

ОТЗЫВ

официального оппонента, члена-корреспондента Российской академии наук, доктора медицинских наук, профессора Суворова Александра Николаевича на диссертационную работу Вязовой Анны Александровны на тему: «Генетическая структура популяции и множественная лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis*», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология

Актуальность темы выполненной работы

Туберкулезная инфекция (ТБ) остается одной из основных причин смертности от инфекционных болезней в мире, несмотря на значительные успехи в области совершенствования диагностики и лечения. В последние десятилетия на фоне благоприятной тенденции к снижению общего уровня заболеваемости и смертности от туберкулеза в Российской Федерации ввиду целого ряда причин растет доля случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ) у впервые выявленных больных, в том числе у ВИЧ-позитивных. Поэтому исследования генетических особенностей различных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* - основного этиологического агента туберкулеза человека - не только не утратили своей актуальности, но обрели повышенное внимание со стороны научного сообщества, эпидемиологов и фтизиатров.

Согласно современным представлениям множественная лекарственная устойчивость *M. tuberculosis* определяется мутационной устойчивостью к ранее эффективной комбинации рифампицина и изониазида - основных противотуберкулезных препаратов. Рекомендованная ВОЗ новая схема лечения МЛУ-ТБ с использованием бедаквилина и линезолида, также не исключает формирования резистентности и к этим препаратам. Очевидная тенденция актуальных штаммов туберкулезных бактерий «ускользать» из под пресса

лекарственной терапии за счет различных генетических механизмов, например, точечных мутаций в геноме возбудителя, требует изучения и постоянного эпидемиологического наблюдения.

Появление новых генотипов, ассоциированных с МЛУ возбудителя обуславливает необходимость проведения дополнительных исследований в области генетики *M. tuberculosis*. При этом важно понимать особенности гетерогенности глобальной и территориальных популяций патогена в связи с оценкой их эпидемиологической и клинической значимости. Согласно современному уровню знаний вид *M. tuberculosis* представлен несколькими филогенетическими линиями, включающими множество генотипов с определенными комбинациями хромосомных маркеров, в т.ч. разнообразных мутаций в генах лекарственной устойчивости, влияющих на фитнес и трансмиссивность штаммов возбудителя.

Формирование представлений о закономерностях и направлениях эволюции *M. tuberculosis* для прогнозирования особенностей развития эпидемического процесса и оптимизации мероприятий по контролю распространения МЛУ-ТБ требует мониторинга микробных популяций на основе единого подхода к использованию молекулярно-генетических методов исследования.

В этой связи, диссертационная работа Вязовой А.А., посвященная изучению генетического разнообразия, мутаций устойчивости к противотуберкулезным препаратам и распространенности генотипов, ассоциированных с первичной множественной лекарственной устойчивостью штаммов, в популяции *M. tuberculosis* на Северо-Западе России с использованием комплекса молекулярно-генетических методов исследования является важной и актуальной.

**Степень новизны исследования, обоснованность научных положений,
выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Новизна представленных результатов обусловлена масштабностью исследования. На основе результатов молекулярно-генетического мониторинга

автором получены новые данные об особенностях организации структуры популяции *M. tuberculosis* на Северо-Западе России. Доказано доминирование штаммов современной сублинии генетического семейства Beijing, принадлежащие к глобально распространенным генотипам B0/W148 и Central Asian/Russian (субтип CAO, впервые выявленный на территориях Северо-Запада России). Впервые в популяции *M. tuberculosis* на Северо-Западе России выявлены ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью кластеры 1065-32 Central Asian/Russian, 1071-32 древней сублинии Beijing и SIT262/Ural, представляющие потенциальную эпидемическую опасность. Автором выявлены и депонированы в международную базу данных SITVIT2 новые профили сполиготипирования *M. tuberculosis*, ранее неизвестные в России и за ее пределами. Разработаны новые способы установления принадлежности штаммов *M. tuberculosis* к современной и древней филогенетическим сублиниям генотипа Beijing, идентификации генотипа Beijing Central Asian/Russian (другое наименование – кластер 94-32), определения принадлежности штаммов *M. tuberculosis* к кластеру 1071-32 древней сублинии Beijing *M. tuberculosis* на основе аллель-специфической ПЦР-РВ. Разработан способ выявления субтипа CAO Central Asian/Russian Beijing *M. tuberculosis* на основе мультиплексной ПЦР. Новизна полученных результатов исследования подтверждена публикациями в открытой печати и патентами РФ.

