

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Домнина Павла Александровича на тему: «Моделирование и изучение свойств не прикрепленных к поверхности бактериальных агрегатов» по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность темы

По современным представлениям к биопленкам относят агрегаты микроорганизмов, погруженных в матрикс экзополимерных веществ, которые они сами и синтезируют. При этом агрегаты могут представлять собой классические биопленки, т.е. прикрепленные к поверхности или разделу фаз – так называемые прикрепленные биопленки, и агрегаты, взвешенные в водной среде. И те и другие морфотипы биопленок широко распространены в природе, включая и организм человека. Многие данные указывают на то, что некоторые хронические инфекции связаны с образованием патогенными бактериями неприкрепленных автоагрегатов, взвешенных в объеме биологических жидкостей. Такие агрегаты могут формироваться в хронических ранах, в ротовой полости, на слизистых дыхательных путей или кишечника. Поскольку неприкрепленные агрегаты демонстрируют все признаки классических биопленок, включая повышенную устойчивость к антимикробным агентам, они представляют серьезную проблему для терапии хронических инфекций.

Изучение моделей неприкрепленных агрегатов в условиях *in vitro* сопряжено с рядом ограничений, связанных с седиментацией агрегатов под действием силы тяжести даже в очень вязких средах, что ограничивает время наблюдения. Поэтому разработка адекватных моделей для изучения бактериальной агрегации в целом и автоагрегации в случае конкретных инфекционных заболеваний, вызванных одним патогеном, является актуальной проблемой для выработки стратегий предупреждения и лечения соответствующих хронических болезней.

В связи с этим **цель работы** – апробация метода магнитной левитации для исследований не прикрепленных и не седиментирующих в условиях *in vitro* агрегатов для моделирования поведения бактерий при хронических инфекциях представляется вполне актуальной.

Для достижения этой цели диссертантом были поставлены следующие **задачи:**

1. Подобрать оптимальные условия для культивирования бактериальных автоагрегатов в новой экспериментальной системе.
2. Сравнить особенности формирования автоагрегатов и прикрепленных биопленок ряда вирулентных и сапрофитических штаммов *Escherichia coli*.
3. Изучить механизмы генетического контроля автоагрегации вирулентного штамма *E. coli* серотипа O157:H7.
4. Провести сравнительный анализ состава протеома бактерий автоагрегатов, выращенных в условиях магнитной левитации и в условиях невесомости в космосе.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций
Обоснованность научных положений, результатов, выводов и рекомендаций базируется на тщательной проработке теоретических основ изучаемой проблемы и анализе собственных экспериментальных данных, включающем статистическую обработку.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, значение полученных результатов для науки и практики

Диссертационная работа Домнина П.А. выполнена на хорошем методическом уровне с использованием современных методов, приборов и биоинформационных программ. Эксперименты проводили не менее чем в трехкратной повторности, и их достоверность не вызывает сомнения. Результаты представлены в виде среднего значения, погрешности – стандартного отклонения по выборке.

- Диссертантом впервые апробирована новая модель не прикрепленных к поверхности бактериальных агрегатов, основанная на феномене магнитной левитации, позволяющая изучать различия в эффективности автоагрегации бактерий (например, влияние точечных мутаций в генах, регулирующих автоагрегацию), которые не дифференцируются стандартными моделями.
- Обнаружены различия в механизмах контроля формирования биопленок и автоагрегатов у патогенных и сапрофитических штаммов *E. coli*.
- Продемонстрирован вклад регулятора транскрипции гетеродимера RcsB/RcsA в автоагрегацию патогенного штамма *E. coli* серотипа O157:H7.

- Бактерии в автоагрегатах (на примере пробиотического штамма *E. coli* M17), сформированных в естественных условиях невесомости (космосе) и искусственных (биопринтер) – имели сходный состав протеома.

Выводы, сделанные Домниным П.А., полностью отражают полученные им результаты и соответствуют целям и задачам диссертационной работы.

