

**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

Антибиотикорезистентность микроорганизмов является глобальной проблемой современной медицины. Ситуацию определяет появление и распространение штаммов с генетически обусловленной антибиотикорезистентностью. Однако не меньший вклад в проблему вносит фенотипическая резистентность, когда чувствительные к антибиотику микроорганизмы выживают при его воздействии. Одним из механизмов формирования фенотипической резистентности является образование бактериальных агрегатов, в которых бактерии в значительной степени могут избегать действия антибиотиков. Работа П.А. Домнина посвящена актуальной теме получения моделей бактериальных агрегатов, что необходимо для изучения их свойств и решения проблемы антибиотикорезистентности.

Научная новизна

В работе П.А. Домнина апробирована новая модель не прикрепленных к поверхности бактериальных агрегатов, основанная на феномене магнитной левитации, обнаружены различия в механизмах контроля формирования биопленок и автоагрегатов у штаммов *E. Coli*, продемонстрирован вклад регулятора транскрипции гетеродимера RcsB/RcsA в автоагрегацию патогенных *E. coli* серотипа O157:H7, проведено сравнение протеомов *E. coli*, выращенных в модели магнитной левитации и в условиях микрогравитации в космосе.

Практическая значимость

Разработанная модель формирования не прикрепленных бактериальных агрегатов дает возможность изучать физиологию бактерии в условиях бактериального агрегата и искать пути повышения эффективности антибиотиков в условиях, моделирующих агрегацию в организме хозяина.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа П.А. Домнина построена по традиционному плану, содержит 6 таблиц и 22 рисунка. На 140 страницах изложены введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы, насчитывающий 258 литературных источников.

В «Обзоре литературы» обобщены сведения по механизмам агрегации бактерий, ее роли в жизненном цикле бактерий, в экологии и медицине, экспериментальных моделях агрегации, моделях, основанных на феномене магнитной левитации и микрогравитации и их ограничениях. Описан механизм использования магнитной силы для разделения клеточной суспензии. Обзор написан с использованием современных источников и является источником интересных сведений о бактериальной агрегации.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны методы исследования. Методы соответствуют поставленным целям и задачам исследования и включают большой арсенал современных методов микробиологии и молекулярной биологии.

Глава «Результаты исследования» содержит 10 разделов, в которых описан принцип работы созданной модели формирования бактериальных агрегатов, охарактеризовано поведение бактерий в магнитном биопринтере, проведен анализ морфологии автоагрегатов *E. coli* с помощью КЛСМ и СЭМ, дана сравнительная характеристика автоагрегации и формирования биопленок патогенными и непатогенными штаммами *E. coli*, даны результаты исследования устойчивости бактерий в биопринтере к антибиотикам и результаты генетических исследований мутантного штамма *Srm*, получение

рекомбинантного штамма *Spm* с компенсированной мутацией и изучение его фенотипа. Также проведено сравнение спектра секретируемых белков штамма M17 в условиях магнитной левитации и стационарной культуры и космоса. На мой взгляд, часть 3.8. «Получение рекомбинантного штамма» следовало отнести к «Материалам и методам исследования».

В главе «Обсуждение результатов» проведен анализ полученных результатов, сопоставление их с литературными данными, дано обсуждение генетической регуляции образования бактериальных агрегатов.

Имеются следующие замечания и вопросы:

1. В тексте небольшое количество опечаток и стилистических нарушений, к примеру, в последнем предложении части 1.4.1
2. В описании к рис. 21 в тексте ошибка, описание не соответствует рисунку.
3. Подсчет КОЕ клеток в агрегатах проводился путем высевов серийных разведений клеток в агрегатах, агрегаты не разрушались. Таким образом, КОЕ отражают количество агрегатов, а не клеток. Или вы разрушали агрегаты, но не указали это?
4. Было показано, что в агрегатах бактерии устойчивы к действию гентамицина в концентрации 80 мкг/мл (что в 12,8 раз выше МИК). Известно, что клетки в условиях стационарной культуры значительно устойчивее к действию антибиотиков, чем клетки логарифмической культуры. Поэтому, хотелось бы разделить вклад «стационарности» и «агрегированности» в антибиотикоустойчивость и сравнить стационарную и агрегированную культуру на устойчивость к антибиотикам, желательно к нескольким антибиотикам разного механизма действия.
5. Обнаруженная мутация гена *rscB* затронула участок связывания белка RcsB с белком RcsA, тем самым снижая их аффинность друг к другу и, как следствие, снижая количество функциональных молекул гетеродимера RcsA-RcsB в бактериальной клетке. Было высказано

предположение (которое подтвердилось), что гиперэкспрессия гена *rcaA* может компенсировать пониженную вследствие мутации аффинность белков RcsA и RcsB. На чем было основано такое предположение?

Заключение

Все поставленные задачи исследования выполнены. Получено большое количество экспериментальных данных, достоверность которых не вызывает сомнений. Полученные данные были проанализированы и обобщены, что позволило сформулировать обоснованные выводы и положения, выносимые на защиту. Можно с уверенностью сказать, что автор провел интересное научное исследование по моделированию и изучению свойств бактериальных агрегатов, полученные результаты обладают новизной и имеют научную значимость и будут способствовать изучению свойств агрегированных бактерий и появлению новых антимикробных препаратов, эффективных против бактерий в агрегатах и биопленках.

По теме диссертации автором были опубликованы 3 статьи в журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Вместе с тем, указанные замечания не принципиальны и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.11. Микробиология, 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:

кандидат биологических наук, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»,
Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, отдел медицинской микробиологии, группа редактирования геномов микроорганизмов, руководитель группы, старший научный сотрудник

Гончаренко Анна Владимировна

29.01.2024

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 660-34-30 доб. 117, e-mail: pylaevanna@

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

14.00.36 – Аллергология и иммунология

Адрес места работы:

119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, отдел медицинской микробиологии, Группа редактирования геномов микроорганизмов

тел.: +7 (495) 954-52-83, e-mail: info@fbras.ru

Подпись Гончаренко А.В.

удостоверяю:

Заведующая канцелярией:

Мажорова Л. Е.

29.01.2024