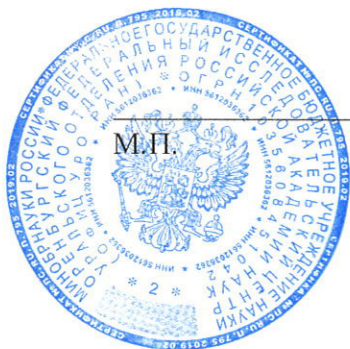




УТВЕРЖДАЮ

Директор ОФИЦ УрО РАН,
академик РАН, С.В. Черкасов

" 05 " июня 20 25 г.

Заключение

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

Диссертация Балкина Александра Сергеевича «Популяционная динамика и транскриптомный ответ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba castellanii*» выполнена в лаборатории биомедицинских технологий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (ИКВС УрО РАН) - обособленного структурного подразделения ОФИЦ УрО РАН.

В период подготовки диссертации соискатель Балкин Александр Сергеевич работал с 03.08.2015 г. по 28.12.2018 г. в должности научного сотрудника центра коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН - обособленного структурного подразделения ОФИЦ УрО РАН; с 29.12.2018 г. по настоящее время работает в должности научного сотрудника лаборатории биомедицинских технологий ИКВС УрО РАН - обособленного структурного подразделения ОФИЦ УрО РАН.

Балкин Александр Сергеевич в 2015 г окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Оренбургский государственный университет» по специальности 020209 «Микробиология». Балкин А.С. обучался в аспирантуре ОФИЦ УрО РАН по направлению подготовки

«Биологические науки» 06.06.01, профиль программы «Микробиология» с 01.09.2015 г. по 31.08.2019 г.

Балкин А.С. сдал кандидатские экзамены в полном объеме, что подтверждается справкой от 16.02.2016 № 4864, выданной Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Оренбургский государственный университет» о сдаче кандидатских экзаменов по истории и философии науки (биологические науки), по специальности 03.02.03 «Микробиология», по иностранному языку (английский). Все экзамены сданы с оценкой «отлично».

Научный руководитель: Черкасов Сергей Викторович, доктор медицинских наук, академик РАН, директор ОФИЦ УрО РАН, главный научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией биомедицинских технологий ИКВС УрО РАН – обособленного структурного подразделения ОФИЦ УрО РАН.

Тема диссертации «Экспрессия генов *Salmonella* при фагоцитозе макрофагами млекопитающих и свободноживущими протистами» и научный руководитель д.м.н., академик РАН Черкасов С.В. утверждены решением Ученого совета ИКВС УрО РАН - обособленного структурного подразделения ОФИЦ УрО РАН от 25.02.2016 (Протокол № 1). Решением Ученого совета ИКВС УрО РАН - обособленного структурного подразделения ОФИЦ УрО РАН от 05.06.2025 (Протокол № 7) тема диссертации изменена и утверждена в следующей редакции: «Популяционная динамика и транскриптомный ответ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba castellanii*».

По итогам обсуждения диссертации принято следующее заключение:

Актуальность проблемы

Диссертационное исследование А.С. Балкина посвящено решению задачи по изучению популяционных взаимодействий и глобальной экспрессии генов энтеропатогенных бактерий при фагоцитозе

свободноживущими протистами, что имеет существенное значение для микробной экологии и здравоохранения. Глобальная экспрессия генов сальмонелл, поглощенных гетеротрофными протистами, в частности инфузориями *Tetrahymena sp.* и свободноживущими амебами *Acanthamoeba rhysodes*, изучены недостаточно, а опубликованные проекты выполнены с использованием технологии секвенирования на микрочипах, что существенно ограничивает полученные результаты и их интерпретацию. Исследование глобальной экспрессии генов сальмонелл внутри фагосом протистов помогают лучше понять молекулярные механизмы адаптации бактерий к условиям внутриклеточной среды простейших, населяющих водные и почвенные экосистемы. Таким образом, имеющийся пробел в изучении механизмов взаимодействия патогенных бактерий и свободноживущих протистов, а также появление современных методов для эффективного изучения транскриптомов бактерий внутри различных хозяев, послужили обоснованием для исследования Балкина А.С.

