

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Инчаговой Ксении Сергеевны

«Влияние антибиотиков на систему «quorum sensing» LuxI/LuxR-типа у бактерий (на примере *Chromobacterium violaceum*)»,
представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 Микробиология

1. Актуальность

Межклеточная химическая коммуникация у бактерий, обозначаемая термином «quorum sensing» (QS), на сегодняшний день привлекает внимание многих ученых-микробиологов по всему миру. Системы QS достаточно разнообразны и различаются между собой в зависимости от химической природы автоиндуктора, а также характера и локализации воспринимающих их рецепторных белков; могут быть специфичны как для одного вида, так и для разных групп микроорганизмов. Под контролем QS находится обширное число морфологических признаков бактерий, включающих бактериальную люминесценцию, синтез пигментов, споруляцию, а также, что немаловажно, биопленкообразование и продукцию факторов вирулентности бактериальных патогенов, что делает QS перспективным инструментом для борьбы с инфекционными заболеваниями бактериальной этиологии.

В настоящее время большое внимание уделяется поиску QS-ингибиторов различной природы, эффективно подавляющих систему межклеточной коммуникации у бактерий, особое место среди которых занимают антибиотики. Подобный интерес к данным веществам связан с их способностью к модуляции QS-зависимых процессов при низких, субингибиторных концентрациях, наряду с имеющейся антибактериальной активностью их высоких концентраций. В литературе имеется достаточно большой массив данных, посвященных данной проблеме, однако четкого ответа на вопросы «как?», «в каких дозах?», «каков механизм действия?», до сих пор не получено. Также остается непонятным, почему одни и те же антибиотики при разных условиях культивирования оказывают разнонаправленное действие на QS. В этой связи, тема диссертационного исследования Инчаговой Ксении Сергеевны, целью которого стало исследование воздействия субингибиторных концентраций антибиотиков из групп пенициллинов, аминогликозидов и тетрациклинов на систему «quorum sensing» (QS) LuxI/LuxR-типа (на примере *Chromobacterium violaceum*) и

разработка на данной основе возможных подходов к усилению их QS-модулирующей активности, является, безусловно, актуальной и соответствующей современным мировым тенденциям развития мировой и отечественной науки в данной отрасли научного знания.

2. Достоверность и новизна

Достоверность научных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения и определяется значительным объемом проведенных экспериментов, а также использованием представительного спектра современных инструментальных микробиологических и биохимических методов исследования. Большинство экспериментов грамотно спланировано и выполнено, а обработка их результатов осуществлена с привлечением адекватных методов статистического анализа. Обсуждение полученных результатов проведено с учетом современных требований и методических подходов биологической науки.

Оценивая новизну проведенного исследования, представляется необходимым выделить три ключевых момента:

1) Диссертантом получены убедительные экспериментальные доказательства способности антибиотиков из группы пенициллинов при субоптимальных температурах культивирования в субингибиторных концентрациях индуцировать QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у *S. violaceum* в отсутствие его естественного автоиндуктора C₆-АГЛ. Вместе с тем обоснован механизм действия данной группы антибиотиков в качестве АГЛ-мимикрирующих молекул.

2) Установлено, что субингибиторные концентрации аминогликозидов и тетрациклинов способны подавлять QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у *S. violaceum*. Важно отметить, что диссертантом выявлен механизм действия аминогликозидов, связанный с подавлением биосинтеза автоиндуктора C₆-АГЛ, что было подтверждено в отношении АГЛ-продуцирующего клинического изолята *P. aeruginosa*.

3) Практически-ориентированным аспектом проведенного исследования стало обоснование последовательного применения аминогликозидного антибиотика амикацина и фармакопейного препарата активированного угля, а также амикацина и малых молекул растительного происхождения (пирогаллола и кумарина) с целью усиления выявленного QS-ингибирующего эффекта антибиотика в отношении *S. violaceum*. Новизна композиции на основе амикацина и кумарина защищена патентом РФ на изобретение № 2616237.

3. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Основные положения, выводы и рекомендации, сформулированные диссертантом, научно обоснованы и аргументированы. Теоретические и методические положения, а также практические рекомендации диссертационного исследования основываются на изучении фундаментальных и прикладных трудов отечественных и зарубежных ученых в области микробиологии, что подтверждается ссылками на них в тексте диссертационной работы. В своем исследовании соискатель опирается на публикации в периодической печати, соблюдая принципы научной преемственности с предшествующими работами по данной проблематике, согласованности полученных в диссертации результатов с основными теоретическими положениями, а также комплексности и системности. Анализ произведен с использованием современных микробиологических методов исследования, результаты статистически обработаны, представлены и обсуждены на научных мероприятиях.

4. Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций

Значимость выводов и рекомендаций диссертационного исследования определяется полученными данными о функционировании антибиотиков в качестве веществ, обладающих наряду с прямой антибактериальной активностью, способностью выступать как соединения с информационными функциями, что обуславливает их участие в регуляции межклеточной химической коммуникации у бактерий при субингибиторных концентрациях. Данный аспект позволяет шире взглянуть на взаимодействия, происходящие между разными группами организмов в естественных условиях среды их обитания.

Говоря о практически-ориентированном аспекте данного диссертационного исследования, нужно отметить, что сделанные диссертантом выводы являются основанием для дополнительного изучения назначаемых антибиотиков при терапии бактериальных инфекций, возбудители которых используют стереотипно устроенные QS-системы LuxI/LuxR-типа для индукции своего патогенного потенциала и формирования биопленок, поскольку выявленный диссертантом QS-индуцирующий эффект пенициллинов определяет неоднозначность использования этой группы антибиотиков в клинической практике. В свою очередь, результаты по усилению QS-ингибирующего действия аминокликозидов веществами органической и неорганической природы являются основанием для дальнейшего тестирования созданных композиций

на животной модели, с целью разработки лекарственного препарата нового принципа действия, а также совершенствования схем лечения и профилактики заболеваний животных и человека.

5. Структура и содержание диссертации, ее завершенность

Диссертация К.С. Инчаговой изложена на 137 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация достаточно полно иллюстрирована 11 таблицами и 29 рисунками, а также имеет список цитируемой литературы по обсуждаемому вопросу, включающий 230 источников, в том числе 219 – зарубежных авторов.

Введение содержит доказательства актуальности проведенного исследования. Этот раздел также включает формулировку цели и задач работы, ее научную новизну, теоритическую и практическую значимость.

Обзор литературы хорошо структурирован и включает описание истории изучения QS, молекулярно-генетической организации QS-систем, биологических характеристик, которые находятся под контролем QS, и возможных путей ингибирования QS. Особое место отведено анализу уже известных эффектов антибиотиков на QS у бактерий.

В главе «Материалы и методы исследования» представлен весь спектр используемых методов исследования, позволивший грамотно решить все поставленные задачи, а также достаточно полно охарактеризованы выбранные объекты исследования.

Глава «Результаты и обсуждение» включает в себя три блока, соответствующие решаемым задачам. В первом достаточно полно описаны результаты исследования действия антибиотиков пенициллинового ряда на QS-зависимое образование пигмента виолацеина у *C. violaceum* с анализом условий формирования выявленных эффектов. Второй блок посвящен влиянию аминокликозидов и тетрациклинов на QS у бактерий. Описаны результаты исследований на музейном штамме *C. violaceum* ATCC 31532, а также на четырех клинических изолятах *P. aeruginosa*. Выявлен механизм QS-ингибирующего действия аминокликозидов. В третьем блоке представлены результаты экспериментов по усилению QS-ингибирующего эффекта аминокликозидов, описаны эффективные сочетания исследованных веществ для достижения этой задачи.

