

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио директора
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки

Института биохимии и физиологии
растений и микроорганизмов
Российской академии наук

д.б.н., профессор _____ Л.Ю. Матора

« 5 » октября 2020 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН) – на диссертационную работу Инчаговой Ксении Сергеевны «Влияние антибиотиков на систему «quorum sensing» LuxI/LuxR-типа у бактерий (на примере *Chromobacterium violaceum*)», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Диссертационная работа К.С. Инчаговой, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, посвящена поиску возможных инструментов управления плотностно-зависимыми системами химической коммуникации бактерий («quorum sensing» (QS)). Подобные системы включают в себя синтез сигнальных молекул, которые могут различаться у разных микроорганизмов, и ответ на них. Многие бактерии, в том числе и *Chromobacterium violaceum*, являющиеся основным объектом диссертационного исследования, используют систему межклеточной коммуникации для координации своего поведения. «Quorum sensing» координируют взаимодействия клеток как внутри вида, так и между видами. Под контролем систем химической коммуникации находятся образование биопленок и синтез факторов вирулентности у многих микроорганизмов, что делает эти системы перспективной мишенью для создания антибактериальных средств нового принципа действия. В качестве возможных инструментов управления «quorum sensing» рассматривают антибиотики, представления о которых не ограничиваются их оценкой как факторов межмикробного антагонизма, предполагают участие данных молекул в процессах межклеточной коммуникации. Основные исследования проведены на штамме *C. violaceum* с полноценной двухкомпонентной системой QS LuxI/LuxR типа, что предполагает возможность реализации биологической активности факторов как подавляющих биосинтез аутоиндуктора, так и нарушающих его восприятие. В связи с вышесказанным, актуальность проблем, поставленных диссертантом, цели и задач вполне очевидна: 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.

Развитие исследований в данном направлении внесет определенный вклад в повышение эффективности методических подходов, позволяющих оказывать влияние на формирование, развитие и функционирование микробных популяций в экологических, медицинских и биотехнологических аспектах их изучения и использования.

Работа соответствует биологической отрасли науки, а именно: специальности 03.02.03 – микробиология, касающейся области исследования теоретических основ жизнедеятельности микроорганизмов, их взаимодействия с факторами внешней среды и живыми организмами.

НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ, ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ, ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ, СФОРМУЛИРОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

В работе впервые обнаружена способность антибиотиков из группы пенициллинов при субоптимальных температурах культивирования индуцировать QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у *C. violaceum* в отсутствие его естественного автоиндуктора N-гексаноил-L-ацилгомосеринлактона (С6-АГЛ). Совокупность полученных экспериментальных результатов позволяет предполагать, что антибиотики пенициллинового ряда могут оказывать на популяцию *C. violaceum* влияние подобное АГЛ-мимикрирующим молекулам.

Выявлено, что аминогликозиды и тетрациклины ингибируют QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у *C. violaceum*. В случае антибиотиков из группы аминогликозидов подобный эффект связан с подавлением биосинтеза автоиндуктора С6-АГЛ, в то время как у тетрациклинов определяется иными, неидентифицированными в рамках проведенного исследования механизмами. Подавление образования автоиндукторов при воздействии аминогликозидов подтверждено в отношении клинического изолята *Pseudomonas aeruginosa*, продуцирующего АГЛ. Обнаружено аддитивное ингибирование QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum* после последовательного применения аминогликозидного антибиотика амикацина, ингибирующего образование С6-АГЛ, и активированного угля, сорбирующего остаточные концентрации автоиндуктора из среды культивирования.

Впервые продемонстрировано усиление аддитивного ингибирующего эффекта амикацина в комбинации с пирогаллолом и кумарином (молекулы растительного происхождения) в отношении QS-системы *C. violaceum*. Новизна подобной композиции защищена патентом РФ на изобретение № 2616237.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Полученные в ходе выполнения работы результаты расширяют существующие представления об антибиотиках как о природных молекулах, являющихся не только факторами межвидового антагонизма, но и участвующих в процессах межвидовой химической коммуникации.

Практически-ориентированный аспект проведенных исследований заключается в том, что полученные результаты свидетельствуют о необходимости определения дополнительных показаний и противопоказаний к использованию антибиотиков для борьбы с бактериальными патогенами растений, животных и человека, обладающими QS-системами LuxI/LuxR-типа. При этом выраженная анти-QS активность аминогликозидов, а также успешный опыт усиления подобного эффекта при сочетании этих антибиотиков с рядом неорганических и органических соединений определяет перспективу разработки и использования подобных композиций для совершенствования лечения и профилактики бактериальных инфекций, возбудители которых используют системы QS при образовании биопленок и индукции биосинтеза факторов вирулентности.

СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ НАУЧНЫХ ПОЛОЖЕНИЙ, ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ

Работа К.С. Инчаговой выполнена на хорошем научно-методическом уровне. Автор проанализировал большой объем литературных данных и убедительно обосновал выбор направления собственных исследований. В работе использованы два штамма *Chromobacterium violaceum*. Дикий штамм *C. violaceum* ATCC 31532 имеет полноценную систему CviI/CviR, в том числе контролируемую QS-зависимый биосинтез сине-фиолетового пигмента виолацеина. Его производный *C. violaceum* NCTC 13274 (CV026) имеет инсерцию транспозона mini-Tn5 в ген *cviI*, что ведет к необратимой утрате биосинтеза автоиндуктора C6-АГЛ и блокирует самостоятельный синтез пигмента виолацеина. Другими инструментами стала пара рекомбинантных биосенсоров *Escherichia coli* *pAL101* и *pAL103*. В отдельной серии экспериментов использовали четыре клинических изолята *Pseudomonas aeruginosa* с экспериментально доказанной способностью к продукции АГЛ.

Экспериментальные исследования проведены с использованием современных методов молекулярной биологии, микробиологии и биохимии. Достоверность экспериментальных данных проверена методами статистического анализа. Шесть основных выводов, приведенных в диссертации, обоснованы анализом достаточно большого объема достоверных экспериментальных данных. Положения, выносимые автором на защиту, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы сравнением экспериментальных данных с результатами анализа литературы.

Результаты диссертационного исследования К.С. Инчаговой прошли апробацию на научно-практических конференциях различного уровня. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в международные системы научного цитирования *Web of Science* и *Scopus*, а также 2 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований, получен 1 патент РФ на изобретение.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты диссертационной работы К.С. Инчаговой могут быть использованы в научных учреждениях биологического профиля; при подготовке курсов лекций по молекулярной биологии и микробиологии в высших учебных заведениях. Разработанные в работе подходы будут полезны при составлении методических рекомендаций по использованию антибиотиков для борьбы с бактериальными патогенами, обладающими QS-системами LuxI/LuxR-типа. Так по материалам исследований получен патент РФ на изобретение № 2616237 «Применение кумарина и его производных в качестве ингибиторов системы «кворум сенсинга» LuxI/LuxR-типа у бактерий», опублик. 13.04.2017. Бюл. №11.

Заключение. Структура диссертационной работы вполне типична. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 230 наименований, из них 219 иностранных языках. В обзоре литературы суммированы современные представления о «quorum sensing», история открытия, принципы молекулярной организации и разнообразие вариантов, а также биологические проявления, находящиеся под контролем QS. Описаны возможные подходы к ингибированию данного явления. Обобщены ранее полученные данные о способности антибиотиков к регуляции QS и проанализированы известные механизмы подобного эффекта. Обоснована актуальность исследования антибиотиков из групп пенициллинов, тетрациклинов и аминогликозидов как возможных модуляторов QS системы LuxI/LuxR-типа у бактерий. Диссертация изложена на 137 страницах, содержит 11 таблиц и иллюстрирована 29 рисунками. Спектр методов, использованных соискателем при выполнении работы, благоприятно отразился на глубине проработки намеченных задач. Венчает работу заключение и 6 выводов.

Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора, выполненных в соавторстве, что отражено в публикациях по теме диссертационной работы. Собственный вклад соискателя состоит также в его непосредственном участии в апробации результатов исследований на научных мероприятиях. Следует отметить, что в трех из пяти статей, рекомендованных перечнем ВАК РФ, К.С. Инчагова является первым автором. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

Все это свидетельствует о высоком профессиональном уровне, научной зрелости и перспективности диссертанта. В этом дополнительно убеждает анализ экспериментальной части диссертационной работы. Полученные диссертантом результаты убедительно свидетельствуют о масштабности проведенной работы и определяющем творческом вкладе соискателя.

При всех положительных сторонах работы в ней имеют место некоторые недостатки: в обзоре литературы отсутствует раздел, обобщающий современные представления о жизнедеятельности *Chromobacterium violaceum*, характеристика естественных условий существования этих бактерий, их взаимодействия с факторами внешней среды и другими организмами.

Исчерпывающие ответы соискателя на сделанные замечания послужат (наряду с материалами диссертации) дополнительным основанием для положительного заключения по диссертационной работе.

Таким образом, диссертация 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, содержащей решение актуальной научной задачи и вносящей вклад в исследования теоретических основ жизнедеятельности микроорганизмов, их взаимодействия с факторами внешней среды и живыми организмами.

По актуальности, новизне и достоверности полученных результатов, обоснованности сделанных выводов, научной и научно-практической значимости работа «Влияние антибиотиков на систему «quorum sensing» LuxI/LuxR-типа у бактерий (на примере *Chromobacterium violaceum*)» отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018)), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор этой работы, Инчагова Ксения Сергеевна, заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности **03.02.03** – микробиология.

Настоящий отзыв обсужден и утвержден на заседании лаборатории генетики микроорганизмов ИБФРМ РАН 5 октября 2020 года протокол № 223.

Отзыв составил
Ведущий научный сотрудник
лаборатории генетики микроорганизмов
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биохимии и
физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук (ИБФРМ РАН)
доктор биологических наук
5 октября 2020 г.

А.В. Шелудько

410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13, ИБФРМ РАН
<http://ibppm.ru/>; раб. тел. (8452)97-04-44; e-mail: shel71@yandex.ru

Подпись А.В. Шелудько *заверяю*
Гл. специалист по кадрам
ИБФРМ РАН
5 октября 2020 г.

О.А. Серова

