

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий» Российской академии наук (ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН),  
д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН,  
эксперт РАН  
С.А. Мирошников

« 18 »

2020 г.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий»  
Российской академии наук

Диссертация Инчаговой Ксении Сергеевны «Влияние антибиотиков на систему «quorum sensing» LuxI/LuxR-типа у бактерий (на примере *Chromobacterium violaceum*)» выполнена на базе ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН.

Научный руководитель – Дерябин Дмитрий Геннадьевич, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН.

В 2015 г. Инчагова Ксения Сергеевна с отличием окончила ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет» по специальности «Микробиология».

В период подготовки диссертации соискатель являлась очным аспирантом ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет» и сотрудником ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН.

Диплом об окончании аспирантуры выдан 29.06.2019 г. ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

**1. Актуальность темы.** Обнаружение плотностно-зависимой химической коммуникации у бактерий, обозначенной термином «quorum sensing» (QS), стало одним из наиболее ярких открытий в микробиологии конца XX века. Первоначально этот феномен был описан у морских люминесцирующих бактерий *Aliivibrio fischeri*, где включали синтазу LuxI, образуемые под её контролем низкомолекулярные аутоиндукторы – ацилированные гомосерин лактоны (АГЛ), а также воспринимающий их

рецепторный белок LuxR, запускающий транскрипцию генов биолюминесценции при достижении высокой плотности бактериальной популяции. В дальнейшем оказалось, что стереотипно устроенные QS системы LuxI/LuxR-типа обнаруживаются у множества других протеобактерий и используется ими в различных процессах функциональной или морфологической дифференцировки. В частности, у почвенной бактерии *Chromobacterium violaceum* синтезируемый белком CviI аутоиндуктор N-гексаноил-L-ацилгомосеринлактон (C<sub>6</sub>-АГЛ) при накоплении в среде культивирования выше критической концентрации взаимодействует с цитоплазматическим рецепторным белком CviR, что индуцирует транскрипцию ряда ранее молчащих генов (в том числе *vioABCDE*-оперона) и проявляется в образовании сине-фиолетового пигмента виолацеина. На этом фоне принципиально важно, что у многих других фито- и зоопатогенных бактерий под контролем QS также находится синтез факторов вирулентности и образование биопленок, что делает эту систему перспективной мишенью для создания антибактериальных средств нового принципа действия.

Работа выполнена на базе ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН в соответствии с планом НИР и соответствует направлению исследований по теме «Изучение механизмов биологической активности лекарственных растений, их воздействия на систему плотно-зависимой коммуникации у бактерий (систему «кворум сенсинга», QS)» (номер госрегистрации НИОКТР АААА-А19-119040290034-9). Исследования поддержаны грантом РФФИ № 16-44-560692 р\_а «Выявление и исследование регуляторных эффектов антибиотиков в отношении системы «чувства кворума» LuxI/LuxR-типа у бактерий», и грантом Правительства Оренбургской области для аспирантов № 18 «Способы усиления кворум-ингибирующей активности антибиотиков».

**2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации.** При выполнении диссертационной работы Инчагова К.С. проявила себя как квалифицированный специалист, способный самостоятельно планировать и проводить научные исследования, критически анализировать полученные результаты. Требования п. 14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018) «О порядке присуждения ученых степеней» выполнены, соискатель лично участвовала в получении результатов работы, а также в подготовке к публикации и их представлении на научных конференциях.

**3. Степень достоверности результатов проведенных исследований.** Проверка первичной документации комиссией, созданной по приказу директора ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН С.А. Мирошниковой №2-П от 09.01.2019 г. в составе председателя, зам. директора по науке, д.б.н. Дускаева Г.К.;

учёного секретаря, к.с.-х.н. Кизаева М.А.; зав. научно-образовательным центром, к.б.н. Марковой И.В.; зав. центром «Нанотехнологии в сельском хозяйстве», д.б.н. Сизовой Е.А.; зав. отделом разведения мясного скота, д.с.-х.н., профессора Тюлебаева С.Д.; зав. отделом технологии мясного скотоводства и производства говядины, д.с.-х.н., профессора Харламова А.В.; зав. Испытательным центром, к.с.-х.н. Холодилиной Т.Н., показала, что она полностью соответствует материалам исследований, представлена в полном объеме и признана достоверным материалом, который соответствует выполненной работе. Результаты получены на сертифицированном оборудовании, обработаны с помощью лицензионных программ и современных методов статистического анализа, используемые в исследовании методики корректны. С материалами проведенных исследований и достоверностью полученных результатов, подтвержденных статистической обработкой, были ознакомлены рецензенты работы. Выводы диссертационной работы обоснованы и согласуются с полученными результатами.

