

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Инчаговой Ксении Сергеевны
«Влияние антибиотиков на систему «Quorum sensing» LuxI-LuxR-типа у бактерий
(на примере *Chromobacterium violaceum*)» по специальности 03.02.03 Микробиология
на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Актуальность темы

Уже несколько десятилетий бактерии активно изучаются во всем мире в контексте их взаимодействий внутри популяций, а также межпопуляционных и межвидовых взаимодействий. В этой связи одной из наиболее интересных и наиболее интенсивно разрабатываемых тем является феномен межклеточных взаимодействий, связанный с продукцией бактериями сигнальных молекул. Изменение «поведения» бактериальной популяции при достижении определенного порогового значения плотности, обусловленное выработкой и рецепцией сигнальных молекул – аутоиндукторов, получило название «Quorum sensing». Под контролем этой системы находится экспрессия генов, кодирующих белки, задействованные в люминесценции (морские бактерии), синтезе пигментов и антибиотиков, споруляции, фомировании биопленок, передаче плазмид и других процессах, необходимых для жизнедеятельности микроорганизмов. Подобными системами обладают многие патогенные микроорганизмы, у которых под контролем системы Quorum sensing (QS) часто находится экспрессия генов, связанных с вирулентностью. Это гены ответственные за формирование биопленок, синтез и выделение протеаз, токсинов и др. В связи с этим десятки исследовательских лабораторий и биотехнологических компаний во всем мире ведут поиск средств регуляции бактериального QS. Стоит отметить, что, если в 2000 г. количество публикаций, посвященных изучению QS было не многим выше 100, за 2010 г. уже было опубликовано около 1000 подобных работ, а в течение прошлого года вышло более 1500 таких работ (по данным scifinder.cas.org). В этой связи актуальность темы работы, посвященной изучению влияния антибактериальных препаратов на систему QS бактерий, не вызывает сомнений. Представленная работа затрагивает одну из самых разрабатываемых тем в современной микробиологии и соответствует тенденциям развития мировой науки в данной отрасли знаний.

Достоверность и новизна исследований и полученных результатов

Автором работы проанализирована способность антибиотиков, относящихся к группам бета-лактамов, аминогликозидов и тетрациклинов оказывать влияние на функционирование системы QS *C. violaceum*. Впервые продемонстрирована способность пенициллиновых антибиотиков к индукции QS-зависимого синтеза виолацеина у этого микроорганизма. В то же время, аминогликозидные и тетрациклиновые антибиотики в субингибиторных концентрациях подавляли этот процесс. Проведено исследование совместного влияния антибиотиков и веществ растительного происхождения пирогаллола и кумарина на активность QS-системы LuxI/LuxR-типа.

Достоверность полученных результатов обеспечивается большим объемом проведенных исследований и наличием необходимых контрольных вариантов. Абсолютно обоснованным представляется использование в качестве биосенсоров штаммов, которые, помимо генетических модификаций, обеспечивающих им свойства детекторов присутствия аутоиндукторов, несут признаки устойчивости к исследуемым антибиотикам. Это позволило достоверно выявить эффект антибиотиков на функционирование системы

QS, избежав искажающего эффекта антибиотиков, присутствующих в среде. Достоверность эффекта бета-лактамных антибиотиков подтверждается, также, экспериментами с инактивацией антибиотиков с помощью бета-лактамаз.

Результаты исследований подвергнуты адекватной статистической обработке.

Значимость для науки и практики

Основной целью представленной диссертационной работы является получение данных о влиянии антибактериальных препаратов на функционирование системы QS и разработка подходов к усилению их действия. Полученные данные позволяют говорить об антибиотиках, как веществах, участвующих в межклеточной, а возможно межвидовой коммуникации бактерий. Данные о наличии у аминогликозидных антибиотиков подавляющего эффекта в отношении системы QS, а также о возможности усиления этого эффекта при сочетании с другими веществами могут послужить основой для разработки новых композиций для лечения и профилактики бактериальных инфекций, возбудители которых активируют гены, обеспечивающие их вирулентность посредством функционирования системы QS.

Оценка содержания диссертации и ее завершенности

Представленная работа оформлена в соответствии с предъявляемыми требованиями, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов, результатов собственных исследований и обсуждения этих результатов, а также содержит обобщающее заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 230 литературных источников. Диссертация изложена на 137 страницах и проиллюстрирована 11 таблицами и 29 рисунками. Работа содержит список использованных сокращений, что значительно облегчает работу с рукописью.

В разделе «Введение» автор отражает актуальность избранной темы, формулирует цель и задачи исследования, описывает методологию, степень достоверности и личное участие автора. В разделе представлены положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В главе «Обзор литературы» подробно рассматриваются вопросы, касающиеся строения и функционирования систем QS у разных групп микроорганизмов, а также анализируется современное состояние проблемы возможного ингибирования этих механизмов. Обзор является достаточно полным, написан на основе анализа значительного количества литературных источников, в том числе самых современных.

