данные согласуются с опубликованными ранее сведениями о том, что биологическая роль мнРНК MTS0997/Mcr11, MTS1338/Drrs, MTS2823/Ms1 и B11/C6 связана с их специфической активностью на разных стадиях роста *M. tuberculosis* и в экстремальных условиях окружающей среды внутри фагосом МФ. Новизной данной части работы являются данные по «раннему» ответу экспрессии 6 генов мнРНК: Mpr5, Mcr3, Mcr15, Mcr7, Mpr11 и Mpr18. Необходимо отметить адекватный набор мнРНК для исследования, что позволило автору высказать предположение о важности перечисленных выше мнРНК в обеспечении адаптационных возможностей туберкулезного микроба в стрессовых условиях.

**Глава 6** посвящена оценке профилактической и терапевтической эффективности препарата «Полиантигенная вакцина для профилактики и вспомогательного лечения туберкулеза «ЛТБвак» на животных моделях, разработанного в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, на основе слитых белков четырех антигенов *M. tuberculosis*. Показано, что испытуемый препарат «ЛТБвак»

усиливал защитное действие живой вакцины «БЦЖ» на моделях острой туберкулезной инфекции у мышей линии С57ВL/6 и у морских свинок альбиносов. Это проявлялось в статистически достоверном снижении микобактериальной нагрузки в легких и селезенке животных в результате двукратной иммунизации препаратом «ЛТБвак» на 3 и 5 неделях после иммунизации вакциной «БЦЖ», по сравнению с аналогичными показателями в контрольных группах. Протективные свойства препарата «ЛТБвак» подтверждены результатами экспериментов по оценке выживаемости животных, морфологии внутренних органов и гистологических срезов паренхиматозных органов. Терапевтический эффект препарата «ЛТБвак» продемонстрирован на модели хронической туберкулезной инфекции у мышей линии С57ВL/6. Трехкратное введение данного препарата мышам с хроническим туберкулезом на 16, 19 и 22 неделях после заражения обеспечивало статистически достоверное снижение микобактериальной обсемененности легких и селезенки мышей, по сравнению с аналогичным показателем в контрольных группах, что подтверждено изучением морфологии внутренних органов и гистологических срезов паренхиматозных органов животных. Этот раздел закономерно завершает огромное комплексное исследование, демонстрирующее интеллектуальные и методологические способности и возможности автора.

В **Заключении** автор анализирует полученные экспериментальные данные, сопоставляя их с данными литературы, подводит итог выполненной работы, обозначает перспективы для дальнейших исследований.

**Выводы** соответствуют цели и задачам диссертации.

В разделе **Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования** автор указывает основные направления использования полученных результатов.

**Содержание автореферата** и его оформление соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в полной мере отражает основные положения диссертации.

**Вопросы и замечания по работе:**

Принципиальных замечаний при чтении диссертации не возникло. Отдельные незначительные неточности в терминах фтизиатрического профиля не снижают ценности рецензируемой работы.

## Заключение

Полученные данные в процессе выполнения диссертационной работы Фурсова М.В. «Молекулярно-генетическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*» вносят вклад в понимание механизмов формирования фенотипа МЛУ и вирулентности современных генетических сублиний возбудителя туберкулеза; особенностей влияния *M. tuberculosis* на иммунную систему организма-хозяина, связанных с изменениями экспрессии генов цитокинов в тканях легких; механизмов адаптации патогена к стрессовым условиям окружающей среды внутри клеток макроорганизма, в том числе, за счет изменения уровней экспрессии мРНК; возможности эффективного использования бустерных рекомбинантных вакцин для совершенствования схем профилактики и терапии туберкулеза у человека.

Представленная диссертация Фурсова Михаила Васильевича на тему: «Молекулярно-генетическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*» является законченной научно-квалификационной работой, в которой, в результате проведенных исследований, содержится решение научной задачи - получение новых знаний о гипервирулентных штаммах микобактерий туберкулеза, механизмах модуляции ими иммунного ответа клеток хозяина, а также преодоления стрессовых факторов при персистенции в эукариотических клетках, дающие им эволюционное преимущество в популяциях возбудителя туберкулеза. Полученные фундаментальные данные имеют огромное практическое значение для эффективного использования бустерных рекомбинантных вакцин для совершенствования схем профилактики и терапии туберкулеза у человека, способствующее повышению эффективности борьбы с туберкулезом, и имеющие существенное значение для отраслей науки - микробиологии, молекулярной биологии и биохимии патогенных микроорганизмов.

Полученные автором результаты достоверны, выводы являются четкими, аргументированными и обоснованными. Работа базируется на достаточном количестве исходных данных, написана доходчиво, грамотно и аккуратно оформлена. Диссертационная работа «Молекулярно-генетическая характеристика гипервирулентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*» отвечает критериям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., в

