



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Оренбургский федеральный исследовательский центр
Уральского отделения Российской академии наук
(ОФИЦ УрО РАН)

Обособленное структурное подразделение
ИНСТИТУТ КЛЕТОЧНОГО И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СИМБИОЗА
Уральского отделения Российской академии наук
(ИКВС УрО РАН)

460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11
тел.: (3532) 77-54-17, факс (3532) 77-44-63; E-mail: icis-ofrc@list.ru

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора В.А. ГРИЦЕНКО на диссертацию ДОМНИНА Павла Александровича **«Моделирование и изучение свойств не прикрепленных к поверхности бактериальных агрегатов»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность темы диссертации

Этология бактерий очень перспективная, но пока мало разработанная область микробиологии, изучающая поведение микроорганизмов в естественных и трансформированных условиях существования. Согласно мнению лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1973) Николаса «Нико» Тинбергена, анализ поведенческих реакций можно считать полноценным только в том случае, если исследователь пытается ответить на 4 ключевых вопроса: какие воздействия/факторы запускают/регулируют тот или иной поведенческий акт? каким путём формируется поведение в онтогенезе? как поведенческие акты могли возникнуть и развиваться в процессе филогенеза? какова адаптивная ценность поведенческого акта, то есть его влияние на способность организма (или популяции) выживать в изменяющихся условиях среды обитания? И хотя эти вопросы были сформулированы для изучения поведенческих реакций животных, на наш взгляд, они вполне применимы и к бактериям, конечно, с поправкой на специфичность жизни/поведения данных микроорганизмов.

Если рассматривать результаты диссертационного исследования П.А. Домнина через призму такого подхода, то становится понятным, что в данной работе речь идет об изучении одной из трех возможных «поведенческих форм» существования бактерий в природе, а именно – не прикрепленных к поверхности агрегатов микроорганизмов, то есть состояния, альтернативного как планктонным клеткам, так и сесильным клеткам, организованным в бактериальные биопленки. Иначе говоря, актуальность темы диссертации П.А. Домнина определяется, преж-

де всего, самым объектом исследования. Действительно, в последнее время бактериальные агрегаты (авто- и ко-агрегаты) привлекают к себе повышенное внимание специалистов разного микробиологического профиля – и тех, кто занимается изучением экологии микроорганизмов во внешней среде (водоемы, донные отложения/иловые осадки и др.), и тех, кто имеет дело с возбудителями инфекционно-воспалительных заболеваний, что подчеркивает междисциплинарный интерес к проблеме агрегации бактерий.

Следует отметить, что бактериальные агрегаты по своей сути функционально дуалистичны, так как совмещают в себе мобильность планктонных клеток и повышенную устойчивость к внешним воздействиям (антибиотики, дезинфектанты, антисептики, эффекторы иммунитета и др.), которая характерна для бактерий в составе биопленок. Такая их особенность может иметь ключевое значение не только в обеспечении выживания/персистенции микроорганизмов, но и в расселении/миграции бактерий с последующей колонизацией ими новых эко-(био-)топов, в том числе при диссеминации патогенов из исходного очага инфекции в процессе развития септических осложнений. В этой связи актуальным представляется и предмет диссертационного исследования П.А. Домнина, направленного на изучение свойств не прикрепленных к поверхности бактериальных агрегатов.

Вышеизложенное определяет **актуальность избранной темы** диссертационного исследования ДОМНИНА Павла Александровича, которое посвящено решению важной задачи микробиологии, а именно – созданию новой модели автоагрегации ряда патогенных и условно-патогенных микроорганизмов с анализом механизмов генетического контроля данного феномена и оценкой особенностей протеома бактерий, выращенных в разных условиях. Актуальность выбранной темы подтверждается представленным диссертантом обзором литературных данных, в котором всесторонне и критически освещены вопросы, касающиеся различных (экологических, биомедицинских, методических) аспектов формирования бактериальных агрегатов, не прикрепленных к какой-либо поверхности.

В результате автору удалось логично и аргументировано сформулировать общую цель диссертационного исследования, а также обосновать задачи, решение которых было подчинено её достижению.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Сформулированные в диссертации П.А. Домнина основные положения, выносимые на защиту, выводы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость базируются на анализе результатов тщательно проведенных экспериментальных, в том числе модельных, микробиологических, микроскопических и молекулярно-генетических исследований, том числе с использованием омиксных технологий (ДНК-секвенирование, протеомный анализ и др.).

Четкий дизайн работы, достаточный объем фактического материала, полученного с использованием набора адекватных и современных методов исследования, корректная статистическая обработка полученных результатов, их математический анализ (с использованием современного программного продукта) и логичная интерпретация данных позволили П.А. Домнину решить поставленные в работе задачи, обосновать все положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, и достичь заявленной цели.