Полученные новые данные о мутациях устойчивости к бедаквилину в генах *mmpR5* (Rv0678) и *atpE* (Rv1305) позволяют осуществлять контроль за распространением генов лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* в Российской Федерации. Показано, что ведущими причинами формирования резистентности к бедаквилину у штаммов *M. tuberculosis* B0/W148 и CAO являются мутации в различных участках гена *mmpR* (Rv0678), ответственного за эффлюкс препарата из микробной клетки.

Автором сформированы информационные базы данных, включающие уникальные характеристики различных штаммов микобактерий: сполиготип,

принадлежность к генетическому семейству, профиль фенотипической устойчивости к противотуберкулезным препаратам. Созданные базы могут быть применены для изучения региональных особенностей и глобального разнообразия популяций возбудителя туберкулеза, что крайне существенно для проведения постоянного мониторинга распространения туберкулезной инфекции.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Результаты диссертационного исследования А.А. Вязовой имеют существенное теоретическое и практическое значение. Теоретическая (фундаментальная) значимость работы заключается в том, что автором внесен весомый вклад в понимание молекулярных основ генетической изменчивости биологических свойств и эволюции *M. tuberculosis* в условиях широкого распространения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью. Получены новые знания о генетическом разнообразии и детерминантах устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам и распространенности штаммов различных генотипов и кластеров в популяции *M. tuberculosis* в Северо-Западном федеральном округе России. Доказано, что распределение генотипов в гетерогенных популяциях *M. tuberculosis* в субъектах Северо-Западного федерального округа крайне неравномерно, что может быть связано с особенностями географической локализации разных областей, уровня урбанизации населения, а также с особенностями регионального ВВП на душу населения. Установлены связи между первичной множественной лекарственной устойчивостью, ассоциированной с определенным спектром мутаций, и принадлежностью штаммов *M. tuberculosis* к различным генотипам, что необходимо для оценки как клинической, так и эпидемиологической значимости штаммов возбудителя. Практическая значимость полученных результатов заключается в возможности применения предложенного А.А. Вязовой алгоритма генотипирования штаммов и разработанных способов быстрого выявления основных генотипов и кластеров современной и древней

сублиний Beijing для характеристики особенностей структуры популяции *M. tuberculosis*. Разработанный алгоритм может быть взят на вооружение службами эпидемиологического надзора во всей Российской Федерации. Разработанные электронные базы данных послужат для накопления и сравнительного анализа информации о генотипах штаммов при проведении молекулярно-генетического мониторинга популяций *M. tuberculosis*. Депонирование полногеномных последовательностей серийных изолятов *M. tuberculosis* в международных банках данных играет важную роль в области распространения и обмена научной информацией. Сформированная коллекция ДНК штаммов, представляющих различные генетические семейства, линии/сублинии и кластеры, может быть использована для исследования особенностей геномики *M. tuberculosis* и выявления генов микобактерий, имеющих отношение к формированию патогенного фенотипа бактерий. Это позволит выявлять как новые мишени для создания антитуберкулезных препаратов, а также для модельной оценки эффективности новых противотуберкулезных соединений. Результаты диссертационного исследования были успешно внедрены в практическую деятельность бактериологической лаборатории ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России и в образовательный процесс ряда высших учебных заведений медицинского профиля.

**Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе
публикации в рецензируемых изданиях**

Достоверность полученных автором результатов работы не вызывает сомнений и определяется логически выстроенным планом исследования с использованием адекватного задачам комплекса лабораторных методов (включая полногеномное секвенирование). Репрезентативность выборок штаммов и достаточный для корректной статистической обработки данных объем исследований, проведенных с

применением специализированного программного обеспечения и международных баз данных, позволяют считать результаты работы достоверными.

Результаты диссертационной работы А.А. Вязовой представлены и обсуждены на 28 научных и научно-практических мероприятиях международного и всероссийского уровней. Диссертантом опубликовано 59 печатных работ, из них 34 статьи в рецензируемых изданиях, 12 – тезисы в рецензируемых изданиях, 9 – тезисы в сборниках трудов и материалах конференций, 4 – патенты на изобретение. Получено два свидетельства о регистрации базы данных.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа А.А. Вязовой оформлена в соответствии с требованиями ВАК, предъявляемым к докторским диссертациям. Она изложена на 277 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и четырех приложений. Работа иллюстрирована 39 рисунками и содержит 89 таблиц.

В разделе «Введение» автором убедительно аргументирована актуальность и степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Материалы и методы подробно описаны, в таблице показан объем исследований, что позволяет объективно оценить его масштабность. Примененные методы исследования являются современными, информативными и адекватны поставленным задачам диссертационной работы. Лаконично сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обоснована достоверность полученных результатов. Приведены сведения о личном вкладе автора, апробации результатов исследования и полноте представления в публикациях.

Диссертационная работа А.А. Вязовой содержит «Обзор литературы» с цитированием 338 отечественных и иностранных источников, причем среди цитированных публикаций существенная часть относится к статьям, вышедшим в печать после 2020 года. В обзоре автором представлены данные о распространении штаммов *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя с акцентом на генетическую изменчивость и эволюцию *M. tuberculosis*. Обзор написан четко, дает полное представление не только об актуальности темы, но и высвечивает нерешенные вопросы в области подходов к унификации критериев классификации и оценки клинико-эпидемиологической значимости генотипов *M. tuberculosis*, в особенности ассоциированных с МЛУ возбудителя.

Говоря об обзоре я бы постарался более четко обозначить отношение автора к внутривидовому разделению туберкулезных штаммов на линии/сублинии, генетические семейства, подсемейства и кластеры. На мой взгляд, это несколько осложняет восприятие материала и требует упрощения или какой-то унификации, которая была бы полезна микробиологическому сообществу. В целом обзор представляется удачным. Считаю, что представленные сведения могут быть опубликованы в виде обзорной статьи.

Раздел «Результаты собственных исследований» состоит из пяти самостоятельных глав, включающих весь объем проведенных исследований.

Во второй главе дана характеристика впервые выявленных больных туберкулезом (включающая пол, возраст, место проживания, структуру клинических диагнозов, ВИЧ-статус), от которых в регионах СЗФО были выделены изученные штаммы *M. tuberculosis*. Охарактеризован медианный возраст пациентов обоего пола, который составил 42 года – возраст трудоспособного и наиболее социально активного населения. Автор установила, что основными диагнозами у этих пациентов были инфильтративный и диссеминированный туберкулез легких; выявлены статистически значимые различия в структуре клинических диагнозов в зависимости от региона СЗФО.

В третьей главе автором охарактеризованы генетические популяции возбудителя туберкулеза в каждом из восьми изученных регионов страны. Показано, что в разных этнических группах населения в разной степени выявляются микобактерии туберкулеза. Показаны гендерные и возрастные отличия в обнаружении штаммов.

В четвертой главе представлен анализ устойчивости штаммов *M. tuberculosis* различных генотипов к основным противотуберкулезным препаратам, обнаружены ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью генотипы, сполиготипы и MIRU-VNTR-кластеры штаммов. Показана неоднородность субпопуляции non-Beijing по спектру сполиготипов и субпопуляции Beijing по спектру MIRU-VNTR-типов. Приведены генотипы штаммов *M. tuberculosis*, выделенные от ВИЧ-позитивных больных с впервые выявленным туберкулезом. Показаны ассоциации наличия туберкулезной инфекции пациентов с ВИЧ статусом.

