

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Ермолаевой Светланы Александровны
на диссертационную работу **Балкина Александра Сергеевича по теме:**
**«Популяционная динамика и транскриптомный ответ *Salmonella enterica*
serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами
Acanthamoeba castellanii», представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология
(биологические науки).**

1. Актуальность темы исследования

Возбудители инфекционных заболеваний, широко распространенные в природе и циркулирующие в природных и/или антропогенных очагах являются частью микробных сообществ, в которых они активно взаимодействуют с другими одноклеточными обитателями соответствующей среды. Такие взаимодействия не только обеспечивают патогенным бактериям выживание в окружающей среде, но и способствуют их эволюции в направлении защиты от фагоцитоза и взаимодействия с фагоцитирующими клетками. Изучение взаимоотношений между патогенными бактериями и свободноживущими бактериоядными простейшими представляют собой фундаментальную проблему экологии возбудителей инфекций, решение которой необходимо для понимания экологии и эволюции возбудителей инфекционных заболеваний в окружающей среде. Данное направление исследований находится на стыке микробиологии, протозоологии и эпидемиологии, и в силу сложности проблемы во многих аспектах является недостаточно изученным. Между тем, механизмы, обеспечивающие способность некоторых патогенных бактерий выживать и размножаться внутри бактериоядных амёб, имеют существенное влияние на способность возбудителей к персистенции во внешней среде, развитию устойчивости к неблагоприятным факторам и повышению вирулентности, что напрямую связано с проблемой возникновения вспышек инфекций. Комплексное исследование данного феномена на уровне популяционной динамики и транскриптомного анализа с применением современных молекулярно-биологических методов соответствует мировому уровню развития науки и восполняет существующие пробелы в знаниях о механизмах выживания сальмонелл в окружающей среде.

2. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Изучение материалов диссертации показывает, что выдвинутые автором научные положения, сделанные им выводы и рекомендации обоснованы полученными экспериментальными результатами. Цели и задачи работы сформулированы на основе всестороннего анализа современных научных публикаций, что подтверждается обширным списком литературы. В ходе выполнения работ диссертант использовал как классические методы характеристики межпопуляционных взаимодействий между простейшими и патогенными сальмонеллами, такие как высевы и прямой подсчет микроорганизмов, так и современные методы, включая транскриптомный анализ. Для проведения биоинформатического и статистического анализов использовались актуальные программы и алгоритмы, рекомендованные для конкретного типа полученных данных. Обоснованность выводов дополнительно подтверждается их апробацией на авторитетных международных и всероссийских конференциях, а также наличием 4 публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы цитирования (Scopus, Web of Science) и перечень ВАК, в том числе в журналах, входящих в первый и второй квартили.

3. Достоверность и новизна исследования и полученных результатов

Не вызывает сомнения достоверность представленных в диссертации результатов и выводов. Все исследования проводились с соблюдением требований по количеству реплик. Постановка экспериментов является тщательно продуманной, контрольные варианты поставлены корректно, статистическая обработка данных выполнена на высоком уровне с использованием адекватного программного обеспечения, что гарантирует достоверность полученных результатов.

Научная новизна исследования также не вызывает сомнений. Описаны новые закономерности изменения популяционной динамики сальмонелл в ходе кокультивирования с амебами. Впервые с применением транскриптомного анализа комплексно охарактеризованы изменения в метаболизме сальмонелл на разных стадиях их внутриклеточного выживания после фагоцитирования амёбой *A. castellanii*. Впервые установлены ключевые молекулярные механизмы и сигнальные пути, активируемые у бактерии для адаптации к внутриклеточным условиям в данном виде протистов. Показана активация части генов, кодирующих факторы патогенности, необходимые для инфекции макрофагов человека, что заставляет по-новому взглянуть на эволюцию патогенности у сальмонелл.

4. Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в существенном расширении представлений о молекулярных основах взаимодействия в системе «бактерия-протист», особенностях метаболизма патогенных бактерий, способных

предотвращать свою гибель в фагосомах простейших, в получении свидетельств в пользу гипотезы о роли простейших как движущего фактора эволюции патогенных бактерий в природных микробных экосистемах. Полученные данные вносят вклад в экологическую микробиологию, эволюционную биологию и понимание механизмов персистенции патогенов.

