

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Пермский
Федеральный исследовательский
центр Уральского отделения
Российской академии наук,
член-корр. РАН, д.ф.-м.н.

О.А. Плехов

20 25 г.



(печать организации)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского
федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской
академии наук (ФНИЦ УрО РАН)**

Диссертация Цыганова Ивана Вадимовича «Зависимость толерантности микобактерий к антибиотикам от факторов регуляции скольжения и формирования биопленок» выполнена на базе кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (ПГНИУ) и лаборатории адаптации микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (далее «ИЭГМ УрО РАН»).

В период подготовки диссертации соискатель Цыганов Иван Вадимович обучался в очной аспирантуре на кафедре микробиологии и иммунологии биологического факультета ПГНИУ по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки, а также работал в лаборатории адаптации микроорганизмов «ИЭГМ УрО РАН» в должности лаборанта-исследователя, а с 2024 – инженера-исследователя.

В 2017г. окончил бакалавриат Федерального государственного бюджетного учреждения высшего профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет» по специальности «Биология» (диплом № 105931 0064020).

В 2019г. с отличием окончил магистратуру Федерального государственного бюджетного учреждения высшего профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет» по специальности «Биология» (диплом № 105931 0206707).

В 2023г. с отличием окончил аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения высшего профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет» по специальности «Биологические науки» (диплом № 105931 0463161).

Научный руководитель:

д.м.н. (03.02.03 Микробиология, 03.01.04 Биохимия), профессор Ткаченко Александр Георгиевич, заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов «ИЭГМ УрО РАН»;

По итогам обсуждения принято следующее **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**:

Актуальность проблемы. Актуальность изучаемой проблемы обусловлена снижением эффективности антибиотиков, связанным с явлением физиологической толерантности бактерий, основанной на формировании персистентных клеток. Важнейшими механизмами, способствующими персистенции у микобактерий, являются биопленкообразование. Ещё одним фактором, способствующим вирулентности микобактерий за счёт ускорения колонизации поверхностей, является скольжение. Стрессовые условия, особенно голодание, запускают эти процессы, в том числе через стринджент-ответ – адаптационный механизм, регулируемый алармонами (p)ppGpp. Перспективным направлением терапии является подавление этого ответа с помощью ингибиторов алармонсинтетаз, таких как синтетический аналог метаболитов морских кораллов – DMNP. Ещё одним важным фактором, влияющим на чувствительность микобактерий к антибиотикам, являются биогенные полиамины, продуцируемые большинством организмов и присутствующих в тканях человека. Поэтому исследование механизмов формирования биоплёнок и скольжения, а также влияния данных процессов на

вирулентность патогенных бактерий и развитие физиологической толерантности к антибиотикам является важной задачей современной микробиологии.

Личное участие автора в получении научных результатов.

Формулирование темы, постановка цели и задач диссертационного исследования осуществлялись в сотрудничестве с научным руководителем – доктором медицинских наук, профессором А. Г. Ткаченко. Автором проведён тщательный анализ российской и зарубежной научной литературы по рассматриваемой проблематике, а также выполнена основная экспериментальная часть, включающая изучение процессов биоплёнкообразования и скольжения микобактерий, их зависимости от биогенных полиаминов, антибиотиков и активности алармонсинтетаз. Синтез соединения 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил) пентановой кислоты (DMNP) был выполнен сотрудниками Пермского государственного национального исследовательского университета. Часть экспериментов по исследованию клеточной поверхности микобактерий методом атомно-силовой микроскопии выполнена в соавторстве со старшим научным сотрудником лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН, к.б.н. Л.Ю. Нестеровой. Основная экспериментальная работа выполнена автором лично.

Требования п. 14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции) «О порядке присуждения ученых степеней» выполнены. В диссертации соискатель ссылается на все источники правомерного заимствования материалов или отдельных результатов и их авторов.

Степень достоверности результатов проведенных исследований.

Полученные Цыгановым И.В. результаты представительны и достоверны, что подтверждается их воспроизводимостью, и не противоречат данным литературы и принятым представлениям о физиологии микроорганизмов. Использованные в исследовании методики корректны. Достоверность различий показана с помощью методов математической статистики (t-критерий Стьюдента, критерий Манна-Уитни) Результаты получены на современном оборудовании, калибровки обоснованы, использованы современные методики сбора и обработки информации. Выводы диссертационной работы обоснованы и согласуются с полученными результатами.

