

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
(Минобрнауки России)

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИНЦ РАН)**

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки
Институт цитологии
Российской академии наук,
член-корр. РАН, д.б.н.
А.Н. Томилин
10 / 2025 года



194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-35-41,
эл.адрес: cellbio@incras.ru; <http://www.cytspb.rssi.ru/>

ИНН 7802030531, КПП 780201001
УФК по г. Санкт-Петербургу (Отдел № 3, ИНЦ РАН),
л/с 20726Ц41010, Северо-Западное ГУ Банка России
р/с 40501810300002000001, БИК 044030001

28.10.2025 № 12316-662-352

Отзыв ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института цитологии Российской академии наук
о научно-практической ценности диссертации Цыганова Ивана
Вадимовича «Зависимость толерантности микобактерий к
антибиотикам от факторов регуляции скольжения и формирования
биопленок», представленной в диссертационный совет 24.1.201.03 по
защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на
соискание ученой степени доктора наук, на базе Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Пермский
федеральный исследовательский центр Уральского отделения
Российской академии наук на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология**

Актуальность темы диссертации

Острота проблемы эффективности антибиотиков по отношению к клинически значимым патогенным микроорганизмам постоянно растёт. Свой печальный вклад в распространение антибиотикорезистентных форм бактерий вносят как бесконтрольное употребление препаратов в медицине и пищевой промышленности, так и недостаточное знание о их реальном воздействии на микробные сообщества. Например, многие хорошо известные антибиотики эффективно справляются с планктонными формами бактерий, причём находящимися в экспоненциальной фазе роста, тогда как в природе более 90% микроорганизмов пребывают либо в состоянии покоя, либо находятся в стационарной фазе. На этом фоне физиологическая

толерантность микроорганизмов к антибиотикам, обусловленная персистенцией, способствует распространению трудно излечимых хронических инфекций. При этом неспецифическая толерантность бактерий зависит, в том числе, от коллективных действий микробного сообщества, таких, как скольжение или роение, а также формирование биоплёнок, и может регулироваться молекулами-алармонами и стрингент-факторами. Среди известных социально значимых патогенов микобактерии, в том числе и возбудители такого серьёзного заболевания, как туберкулёз, до сих пор входящего в первую десятку причин смертности во всём мире, обладают одними из наиболее развитых механизмов формирования физиологической толерантности.

В клинической микробиологии в последнее время наблюдается тенденция к разработке комплексных подходов в борьбе с патогенными штаммами бактерий, основанных на глубоком понимании всей сложности процессов, происходящих в бактериальном сообществе. Данная диссертационная работа, выполненная соискателем степени кандидата биологических наук Цыгановым Иваном Вадимовичем, является особенно актуальной в связи с тем, что в её рамках были исследованы причины формирования физиологической толерантности модельной микобактерии к давно применяемым для лечения туберкулёза антибиотикам, рифампицину и стрептомицину, а также было продемонстрировано более эффективное по сравнению с ними воздействие на клетки-персистеры вновь синтезированного ингибитора персистенции DMNP. Что ещё более ценно, Цыганов И.В. совместно со своим научным руководителем протестировали влияние антимикробных препаратов на формирование биоплёнок, способность к скольжению и выживание модельного микроорганизма в условиях, приближенных к физиологическим – при добавлении в среду полиаминов-метаболитов клеток организма-хозяина.

Диссертационное исследование подтверждает необходимость комплексного подхода к изучению механизмов влияния антибактериальных препаратов, особенно вновь синтезированных, на видовые и популяционные свойства микробных мишеней. В связи с вышесказанным актуальность темы, исследуемой в данной диссертационной работе, не вызывает сомнений.

Связь с научными программами и собственный вклад автора в исследования

Диссертационная работа Цыганова И.В. «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, г. Пермь.

Исследование проводилось при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда «Разработка высокоактивных соединений против резистентных форм туберкулеза с новым механизмом действия» (18-73-10156); гранта Российского научного фонда «Создание нового класса противотуберкулезных соединений на основе синтеза природных дитерпенов выделенных из морских кораллов и их аналогов» (15-13-00092); проекта «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды» при поддержке Минобрнауки РФ (АААА-А19-119112290009-1); проекта «Роль полиаминов в регуляции бактериальной персистенции» при поддержке РФФИ и Администрации Пермского края (р_а 16-44-590279).