Работа также имеет практическое значение, которое включает возможность дальнейшего использования полученных результатов, в том числе для разработки новых подходов к оценке выживаемости патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды; выявления новых молекулярных мишеней для контроля численности патогенных бактерий в экосистемах; подготовки учебных курсов и методических пособий для студентов по специальностям «Микробиология», «Эпидемиология», «Молекулярная биология».

5. Структура и содержание диссертации, ее завершенность, качество оформления

Диссертация А.С. Балкина изложена на 163 страницах машинописного текста, построена по классической схеме, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация характеризуется чрезвычайно подробным и хорошо структурированным обзором литературы. Диссертация хорошо иллюстрирована 5 таблицами и 16 рисунками, Список цитируемой литературы по теме диссертации включает 230 источников, из которых 2 - отечественные.

Структура работы является логичной и полностью соответствует поставленным цели и задачам.

Введение содержит четкое и убедительное обоснование актуальности темы исследования, основанное на глубоком анализе современного состояния проблемы. В разделе корректно сформулированы цель, задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Обзор литературы написан на высоком научном уровне, хорошо структурирован и демонстрирует свободное владение автором предметной областью. В обзоре подробно рассмотрены вопросы экологии сальмонелл, их взаимодействия с протистами, механизмов вирулентности и внутриклеточной адаптации.

Глава «Материалы и методы» содержит исчерпывающее описание всех объектов и методов исследования. Автором был применен широкий спектр современных методов: бактериологические, микроскопические (включая конфокальную микроскопию), молекулярно-генетические (ПЦР, клонирование, секвенирование), биоинформатические. Изложение методик позволяет в полной мере оценить корректность проведенных экспериментов и повторить их. Однако,

можно отметить, что раздел, посвященный методам секвенирования (в частности подготовка библиотек Carrrable-Seq), несколько избыточен по объему деталей, непосредственно не используемых в дальнейшем в логике собственного исследования автора. Тем не менее, это не умаляет общей ценности главы.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из трех логически связанных частей, соответствующих решаемым задачам. Вначале описана разработка и оптимизация модели взаимодействия бактерий и амёб, что является критически важным фундаментом для всего последующего исследования. Далее подробно и наглядно, с использованием большого количества иллюстраций и таблиц, представлены результаты по популяционной динамике и транскриптомному анализу. Автор не просто констатирует полученные данные, но и проводит их глубокое обсуждение, сравнивая с результатами других научных групп, работавших с клетками млекопитающих. Кульминацией работы является построение комплексной модели инфекционного процесса, интегрирующей все полученные данные.

Диссертация является завершённым, целостным научным исследованием. Все поставленные задачи решены, а цель работы достигнута. Качество оформления работы высокое: текст написан грамотным научным языком, иллюстративный материал четкий и информативный, библиографический список полный и соответствует современному уровню развития науки.

6. Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертации А.С. Балкина исчерпывающе представлены в 7 печатных работах, в том числе в 3 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами Web of Science или Scopus, 1 работе в научных изданиях из перечня ВАК, и 3 работах в научных изданиях, индексируемых в РИНЦ.

7. Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в полной мере отражает основные положения диссертации.

8. Соответствие специальности

Рассматриваемая диссертационная работа Балкина А.С. соответствует паспорту научной специальности 1.5.11. «Микробиология», (биологические науки), п. 5. Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов.

9. Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы

Диссертационная работа А.С. Балкина обладает рядом несомненных достоинств. К ним относятся, актуальность темы в рамках изучения экологии патогенных микроорганизмов и механизмов их циркуляции в природных экосистемах как способа мониторинга формирования высококовирулентных видов и штаммов в природных условиях, направленного на предотвращение появления новых эмерджентных инфекций; комплексный и современный методический подход, включающий широкий спектр методов: от классической микробиологии до самых современных технологий NGS-секвенирования (Cappable-Seq) и биоинформатического анализа; всесторонняя характеристика изучаемого процесса, достигнутая благодаря грамотному сочетанию методов исследования. Полученные данные имеют существенную научную новизну и вносят значительный вклад в микробную экологию, выявляя ранее неизвестные адаптационные стратегии бактерий.