Научная новизна работы. Впервые продемонстрировано участие алармонсинтетаз, кодируемых генами *rel_{Msm}* и *relZ*, в регуляции биоплёнкообразования и скольжения микобактерий. Установлена связь между концентрацией гликопептидолипидов на внешней оболочке микобактериальных клеток и их способностью формировать поверхностные биоплёнки (пелликулы). Также впервые показано, что полиамины спермидин и спермин модулируют действие антибиотиков на скользящие клетки и клетки в биоплёнке через влияние на внутриклеточную концентрацию полифосфатов. Ингибитор алармонсинтетаз DMNP продемонстрировал более выраженное подавляющее действие на микобактериальные сообщества по сравнению с традиционными антибиотиками.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данное исследование имеет высокую теоретическую значимость. Результаты углубляют понимание биоплёнкообразования и скольжения микобактерий. Установлено, что полиамины влияют на эти процессы и модифицируют действие антибиотиков, что важно для повышения эффективности терапии микобактериозов. Оценка активности противотуберкулёзных препаратов в отношении биоплёнок и скользящих колоний демонстрирует зависимость их эффективности от микросреды, включая наличие полиаминов. Применённый подход может быть использован для поиска антибиотиков, подавляющих формирование персистеров, что перспективно для повышения эффективности лечения и предотвращения устойчивости. Результаты получены впервые и сопоставимы с Российским и мировым уровнем исследований.

Ценность научных работ соискателя. Ценность научных работ Цыганова И.В. заключается в изложении механизмов скольжения и биоплёнкообразования микобактерий, а также сравнительному исследованию чувствительности микобактерий в составе данных бактериальных сообществ к традиционным антибиотикам и вновь синтезированному соединению, обладающему способностью ингибировать активность алармонсинтетаз. Научные работы Цыганова Ивана опубликованы в центральных и региональных изданиях. Публикации используются в научной деятельности ученых, занимающихся проблемами толерантности к антибиотикам, а также процессами биоплёнкообразования и скольжения микобактерий.

Научная специальность, которой соответствует диссертация. По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям, по объему и новизне полученных автором данных диссертационная работа полностью соответствует паспорту специальности научных работников 1.5.11. Микробиология (биологические науки) и области исследования паспорта специальности: п. 5 (Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов) и п. 15 (Структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки).

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах. Результаты диссертационного исследования опубликованы в 19 научных работах, из них работ, опубликованных согласно перечню российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (перечень ВАК РФ) – 4, а также работ в научных изданиях, индексируемых базами Scopus и/или Web of Science – 5. Изложенные материалы полностью отражают результаты диссертационной работы.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. **Цыганов И.В.**, Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г. Дифференцированная оценка воздействия биогенных полиаминов и алармонсинтетазы Rel_{Msm} на характер скольжения *Mycobacterium smegmatis* // *Вестник Пермского университета. Серия: Биология*. – Пермь. – 2024. – № 4. – С. 401-411.
2. **Tsyganov I.V.**, Tkachenko A.G. Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics // *Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii*. – 2022. – V. 26 – №5. – P. 458-466.
3. Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Sidorov R.Y., Nesterova L.Y., Akhova A.V., **Tsyganov I.V.**, Vaganov V.Y., Shipilovskikh S.A., Rubtsov A.E., Malkov A.V. A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases // *Cell chemical biology*. – 2021. – № 28. – P. 1-13.
4. **Цыганов И.В.**, Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Скольжение бактерий: Способ пассивного распространения без использования жгутиков и пилей (обзор) // *Вестник Пермского университета. Серия: Биология*. – Пермь – 2021. – № 4. С. 263-274.
5. Zamakhaev M., **Tsyganov I.**, Nesterova L., Akhova A., Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Tkachenko A., Shumkov M. *Mycobacterium smegmatis* possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines // *Int J Mycobacteriol*. – 2020. – V. 9. – №2. – P.138-143.
6. Nesterova L. Yu., **Tsyganov I. V.**, Tkachenko A. G. Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell-Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis* // *Applied Biochem and Microbiol*. – 2020. – V. 56. – №4. – P. 387-394.

Диссертация «Зависимость толерантности микобактерий к антибиотикам от факторов регуляции скольжения и формирования биопленок» Цыганова Ивана Вадимовича рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Заключение принято на заседании Проблемной комиссии «ИЭГМ УрО РАН» по специальности «Микробиология». Присутствовало на заседании 13 чел. из 15 списочного состава. Результаты голосования: «за» – 13 чел., «против» – 0 чел., «воздержались» – 0 чел. Протокол №2 от 10.04.2025

Секретарь заседания Проблемной комиссии
по микробиологии, зам. директора «ИЭГМ УрО РАН»
по научным вопросам,
д.б.н., доцент

 Д.О. Егорова
(печать)



"ИЭГМ УрО РАН"	
Подпись	
заверяю	
главный специалист по кадрам М.В. Корепанова	

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по научной работе и
инновациям
Пермского государственного
национального исследовательского
университета