Связь с планом основных научных работ учреждения

Диссертационное исследование выполнено в рамках темы НИР ОФИЦ УрО РАН «Роль микробного фактора в функционировании физиологических систем организма человека» (2017-2021 г., № гос. регистрации 116021510073) и темы НИР «Исследование симбиотических систем про- и эукариот в биологии и медицине» (2022-2026 г., FUUG-2022-0007, № гос. регистрации 122020100106-5).

Степень обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций

Объём экспериментального материала и его обработка адекватны поставленной цели исследования.

Автор использовал современные методы исследования, такие как конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, молекулярно-генетические методы включая количественную ПЦР в режиме реального времени и высокопроизводительное секвенирование, с использованием

сертифицированного и поверенного оборудования, программного обеспечения для биоинформатического и статистического анализа полученных данных. На основании акта проверки достоверности первичной документации сделан вывод о соответствии результатов, зафиксированных в первичной документации, с данными, отраженными в диссертации. Использованные методики соответствуют сформулированным задачам. Полученные данные достоверны и подтверждаются 5 таблицами и 16 рисунками.

Результаты исследования обоснованы и позволяют вынести на защиту следующие положения:

1. *S. Typhimurium*, находящиеся внутри *A. castellanii* в присутствии гентамицина, не проявляют выраженного цитотоксического эффекта в отношении амеб, который регистрируется при совместном культивировании без антибиотика.

2. Транскриптом *S. Typhimurium* на ранней стадии инфекции *A. castellanii* характеризуется уникальными особенностями, включая подавление генов цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования, активацию генов глиоксилатного цикла, системы хемотаксиса и биосинтеза жгутикового аппарата, что отражает специфичность взаимодействия «патоген-хозяин».

3. Паттерны экспрессии островков патогенности SPI-1, SPI-2, SPI-3, генов ответа на окислительный стресс, транспорта железа у сальмонелл характеризуются схожей динамикой как при инфекции акантамеб, так и профессиональных фагоцитов млекопитающих.

В итоге, на основании обширного фактического материала и проведенных исследований диссертант пришел к выводам, которые логично вытекают из самого содержания работы. Научные положения, заключение и выводы, сформулированные автором в работе, обоснованы достаточным размером выборок и современными методами исследований, использованными в работе, широко обсуждены в печати и на научных

конференциях, как всероссийского, так и международного уровня. Выводы диссертационного исследования полностью соответствуют поставленным целям и задачам и вытекают из представленного исследования.

Таким образом, достаточный объем данных, полученных с помощью широкого спектра современных методов исследования, адекватность методических подходов, сопоставление результатов с данными современной научной литературы, дают основание для заключения о достаточной обоснованности полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Научная новизна

В работе Балкина А.С. впервые применен метод Carrable-Seq для селективного обогащения первичных транскриптов мРНК сальмонелл, позволивший существенно снизить повысить эффективность оценки транскриптома. С использованием высокопроизводительного секвенирования (NGS) оценена динамика экспрессии генов сальмонелл, отвечающих за метаболизм, окислительный стресс, системы вирулентности, ингибиторы лизоцима и хемотаксис сальмонелл внутри *Acanthamoeba castellanii* в ключевых точках их взаимодействия. Впервые выявлена активация генов первого островка патогенности сальмонелл, а также жгутикового аппарата и хемотаксиса при фагоцитозе простейшими. Показано подавление экспрессии генов ЦТК, гликолиза, и пентозо-фосфатного пути, активация генов глиоксилатного шунта, что в отличие от условий внутри фагоцитов млекопитающих, отражает переключение сальмонелл внутри клеток амёб на альтернативные источники углерода (ацетат, жирные кислоты).

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Все исследования проводились как минимум в трех биологических повторностях. Для определения оптимального статистического метода проводилась проверка полученных данных на нормальность распределения. Исследования проведены с помощью современных молекулярно-

биологических и микробиологических методик: создание бактериальных мутантов, конфокальная лазерная микроскопия, ПЦР в режиме реального времени, высокопроизводительное секвенирование транскриптома, биоинформатические методы анализа данных секвенирования. Для проведения биоинформатического и статистического анализов использовались современные программы и алгоритмы, в зависимости от типа полученных данных, в том числе пакеты R «Rsubread», «DESeq2», «fgsea».