Материалы диссертации П.А. Домнина прошли широкую научную «экспертизу» и были обсуждены на 4 научных конференциях (3 – всероссийские, 1 – международная), а также нашли свое отражение в 4 публикациях, индексируемых в международных базах Web of Science и Scopus, включая 3 из них – в изданиях Q1, причем в 3-х работах П.А. Домнин выступал первым автором с весомым вкладом в их подготовку. Все это свидетельствует о том, что диссертационная работа и полученные в ней результаты подверглись всестороннему анализу и рецензированию со стороны российских и зарубежных специалистов.

Новизна исследования, значимость для науки и практики полученных автором результатов

Научная новизна и практическая ценность диссертационной работы П.А. Домнина определяются следующими наиболее значимыми результатами.

Автором апробирована новая модель получения не прикрепленных к поверхности бактериальных агрегатов, основанная на феномене магнитной левитации при использовании магнитного биопринтера, позволяющая изучать не только количественно-качественные характеристики процесса автоагрегации бактерий и их фенотипические свойства, но и молекулярно-генетические механизмы формирования автоагрегатов. При этом объектами исследования выступал относительно широкий спектр микроорганизмов разной видовой принадлежности, представленный как грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes*, так и грамотрицательными микроорганизмами *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Диссертанту с помощью этой модели впервые удалось изучить и описать рост в жидкой питательной среде (с гадобутролом в концентрациях 0,1 и 0,2 М) указанных бактерий в условиях магнитной левитации, определить доли бактериальных клеток в агрегатах и культуральной жидкости, а также оценить соотношение живых и мертвых клеток бактерий в агрегатах с учетом их таксономической принадлежности.

На примере *E. coli* П.А. Домнин впервые с помощью разных методов микроскопии (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия – КЛСМ, сканирующая электронная микроскопия – СЭМ) проанализировал морфологию бактериальных агрегатов и показал, что в процессе роста формируется не один большой автоагрегат, а множество мелких агрегатов с наличием в их составе внеклеточного матрикса, коррелирующего с присутствием на поверхности клеток амилоидоподобных белковых структур – курлей, выявляемых с помощью красителя конго красного. Кроме того, им обнаружены межштаммовые особенности/отличия автоагрегации у разных изолятов *E. coli* по ряду регистрируемых показателей (геометрия, относительная «плотность» КОЕ в 1 мм³, седиментационный тест), а также установлено, что способность бактерий к агрегации и биопленкообразованию относительно независимые между собой признаки, которые, очевидно, имеют самостоятельную генетическую регуляцию.

Это предположение подтвердили результаты экспериментов с использованием штамма *E. coli* ATCC 43890, способного к автоагрегации, но не формирующего биопленки, и его мутантного аналога *Cpm* (*Curl* producing mutant), продуцирующего курли при выращивании на питательном агаре с красителем конго красным, благодаря спонтанной мутации. Оказалось, что эти генетически связанные штаммы *E. coli* не отличались по способности к биопленкообразованию, но проявляли разную способность к формированию автоагрегатов: наличие у эшерихий (штамм *Cpm*) курлей

сопровождается их повышенной автоагрегацией (в сравнении со исходным штаммом ATCC 43890). П.А. Домниним впервые проведено картирование спонтанной мутации, приведшей к увеличению у эшерихий продукции курлей, и установлено, что у штамма *E. coli* Срт в гене *rscB* имеется точечная замена с цитозина на аденин в позиции 639, что приводит к замене 206-й аминокислоты с серина на фенилаланин в участке белка *RcsB*, взаимодействующего с *RcsA*, что, в свою очередь, изменяет регуляцию экспрессии соответствующего фенотипа у данного штамма. Это положение было доказано автором путем изучения фенотипа у полученного с помощью вектора рAL2-Т рекомбинантного штамма *E. coli* Срт, гиперэкспрессирующего ген *rscA* и, тем самым, компенсирующего пониженную аффинность мутированного белка гена *RcsB* и *RcsA*. Результаты свидетельствовали о причастности регулятора транскрипции гетеродимера *RcsA/RcsB* к контролю процесса автоагрегации клеток патогенного изолята *E. coli* O157:H7 (ATCC 43890) без влияния на способность этих бактерий к биопленкообразованию.