#### **4. Новизна и практическая значимость диссертации.**

Впервые обнаружена способность антибиотиков из группы пенициллинов при субоптимальных температурах культивирования индуцировать QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у *S. violaceum* в отсутствие его естественного аутоиндуктора C<sub>6</sub>-АГЛ. Показано, что разрушение пенициллинов под действием экзогенных бета-лактамаз I и II типа ведет к совместному исчезновению антибактериального и виолацеин-индуцирующего эффектов, в то время как ингибирование собственных бета-лактамаз *S. violaceum* с использованием сульбактама и клавулановой кислоты сопровождается сочетанным изменением рост-ингибирующей и виолацеин-индуцирующей активностей пенициллинов. Совокупность полученных результатов предполагает возможность функционирования пенициллинов в качестве АГЛ-мимикрирующих молекул.

Установлено, что аминокликозиды и тетрациклины в широком диапазоне субингибиторных концентраций ингибируют QS-зависимый синтез пигмента виолацеина у *S. violaceum*. Продемонстрировано, что у антибиотиков из группы аминокликозидов подобный эффект связан с подавлением биосинтеза аутоиндуктора C<sub>6</sub>-АГЛ, в то время как у тетрациклинов определяется иными, неидентифицированными в рамках настоящего исследования механизмами. Подавление образования аутоиндукторов при воздействии субингибиторных концентраций аминокликозидных антибиотиков подтверждено в отношении АГЛ-продуцирующего клинического изолята *P. aeruginosa*.



Показано, что последовательное применение аминогликозидного антибиотика амикацина, ингибирующего образование аутоиндуктора C<sub>6</sub>-АГЛ в культуре *S. violaceum*, и активированного угля, сорбирующего остаточные концентрации C<sub>6</sub>-АГЛ из среды культивирования, обеспечивает аддитивное подавление QS, в то время как их одновременное использование не ведет к формированию подобного эффекта, вероятно, за счет частичной сорбции антибиотика на частицах активированного угля. Впервые продемонстрирована возможность супераддитивного усиления анти-QS эффекта амикацина в комбинации с малыми молекулами растительного происхождения (пирогаллолом и кумарином), нарушающими процессы восприятия C<sub>6</sub>-АГЛ. Новизна подобной композиции защищена патентом РФ на изобретение № 2616237.

Полученные результаты расширяют представления об антибиотиках как природных молекулах, вовлеченных не только в феномен межвидового антагонизма, но в субингибиторных концентрациях участвующих в процессах межвидовой химической коммуникации. При этом биологическая целесообразность действия пенициллинов в качестве индукторов системы QS для воспринимающих их микроорганизмов может определяться запуском защитных реакций при низкой численности популяции в неоптимальных условиях существования. В свою очередь анти-QS активность тетрациклинов и аминогликозидов может сообщать их продуцентам дополнительные селективные преимущества, предотвращая у соседствующих с ними бактериальных популяций возможность QS-регулируемого образования биопленок и биосинтеза «ответных» факторов межмикробного антагонизма.

Практически-ориентированный аспект полученных результатов заключается в определении дополнительных показаний и противопоказаний к использованию антибиотиков для борьбы с бактериальными патогенами растений, животных и человека, обладающими стереотипно устроенными QS-системами LuxI/LuxR-типа. При этом выраженная анти-QS активность аминогликозидных антибиотиков с идентификацией лежащего в основе этого механизма, а также успешный опыт усиления подобного эффекта при сочетании аминогликозидов 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 своего патогенного потенциала.

**5. Ценность научных работ соискателя.** Полученные результаты вносят вклад в решение актуальной фундаментальной проблемы, связанной с изучением влияния антибиотиков на плотностно-зависимую химическую

коммуникацию у бактерий. Взгляд на антибиотики как на вещества, имеющие информационные свойства помимо прямого антибактериального эффекта, открывает возможность для более глубокого понимания межвидовых связей внутри эконисы. Полученные данные уточняют систему показаний и противопоказаний к применению изученных групп антибиотиков при терапии бактериальных инфекций, а пути усиления QS-ингибирующей активности названных соединений могут стать основой в разработке новых антибактериальных средств.

