

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации Мартьянова Сергея Владиславовича «Возможности управления формированием и функционированием микробных биопленок на примере хемогетеротрофных бактерий из разных экотопов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Решение диссертационного совета от 23 июня 2021 г. №5 о присуждении Мартьянову Сергею Владиславовичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация **Мартьянова Сергея Владиславовича «Возможности управления формированием и функционированием микробных биопленок на примере хемогетеротрофных бактерий из разных экотопов»** по специальности – 03.02.03 – Микробиология принята к защите 15 апреля 2021 г. протокол №3 диссертационным советом Д002.247.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом № 205/нк от 16.03.2017 г.

Соискатель **Мартьянов Сергей Владиславович**, 1991 года рождения, гражданин РФ, в 2014 г. окончил с отличием МГУ им М.В. Ломоносова по специальности «микробиология». В период 2014-2019 гг. проходил обучение в очной аспирантуре ФИЦ Биотехнологии РАН. С 2014 г. по настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории выживаемости микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН.

Научный руководитель – д.б.н., профессор Плакунов В.К., главный научный сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Дерябин Дмитрий Геннадьевич, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник, лаборатории селекционно-генетических исследований в животноводстве Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук» и Плюта Владимир Александрович, кандидат биологических наук, научный сотрудник

лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», факультет биотехнологии и промышленной экологии - в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа Мартьянова С.В. является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научных проблем о механизмах формирования биопленок, их функционировании и выбор потенциальных антибиопленочных агентов для борьбы с нежелательным формированием микробных биопленок. Диссертационная работа соответствует «Положению о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а соискатель, Мартьянов Сергей Владиславович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Микробиология».

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии. Так, доктор медицинских наук Дерябин Дмитрий Геннадьевич известен своими исследованиями в области влияния антибиотиков, гликозидов на систему «кворум сенсинг» бактерий. Кандидат биологических наук Плюта Владимир Александрович известен исследованиями летучих веществ бактерий, их влиянием на систему «кворум сенсинга». Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области разработки широкого круга биопрепаратов, образования биопленок, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 7 статьях в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. **Мартьянов С.В.**, Журина М.В., Эль-Регистан Г.И., Плакунов В.К. Активирующее действие азитромицина на формирование микробных биопленок и борьба с этим явлением // Микробиология. 2015. Т. 84 (1). С. 27-36.

2. Плакунов В.К., **Мартьянов С.В.**, Тетенева Н.А., Журина М.В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в стационарных условиях // Микробиология. 2016. Т. 85 (4). С. 484-489.
3. Журина М.В., Ганнесен А.В., **Мартьянов С.В.**, Тетенева Н.А. Никлозамид как перспективный антибиопленочный агент // Микробиология. 2017. Т.86 (4). С. 439–447.
4. **Мартьянов С.В.**, Летаров А.В., Иванов П.А., Плакунов В.К. Стимуляция биосинтеза виолацеина в биопленках *Chromobacterium violaceum* под воздействием диметилсульфоксида // Микробиология. 2018. Т.87 (3). С. 325–329.
5. Teteneva N.A., **Mart'yanov S.V.**, López M-E., Kahnt J., Glatter T., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Sourjik V. Multiple drug-induced stress responses inhibit formation of *Escherichia coli* biofilms // Appl. Environ. Microbiol. 2020. V. 86 (21). P. 1113-20.
6. Плакунов В.К., **Мартьянов С.В.**, Тетенева Н.А., Журина М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты // Микробиология. 2017. Т. 86 (4). С. 1-19.
7. Плакунов В.К., Журина М.В., Ганнесен А.В., **Мартьянов С.В.**, Николаев Ю.А. Антибиопленочные агенты: неоднозначность терминологии и стратегии поиска // Микробиология. 2019. Т.88 (6). С. 705-709.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: 1) XXVII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2015); 2) 19-ой Международной школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века». (Пушино, 2015); 3) X, XI молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», (Москва, 2015, 2016); 4) Congress «Antimicrobial resistance in microbial biofilms and options for the treatment» (Belgium, Ghent, 2016); 5) XXIX Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2017); 6) отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН (Москва, 2017); 7) I Российском микробиологическом Конгрессе (Пушино, 2017).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора медицинских наук Дерябина Дмитрия Геннадьевича, (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- 1) В выводе 2 никлозамид обозначен как ингибитор системы “quorum sensing” с одновременным указанием на то, что данное соединение способно стимулировать биосинтез антибиотиков-феназинов у *P. aeruginosa*. Как могут быть объяснены эти два взаимоисключающие эффекта, если учесть, что у *P. aeruginosa* синтез феназинового соединения пиоцианина находится под

положительным контролем трехкомпонентной системы QS [Pierson L.S.^{3rd}, Pierson EA. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. Appl Microbiol Biotechnol. 2021. 86(6): 1659-1670]?