Основные положения диссертационной работы были представлены и обсуждены на международной конференции «XVII International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-living Amoebae» (Тунис, Джерба-Зарзис, 2017) – стендовый доклад; III-ей всероссийской молодежной научной школе-конференции с международным участием «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» (Оренбург, 2017) – устный доклад; VIII-ом Европейском конгрессе по протистологии (Италия, Рим, 2018) - стендовый доклад; 39-й конференции немецкого протистологического общества (Германия, Кайзерслаутерн, 2020) – стендовый доклад; X Российской научной конференции «Персистенция и симбиоз микроорганизмов» с международным участием, посвященной 300-летию Российской академии наук, Десятилетию науки и технологии (Оренбург, 2023) – устный доклад.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации

Все этапы диссертационного исследования, включая формулирование основной идеи, планирование работы, формулировка цели и задач, определение методологии и общей концепции, выбор методов исследования, проведение экспериментов, анализ полученных данных, проводились лично или при непосредственном участии автора. Написание и оформление статей проводилось соискателем совместно с научным руководителем. Получение и интерпретация экспериментальных данных, анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации осуществлялось соискателем

лично. Основные положения диссертации представлены в виде научных публикаций и докладов на научно-практических мероприятиях соискателем как лично, так и в соавторстве. На основании акта проверки достоверности первичной документации от 30.04.2025 г (комиссией в составе председателя д.б.н., доцента О.Л. Карташова; членов комиссии: д.б.н., доцент Яценко-Степанова Т.Н., д.б.н., доцент Сгибнев А.В., к.б.н. Щуплова Е.А.) сделан вывод о соответствии результатов, зафиксированных в первичной документации, с данными, отраженными в диссертации, а также о личном участии автора в проведении всех исследований, указанных в диссертации. Участие соавторов отражено в совместных публикациях.

Практическая и теоретическая значимость

Исследование вносит существенный вклад в фундаментальное понимание экологии, эволюции и механизмов выживания сальмонелл, раскрывая их сложные взаимодействия с простейшими, являющиеся ключевым фактором сохранения патогенов в окружающей среде. Данные о схожести факторов вирулентности, используемых для преодоления фагоцитоза амебами и профессиональными фагоцитами, поддерживают гипотезу о том, что взаимодействие с простейшими служит «тренировкой» и поддерживает вирулентный потенциал сальмонелл в окружающей среде. Практическая значимость работы заключается в разработке модели взаимодействия «сальмонелла-амеба», которая открывает перспективы для разработки принципиально новых стратегий контроля сальмонелл в окружающей среде, направленных на разрыв связи «патоген-простейшее», что необходимо для повышения безопасности воды и пищевых продуктов и профилактики заболеваний.

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

Представленная диссертационная работа и опубликованные по ее результатам материалы соответствуют специальности 1.5.11. Микробиология на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Направления

исследований в соответствии с паспортом специальности 1.5.11. Микробиология: физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов; патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности; межмикробные взаимодействия, включая синтрофные ассоциации и чувство кворума.

Полнота опубликования научных результатов

Основные положения диссертации отражены в 7 печатных научных работах, 4 - в рецензируемых научных изданиях, 3 – в сборниках тезисов конференций, индексируемых в РИНЦ.

Публикации по теме диссертации:

1. Балкин А.С., Черкасов С.В. Модель взаимодействия *Acanthamoeba castellanii* с бактериями *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028S // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017. – № 9(209). – С. 47-50. [РИНЦ]

2. Balkin A.S., Plotnikov A.O., Gogoleva N.E., Gogolev Y.V., Demchenko K.N., Cherkasov S.V. Cappable-Seq Reveals Specific Patterns of Metabolism and Virulence for *Salmonella* Typhimurium Intracellular Survival within *Acanthamoeba castellanii* // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – №16. – P. 9077. [Scopus Q1, WOS Q1, РИНЦ]

