

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Николаева Юрия Александровича
на диссертационную работу **Цыганова Ивана Вадимовича по теме: «Зависимость толерантности микобактерий к антибиотикам от факторов регуляции скольжения и формирования биоплёнок»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки).

1. Актуальность темы исследования

Рассматриваемая работа Цыганова И.В. посвящена изучению актуальной проблемы фундаментальной и медицинской микробиологии, а также и медицины - регуляции выживания бактерий в присутствии антибиотиков, что является первым шагом к развитию антибиотикорезистентности, рассматриваемой как одна из угроз человечеству. Оба аспекта выживания бактерий при антибиотикотерапии, на клеточном уровне (в виде клеток-персистеров) и на уровне популяций в организме хозяина (в виде биоплёнок) активно исследуются в мире и РФ и являются высоко-актуальными. Проблематика работы соответствует Стратегии предупреждения распространения антибиотикорезистентности в РФ, а также Стратегии научно-технологического развития РФ.

2. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Основные положения, выводы и рекомендации, сформулированные диссертантом, научно обоснованы и аргументированы.

Выводы сделаны автором на основе многочисленных хорошо продуманных и добротнo выполненных экспериментов, с использованием как традиционных (по микробиологии), так и самых современных методов исследования (молекулярная биология, генная инженерия, атомно-силовая микроскопия). Результаты представлены и обсуждены на научных мероприятиях, что дополнительно свидетельствует об их обоснованности.

Обоснованность выводов, сделанных в работе, подтверждается публикациями в высокорейтинговых научных журналах.

3. Достоверность и новизна исследования и полученных результатов

Достоверность научных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения и определяется значительным объемом проведенных экспериментов, а также использованием современных микробиологических, молекулярно-биологических, микроскопических и биохимических методов исследования, а также оригинальных методов компьютерной обработки изображений, адекватных поставленным задачам исследования. Результаты экспериментов обработаны с привлечением нескольких адекватных методов статистического анализа. Полученные результаты качественно обсуждены в сравнении с современными публикациями по теме работы.

Полученные диссертантом результаты характеризуются высокой степенью новизны. Впервые изучено влияние двух алармонсинтетаз, продуктов генов *rel_{Msm}* и *relZ*, на биоплёнкообразование и скольжение микобактерий, на антибиотикочувствительность микобактерий.

В ходе работы получены новые результаты:

- 1) Роль алармонсинтеаз Rel_{Msm} и RelZ в процессе биоплёнкообразования и скольжения *M. smegmatis* заключается в сохранении целостности поверхностных биоплёнок (пелликул) и в повышении устойчивости бактерий к антибиотикам;
- 2) Эффект алармонсинтеаз обусловлен их влиянием на количество гликопептидолипидов в составе клеточной оболочки и, соответственно, на гидрофобность поверхности микобактерий;
- 3) Установлена корреляция между количеством гликопептидолипидов клеточной поверхности микобактерий и их способностью образовывать поверхностные биоплёнки;
- 4) Впервые показана роль биогенных полиаминов спермидина и спермина в регуляции эффективности действия антибиотиков в отношении микобактерий в составе биоплёнки, расшифрован один из механизмов влияния - путем модуляции уровня внутриклеточных полифосфатов;
- 5) Впервые показана активность синтетического ингибитора алармонсинтеаз DMNP по подавлению микобактериальных сообществ, биоплёнок, включая и скользящие колонии. Также были сравнены антимикобактериальные активности DMNP и традиционных антибиотиков стрептомицина и рифампицина, получены интересные данные, весьма ценные для клиники;
- 6) Продемонстрирована важность учета роли биогенных полиаминов в чувствительности/устойчивости микобактерий к применяемым антибиотикам и новому антимикробному веществу, DMNP: полиамины усиливают образование биоплёнок, повышают антибиоплёночный эффект DMNP и рифампицина, являются их адьювантами; они оказывают разнонаправленное воздействие на способность микобактерий к скольжению: спермидин способствует его усилению, а спермин вызывает обратный эффект. Тем самым продемонстрирована важная роль полиаминов как средства взаимовлияния макроорганизма с его микробиотой.

4. Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая и практическая значимость выводов и рекомендаций диссертационного исследования определяется полученными данными о связи между основными регуляторами стресса микобактерий, алармонсинтеазами Rel_{Msm} и RelZ, и процессами биоплёнкообразования и скольжения микобактерий, с одной стороны, и стрессоустойчивостью (антибиотикоустойчивостью) этих бактерий, с другой стороны. Полученные результаты расширяют знания о биологии микобактерий – механизмах их выживания, биоплёнкообразования, распространения в микроокружении, а также могут востребованы для повышения эффективности терапии микобактериозов с применением антибиотиков – путём учёта количества полиаминов, применения нового антимикробного вещества DMNP.