Выбор направления диссертационной работы, её цели и задач проводился совместно с научным руководителем – д.м.н., проф., А.Г. Ткаченко. Личный вклад автора работы заключается в самостоятельном проведении анализа данных литературы по теме диссертации, а также осуществлении основной экспериментальной работы: в изучении биоплёнкообразования и скольжения микобактерий, влияния на эти процессы биогенных полиаминов, антибиотиков и активности алармонсинтетаз, включая анализ изменений содержания гликопептидолипидов и полифосфатов. Химический синтез 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил) пентановой кислоты (DMNP) выполнен сотрудниками Пермского государственного национального исследовательского университета. Исследования клеточной поверхности методом атомно-силовой микроскопии проведены совместно с к.б.н. Л.Ю. Нестеровой. В сферу ответственности Цыганова И.В. входила обработка экспериментальных данных и подготовка материалов к опубликованию в рецензируемых научных изданиях. Личный вклад автора суммарно составляет более 80% от всего объёма работ, представленных в диссертации.

Научная новизна

Данные положения демонстрируют вклад автора в существующее знание и обуславливают новизну результатов исследования:

1. Впервые выявлена совокупная роль алармонсинтетаз Rel_{Msm} и RelZ в сохранении целостности поверхностных биоплёнок (пелликул) *Mycobacterium smegmatis* и повышении толерантности бактерий к антибиотикам.

2. Впервые показано прямое влияние алармонсинтетаз на поддержание количества гликопептидолипидов (ГПЛ) в оболочке клетки и степень гидрофобности поверхности микобактерий. Делеция генов алармонсинтетаз приводит к фрагментации биоплёнок. В отличие от этого, скольжение не зависит от содержания ГПЛ, но прямо коррелирует с уровнем полифосфатов.

3. Впервые продемонстрирован регуляторный эффект биогенных полиаминов – спермидина и спермина – на эффективность действия антибиотиков в отношении скользящих клеток микобактерий, а также клеток в составе биоплёнки, путем модуляции внутриклеточных уровней полифосфатов.

4. Впервые показана более высокая по сравнению с другими антибиотиками эффективность синтетического ингибитора алармонсинтетаз DMNP сразу на обе адаптивные реакции коллективного взаимодействия микобактерий: биоплёнкообразование и скольжение. Впервые продемонстрирована положительная роль спермина в усилении подавляющего эффекта DMNP на микобактериальные биоплёнки.

Степень обоснованности научных результатов, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные результаты подробно описаны и обоснованы в тексте диссертации, причём как в главе 3 «Результаты исследований», так и отдельно, сугубо в главе 4 «Обсуждение результатов». При этом для сравнения и предметного обсуждения приведены многочисленные примеры из современных источников научной литературы по воздействию антибиотиков на бактериальные биоплёнки, по структуре скользящих колоний, по воздействию DMNP на клетки микобактерий, по влиянию на механизмы физиологической толерантности микроорганизмов бактериальных полифосфатов и биогенных полиаминов. Проведён качественный статистический анализ полученных результатов. Методология, использованная при исследовании, подробно описана, что делает возможным пошаговое воспроизведение экспериментов. Выводы, сформулированные на основе проведенных исследований, обоснованы, логически следуют из представленных данных и соответствуют цели исследования и поставленным задачам. Рекомендации, вытекающие из результатов и выводов, также обоснованы и могут иметь практическое измерение, особенно в рамках исследований возможности применения DMNP вместе с уже используемыми антибиотиками в комплексной терапии микобактериальных инфекций, основанной на глубоком понимании сложных процессов, происходящих как в самом микробном сообществе, так и при его взаимодействии с организмом хозяина.

Общая оценка работы

Структура диссертации соответствует пункту 30 (ред. 1 августа 2021 г.) приказа Министерства образования и науки РФ от 10 ноября 2017 г. N 1093 "Об утверждении Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук". Полный объём диссертации составляет 145 страниц.