По материалам диссертации опубликованы 4 работы в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты работы представлены на отечественных и международных конференциях.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Диссертационная работа Домнина П.А. изложена на 140 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитированной литературы, который включает 258 источника. Диссертация содержит 6 таблиц и 22 рисунка. Материал диссертационной работы хорошо структурирован, изложен последовательно, логично, содержит информативные графики, диаграммы, иллюстрации и таблицы.

Во «Введении» автор очень кратко описывает существующую научную проблему, актуализирует тему исследования, обосновывает цель и основные направления ее реализации, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

В «Обзоре литературы» описаны процессы флокуляции, коагрегации и автоагрегации бактерий, роль микробных агрегатов в экологических системах и медицине. Рассмотрены молекулярные механизмы автоагрегации патогенных бактерий в естественных условиях и существующие экспериментальные модели, основанные на феномене магнитной левитации.

В «Материалах и методах» представлены различные микробиологические, микроскопические и молекулярно-генетические методы исследования автоагрегатов и методы статистической обработки данных. Приведены сведения об устройстве экспериментальной системы, основанной на феномене магнитной левитации.

Глава «Результаты исследования» начинается с описания системы и принципа работы магнитного биопринтера и возможности применения его для получения взвешенных в жидкой среде бактериальных автоагрегатов. Для

чистоты эксперимента диссертантом была исключена возможность токсического эффекта гадобутрола (добавляемого в среду для обеспечения левитации бактерий в статическом магнитном поле), а также магнитного поля на клетки бактерий.

На 2 штаммах грамположительных и 2 штаммах грамотрицательных бактерий изучены процессы образования автоагрегатов, их морфология, количественные и качественные показатели, устойчивость к антибиотикам (на примере гентамицина). Показано, что бактериальные автоагрегаты образовывались за счет сближения клеток в магнитной ловушке биопринтера под действием магнитного поля; агрегаты состояли из бактериальных клеток и внеклеточного полимерного матрикса.

Дальнейшие и основные исследования проводили на трех штаммах *E. coli*: вирулентном штамме ATCC 43890 (серовар O157:H7), пробиотическом штамме M17 и лабораторном штамме JM109 (производный от штамма K12).

Все указанные штаммы были охарактеризованы по следующим признакам:

- способности к образованию прикрепленных биопленок в лунках полистиролового планшета,
- эффективности образования автоагрегатов (определение соотношения числа КОЕ в агрегате и в культуральной среде),
- числу жизнеспособных клеток в агрегатах,
- плотности агрегатов (число КОЕ бактерий на 1 мм³ агрегата),
- оценке автоагрегации с помощью седиментационного теста,
- наличие курлей-фимбрий на поверхности клеток при росте колоний на агаре.

Следующий раздел «Результатов» посвящен изучению автоагрегации вирулентного штамма *E. coli* ATCC 43890 (серовар O157:H7). Показано, что вирулентный штамм, не имеющий курли-пилей на поверхности клетки, был не способен к образовыванию прикрепленных биопленок, но в условиях левитации формировал небольшие, но плотные автоагрегаты.

Одним из ключевых факторов образования биопленок является способность бактерий к формированию внеклеточного матрикса. Частым компонентом матрикса являются амилоидные белки, которые у ряда штаммов *E. coli* представлены курли-волоконками. Так, диссертантом было показано, что патогенный штамм, не имеющий курлей на поверхности клеток, синтезировал и включал их в состав экзополимерного матрикса. В результате амилоидные белки курли присутствовали в автоагрегатах в значительном количестве.

Как было показано в литературном обзоре способность бактерий к авторегуляции может обуславливаться различными механизмами, и наличие/отсутствие курлей на поверхности клетки может играть решающее значение в формировании агрегатов, прикрепленных или не прикрепленных к поверхности.