3. Balkin A.S., Cherkasov S.V., Gogolev Y.V., Plotnikov A.O. The Phase-Specific Dynamics in Gene Expression of *Salmonella* Typhimurium During *Acanthamoeba castellanii* Infection // Current Microbiology. – 2025. – V. 82. – P. 270. [Scopus Q2, WOS Q3, РИНЦ]

4. Balkin A, Plotnikov A, Konnova T, Shagimardanova E, Hamo H, Gogolev Y, Gogoleva N. Cappable-seq RNA-sequencing data sets of *Escherichia coli* K-12 MG1655 treated with novobiocin, tetracycline, and rifampicin // Microbiology Resource Announcements. – 2025. – V. 14. – №2. – P. e01194-24. [Scopus Q3, WOS Q4, РИНЦ]

5. Гоголев Ю.В., Гоголева Н.Е., Исмаилов Т.Т., Осипова Е.В., Балкин А.С., Севастьянов А.С. Транскриптомное профилирование бактерий в растительно-микробных и протисто-бактериальных патосистемах / II объединенный научный форум. VI съезд физиологов снг. VI съезд биохимиков россии. IX российский симпозиум "белки и пептиды" (сочи, дагомыс, 01–06 октября 2019) // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2019. – Т. 11, № S2. – С. 12. [РИНЦ]

6. Балкин А.С., Плотников А.О., Гоголева Н.Е., Гоголев Ю.В., Черкасов С.В. Особенности метаболизма и вирулентности *Salmonella Typhimurium* в условиях фагоцитоза *Acanthamoeba castellanii* // Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах: сборник тезисов, Оренбург, 04–08 октября 2021 // Оренбург: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук, 2021. – С. 43-44. [РИНЦ]

7. Гоголев Ю.В., Коннова Т.А., Осипова Е.В., Гоголева Н.Е., Хамо Хамза Х.Х., Балкин А.С. Структура транскриптомов бактерий и метатранскриптомика патосистем / Международный Конгресс "VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы" : Сборник тезисов, Саратов, 14–19 июня 2024. // Санкт-Петербург: ООО Издательский дом "Петрополис", 2024. – С. 68. [РИНЦ]

Соблюдение этических норм и возможность открытого доступа

Диссертация соответствует требованиям, установленным пунктом 14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства России от 18 марта 2023 г. № 415). В диссертации соискатель ссылается на все источники правомерного заимствования материалов или отдельных результатов и их авторов.

В диссертации не содержатся сведения или информация с ограниченным доступом, материалы не подпадают под действие экспертного контроля: экспертное заключение ИКВС УрО РАН – обособленного структурного подразделения ОФИЦ УрО РАН от 20.05.2025 г.

Заключение

На заседании Ученого совета ИКВС УрО РАН – обособленного структурного подразделения ОФИЦ УрО РАН сделано заключение, что диссертационная работа А.С. Балкина «Популяционная динамика и транскриптомный ответ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba castellanii*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершенной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена задача по созданию модели взаимодействия *Salmonella-Acanthamoeba* и оценке глобальной экспрессии генов сальмонелл при фагоцитозе свободноживущими протистами, что имеет существенное значение для микробной экологии и здравоохранения. Работа по своей научной новизне, теоретической и практической значимости, объему исследований, отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. №842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 18.03.2023 № 415). Диссертация Балкина А. С. «Популяционная динамика и транскриптомный ответ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba castellanii*» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 1.5.11 Микробиология (биологические науки).

Заключение принято на заседании Ученого совета Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

Присутствовало на заседании 15 членов Ученого совета ИКВС УрО РАН - обособленного структурного подразделения ОФИЦ УрО РАН.

Результаты голосования: "за" - 15 чел., "против" - 0 чел., "воздержалось" - 0 чел., протокол № 7 от " 05 " июня 2025_ г.

СЕКРЕТАРЬ:

ученый секретарь ИКВС УрО РАН -
обособленного структурного подразделения
ОФИЦ УрО РАН к.б.н.

Е.А. Щуплова

Подпись ученого секретаря ИКВС УрО РАН, к.б.н. Е.А. Щупловой заверяю.

Начальник отдела кадров ОФИЦ УрО РАН _____ И.В. Турленко

05 июня 2025 г.