Основная часть диссертации состоит из 4 глав. Первой главой идёт обзор литературы, включающий пять разделов, в которых подробно описаны основные аспекты исследуемой в рамках диссертационной работы проблемы.

Сначала автор заостряет внимание на общих вопросах устойчивости микобактерий к антибиотикам, потом переходит к анализу имеющихся в научной литературе сведений по микобактериальным биоплёнкам и их значению для выживания клеток в неблагоприятных условиях, а также скольжению микобактерий, а завершает обзор перечислением и обсуждением физиологических функций полифосфатов и биогенных полиаминов. В целом в рамках работы было проанализировано более 200 источников литературы, что позволило чётко сформулировать основания для исследований в данной области.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание методик, применяемых в рамках диссертационного исследования, включая микробиологические, молекулярно-биологические, генно-инженерные, биохимические и биоинформационные подходы, в том числе информацию об объектах исследования, питательных средах, методах культивирования поверхностных биоплёнок и скользящих колоний, установления минимальных концентраций используемых антибактериальных агентов, тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии, атомно-силовой микроскопии.

Результаты экспериментов убедительно подтверждают выдвинутые на защиту положения и представляют собой обширный объем экспериментальных данных. Адекватная статистическая обработка способствует правильной интерпретации полученных результатов. Глава «Обсуждение результатов» содержит дополнительные аргументы, основанные на глубоком анализе научной литературы.

Основные положения диссертации проиллюстрированы 47 рисунками и 11 таблицами, список литературы содержит 213 библиографических источников. Работа оформлена профессионально. Достаточно внушительный объем экспериментальных данных хорошо структурирован и последовательно изложен. Автор компетентен в тематике исследования, и своей работой вносит серьёзный вклад в решение проблем, связанных как с изучением механизмов коллективного ответа микробного сообщества на стресс, так и с физиологически обусловленной, неспецифической антибиотикорезистентностью микобактерий.

Материалы диссертации опубликованы в научной печати. По материалам диссертации вышло 19 работ, в том числе 5 статей – в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах цитирования Scopus и Web of Science, и 4 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Результаты диссертации апробированы на 9 всероссийских и межрегиональных научных конференциях. Автореферат суммирует основные методы и результаты диссертации и полностью соответствует содержанию диссертации.

Значимость полученных результатов для науки и практики

С теоретической точки зрения результаты исследования вносят существенный вклад в понимание механизмов формирования биоплёнок и скольжения микобактерий. С практической точки зрения новые экспериментальные данные о воздействии полиаминов на скольжение, биоплёнкообразование и антибактериальную активность антибиотиков могут быть использованы для повышения эффективности терапии микобактериозов. Данная в работе оценка активности основных антибиотиков, применяемых при терапии туберкулеза и других микобактериозов в отношении биоплёнок и скользящих колоний расширяет существующие представления о зависимости их эффективности от условий бактериального окружения в организме хозяина, включая полиамины. Используемые с этой целью приёмы могут применяться для оптимизации поиска новых антибиотиков со специфическими мишенями, действие которых направлено на подавление формирования персистентных клеток, что является перспективным направлением для повышения их терапевтической эффективности и профилактики развития антибиотикорезистентности.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Соединение DMNP может быть рассмотрено в качестве возможной основы для разработки нового противотуберкулезного лекарственного препарата, нацеленного на преодоление ответа на стресс и предназначенного для использования в комбинированной терапии с антибиотиками, оказывающими воздействие на активно растущие клетки микобактерий. Одновременное разрушение биоплёнок и воздействие на планктонные клетки позволит модернизировать стратегию элиминации бактериальных патогенов из организма-хозяина. Рекомендуются также продолжить исследования механизмов формирования биоплёнок и скольжения микобактерий, особенно заострив внимание на правильной интерпретации полученных в рамках диссертационного исследования приоритетных данных, противоречащих существующим моделям, описанным в научной литературе.

