ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, доцента Каюмова Айрата Рашитовича на диссертационную работу **Цыганова Ивана Вадимовича по теме «Зависимость толерантности микобактерий к антибиотикам от факторов регуляции скольжения и формирования биопленок»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Актуальность темы исследования:

Работа Цыганова Ивана Вадимовича посвящена исследованию возможности управления процессами биопленкообразования и скольжением у микобактерий, среди которых возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*, отнесенный ВОЗ к микроорганизмам с критическим уровнем опасности. Рассматриваемая в работе возможность использования ингибиторов алармонсинтетаз гуанозин пента-тетрафосфатов (p)ppGpp является одним из новых подходов для влияния на процессы адаптации бактерий к стрессам и развитию неспецифической толерантности к антибиотикам. Так, наиболее устойчивая к терапии часть популяции патогенных микобактерий, клетки-персистеры и клетки, погруженные в биопленки, приводит к рецидивам и длительному, практически не поддающемуся лечению, хроническому течению заболеваний, вызванных микобактериями. Поэтому поиск новых потенциальных мишеней для подавления биопленкообразования является перспективным шагом в решении проблемы эффективности антимикробной терапии микробной инфекции. На примере модельного вида *Mycobacterium smegmatis* Иваном Вадимовичем охарактеризировано влияние алармонсинтетаз на биопленкообразование, скольжение (один из факторов диссеминации патогена в организме), синтез гликопептидолипидов и полифосфатов у микобактерий, а также показано влияние полиаминов, которые присутствуют в тканях человека, на эти процессы и эффективность противотуберкулезных препаратов – рифампицина, стрептомицина, изониазида и нового соединения DMNP в отношении микобактерий.

Полученные результаты углубляют понимание коллективных стратегий выживания микобактерий и открывают перспективы для создания новых эффективных терапевтических подходов. Оценка влияния антибиотиков на биоплёнки и скольжение позволяет пересматривать критерии их эффективности, а поиск новых мишеней – таких как дормантные клетки – даёт основу для сокращения длительности лечения и профилактики устойчивости.

Достоверность и степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации:

Диссертационное исследование представляет собой завершённое научное исследование, выполненное на высоком методологическом уровне и с привлечением современных общепризнанных методов микробиологии и молекулярной микробиологии.

Структура диссертационной работы следует классическому научному формату: она включает литературный обзор, описание применённых методик, а также изложение и интерпретацию экспериментальных данных. В обзорной части всесторонне освещены ключевые биологические свойства микобактерий, механизмы образования биоплёнок и их роль в устойчивости к антимикробным препаратам, скольжение как форма поверхностной мобильности, а также функции полифосфатов и полиаминов в регуляции этих процессов.

Представленный теоретический материал логично структурирован и тщательно отобран, что позволяет адекватно оценить актуальность исследуемой проблемы и степень новизны полученных результатов. Обоснованная постановка задач и чёткое изложение концептуальных основ исследования подчёркивают значимость вклада автора в разработку новых стратегий борьбы с туберкулёзом и другими микобактериальными инфекциями.

В экспериментальной части применён широкий спектр современных микробиологических и аналитических методик: определение ростовых характеристик делеционных мутантов и штаммов дикого типа *M. smegmatis*, культивирование биоплёнок, измерение минимальных бактерицидных концентраций и доз, ингибирующих биоплёнкообразование, микроскопические методы (фазово-контрастная, флуоресцентная и атомно-силовая микроскопии), количественное определение полиаминов, поли- и монофосфатов, а также гликопептидолипидов с применением тонкослойной и ВЭЖ-хроматографии. Автор исследования использовал как положительные, так и отрицательные контроли, в том числе подход с восстановлением фенотипа за счет рекомбинантных плазмид для гиперпродукции белков, что дополнительно подтверждает достоверность результатов. Также использованы методы цифровой обработки экспериментальных изображений. Применение этого комплекса подходов позволило успешно реализовать цели исследования и обоснованно подтвердить выносимые на защиту научные положения.

Полученные данные не противоречат данным литературы и современным представлениям о роли микробных биопленок в толерантности бактерий. При этом автором использовано 209 литературных источников, опубликованных в основном не позднее 2010 г. в рецензируемых ведущих российских и зарубежных журналах. Предложенные направления дальнейшего применения полученных данных демонстрируют прикладную ценность исследования. Высокий уровень научной аргументации, глубина анализа и зрелость сформулированных положений свидетельствуют о высоком профессионализме автора и подчеркивают значимость проделанной научной работы.