В пятой главе на основе различных модификаций ПЦР описаны разработанные ускоренные способы выявления значимых вариантов – кластера 94-32 (Central Asian/Russian), субтипа CAO, древней и современной филогенетических сублиний и кластера 1071-32 древней сублинии в субпопуляции *M. tuberculosis* Beijing. При этом автором разработан ряд протоколов с использованием как ПЦР-РВ, так и мультилокусной ПЦР. Дополнительно автором предложен алгоритм исследования популяции *M. tuberculosis*.

В шестой главе описаны наиболее распространенные мутации резистентности к бекваквину серийных изолятов *M. tuberculosis* в геноме бактерий с использованием секвенирования нового поколения.

В разделе «Заключение» проанализированы полученные результаты, дана их оценка с использованием сведений научной литературы, подчеркнуты их научная новизна, обоснована теоретическая и практическая значимость.

Выводы полностью соответствуют цели и задачам диссертации, убедительно аргументированы и подтверждены достоверными данными, полученными в ходе исследования.

В разделе «Практические рекомендации» определены основные предложения, которые могут представлять интерес для научного сообщества, специалистов эпидемиологической службы и практического здравоохранения.

Автореферат диссертационного исследования А.А. Вязовой отражает содержание, результаты и выводы диссертационной работы в необходимом объёме, и соответствует тексту диссертации. Автореферат в достаточной степени проиллюстрирован рисунками и таблицами. Диссертация и автореферат оформлены согласно требованиям ГОСТ 7.0.11-2011.

Соответствие специальности

По тематике, методам исследования, научным положениям и выводам диссертационная работа А.А. Вязовой соответствует паспорту специальности научных работников 1.5.11 – микробиология (биологические науки) и области исследования: пункты 1 – «Проблемы эволюции микроорганизмов, установление их филогенетического положения», 3 – «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов», 4 – «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне».

Принципиальных замечаний по работе нет. В рисунках и некоторых таблицах используются многочисленные обозначения на английском, что не всегда обязательно, так как имеют русскоязычные аналоги.

В процессе ознакомления с диссертацией возникло несколько вопросов:

1. Можно ли применять разработанный алгоритм ускоренного анализа генетического профиля штаммов при исследовании популяций *M. tuberculosis* на других регионах России и стран ближнего зарубежья?

2. В чем автор видит геномные особенности генотипа Beijing, позволившие данной генетической линии столь широко распространиться по Земному шару?
3. По мнению автора, каковы перспективы возникновения новых, ранее не выявленных мутаций к антибиотикам среди штаммов *M. tuberculosis* в обозримом будущем?

Отдельные незначительные замечания в целом и заданные вопросы не носят принципиального характера в плане высокой оценки работы диссертанта и не снижают общего положительного впечатления от проделанной работы.

Заключение

Диссертационная работа Вязовой Анны Александровны на тему: «Генетическая структура популяции и множественная лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis*», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология, является законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований и разработок в области молекулярно-генетического мониторинга микробной популяции осуществлено решение актуальной научной проблемы оценки значения изменчивости биологических свойств для эволюции *M. tuberculosis* в условиях широкого распространения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Вязовой Анны Александровны полностью отвечает требованиям пунктов 9 - 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации 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 26.05.2020 № 751,

от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, Вязовая Анна Александровна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Официальный оппонент:

Заведующий отдела молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования (ФГБНУ «ИЭМ») (адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12; телефон: +7 (812) 234-68-68; e-mail: alexander_suvorov1@hotmail.com)

член-корреспондент РАН,

доктор медицинских наук, профессор  Суворов Александр Николаевич

Подпись А.Н. Суворова заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования (ФГБНУ «ИЭМ») (адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12; телефон: +7 (812) 234-68-68; e-mail: iem@iemspb.ru)

Кандидат медицинских наук 

Углева Елена Михайловна

19.10.2023