Соответствие содержания диссертации специальности и отрасли науки, по которой она рекомендуется к защите

Диссертационная работа охватывает следующие направления специальности 1.5.11. «Микробиология»: 5. Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов. 7. Ферменты микроорганизмов.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата диссертации Цыганова И.В. «Зависимость толерантности микобактерий к антибиотикам от факторов регуляции скольжения и формирования биопленок», представленной на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология, в полной мере отражает суть диссертационной работы.

Цели, задачи, положения, выносимые на защиту, заключение и выводы, приведенные в автореферате, соответствуют таковым в диссертации.

При обсуждении диссертации возникли следующие замечания, вопросы и рекомендации по работе:

- 1) В тексте диссертации встречаются стилистические неточности, некоторое количество опечаток, с научной точки зрения не совсем корректно построенные фразы, повторения в тексте литературного обзора (например, на стр. 39 и 41-42), но в целом это не влияет на качество работы;
- 2) По обзору литературы не хватает краткого заключения, суммирующего представленную информацию для читателя;
- 3) По мнению диссертанта, почему целостная биоплёнка успешно формируется, когда в клетках делеционного штамма с компенсирующей плазмиды синтезируется только одна из алармонсинтетаз, причём любая (стр. 59, рисунок 7)? Возможно ли, что сверхэкспрессия одной алармонсинтетазы компенсирует отсутствие второго фермента?
- 4) Какова, по мнению диссертанта, природа разнонаправленного действия алармонсинтетаз на процесс скольжения колоний?
- 5) Почему клетки с двойной делецией генов алармонсинтетаз более подвержены скольжению, но при этом размер колоний сравним с родительским штаммом?
- 6) Почему решили не конструировать и не использовать для сравнительных экспериментов штамм с делецией *M. smegmatis* mc² 155 Δ relZ?
- 7) Хорошо было бы провести эксперименты по одновременному, комплексному воздействию DMNP и других антибиотиков (в паре, на выбор) на формирование биоплёнок, скольжение и выживаемость бактерий. Например, в химиотерапии одновременное использование целого набора противоопухолевых антибиотиков с различным действием повышает эффективность терапии.

Заключение

Диссертация Цыганова Ивана Вадимовича, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология, является завершённой научно-квалификационной работой и соответствует п. 5 «Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов» Паспорта научной специальности 1.5.11. Микробиология. Актуальность рассматриваемых вопросов, новизна, достоверность, обоснованность

научных положений, научно-практическая значимость полученных результатов свидетельствуют о том, что диссертационная работа соответствует требованиям п.п. 9–14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (с изменениями и дополнениями в редакции № 1539 от 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Цыганов И.В. заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

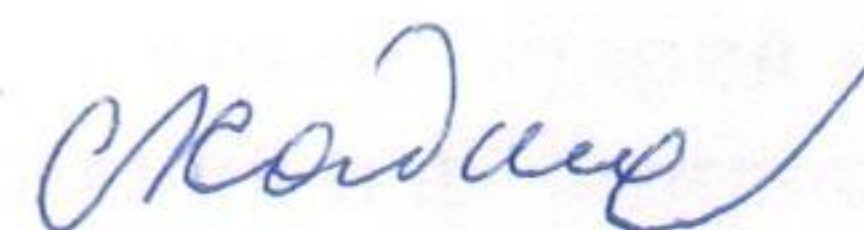
Диссертационная работа и автореферат обсуждены, отзыв заслушан, одобрен и утвержден на семинаре Лаборатории цитологии одноклеточных организмов ФГБУН Институт цитологии Российской академии наук, протокол заседания №9 от 27.10.2025 г.

Руководитель Группы молекулярной цитологии прокариот и бактериальной инвазии, ведущий научный сотрудник Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН, кандидат биологических наук (специальность 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология)



Вишняков
Иннокентий Евгеньевич

Ведущий научный сотрудник Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН, доктор биологических наук (специальность 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология)



Хайтлина
София Юрьевна

27.10.2025

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской Академии наук
Адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, ул. Тихорецкий проспект, д.4
Тел.: +7 (812) 297-18-29
Электронная почта организации: cellbio@incras.ru
Электронная почта составителя отзыва: innvish@gmail.com



Подпись руки Вишнякова И. В.
Хайтлиной С. Ю.
27.10.2025
канцелярией