Работу завершает Заключение, в краткой форме обобщающее результаты проведенного исследования и расставляющее наиболее значимые акценты.

Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора, обоснованы и достоверны.

6. Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертации К.С. Инчаговой исчерпывающе представлены в 9 печатных работах, в том числе в 3 статьях в рецензируемых журналах, входящих в международные системы научного цитирования *Web of Science* и *Scopus*, в 1 патенте РФ на изобретение.

7. Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертации, замечаний нет.

8. Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы

В целом представленная работа свидетельствует о высокой квалификации диссертанта как научного работника. Работа хорошо оформлена, в полной мере снабжена графическим материалом, изложена по существу, логически последовательно, грамотно. Хорошо обоснована актуальность темы диссертационного исследования, представлен анализ мировой научной литературы по данной проблеме. Из актуальности логически вытекает цель исследования, грамотно поставлены задачи для ее достижения.

Отдельное внимание хотелось бы уделить выбранному методическому подходу. Используемые в работе штаммы обладают адекватным набором характеристик, необходимым для достижения поставленных задач, и являются одним из наиболее используемых инструментов исследования регуляции QS-зависимых процессов.

Работа является практически значимой как для фундаментальной науки, так и имеет прикладное достаточно значимое направление.

Однако, наряду с изложенными достоинствами представленной диссертации, имеют место недостатки и упущения.

Так, при исследовании антибиотиков пенициллинового ряда, на взгляд оппонента, не достаточно доказанной является гипотеза действия данной группы соединений в субоптимальном диапазоне температур культивирования. Хотелось бы получить более весомые экспериментальные

доказательства данного предположения. В частности, это положение могло быть подтверждено посредством молекулярного докинга.

Также хотелось бы видеть в диссертации более внятное объяснение механизма действия тетрациклинов на АГЛ-опосредованную систему QS *C. violaceum*.

Интересным результатом исследования являются пути усиления QS-ингибирующего действия аминогликозидов, однако использование пирогаллола и кумарина, на взгляд оппонента, не выглядит перспективным для применения в медицине, так как эти вещества являются достаточно токсичными в отношении человека и животных. Также можно было бы расширить спектр используемых антибиотиков на данном этапе исследования и не ограничиваться только амикацином.

В то же время существенных недостатков у оппонируемой работы не выявлено, а указанные замечания никак не умаляют значимость проделанной работы и не изменяют ее общую положительную оценку.

При общей положительной оценке работы у оппонента также возникли следующие вопросы:

1) Каков биологический смысл формирования QS-стимулирующего эффекта у *C. violaceum* в ответ на действие пенициллинов в естественных условиях среды обитания?

2) С чем может быть связано значительное накопление АГЛ в среде культивирования в субингибиторном диапазоне концентраций тетрациклинов?

3) Чем обоснован выбор данных малых молекул растительного происхождения (пирогаллола и кумарина)?

Заключение

Диссертационная работа Инчаговой Ксении Сергеевны «Влияние антибиотиков на систему «quorum sensing» LuxI/LuxR-типа у бактерий (на примере *Chromobacterium violaceum*)», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение важной задачи, имеющей теоретическую и практическую значимость. По своей актуальности, научной новизне, практической значимости и уровню проведенных исследований диссертационная работа в полной мере соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства

Российской Федерации от 24.09.13 г. № 842 (ред. от 01.10.2018),
предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор – Инчагова Ксения
Сергеевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Официальный оппонент,
Заведующий лабораторией
выживаемости микроорганизмов
Института микробиологии
имени С.Н. Виноградского
ФИЦ Биотехнологии РАН,
доктор биологических наук
28.10.2020 г.

Николаев Юрий Александрович

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
Тел.: +7 (495) 954-52-83
E-mail: nikolaevya@mail.ru

Подпись Ю.А. Николаева заверяю
Заместитель начальника отдела кадров
ФИЦ Биотехнологии РАН
28.10.2020 г.



Шиян Ирина Николаевна