

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу Мартьянова Сергея Владиславовича «Возможности управления формированием и функционированием микробных биопленок на примере хемогетеротрофных бактерий из разных экотопов», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 –«Микробиология»**

Диссертационная работа С.В. Мартьянова посвящена исследованию процессов управления формированием и функционирования микробных биопленок. Эта тема, включающая изучение и выявление закономерностей действия на биоплёнки биологически активных соединений различной природы (4-гексилрезорцина, никлозамида, сульфатаизола и др.), а также их влияния на Quorum Sensing (QS) бактериальную систему коммуникации, является важной как в фундаментальном, так и в прикладном отношении.

Известно, что образование биопленок является значительной проблемой в медицине и промышленности, поскольку в составе биопленок бактерии многократно устойчивее к антибиотикам, иммунному ответу макроорганизма и обработке биоцидами; к тому же, более 60% всех хронических заболеваний осложняются образованием биопленок патогенных микроорганизмов. С учетом опасности стимуляции роста биопленок при терапии антибиотиками, интерес также представляет поиск агентов, способных устранять стимулирующий эффект антибиотиков на формирование микробных биопленок. С другой стороны, знание структуры биопленок и способов влияния на формирование биоплёнок может быть полезным для биотехнологии при создании биоплёнок штаммов продуцентов, более устойчивых к действию негативных факторов окружающей среды. Постоянный интерес к поиску и изучению соединений способных модулировать рост биопленок, образуемых патогенными микроорганизмами, разрушать зрелые биопленки и убивать обитающих в них бактерий, свидетельствуют о значимости и актуальности темы диссертационной работы С.В. Мартьянова. Не вызывает сомнения необходимость фундаментального понимания функций, структуры биопленок, закономерностей действия на биоплёнку различных биологически активных соединений.

Диссертация С.В. Мартьянова построена традиционно, в ней имеются все необходимые разделы: введение, цели и задачи работы, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список цитируемой литературы. Объем диссертации: 123 с.

Во введении С.В. Мартьянов обосновал важность проблематики своей работы, как в фундаментальном плане, так и для прикладных областей, новизну исследований и их практическую значимость.

В обзоре литературы приведены сведения о стадиях формирования биопленок, внимание уделяется различным стратегиям борьбы с нежелательным формированием микробных биопленок, поиску модуляторов (ингибиторов и стимуляторов) роста биопленок среди соединений, уже применяемых в клинической практике или пищевой промышленности. В обзоре подчёркивается важность исследования влияния биологически активных соединений, в частности, антибиотиков, на рост и формирование моно- и мульти- видовых биоплёнок. Отмечена роль Quorum Sensing (QS) систем регуляции в устойчивости и взаимодействии биоплёнок микроорганизмов с антибиотиками, а также описаны стратегии, направленные на ингибирование QS систем.

В главе «Материалы и методы» С.В. Мартьянов приводит описание методов изучения закономерностей роста и устойчивости биоплёнок грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов к действию различных биологически активных соединений (антигельминтного агента никлозамида; 4-гексилрезорцина используемого в пищевой промышленности в качестве консерванта; биоцида широкого спектра действия клиохинола, сульфатаизола и др.). Содержание этой главы свидетельствует о высоком методическом уровне работы, выполненной с применением многих современных микробиологических и биохимических методов. Особый интерес вызывает комплексный подход к изучению биопленок модельных микроорганизмов при действии исследуемых соединений, в частности протеомный анализ при помощи масс-спектрометрии по принципу орбитальной ионной ловушки, метод проточной цитометрии для измерения интенсивности флуоресценции биопленочных клеток, а также скрининг библиотеки соединений Prestwick Chemical Library, на предмет выявления веществ обладающих антибиопленочной активностью.

В разделе Результаты описаны полученные автором приоритетные данные о влиянии биологически активных соединений различной природы на биоплёнки грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (*Dietzia natronolimnaea* 2610-1; *Kocuria rhizophila* DC2201; *Rhodococcus equi*; *Chromobacterium violaceum* CVWT и CV026; *Pseudomonas chlororaphis* 66 и др.). Применение различных способов получения биоплёнок (на фильтрах из стекловолокна, на тефлоновых кубиках, в лунках иммунологических планшетов) позволяет автору более полно охарактеризовать исследуемые модуляторы роста биоплёнок и выявить новые механизмы и закономерности их действия. В данной части работы подробно изучена активность 4-гексилрезорцина в

качестве антибиопленочного агента, как самого по себе, так и в сочетании с азитромицином. Показана способность 4-гексилрезорцина устранять стимулирующий эффект суббактериостатических концентраций азитромицина на формирование микробных биопленок. Кроме того, установлено, что 4-гексилрезорцин обладает выраженным антимикробным и антибиопленочным действием, а также значительно увеличивает чувствительность тестируемых грамположительных бактерий к азитромицину. Автору удалось показать, что главной мишенью действия 4-гексилрезорцина являются пути биосинтеза углеводных компонентов внеклеточного полимерного матрикса биопленки, играющего важную роль в устойчивости биопленок к стрессовым физико-химическим факторам и биоцидам.