- 2) Каким образом стрессовый ответ и подавление образование биопленки модельным штаммом *Escherichia coli* K12 W3110 связаны между собой? Вывод 4 представляет эту связь как причинно-следственную, в то же время подавление формирование амилоидных белков курли и развитие различных видов стресса могут являться параллельно протекающими процессами, где «после того» никак не значит «вследствие того».

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Плюты Владимира Александровича, (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- 1) Какие соединения из библиотеки Prestwick Chemical Library, по мнению автора, наиболее перспективны в качестве пробиопленочных агентов
- 2) Ставился ли контроль по действию диметилсульфоксида (ДМСО) на формирование биопленок в экспериментах по изучению влияния 4-гексилрезорцина и никлозамида? В экспериментах по изучению действия 4-гексилрезорцина и никлозамида на рост и формирование биопленок в качестве растворителя для приготовления стокового раствора этих соединений использовался ДМСО. В то же время для самого растворителя было показано, что он способен влиять на синтез виолацеина.

Данные вопросы носят дискуссионный характер и не влияют на обоснованность приведенной в диссертации аргументации и на положительную оценку исследования в целом.

Отзыв ведущей организации Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности – отзыв положительный.

В качестве замечания необходимо отметить следующее: при рекомендации использования отобранных потенциальных модуляторов биопленок разных биосистем автором не учитываются и не обсуждаются экономические вопросы, в частности, определяемые большими объемами препаратов при их использовании в биотехнологических процессах.

Для разработки практических рекомендаций по применению полученных результатов, особенно в условиях техногенных сред, необходимо тщательно проработать вопрос о возможном формировании у микроорганизмов-мишеней резистентности к антибиопленочным агентам.

На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:

1. Здоровенко Э.Л. – к.х.н., снс лаборатории химии углеводов им. Н.К. Кочеткова, ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН
2. Котова И.Б. – д.б.н., профессор кафедры микробиология биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» - замечания: «Можно ли экстраполировать полученные на модельных

моновидовых (однокомпонентных) биопленках данные на реальную ситуацию в природе и биотехнологии, где биопленки являются более сложными образованиями, состоящими из нескольких микробных культур, а влияющие на их жизнедеятельность факторы более многообразны?»

3. Потехина Н.В. – д.б.н., внс кафедры микробиология биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
4. Литов А.Г. – к.б.н., снс лаборатории биологии арбовирусов ФГАНУ Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН. Замечания: «в графиках на рис. 1 и 2 отсутствуют доверительные интервалы для значений изменения оптической плотности. ...на стр. 12 говорится, что из библиотеки были отобраны 6 кандидатов с «наиболее выраженным эффектом на рост биопленок» со ссылкой на рис. 3. Однако согласно рис. 3 видно, что существует, по крайней мере, несколько соединений из этой библиотеки, которые подавляют рост биопленок сильнее».
5. Самылина О.С. – кбн, снс лаборатории реликтовых микробных сообществ, ФИЦ Биотехнологии РАН. Замечания: «Среди недостатков данной работы можно отметить некоторую её фрагментарность. Часть работы, посвященная работе над коммерческой библиотекой препаратов, не выглядит как логичное продолжение предыдущей части работы, несмотря на то, что автор утверждает обратное на стр. 19».
6. Арзумян В.Г. – д.б.н., профессор, зав. лабораторией физиологии грибов и бактерий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
7. Манзенюк О.В. – к.м.н., снс ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Все отзывы положительные.

Вопросы задавали: дбн Летаров А.В., дбн Терешина В.М., дбн Пименов Н.В.

В дискуссии приняли участие: дбн Дедыш С.Н., дбн Пименов Н.В., Терешина В.М.

Диссертационный совет отмечает, что диссертация Мартьянова С.В., посвященная поиску потенциальных ингибиторов и стимуляторов роста биопленок модельных бактерий среди уже вошедших в практику использования, широко применяемых соединений, является завершенной научной работой.

