

## **ОТЗЫВ**

*официального оппонента, доктора биологических наук, профессора, Шемякина Игоря Георгиевича на диссертацию в виде научного доклада Филипенко Максима Леонидовича «Молекулярно-генетическое типирование *Mycobacterium tuberculosis*, выявление мутаций генома, вызывающих резистентность к противотуберкулезным препаратам», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология*

**Актуальность темы исследования.** Туберкулез остается одной из острых проблем современной инфекционной медицины, что связано, в первую очередь, с биологическими особенностями возбудителя *Mycobacterium tuberculosis*, которые выработали широкий спектр стратегий, чтобы адаптироваться в организме своего хозяина. Прежде всего – это высокая контагиозность, а также развитие резистентности к проводимой терапии. Для исследования и решения таких проблем многие годы использовались клинические, эпидемиологические, биохимические подходы. С интенсивным развитием методов молекулярно-генетической характеристики геномов появились возможности выявлять не только новые специфические штаммы микобактерий, но и исследовать молекулярные основы развития резистентности к противотуберкулезным препаратам, набор которых пока остается весьма ограниченным. Поэтому цель диссертационной работы Филипенко М.Л., направленная на изучение генетических особенностей изолятов *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории бывшего Советского Союза, а также разработка новых подходов для клинической диагностики туберкулеза, является актуальной научной проблемой современной молекулярной биологии.

**Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, их значение для науки и практики.** Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения, так как Филипенко М.Л. проведено молекулярно-

генетическое исследование для достаточно репрезентативной выборки (1454-х изолятов *M.tuberculosis*) с детальной характеристикой их генетической структуре за период с 2000 по 2010 годы. Результаты были обработаны с применением современных статистических и филогенетических методов с постулированием логически обоснованных выводов.

Многие результаты проведенного диссертационного исследования носят элементы новизны. Впервые получены данные о клональной структуре изолятов *M.tuberculosis* в Западно-Сибирском регионе России, определен спектр и частоты мутаций, вызывающих резистентность к рифапмицину. Также впервые охарактеризована коллекция изолятов *M.tuberculosis*, в том числе XDR-типа, циркулирующих на территории Западной Сибири. Филипенко М.Л. предложен ряд оригинальных методических подходов для выявления ключевых мутаций, вызывающих лекарственную резистентность у микобактерий туберкулеза. Также впервые разработаны методики для клинической диагностики туберкулеза с помощью изотермальной амплификации нуклеиновых кислот. Для этой цели впервые клонированы и охарактеризованы ферменты, обладающие цепь-вытесняющей активностью, а также устойчивостью к разным типам ингибиторов, обоснован выбор интеркалирующего красителя для детекции результатов амплификации. Были предложены и охарактеризованы структуры олигонуклеотидных праймеров для ПЦР в реальном времени и аллель-специфичной изотермальной петлевой амплификации (LAMP), способных обеспечить максимальную чувствительность выявления микобактерий туберкулезного комплекса. Такие технологии позволяют проводить эффективную диагностику туберкулеза.

Диссертационное исследование Филипенко М.Л. имеет неоспоримую теоретическую ценность фундаментального характера в области молекулярной и клеточной биологии. Были идентифицированы ассоциации генетических типов *M.tuberculosis* с наличием разнообразных мутаций, вызывающих лекарственную резистентность, что важно для проведения дальнейших функциональных исследований, устанавливающих взаимосвязь



генотипа с фенотипом. Важно отметить, что предложенные автором подходы для выявления мутаций, вызывающих лекарственную резистентность, уже много лет используются для проведения научных исследований. Результаты диссертационного исследования Филипенко М.Л. важны также для практического применения в диагностике инфекционных заболеваний человека. Так, разработанная платформа выявления мутаций в геноме микобактерий с помощью изотермальной амплификации нуклеиновых кислот, уже находит свое применение в клинической диагностике туберкулеза и находится в стадии коммерциализации.