5. Структура и содержание диссертации, ее завершенность, качество оформления

Диссертация Цыганова И.В. изложена на 145 страницах, построена по классической схеме, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, главы с результатами собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и библиографического списка. Диссертация хорошо иллюстрирована 11 таблицами и 47 рисунками, а также имеет список цитируемой

литературы по теме диссертации, включающий 213 источников, из которых 21 - отечественный.

Введение содержит доказательства актуальности проведенного исследования и включает формулировку цели и задач работы, формулирует научную новизну, теоретическую и практическую значимость, кратко характеризует методологию и методы исследования.

Обзор литературы, как и вся работа, написан на прекрасном русском языке, легко читается, хорошо структурирован. В обзоре рассмотрены аспекты биологии микобактерий, исследованные в рамках диссертационного исследования, доказывающие актуальность и необходимость его проведения – проблему устойчивости микобактерий к стрессорам, включая антибиотики, и роль алармонов, биоплёнкообразование, механизмы перемещения в микроокружении, функции полифосфатов и биогенных полиаминов.

Однако, обзор литературы не лишён некоторых недостатков. По некоторым аспектам автор цитирует недостаточно и не самые основные источники, им не учтены последние взгляды на структуру биоплёнок (с. 19), также упущен такой популярный и эффективный подход к созданию антимикробных химиопрепаратов, как использование адъювантов (усилителей) антибиотиков, хотя в последнем случае автор в работе описывает этот феномен в своих результатах. Также можно было бы более чётко разделить звучащие похоже понятия «персистенция» (как переживание) и клетки-«персистеры» (толерантные к биоцидным стрессорам). Также можно было бы подробнее описать механизмы подвижности микобактерий (хотя бы гипотезы), несмотря на неоднократное упоминание о недостаточности сведений об этом. Трудно согласиться с тем, что «бактериальные процессы, являющиеся мишенями антибиотиков, активны в логарифмической фазе роста культуры. В то же время в природе большинство бактерий пребывают в стационарной стадии роста» (с. 15, 16). Удаление некоторых жаргонизмов-англицизмов также украсило бы работу («эмергентные свойства» и др.).

В главе «Материалы и методы исследования» полно охарактеризованы объекты исследования, а также представлен весь спектр используемых методов исследования, позволивший грамотно решить все поставленные задачи. Автором использованы методы микробиологии, биохимии, молекулярной биологии и генетики, микроскопии и компьютерного анализа данных. Этот раздел можно особо отметить положительно, как доказывающий высокий профессионализм диссертанта и творческий подход к анализу результатов, когда в условиях ограниченности ресурсов из первичных данных (фотографий) извлекается вся доступная информация о структуре биоплёнок, скоростях перемещения и т.п. Также как положительный момент необходимо отметить адекватное и высокопрофессиональное использование методов статистики, нормальной и непараметрической для разных наборов данных.

К недостаткам раздела, имеющим последствия для анализа данных можно отнести характеристику культур по оптической плотности и отсутствие для этого данных по количеству клеток (с. 48 и др.), а также выражение эффектов веществ на рост культур и биоплёнок в относительных единицах (в единицах МПК, вместо концентрационных – М или весовых). В разделе по определению концентрации клеток не указана был ли контроль диспергированности клеток (с. 49).

Глава «Результаты исследований» включает в себя четыре блока: в первом охарактеризована роль алармонсинтетаз в формировании биоплёнок и скольжении при переходе культуры *M. smegmatis* в стационарную фазу роста; затем приведены результаты исследования эффективности действия ингибитора персистенции нового антимикробного соединения DMNP на клетки *M. smegmatis* в условиях формирования биоплёнок и скольжения в сравнении с традиционными противотуберкулёзными антибиотиками; далее представлены результаты исследования роли гликопептидолипидов и полифосфатов в формировании биоплёнок микобактерий и их скольжении; в завершение раздела продемонстрирована роль полиаминов на синтез гликопептидолипидов и полифосфатов в процессе формирования биопленок и скольжения, а также на эффективность применения антибиотиков против микобактерий.

В качестве комментария можно отметить, что структура этого раздела напрямую не соответствует формулировкам поставленных задач, что было бы логично, но при этом выполнение задач полностью доказано приведёнными экспериментальными данными.

Работу завершают разделы «Обсуждение результатов» (в краткой форме обобщающее результаты проведенного исследования и расставляющее наиболее значимые акценты), «Заключение», «Выводы».

Диссертация является завершённым трудом, этапом большого исследования, имеющего продолжение в направлениях, обозначенных в самой работе, что важно отметить как «плюс» рассматриваемой работы.

Работа прекрасно оформлена, написана хорошим понятным научным языком, с минимумом опечаток и ошибок.

6. Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертации Цыганова И.В. исчерпывающе представлены в 19 печатных работах, в том числе в 8 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, в том числе - входящих в международные системы научного цитирования *Web of Science* или *Scopus*.

7. Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в полной мере отражает основные положения диссертации. Рис. 6 автореферат несколько дополнен относительно его версии в диссертации.

8. Соответствие специальности

Рассматриваемая диссертационная работа Цыганова И.В. соответствует паспорту научной специальности 1.5.11. «Микробиология», (биологические науки), п. 5. Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов.

9. 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.

В качестве положительных моментов работы можно отметить: использование разных статистик для разных выборок – параметрической (нормальной) и непараметрической, а также «изящество» и эффективность компьютерной обработки фотографий, что позволило автору извлечь из первичных фотографий важную и существенную информацию по пролиферации клеток и скорости движения края колонии.

Прикладное значение работы очевидно и описано выше.

Однако, в рассматриваемой диссертации имеют место недочёты, при отсутствии которых, она бы выиграла.

Цель работы сформулирована слишком широко и недостаточно конкретно.

Автор недостаточно корректно использует однокоренные термины персистенция (клетки) и персистенция (выживание в макроорганизме) (с. 23, диссертации, с. 3 автореферата и др.), а также путает (редко) два типа устойчивости – толерантность и резистентность (с. 13, диссертации, с. 3 автореферата и др.).

На рис. 6 автореферата размерность логарифма указана неверно ($\log_{10}$, а должно быть $\lg$), а на с. 51 диссертации – размерность концентрации – мкМоль.

Говоря о «размножении колоний» (с. 16-17) автор, видимо, имел ввиду популяцию?

При оценке влияния/не влияния на пролиферацию микобактерий не хватает прямых измерений размножения или метаболической активности культур, эти несложные опыты только бы украсили работу.

Недостатком видится выражение эффектов веществ на рост культур и биоплёнок только в относительных единицах (в единицах МПК, вместо концентрационных – М или весовых), что привело автора к выводам относительно эффективности DMNP и антибиотиков рифампицина и стрептомицина (раздел 3.2), нерелевантным к их практическому применению. Наиболее эффективный препарат должен иметь более низкую концентрацию в мг/л, а не в МПК. Представляется, что лучше было бы привести и использовать в обсуждении обе концентрации, весовую и относительную.

Непонятно спорное утверждение автора, не подтверждённое цитатами «критерий для оценки эффективности воздействия антибиотика на бактериальные клетки, согласно которому чем больше различия между МКПБ и МБК, тем эффективнее антибиотик действует на клетки в составе биоплёнки, а не на их планктонные формы.» (с. 75-76). Представляется, что ситуация противоположна, чем ниже отношение МКПБ/МБК, тем более эффективно вещество против биоплёнок. Очевидно, имеет место опечатка.

В работе также отмечены немногочисленные опечатки и стилистические шероховатости (с. 16, 18, 25, 34, 49, 70, 84 и др.).

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

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

- 1) На рис. 9 отмечено не строго центральное расположение колоний. Это результат согласованного движения всех клеток или неточности нанесения первой капли инокулята?

- 2) Сравнивали ли (были ли расчёты) скорости движения края колонии и скорости нарастания биомассы микобактерий (как причины движения края колонии)?
- 3) Как соотносятся использованные в работе концентрации полиаминов с их концентрациями в тканях человека?
- 4) Планируются ли опыты на животных, мышах для подтверждения перспектив использования DMNP?

Заключение

Диссертационная работа Цыганова Ивана Вадимовича по теме: «Зависимость толерантности микобактерий к антибиотикам от факторов регуляции скольжения и формирования биоплёнок», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки), является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение важной задачи – раскрыт один из молекулярных механизмов толерантности микобактерий к антибиотикам в процессе формирования биоплёнок, в том числе - скольжения, что имеет существенное значение для контроля антибиотикорезистентности бактерий и борьбы с персистирующими инфекциями микобактерий.

По своей актуальности, научной новизне, практической значимости и уровню проведенных исследований диссертационная работа Цыганова Ивана Вадимовича «Зависимость толерантности микобактерий к антибиотикам от факторов регуляции скольжения и формирования биоплёнок» соответствует требованиям п.п. 9-11,13,14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор Цыганов Иван Вадимович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент,

Доктор биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология,
Заведующий лабораторией выживаемости микроорганизмов
Института микробиологии им. С.Н. Виноградского
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук»,
117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 2;
тел: +7 (499) 135-21-39; e-mail: NikolaevYA@mail.ru



Николаев Юрий Александрович
24.10.2025 г.

Подпись Ю.А. Николаева заверяю
Учёный секретарь
ФИЦ Биотехнологии РАН



Орловский А.Ф.
24.10.2025 г.