кандидат физико-математических наук
Владимир Александрович ИРХА



шона

20 25 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования «Пермский государственный национальный
исследовательский университет» по диссертационной работе Цыганова Ивана
Вадимовича, представленной на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология

Диссертация Цыганова Ивана Вадимовича «Зависимость толерантности
микробактерий к антибиотикам от факторов регуляции скольжения и формирования
биопленок» выполнена на базе кафедры микробиологии и иммунологии
биологического факультета федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный
национальный исследовательский университет» (ПГНИУ) и лаборатории
адаптации микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук» – филиала федерального
государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального
исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук
(ИЭГМ УрО РАН).

В период подготовки диссертации соискатель Цыганов Иван Вадимович
обучался в очной аспирантуре на кафедре микробиологии и иммунологии
биологического факультета ПГНИУ по направлению подготовки 06.06.01
Биологические науки, а также работал в лаборатории адаптации микроорганизмов

ИЭГМ УрО РАН в должности лаборанта-исследователя, а с 2024 – инженера-исследователя.

В 2017г. окончил бакалавриат ПГНИУ по специальности «Биология» (диплом № 105931 0064020).

В 2019г. с отличием окончил магистратуру ПГНИУ по специальности «Биология» (диплом № 105931 0206707).

В 2023г. с отличием окончил аспирантуру ПГНИУ по специальности «Биологические науки» (диплом № 105931 0463161).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук (03.02.03 Микробиология, 03.01.04 Биохимия), профессор Ткаченко Александр Георгиевич, заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН.

По итогам обсуждения принято следующее **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**:

Актуальность проблемы. Актуальность рассматриваемой проблемы обусловлена снижением эффективности антибиотиков, что связано с феноменом физиологической толерантности бактерий, основанным на формировании персистентных клеток. У микобактерий ключевыми механизмами, способствующими развитию персистенции, является образование биоплёнок. Дополнительным фактором вирулентности, ускоряющим колонизацию поверхностей, выступает скольжение. Эти процессы активируются в условиях стресса, особенно при голодании, и регулируются через стринджен-ответ – адаптивный механизм, контролируемый алармонами (p)ppGpp. Перспективной терапевтической стратегией считается ингибирование данного ответа с использованием синтетических ингибиторов алармонсинтетаз, таких как DMNP – структурный аналог метаболитов морских кораллов. Существенное влияние на чувствительность микобактерий к антибиотикам оказывают также биогенные полиамины, синтезируемые многими организмами и присутствующие в тканях человека. В связи с этим изучение механизмов биоплёнкообразования и скольжения, а также их вклада в вирулентность патогенов и развитие физиологической толерантности к антибиотикам представляет собой одну из приоритетных задач современной микробиологии.

Личное участие автора в получении научных результатов.

Формулирование темы, а также постановка цели и задач диссертационного исследования были осуществлены в сотрудничестве с научным руководителем – доктором медицинских наук, профессором А. Г. Ткаченко. Автором проведён всесторонний анализ российской и зарубежной научной литературы, посвящённой рассматриваемой проблематике, а также выполнена основная экспериментальная часть работы, включающая исследование процессов биоплёнкообразования и скольжения микобактерий, их зависимости от действия биогенных полиаминов, антибиотиков и активности алармонсинтетаз. Синтез соединения 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил)пентановой кислоты (DMNP) был проведён сотрудниками ПГНИУ. Отдельные эксперименты по изучению клеточной поверхности микобактерий методом атомно-силовой микроскопии выполнены совместно со старшим научным сотрудником лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН, к.б.н. Л. Ю. Нестеровой. Основной объём экспериментальной работы выполнен лично автором.

Требования п. 14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции) «О порядке присуждения ученых степеней» выполнены. В диссертации соискатель ссылается на все источники правомерного заимствования материалов или отдельных результатов и их авторов.

Степень достоверности результатов проведенных исследований.

Результаты, полученные Цыгановым И.В., являются достоверными и репрезентативными, что подтверждается их воспроизводимостью, соответствием данным литературы и современным представлениям о физиологии микроорганизмов. Применённые в работе экспериментальные методы являются корректными и адекватными поставленным задачам. Надёжность выявленных различий подтверждена с использованием методов математической статистики, включая t-критерий Стьюдента и критерий Манна–Уитни. Исследования проводились с применением современного оборудования, прошедшего необходимую калибровку, а сбор и обработка данных осуществлялись с использованием актуальных методических подходов. Сделанные в диссертации выводы логично вытекают из полученных экспериментальных данных и обоснованы.