Проведена оценка антибиопленочной активности 1280 соединений из коммерческой библиотеки Prestwick Chemical Library в отношении модельного штамма *Escherichia coli* K12 W3110, основным компонентом внеклеточного полимерного матрикса которого являются белковые нити курли. По результатам оценки антибиопленочной активности отобраны 6 перспективных кандидатов с наиболее выраженным эффектом на рост биопленок в сравнении с действием на планктонную культуру. Среди них 1 биоцид широкого спектра действия (клиохинол), 2 антибактериальных соединения (пипемидовая кислота, цефуроксим), противовирусный препарат (азидотимидин), и 2 сурфактанта (тилоксапол, бромид тонзония). Изучены механизма действия этих соединений, а также их эффективность в отношении уропатогенных штаммов *E. coli*. Для всех соединений показан выраженный антибиопленочный эффект в исследуемом диапазоне (1.25 – 10 мкМ). Автором выдвинуто предположение о том, что, по-видимому, в основе антибиопленочного эффекта тилоксапола лежит подавление адгезии, в то время как остальные соединения (клиохинол, пипемидовая кислота, азидотимидин, цефуроксим и бромид тонзония) подавляют как рост, так и созревание биопленок. Для проверки выдвинутого предположения автором были сконструированы репортерные штаммы *E. coli* K12 W3110/pVS1621 и W3110/pVS1157. Уровень экспрессии с промотора гена *fljC* (кодирует структурный белок жгутика), и *csgA* (кодирует структурный белок фибриллы курли) оценивали методом проточной цитометрии по усредненным значениям интенсивности флуоресценции. Установлено, что в основе антибиопленочного эффекта клиохинола, пипемидовой кислоты, азидотимидина и цефуроксима лежит подавление формирования амилоидных белков курли на уровне транскрипции. С целью более детального изучения механизма действия азидотимидина, клиохинола, цефуроксима и пипемидовой кислоты был проведен протеомный анализ и показано, что в основе антибиопленочного эффекта

действия этих соединений лежат разные типы стрессовых ответов. В частности количество структурных белков курли (CsgA, CsgB, CsgC) снижалось во всех случаях, за исключением клиохинола, для клиохинола данный эффект связан с его хелатирующими свойствами. Полученные результаты свидетельствуют в пользу высказанного автором предположения о том, что механизм биосинтеза курли является главной мишенью для исследуемых соединений, и именно воздействие на данный компонент вызывает столь выраженный антибиопленочный эффект.

В прикладном аспекте интерес представляют результаты исследований по действию никлозамида и диметилсульфоксида (ДМСО) на синтез биологически активных веществ – феназинов и виолацеина в биопленках и планктонной культуре *P. aeruginosa* PAO1 и *S. violaceum* CVWT, соответственно. Получены данные о том, что никлозамид при высоких концентрациях (до 10 мкг/мл) способен стимулировать биосинтез антибиотиков-феназинов у *P. aeruginosa*, диметилсульфоксид (в диапазоне концентраций от 1.5 до 5%) - синтез виолацеина в биопленках *S. violaceum* CVWT. Использование ДМСО для стимуляции синтеза виолацеина и никлозамида для стимуляции синтеза феназинов может быть перспективно для совершенствования биотехнологии производства указанных соединений.

Многие результаты, описанные в работе С.В. Мартянова, получены автором впервые, они важны для понимания глобальной картины процессов управления формированием и функционирования микробных биопленок. Полученные результаты вносят вклад в понимание фундаментальных закономерностей образования биоплёнок и функций её отдельных компонентов, а также механизмов действия различных биологически активных соединений (никлозамида, 4-гексилрезорцина, клиохинола, сульфатаиазола и др.)

Список литературы включает 237 источников. Автореферат отражает содержание диссертации.

В работе С.В. Мартянова представлен обширный экспериментальный материал, позволивший автору сделать ряд приоритетных заключений. Результаты диссертационной работы открывают новые перспективы изучения закономерностей образования биопленок бактерий, их биохимического состава, а также разработки методов контроля и борьбы с биопленками. Эти данные могут быть использованы в прикладных целях в медицине и сельском хозяйстве.

К диссертационной работе имеется несколько вопросов:

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 биоплёнок в качестве растворителя для приготовления стоковых растворов этих соединений использовался ДМСО. В тоже 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.

Имеются некоторые замечания относительно стиля изложения и оформления работы – наличие в диссертации досадных опечаток, лишних фраз, и ряда других моментов несколько затрудняет восприятие изложенной в работе информации. Однако эти замечания нисколько не умаляют значимости диссертационного исследования.

В целом, диссертация С.В. Мартьянова заслуживает высокой оценки. В ней содержатся оригинальные данные, представляющие большой научный интерес. Для диссертационной работы С.В. Мартьянова характерны актуальность избранной темы, степень обоснованности научных положений, выводов, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна. Результаты работы опубликованы в 7 научных статьях в ведущих рецензируемых научных журналах из перечня ВАК при Министерстве образования и науки РФ, индексируемых в базах данных Scopus и/или Web of Science, а также представлены в докладах на всероссийских и международных научных конференциях.

Диссертация С.В. Мартьянова является законченной научно-квалификационной работой и соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости результатов. Диссертационная работа «Возможности управления формированием и функционированием микробных биопленок на примере хемогетеротрофных бактерий из разных экотопов» соответствует критериям, установленным для кандидатских диссертации «Положением о присуждении ученых степеней» (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, от 2 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 1 октября 2018 г. № 1168), а сам диссертант, Мартьянов Сергей Владиславович, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология».

Официальный оппонент:

Плюта Владимир Александрович

кандидат биологических наук, код специальности ВАК: 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» и 03.02.03 – «Микробиология».

Научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов.

Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»  
123182 г. Москва площадь академика И.В. Курчатова, д. 2, НИЦ «Курчатовский институт»  
- ИМГ

plyutaba@gmail.com

+7 (499) 196-02-15;

28 мая 2021 г.

Подпись сотрудника организации В.А. Плюта удостоверяю



Ученый секретарь НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ  
к.б.н. Л.Е. Андреева