В специальной серии экспериментов П.А. Домниним показано, что условиях магнитной левитации на Земле у бактерий *E. coli* M17 (пробиотический штамм) изменяется протеомный профиль эшерихий в сравнении с контролем, причем регистрируемые у них изменения демонстрируют определенное/значительное сходство (но не тождественность) с трансформацией протеома, которая наблюдается у этого штамма эшерихий в условиях микрогравитации в космосе и затрагивает экспрессию поверхностных белков Ag43 и BtuB (однонаправлено увеличивается) и ряда белков, участвующих в метаболизме углеводов, в частности: стимулируется продукция изоцитратлиазы *AceA* и изоцитратдегидрогеназы *Idh*, но снижается синтез ацетаткиназы *AskA*, анаэробной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *GlpA*, метилглиоксальсинтазы *MgsA* и транскетолазы *Tkt1* (при магнитной левитации); увеличивается продукция изоцитратлиазы *AceA*, D-лактатдегидратазы *ElpV* и метилглиоксальсинтазы *MgsA*, но ингибируется синтез ацетаткиназы *AskA*, изоцитратдегидрогеназы *Idh* и некоторых других белков (при космическом полете).

В этой связи возникает резонный вопрос – какие, на взгляд автора, дополнительные (может быть, специфические) факторы влияют на эшерихии в условиях космического полета (в сравнении с магнитной левитацией), которые способны оказывать такое относительно дискордантное регуляторное воздействие на протеом эшерихий, в части ферментов участвующих в метаболизме углеводов?

Что касается оценки практической ценности результатов данного диссертационного исследования, то необходимо отметить, прежде всего, разработанную/апробированную П.А. Домниним модель получения автономных бактериальных агрегатов с помощью магнитного биопринтера (магнитной левитации) и предложенную методологию их комплексного изучения, в том числе при образовании таких агрегатов в различных условиях культивирования микроорганизмов, например, во время космических полетов (микрогравитация). Кроме того, полученные в процессе выполнения работы результаты, касающиеся генетики и фенетики эшерихий в составе не фиксированных автоагрегатов, могут служить исходной информативной базой для последующего анализа особенностей агрегированных комплексов, сформированных бактериями иной видовой/родовой принадлежности.

В целом результаты выполненного П.А. Домниним исследования расширяют представления о возможных организационных/структурных формах существования популяций микроорганизмов в Природе, в частности – в виде агрегирован-

ных комплексов бактерий, не связанных с поверхностью, и, потому, способных мигрировать в пространстве, что повышает их потенциал для колонизации новых экотопов и адаптации к условиям окружающей среды. Таким образом, представленные диссертантом данные, фактически, отвечают на три из четырех вопросов этологии, сформулированных Николасом «Нико» Тинбергеном.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Разработанная П.А. Домниным модель формирования не фиксированных к поверхности бактериальных агрегатов с помощью магнитной левитации может быть успешно использована при изучении особенностей этого феномена у бактерий иной таксономической принадлежности, а также для исследования образования коагрегатов, учитывая, что в естественных условиях экотопы заселены популяциями микроорганизмов разных видов. Не менее перспективно использование этой модели для анализа генетических механизмов регуляции биологических, в том числе патогенных, свойств и антибиотикорезистентности возбудителей инфекционно-воспалительной патологии.

Структура, содержание диссертации, ее завершенность

Диссертация П.А. Домнина изложена на 140 страницах компьютерного текста, оформлена в соответствии с предъявляемыми требованиями, выдержана в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов, главы с результатами собственных исследований (в виде 10 самостоятельных разделов), главы с обсуждением полученных данных, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 258 исключительно зарубежных источников (значит ли это, что для отечественных исследователей эта проблема не представляет пока интереса или отсутствие в Списке отечественных источников продиктовано иными причинами?). Фактический материал наглядно иллюстрирован 6 таблицами и 22 рисунками. Последовательность глав корреспондирует с порядком решаемых задач. Сформулированные в диссертации выводы и положения, выносимые на защиту, логично вытекают из представленных результатов.

Диссертация носит внутренне целостный и завершенный характер. Замечания по оформлению рукописи диссертации и языку изложения отсутствуют. Имеющиеся в тексте диссертации незначительные стилистические и грамматические огрехи не портят позитивного впечатления от знакомства с работой.

В разделе «Введение» П.А. Домнин отражает актуальность избранной темы и ее разработанность, формулирует цель и задачи исследования, описывает методологию, степень достоверности и личное участие автора. Здесь же представлены положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость работы.

В Главе 1 («Обзор литературы»), состоящей из 10 разделов, автором описан феномен бактериальной автоагрегации и подробно рассмотрены вопросы, касающиеся роли авто- и коагрегации бактерий в экологии и медицине, молекулярных механизмов и регуляции автоагрегации, методов исследования и существующих экспериментальных моделей автоагрегации, а также применения феномена магнитной левитации в науке и медицине.

Глава 2 «Материалы и методы исследования» посвящена описанию взятых в работу штаммов микроорганизмов и методов их исследования. Представлена ин-

формация о статистическом анализе и оценке достоверности полученных данных.