***Оценка содержания диссертации, ее завершенность.***

Диссертационная работа Филипенко М.Л. в виде научного доклада изложена на 31-й странице машинописного текста, состоит из введения, содержания работы, заключения, выводов и списка опубликованных работ (29 научных статей и 5 патентов). Работа иллюстрирована 11-ю рисунками.

Во «Введении» обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту.

Основные результаты исследования опубликованы в 22-х статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus и 7 журналах базы данных РИНЦ; получено 5 патентов на изобретение РФ. Результаты работы также вошли в виде отдельной главы в коллективный сборник «Роль микроорганизмов в функционировании живых систем: фундаментальные проблемы и биоинженерные приложения». Отмечается, что представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии и руководстве на всех этапах исследования.

Раздел «Содержание работы» состоит из 3-х глав и посвящен описанию результатов собственных исследований. В главе 1 «Генетическое типирование изолятов *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории бывшего Советского Союза, включая Западную Сибирь» приведены результаты, показавшие, что

VNTR-типирование позволяет получить представление о клональной структуре изолятов микобактерий, циркулирующих на определенной территории, а также решать локальные клинические задачи, возникающие при лечении пациентов с туберкулезом. Убедительно показано, что особенности клональной генетической структуры изолятов микобактерий от пациентов, проживающих в Казахстане и в Украине, позволяют предположить активное проникновение на их территории изолятов семейства Beijing из России. С другой стороны, семейство LAM, по-видимому, является эндемичным для Западной Украины и в большей степени ассоциировано с лекарственной резистентностью. В главе 2 «Определение спектра и частоты встречаемости мутаций, вызывающих лекарственную резистентность *M.tuberculosis*» представлены результаты анализа базовых механизмов резистентности к рифампицину, изониазиду и пиразинамиду. Здесь представлены результаты по определению профиля мутаций XDR изолятов *M.tuberculosis* в Новосибирске. Наконец, в главе 3 приводятся результаты разработки эффективных методов диагностики туберкулеза с помощью выявления ДНК *M.tuberculosis*, показавшие, что они являются перспективными как для типирования микобактерий, так и для выявления лекарственной резистентности.

В главе «Заключение» Филипенко М.Л. приводит краткий анализ полученных результатов, как первое систематическое исследование туберкулеза в Западно-Сибирском регионе.

Семь выводов отражают основные результаты диссертационного исследования. В целом, они объективны, соответствуют поставленным задачам, отражают суть и результаты работы, подтверждаются представленными фактическими данными. Практические рекомендации направлены на оптимизацию решения задач молекулярной диагностики туберкулеза и выявление устойчивых к терапии штаммов микобактерий

На основании анализа диссертации можно сделать вывод о завершении работы Филипенков М.Л..



Принципиальных возражений по основной концепции работы, положениям, выносимым на защиту, полученным данным, выводам, не возникло. Отмечая, в целом, высокий уровень выполненного исследования, считаю необходимым в плане научной дискуссии поставить ряд вопросов перед соискателем:

1. Изучался ли автором работы вклад так называемых компенсаторных мутаций в тип и частоту встречаемости мутаций вызывающих лекарственную резистентность микобактерий туберкулеза?
2. Насколько важен вклад генома организма хозяина, его иммунной системы на развитие туберкулезной инфекции, либо все определяет геном микобактерии?


**Заключение.** Диссертационная работа Филипенко Максима Леонидовича на тему «Молекулярно-генетическое типирование *Mycobacterium tuberculosis*, выявление мутаций генома, вызывающих резистентность к противотуберкулезным препаратам», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой, на основании полученных автором оригинальных фундаментальных данных, разработаны принципиально новые подходы для диагностики туберкулеза, а также выявления мутаций генома, вызывающих резистентность к противотуберкулезным препаратам. Считаю, что данная диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, от 20 марта 2021 г. № 426 с изменениями от 11 сентября 2021 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор

заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

28.10.2022

Официальный оппонент:

д.б.н., профессор

  
Шемякин И.Г.

[shemyakin@obolensk.org](mailto:shemyakin@obolensk.org)

*Подпись Шемякина И.Г. заверяю*

*Директор ГНЦ ПМБ академик РАН Дятлов И.А.*