Новизна исследования и полученных результатов:

В диссертационном исследовании Цыганова И.В. впервые проведён комплексный анализ роли алармонсинтетаз Rel_{Msm} и RelZ в регуляции процессов биопленкообразования и скольжения микобактерий, выявлена взаимосвязь между уровнем их активности, содержанием гликопептидолипидов на поверхности клеток и способностью микобактерий к биоплёнообразованию. Также впервые показана

способность биогенных полиаминов, таких как спермидин и спермин, влиять на эффективность действия антибиотиков в отношении скользящих и биоплёночных форм микобактерий. Этот эффект реализуется, по-видимому, через изменение внутриклеточных концентраций полифосфатов. Было установлено, что несмотря на известный факт отсутствия возможности синтеза микобактериями собственных полиаминов, в их геноме присутствуют гены синтеза предшественников путресцина. Кроме того, автор впервые показал, что гликопептидолипиды не играют ключевой роли в обеспечении скольжения у *M. smegmatis*, что пересматривает прежние представления о молекулярных основах этой формы подвижности.

В настоящем исследовании впервые охарактеризовано влияние синтетического аналога эрогоргиаена — 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил) пентановой кислоты (DMNP), обладающего активностью ингибитора персистенции, на физиологические процессы у микобактерий. Показано его воздействие на активность алармонсинтетаз, а также на ключевые характеристики микобактериальной жизнедеятельности: формирование биоплёнок, способность к скольжению, синтез полифосфатов. Кроме того, проанализированы взаимодействия DMNP с биогенными полиаминами и стандартными противотуберкулёзными средствами, что открывает новые перспективы для повышения эффективности антимикробной терапии.

Рассматриваемая работа характеризуется **теоретической и практической значимостью.** Полученные в ходе исследования материалы раскрывают пробелы в понимании роли алармонсинтетаз и полиаминов в эффектах коллективного поведения бактериальных колоний – формирования биопленки, формирования скользящих колоний, а также устойчивости к антимикробным препаратам.

С практической точки зрения понимание механизмов действия полиаминов создают прочную фундаментальную основу для разработки новых подходов к повышению эффективности терапии заболеваний, вызванных патогенными микобактериями с применением как традиционных, так и новых препаратов. Так, исследования лекарственных агентов, таких как синтетическое соединение DMNP, обладающее способностью воздействовать на дормантные (малочувствительные к терапии) клетки, открывают горизонты новых потенциальных мишеней для селективного подавления персистирующих форм микобактерий, что существенно расширяет арсенал средств в борьбе с туберкулёзом и другими микобактериозами. Оценка антимикробной активности основных противотуберкулёзных средств в отношении биоплёночных структур и скользящих форм микобактерий позволяет критически пересмотреть их эффективность в условиях, приближенных к клиническим реалиям.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом, качества оформления:

Диссертационная работа отличается логичной организацией и научной последовательностью изложения. Введение содержит чёткую формулировку цели и

задач исследования, а структура всей работы органично отражает этапы научного поиска. Экспериментальные методы подобраны обоснованно, соответствуют современным требованиям и реализованы с соблюдением методологической строгости.

Представленные результаты изложены систематизировано и в ясной форме, что обеспечивает их лёгкое восприятие и интерпретацию. Все выводы логически вытекают из полученных данных и имеют надёжное экспериментальное подтверждение. Иллюстративные материалы выполнены на высоком уровне и служат важным дополнением к тексту, усиливая его информационную ценность.

Работа оформлена в соответствии с принятыми научными стандартами, демонстрируя высокий уровень академической культуры. Полученные данные сопоставлены с актуальной научной литературой, что подчеркивает своевременность и значимость исследования. В целом, диссертация отражает современное состояние знаний в рассматриваемой научной области.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати:

Результаты диссертационного исследования Цыганова И.В. представлены на 8 международных и межрегиональных конференциях. По материалам диссертации опубликовано 11 работ: 5 работ в научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science или Scopus, 4 работы в научных изданиях из перечня ВАК, 2 работы в научных изданиях, индексируемых в РИНЦ.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации:

Автореферат представляет собой лаконичное изложение содержания диссертации, адекватно передающее её концептуальные основы и научную направленность. Структурная организация текста согласуется с построением основной работы, обеспечивая целостное восприятие представленных результатов. Изложенные положения чётко отражают суть проведённого исследования и позволяют оценить его научную и практическую значимость.