Глава 3 содержит фактические данные проведенных исследований, которые структурированы в 10 разделов, в соответствии с решаемыми в работе задачами. В первых двух разделах этой главы описана использованная в работе система магнитного биопринтера, принцип ее работы и отражены данные о поведении в условиях магнитной левитации 4 штаммов микроорганизмов разной видовой принадлежности – грамположительных бактерий *S. aureus* штамм ATCC 25923 и *L. monocytogenes* штамм EGD_e и грамотрицательных бактерий *E. coli* штамм ATCC 43890 и *P. aeruginosa* штамм 2943. В следующих двух разделах представлен материал о морфологии автоагрегатов *E. coli*, полученный с использованием разных видов микроскопии (КЛСМ и СЭМ), а также дана сравнительная характеристика автоагрегации и формирования биопленок патогенными и непатогенными штаммами *E. coli*. В отдельном разделе отражены данные об изменении антибиотикоустойчивости бактерий, выращенных в условиях магнитной левитации. Последующие четыре раздела (3.6-3.9) посвящены изучению генетических механизмов регуляции образования агрегатов штамма *E. coli* ATCC 43890 и его рекомбинантных аналогов, а также исследованию их фенотипов. Заключительный раздел этой главы содержит данные об изменении протеомного профиля *E. coli* M17 (пробиотический штамм) в разных условиях культивирования (контроль, магнитная левитация, микрогравитация в условиях космического полета).

В Главе 4 дано краткое обсуждение полученных результатов с анализом их соответствия имеющимся в литературе данным, что позволило автору обосновать научную новизну выполненного диссертационного исследования.

«Заключение» содержит подведение автором итогов выполненного исследования с акцентами на наиболее существенных его результатов и возможных перспективах дальнейшей разработки проблемы автоагрегации бактерий.

Выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют результатам решения задач, поставленных для достижения заявленной в работе цели.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертационная работа выполнена на высоком методологическом и методическом уровнях, написана хорошим литературным языком. Достоинствами работы являются четко сформулированные цель и задачи исследования, доступно описанные результаты проведенных экспериментов, адекватно проведенный статистических анализ полученных данных и логичная их интерпретация.

Автореферат составлен в традиционной форме, соответствует требованиям и полностью отражает основные результаты диссертационного исследования.

Положительно оценивая данную диссертацию, хотелось бы узнать мнение автора по следующим вопросам (помимо заданных выше), которые появились при знакомстве с фактическим материалом работы:

1. Можно ли рассматривать естественные формы существования некоторых видов бактерий (стафилококки, стрептококки) в виде грозди или цепочки клеток как аналоги автоагрегатов, и значит ли это, что у данных бактерий автоагрегаты, формирующиеся в условиях магнитной левитации, являются пространственно-организационными структурами второго порядка?

2. Зависит ли формирование агрегатов бактерий от таких двух интегральных характеристик поверхности бактериальных клеток, как их дзета-потенциал и

степень гидрофобности (гидрофильно-липофильный баланс – ГЛБ)?

3. Какими препаративными методами Вы пользовались для определения количества бактериальных клеток (КОЕ) в агрегатах при оценке их плотности в единице объема агрегата, обеспечивали ли эти процедуры достаточный уровень дезинтеграции бактериальных агрегатов (до единичных клеток) и как визуализировалась эффективность таких манипуляций?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, диссертационная работа П.А. ДОМНИНА на тему «Моделирование и изучение свойств не прикрепленных к поверхности бактериальных агрегатов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение актуальной научной задачи в рамках направления «Структурированные сообщества микроорганизмов, том числе биопленки, связанной с моделированием, анализом характеристик и изучением генетических механизмов формирования агрегатов бактерий, что имеет существенное значение для развития микробиологии. Данная работа, оформленная 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, характеризуется актуальностью, научной новизной, теоретической и практической значимостью, что указывает на ее соответствие критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – ДОМНИН Павел Александрович – заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки).

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН ИКВС УрО РАН) – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ОФИЦ УрО РАН)
Тел.: +7 (919) ; E-mail: vag59

Гриценко
Виктор Александрович

Специальности, по которым официальным оппонентом защищена диссертация:
03.00.07 – Микробиология и 03.00.16 – Экология (медицинские науки)

Адрес учреждения: ИКВС УрО РАН – обособленное структурного подразделения ОФИЦ УрО РАН (адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, дом 11; телефон: +7 (3522) 77-54-17; e-mail: icis-ofrc@list.ru).

Подпись главного научного сотрудника ИКВС УрО РАН, доктора медицинских наук, профессора В.А. Гриценко заверяю.

Начальник отдела кадров ОФИЦ УрО РАН

И.В. Турленко

« 31 » января 2024 г.