#### **6. Специальность, которой соответствует диссертация.**

Диссертационная работа соответствует п. 3 «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» паспорта специальности 03.02.03 «Микробиология», отрасль науки – биологические науки.

#### **7. Полнота изложения материалов диссертации**

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.

Отдельные фрагменты работы доложены и обсуждены на VIII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2016), научной конференции «История и методология физиолого-биохимических и почвенных исследований» (Пермь, 2017), а также XXI Международном конгрессе МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии (Москва, 2019).

Научные статьи в изданиях, индексируемых в базах данных *Web of Science* и *Scopus*:

1. Дерябин, Д.Г. Субингибиторные концентрации антибиотиков группы пенициллина индуцируют кворум-зависимый синтез виолацеина у *Chromobacterium violaceum* / Д.Г. Дерябин, К.С. Инчагова // Микробиология. – 2017. – Т.86 (4). – С.448-454.

2. Дерябин, Д.Г. Ингибирующий эффект аминогликозидов и тетрациклинов на систему «кворум сенсинга» *Chromobacterium violaceum* / Д.Г. Дерябин, К.С. Инчагова // Микробиология. – 2018. – Т.87(1). – С.3-11.

3. Инчагова, К.С. Подавление «кворум сенсинга» *Chromobacterium violaceum* при воздействии комбинаций амикацина с активированным углем или малыми молекулами растительного происхождения (пирогаллолом и кумарином) / К.С. Инчагова, Г.К. Дускаев, Д.Г.Дерябин // Микробиология. – 2019. – Т.88(1). – С.72–82.

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований:

4. Инчагова, К.С. Сорбционные свойства активированного угля в отношении N-(бета-кетокaproил)-L-гомосерин лактона, оцененные с использованием индуцибельного бактериального LUX-биосенсора / К.С. Инчагова, Е.А. Строганова, Д.Г. Дерябин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – Т. 19 (11). – С.11-15.

5. Инчагова, К.С. Воздействие антибиотиков канамицина и доксициклина на образование автоиндуктора N-бутирил-L-гомосерин лактона клиническими изолятами *Pseudomonas aeruginosa* / К.С. Инчагова, А.А. Галаджиева // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2016. – Т. 197 (9). – С.54-59.

Патент на изобретение:

6. Дерябин Д.Г., Инчагова К.С. Толмачёва А.А. Применение кумарина и его производных в качестве ингибиторов системы «кворум сенсинга» LuxI/LuxR-типа у бактерий // Патент РФ на изобретение № 2616237. – опубл. 13.04.2017. – Бюл. № 11.

Материалы конференций:

7. Инчагова, К.С. Воздействие антибиотиков на систему Quorum Sensing luxI/luxR типа у бактерий (на примере *Chromobacterium violaceum*) / К.С. Инчагова, А.А. Толмачева // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: материалы конференции, VIII Всероссийская конференция молодых учёных. – Саратов: Научная книга. – 2016. – С. 89.

8. Инчагова, К.С. Усиление кворум-ингибирующей активности антибиотиков / К.С. Инчагова // История и методология физиолого-биохимических и почвенных исследований. Сборник научных трудов. – Пермь. – 2017. – С. 68.

9. Дерябин, Д.Г. Антибиотики как потенциальные регуляторы системы «Quorum sensing» у бактерий / Д.Г. Дерябин, К.С. Инчагова // XXI Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии. – Москва. – 2019. – С. 25.

Диссертация Инчаговой Ксении Сергеевны «Влияние антибиотиков на систему «quorum sensing» LuxI/LuxR-типа у бактерий (на примере *Chromobacterium violaceum*)» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Заключение принято на расширенном заседании комиссии ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН по специальности 03.02.03 Микробиология.



Присутствовало на заседании 17 чел. из 19 списочного состава комиссии. Результаты голосования: «за» – 17 чел. (единогласно), «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 3 от «18» июня 2020 г.

Председатель заседания:  
заведующий центром «Нанотехнологии  
в сельском хозяйстве» ФГБНУ ФНЦ  
БСТ РАН, д.б.н.

Сизова Е.А.

Секретарь заседания:

Макаева А.М.

*Наршимь Сизовой Еленой Анатольевной  
г. секретарь кадровой службы*