Глава «Материалы и методы исследования» посвящена описанию использованных в работе методов и бактериальных штаммов, среди которых присутствуют представители разных, в том числе клинически значимых видов микроорганизмов. В исследовании использован значительный арсенал бактериальных штаммов, включающих как лабораторные генетически-модифицированные штаммы с различными вариантами функциональных и дефектных генов системы QS, а также клинические изоляты.

Использованные современные методы оценки активности системы QS, в том числе биотестерные системы, позволили всесторонне рассмотреть и оценить влияние антибиотиков и их комбинаций с другими веществами на функционирование систем межклеточной коммуникации LuxI-LuxR-типа.

Глава 3 посвящена описанию результатов исследования и их обсуждению. Особый интерес, на мой взгляд, представляют результаты, связанные с эффектом пенициллиновых антибиотиков на работу системы QS, а также интерпретации, касающиеся механизмов этого явления. Автор предполагает, что в данном случае антибиотики могут выступать в

качестве АГЛ-мимикрирующих агентов. Подобный механизм представляется вероятным, хотя прямых доказательств такого действия пенициллинов пока нет, и данная проблема нуждается в дальнейшем изучении. Безусловного внимания заслуживают результаты, демонстрирующие ингибирующий эффект аминогликозидов на работу системы. Значимыми являются результаты комбинированного действия амикацина и веществ растительного происхождения с доказанной анти-QS активностью пирогаллола и кумарина.

В главе «Заключение» автор проводит анализ полученных данных, формулирует перспективы дальнейшей разработки темы.

Выводы, сделанные автором, обоснованы и полностью соответствуют поставленной цели, задачам и содержанию работы.

Анализируя работу в целом, необходимо отметить, что она является завершённым исследованием. Диссертация написана грамотным, литературным языком, текст достаточно выверен и практически не содержит опечаток и грамматических ошибок. Таблицы и рисунки в полной мере иллюстрируют полученные результаты и соответствуют тексту. Методы, использованные в работе адекватны поставленным задачам, а выводы полностью соответствуют полученным результатам. Особо хочется отметить качество литературного обзора, который при достаточно небольшом объеме содержит всю необходимую информацию, для ознакомления с вопросами о строении, работе и разнообразии систем QS.

Однако, наряду с несомненно положительным впечатлением от представленной работы, в процессе ознакомления с ней возникли вопросы и замечания.

1. Автор говорит о том, что анти-QS эффект пирогаллола может быть проявлением его прооксидантной активности. Каким образом может действовать данный механизм? Как прооксидантная активность может быть связана с эффектом на работу системы QS?

2. Были ли детектированы какие-либо бета-лактамазы у *C. violaceum* (по вашим или литературным данным)?

3. Насколько мне известно, в синтезе молекул АГЛ принимает участие синтаза LuxI, однако судя по рисунку 3 в диссертационной работе в этом процессе каким-то образом задействован белок LuxR. Поясните, пожалуйста данную схему.

4. На рис. 18 целесообразно было бы добавить подписи с информацией о содержании антибактериальных компонентов в дисках. Без них рисунок неинформативен.

5. Возможно, не совсем корректно говорить о концентрации АГЛ в супернатантах при анализе, основанном на проявлении признака, находящегося под контролем системы QS у тестерного штамма, сопоставляя его с эффектом чистого вещества. Обычно о концентрации говорят при использовании аналитических или прямых методов оценки. Возможно в данном случае более правильно было бы говорить об активности супернатантов, которая соответствует определенной концентрации АГЛ. (Данное замечание носит исключительно терминологический характер).

6. В описании и комментариях к рис. 24 (стр. 87), вероятно, допущена ошибка, поскольку указанная концентрация активированного угля (20 000 мг/мл) нереальна.

Результаты диссертации, опубликованные в научной печати

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, входящих в международные системы научного цитирования и 2 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК РФ, а также получен 1 патент на изобретение.

Соответствие автореферата диссертации

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК РФ и полностью отражают основные положения диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Инчаговой Ксении Сергеевны «Влияние антибиотиков на систему «Quorum sensing» LuxI-LuxR-типа у бактерий (на примере *Chromobacterium violaceum*)» по специальности 03.02.03 Микробиология на соискание ученой степени кандидата биологических наук является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач изучения воздействия субингибиторных концентраций антибиотиков трех классов на систему Quorum sensing LuxI-LuxR-типа и разработки возможных подходов к усилению подавляющей активности антибиотиков в отношении QS-системы, что имеет значение для развития микробиологии и практического применения. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842. Автор диссертации Инчагова К.С. заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

06.11.2020

Официальный оппонент,
с.н.с. лаборатории адаптации микроорганизмов
«ИЭГМ УрО РАН» - филиала ПФИЦ УрО РАН,
доцент кафедры
физиологии растений и экологии почв ПГНИУ
кандидат биол. наук по специальности
03.02.03 Микробиология

Нестерова Лариса Юрьевна

Контактные данные официального оппонента:

Почтовый адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, « Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии Наук» - филиал Федерального государственного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

Контактный телефон: 8(342) 2122159

Адрес электронной почты: larisa.nesterova@bk.ru

Подпись Нестеровой Л.Ю. удостоверяю:
Директор «ИЭГМ УрО РАН», чл.-корр. РАН



В.А. Демаков