Соответствие специальности:

Диссертационная работа соответствует специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки). Содержание работы соответствует направлениям исследований паспорта научной специальности 1.5.11. «Микробиология»: 5. Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов. 15. Структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки.

Достоинства работы:

Основным достоинством работы является попытка разработки подходов к преодолению лекарственной устойчивости микобактерий, обусловленной формированием биопленки и переходом в дормантную (персистирующую) форму, поскольку, независимо от того новые или традиционные препараты используются,

сочетание данной стратегии с традиционной антимикробной терапией может существенно 1) повысить эффективность последней, 2) снизить скорость развития резистентных штаммов и 3) уменьшить побочные эффекты от препаратов.

В экспериментальной части хотелось бы отметить, что путем восстановления генотипа в мутантном штамме с помощью экспрессионных плазмид с геном relMsm или relZ автор убедительно демонстрирует роль кодируемых алармонсинтетаз в формировании прочной биопленки.

Особого внимания заслуживает продемонстрированное в работе синергетическое действие спермина с соединением DMNP и рифампицином в отношении микобактериальных биоплёнок. Этот эффект открывает перспективы для разработки новых терапевтических стратегий, направленных на преодоление устойчивости микобактерий к антимикробным препаратам.

Наконец, нужно отметить, что валидность полученных результатов подтверждается сходимостью выводов и заключений, полученных в результате различных экспериментов.

Замечания:

При демонстрации скользящих колоний (Рис 8, 11) было бы более наглядно давать серию изображений через заданный промежуток времени для визуализации скольжения.

В экспериментах по влиянию рифампицина на биомассу поверхностных биоплёнок (рис 16, 18, 20) было бы полезно указать значение IC50, концентрации приводящей к полумаксимальному подавлению биопленки, и сравнивать между собой эти значения.

Для многих экспериментов не хватает третьего мутанта по relZ.

Однако данные замечания носят технический характер и не снижают значимости работы и положительного мнения о ней.

Вопросы:

С 2022 года в литературе обсуждается вопрос существования бактерий в составе капельных биопленок (Sauer et al., Nat Rev Micro, 2022, Flemming et al., Nat Rev Micro, 2023). Были ли попытки оценки образования капельных биопленок в культуре M.smegmatis?

Автор ссылается на работу Ojha et al 2005, что микобактерии формируют преимущественно поверхностные биопленки. Насколько они релевантны в отношении патогенных штаммов в условиях организма хозяина?

Почему использованы 2 мМ полиамины? Не будут ли эти концентрации токсичны в условиях терапии даже при наружном применении? Способны ли сами миобактерии к синтезу полиаминов? И если да, то до каких концентраций?

Заключение

Диссертация Цыганова Ивана Вадимовича на тему «Зависимость толерантности микобактерий к антибиотикам от факторов регуляции скольжения и

формирования биоплёнок», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология, представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, в которой решается актуальная задача по исследованию коллективных реакций микобактерий (скольжения и биопленкообразования), участие алармона (p)ppGpp и биогенных полиаминов в регуляции данных процессов, а также проводится сравнительный анализ эффективности их ингибирования различными антибактериальными препаратами.

Таким образом, диссертационная работа Цыганова Ивана Вадимовича по теме «Зависимость толерантности микобактерий к антибиотикам от факторов регуляции скольжения и формирования биопленок» соответствует требованиям пп.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 ее автор Цыганов Иван Вадимович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Каюмов Айрат Рашитович
27.10.2025

доктор биологических наук (03.02.03 – Микробиология, 03.01.04 – Биохимия), доцент, заведующий кафедрой генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

420008 г. Казань, ул. Кремлевская, 18

тел. +79046651908; e-mail: kairatr@yandex.ru

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» (ФГАОУ ВО КФУ) KAZAN (VOLGA REGION) FEDERAL UNIVERSITY

ИНН 1655018916 ОГРН 1021602841391

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНН 1655018916 ОГРН 1021602841391 УПРАВЛЕНИЕ ДОКУМЕНТООБОРОТА И КОНТРОЛЯ
ПОДПИСЬ
А. Р. Каюмова заверяю
Документовед Горошко И.И.