В работе впервые показана возможность устранения стимулирующего действия сверхнизких концентраций антибиотика азитромицина на рост биопленок модельных микроорганизмов при помощи традиционных консервантов и лекарственных препаратов (4-гексилрезорцина, никлозамида, сульфатаизола). Впервые показан антибиопленочный эффект указанных соединений в отношении модельных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Обнаружен антибиопленочный эффект и изучен

механизм ингибирующего действия клиохинола, азидотимидина, цефуроксима, пипемидовой кислоты, тилоксапола и бромида тонзония на биопленки *Escherichia coli*. Изучен пробиопленочный стимулирующий эффект никлозамида на синтез антибиотиков-феназинов в биопленках *Pseudomonas aeruginosa*, а также стимуляция диметилсульфоксидом синтеза широко изучаемого ингибитора роста микроорганизмов и опухолевых клеток виолацеина в биопленках *Chromobacterium violaceum*. В работе использованы как стандартные методы (выращивание биопленок в лунках иммунологических планшетов, конфокальная микроскопия, протеомика, проточная цитометрия, тонкослойная хроматография), так и оригинальные методики (метод тефлоновых кубиков, метод выращивания биопленок на фильтрах из стекловолокна).

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что в работе впервые проведен скрининг широко применяемых в клинической практике биоцидов (азитромицина, никлозамида, клиохинола, цефуроксима, пипемидовой кислоты, бромида тонзония, тилоксапола, сульфатаиазола), пищевого консерванта 4-гексилрезорцина, противовирусного препарата азидотимидина, органического растворителя диметилсульфоксида на наличие анти- и пробиопленочной активности в отношении модельных бактерий из разных экотопов. В работе показан синергидный и аддитивный противобиопленочный эффект 4-гексилрезорцина, никлозамида, сульфатаиазола в сочетании с азитромицином. Методом проточной цитометрии и протеомики выявлены различные типы стрессовых ответов, лежащие в основе антибиопленочного эффекта азидотимидина, клиохинола, цефуроксима, пипемидовой кислоты в отношении модельного штамма *E. coli*, а также эффективность данных соединений против биопленок уропатогенных штаммов этой бактерии. Показано, что в основе антибиопленочного эффекта никлозамида в отношении грамположительных бактерий лежит подавление роста бактериальных клеток, в то время как для 4-гексилрезорцина антибиопленочный эффект связан с подавлением формирования внеклеточного матрикса биопленок. Показано, что в основе стимулирующего эффекта никлозамида на биопленки *Chromobacterium violaceum*, а также стимуляции синтеза феназинов клетками *P. aeruginosa* может лежать опосредованное воздействие на систему quorum sensing.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что в результате проведенных исследований были сформулированы основные принципы поиска антибиопленочных препаратов, в ходе которого проверялось наличие и пробиопленочной активности. Этот подход позволил обнаружить пробиопленочную активность у ряда соединений, что может быть использовано в практических целях, поскольку микробные биопленки находят широкое применение в биотехнологии. В то же время применение традиционных, широко используемых в клинической практике и пищевой промышленности соединений в качестве антибиопленочных агентов не требует затратных испытаний, и позволит ускорить срок их внедрения в клиническую практику.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что полученные результаты являются воспроизводимыми и достоверными, а выводы и положения обоснованными. При выполнении диссертационной работы был применен комплекс микробиологических и биохимических методов, экспериментальные данные были статистически обработаны.

По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 7 статей в рецензируемых научных журналах из Перечня ВАК при Министерстве образования и науки РФ и индексируемых в Web of Science, и 8 тезисов конференций.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в реализации всех этапов работы, включая планирование и постановку экспериментов, анализ и статистическую обработку экспериментальных данных, представление основных положений работы на конференциях, подготовку публикаций по теме работы.

Диссертация **Мартьянова Сергея Владиславовича «Возможности управления формированием и функционированием микробных биопленок на примере хемотротрофных бактерий из разных экотопов»** является законченной научно-квалификационной работой, которая посвящена поиску потенциальных ингибиторов и стимуляторов роста биопленок модельных бактерий.

Работа соответствует профилю Диссовета Д002.247.02 и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук в соответствии с п.9-11, 13-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842.

На заседании 23 июня 2021 г. Диссертационный совет принял решение присудить **Мартьянову Сергею Владиславовичу** ученую степень кандидата биологических наук по специальности – 03.02.03 – Микробиология.

При проведении открытого голосования диссертационный совет в количестве 16 чел., из них 9 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали «за» присуждение ученой степени – 16, «против» - 0, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета Д002.247.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор биологических наук



Н.В. Пименов

Ученый секретарь
диссертационного совета Д002.247.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор биологических наук

Т.В. Хижняк

23 июня 2021 г.