Научная новизна работы. Впервые продемонстрировано участие алармонсинтетаз, кодируемых генами *relMsm* и *relZ*, в регуляции биоплёнкообразования и скольжения микобактерий. Установлена связь между концентрацией гликопептидолипидов на внешней оболочке микобактериальных клеток и их способностью формировать поверхностные биоплёнки (пелликулы). Также впервые показано, что полиамины спермидин и спермин модулируют действие антибиотиков на скользящие клетки и клетки в биоплёнке через влияние на внутриклеточную концентрацию полифосфатов. Ингибитор алармонсинтетаз DMNP продемонстрировал более выраженное подавляющее действие на микобактериальные сообщества по сравнению с традиционными антибиотиками.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Проведённое исследование обладает высокой теоретической значимостью. Полученные данные расширяют представления о механизмах биоплёнкообразования и скольжения микобактерий. Установлено, что биогенные полиамины оказывают влияние на указанные процессы и способны модифицировать эффективность действия антибиотиков, что представляет практический интерес для повышения результативности терапии микобактериозов. Выявленная зависимость активности противотуберкулёзных препаратов от присутствия полиаминов, подчёркивает важность учёта физиологических условий при оценке антимикробного действия. Применённый в работе подход может быть использован для поиска антибиотиков, способных подавлять формирование персистирующих клеток, что открывает перспективы для повышения эффективности лечения и предупреждения развития устойчивости. Полученные результаты являются оригинальными и соответствуют современному уровню отечественных и зарубежных исследований.

Данное исследование имеет высокую теоретическую значимость. Результаты углубляют понимание биоплёнкообразования и скольжения микобактерий.

Ценность научных работ соискателя. Научная ценность работ Цыганова И.В. заключается в анализе механизмов скольжения и биоплёнкообразования микобактерий, а также в сравнительном исследовании чувствительности микобактериальных сообществ к традиционным антибиотикам и новому синтетическому соединению, ингибирующему активность алармонсинтетаз.

Результаты исследований опубликованы в центральных и региональных научных изданиях. Публикации находят применение в научной деятельности специалистов, исследующих вопросы антибиотикорезистентности, а также особенности биоплёнкообразования и скольжения у микобактерий.

Научная специальность, которой соответствует диссертация. По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям, по объему и новизне полученных автором данных диссертационная работа полностью соответствует паспорту специальности научных работников 1.5.11. Микробиология (биологические науки) и области исследования паспорта специальности: п. 5 (Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов) и п. 15 (Структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки).

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах. Результаты диссертационного исследования опубликованы в 19 научных работах, из них работ, опубликованных согласно перечню российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (перечень ВАК РФ) – 4, а также работ в научных изданиях, индексируемых базами Scopus и/или Web of Science – 5. Изложенные материалы полностью отражают результаты диссертационной работы.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Sidorov R.Y., Nesterova L.Y., Akhova A.V., Tsyganov I.V., Vaganov V.Y., Shipilovskikh S.A., Rubtsov A.E., Malkov A.V. A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases // *Cell chemical biology* – 2021. – № 28. – P. 1-13.
2. Zamakhaev M., Tsyganov I., Nesterova L., Akhova A., Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Tkachenko A., Shumkov M. *Mycobacterium smegmatis* possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines // *Int J Mycobacteriol.* – 2020. – V. 9. – №2. – P.138-143.
3. Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics // *Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii.* – 2022. – V. 26 – №5. – P. 458-466.
4. Nesterova L. Yu., Tsyganov I. V., Tkachenko A. G. Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell-Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis* // *Applied Biochem and Microbiol.* – 2020. – V. 56. – №4. – P. 387-394.
5. Цыганов И.В., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г. Дифференцированная оценка воздействия биогенных полиаминов и алармонсинтетазы Rel_{Msm} на характер

скольжения *Mycobacterium smegmatis* // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – Пермь. – 2024. – № 4. – С. 401-411.

Диссертация «Зависимость толерантности микобактерий к антибиотикам от факторов регуляции скольжения и формирования биопленок» Цыганова Ивана Вадимовича рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Заключение принято на заседании кафедры микробиологии и иммунологии ПГНИУ.

Присутствовало на заседании 22 чел. Результаты голосования: «за» – 22 чел., «против» – 0 чел., «воздержались» – 0 чел. Протокол заседания кафедры микробиологии и иммунологии №8 от 21 апреля 2025 г.



Председатель

Сайдакова Евгения Владимировна,
доктор биологических наук, профессор
кафедры микробиологии и
иммунологии биологического
факультета ПГНИУ



Секретарь

Криворучко Анастасия Владимировна,
доктор биологических наук, профессор
кафедры микробиологии и
иммунологии биологического
факультета ПГНИУ