В связи с этим следующий раздел диссертации был посвящен изучению генетических детерминант автоагрегации. С этой целью был получен курли-образующий мутант вирулентного штамма АТСС 43890. Мутант аналогично дикому штамму не образовывал прикрепленных биопленок, однако формирование автоагрегатов происходило более эффективно, с участием 99% бактерий, находящихся в биопринтере. Таким образом, диссертантом было показано, что наличие поверхностных структур клетки – курлей – способствует более эффективному формированию автоагрегатов. В связи с этим хотелось бы особенно отметить оригинальность разработанного диссертантом метода окраски курлей непосредственно в автоагрегате в процессе его формирования в биопринтере.

Помимо роли курлей в формировании автоагрегатов диссертантом были изучены некоторые механизмы регуляции образования автоагрегатов с участием гетеродимера RcsB/Rcs. С использованием разработанной модели впервые было показано, что регулятор транскрипции гетеродимер RcsB/RcsA в связанном состоянии подавляет автоагрегацию патогенного штамма *E. coli* серотипа O157:H7, в то время как нарушение связывания двух белков в димере, напротив, стимулирует ее эффективность. Механизм регуляции с участием белков RcsB/RcsA димера объяснен на уровне картирования мутаций в патогенном штамме. Механизмы регуляции были объяснены и доказаны на геномном уровне.

Для лучшего понимания процессов или изменений, неизменно происходящих в клетках при формировании автоагрегатов, диссертантом был проведен протеомный анализ бактериальной культуры в биопринтере, в результате которого были выявлены и идентифицированы 23 различных белка, относящихся к четырем функциональным группам, экспрессия которых повышалась при формировании патогенным штаммом *E. coli* автоагрегатов.

Последний раздел работы посвящен сравнительному изучению протеома автоагрегатов пробиотического штамма *E. coli* M17, выращенного в условиях естественной и искусственной невесомости. С помощью разработанной

экспериментальной системы были продемонстрированы схожие изменения в протеоме *E. coli* M17 при росте бактерий в условиях магнитной левитации и условиях невесомости в рамках эксперимента на борту МКС по сравнению с ростом в стандартной планктонной культуре. В целом, полученные результаты свидетельствуют, что разработанную модель можно использовать для изучения механизмов феномена автоагрегации бактерий, в том числе, вызванной условиями роста бактерий в космосе.

Хорошо написана глава «Обсуждение», в которой автор обосновывает логику проведения экспериментов, интерпретирует полученные результаты, высказывает свои предположения.

Завершается диссертационное исследование «Заключением» и «Выводами».

Автореферат изложен на 22 страницах, хорошо оформлен и полностью соответствует содержанию самой диссертации. Выводы в автореферате и диссертации идентичны.

Замечания и пожелания.

Как и любая объемная работа, диссертация П.А. Домнина содержит ряд замечаний.

В диссертации и автореферате присутствуют опечатки, неточные выражения, в автореферате отсутствует нумерация страниц, в тексте диссертации имеются аббревиатуры, к которым не даны расшифровки, часто вместо слова «предположение» употребляется – «гипотеза». Некоторые пункты содержания не соответствуют «Результатам» и «Обсуждению».

Вместе с тем хотелось бы задать диссертанту несколько вопросов:

1. Образуется ли *E. coli* какие-либо агрегаты при росте в стационарной культуре?
2. Почему определяли курли в колониях, а не в суспензионной культуре?
3. Планируется ли или может быть проведены исследования по созданию в условиях магнитной левитации смешанных бактериальных агрегатов, состоящих из разных штаммов бактерий.

Высказанные замечания не снижают общей высокой оценки работы, не умаляют значимости полученных результатов и не меняют основные выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.11. Микробиология (по биологическим

наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Домнин Павел Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
кафедры микробиологии
биологического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»
Потехина Наталья Викторовна

Контактные данные:

тел.: 7(963) , e-mail: potekhina

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация: 03.02.03 - Микробиология (биол. науки)

Адрес места работы:

119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.12,

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

биологический факультет, кафедра микробиологии

Тел.: + 7 (495) 939-45-45; e-mail: mail@microbiomsu.ru

Подпись доктора биологических наук Н.В. Потехиной удостоверяю:

Ученый секретарь биологического факультета МГУ

Е.В. Петрова

01 февраля 2024 г.