Достоинством непосредственно диссертации является глубокий сравнительный анализ данных, полученных автором при изучении взаимодействия сальмонелл с амебами, с результатами, полученными на моделях клеток млекопитающих, что позволяет выявить как общие закономерности, так и специфические особенности изучаемого взаимодействия. Стоит отметить логическую завершенность и целостность работы. Все этапы исследования логически взаимосвязаны и подчинены достижению поставленной цели. Работа представляет собой законченное научное исследование.

Диссертация хорошо структурирована, написана четким научным языком. Результаты работы прошли широкую апробацию на международных и всероссийских конференциях и опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых журналах.

Существенных недостатков у работы не выявлено. Из формальных замечаний нужно отметить, что оформление списка литературы не соответствует ГОСТ Р 7.0.100–2018. Есть также ряд мелких замечаний. В разделе «Обзор литературы» можно было бы более подробно осветить вклад отечественных исследователей в изучение взаимодействия бактерий с простейшими, хотя общая глубина анализа литературы не вызывает нареканий. В разделе результаты рисунки 7 и 8 в автореферате довольно малы, что затрудняет восприятие отдельных значений экспрессии генов.

Вместе с тем, перечисленные замечания не являются принципиальными и не влияют на общую высокую оценку работы.

Оценка научной работы соискателя в целом:

Научная работа А.С. Балкина является самостоятельным, законченным и целостным исследованием. Соискатель продемонстрировал глубокие теоретические знания, высокую квалификацию и владение современным арсеналом экспериментальных и аналитических методов. Прделанный объем работы

является значительным и полностью соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Личный вклад автора во все этапы исследования является определяющим.

Вопросы к соискателю:

Первый вопрос касается оценки автором потенциального эффекта гентамицина на метаболизм бактерий на поздних стадиях взаимодействия. Автор использует гентамицин для устранения внеклеточных бактерий, что является стандартным подходом при работе в клеточными культурами и достаточно широко используется при исследования взаимодействия бактерий с простейшими. Однако на поздних этапах культивирования возможно частичное накопление гентамицина внутри клеток. Автор обсуждает такую возможность, что свидетельствует о понимании им недостатков данного подхода. Для уменьшения попадания гентамицина в клетки в результате пино- и фагоцитоза можно было бы использовать цитохалазин. Альтернативно, после первичной отмывки внеклеточных бактерий, от бактерий, вышедших из разрушенных простейших, можно было избавляться на поздних этапах, непосредственно перед сбором внутриклеточных бактерий. Вопрос касается того, рассматривал ли автор такие варианты, и вторая часть вопроса, - это существует ли информация как субингибирующие концентрации гентамицина влияют на метаболизм сальмонелл.

Второй вопрос касается усиления экспрессии флагеллярного аппарата внутриклеточных сальмонелл. Какие сигналы, по мнению автора, могли стимулировать такой эффект? Какую роль может играть флагеллярный аппарат в адаптации сальмонелл к внутриклеточному пространству?

На Ваш взгляд, могут ли выявленные Вами особенности транскриптомного ответа (например, подавление ЦТК и активация глиоксилатного шунта) быть универсальным механизмом выживания сальмонелл в различных типах протистов, или же это специфично именно для взаимодействия с *A. castellanii*?

Встречались ли Вам в процессе анализа данные, которые могли бы указывать на возможный горизонтальный перенос генов между амёбой и сальмонеллой в изученной системе?

Заключение

Диссертационная работа Балкина Александра Сергеевича по теме «Популяционная динамика и транскриптомный ответ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba castellanii*» является самостоятельной, завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи установления молекулярных механизмов адаптации патогенных бактерий на модели сальмонелл к внутриклеточному пространству бактериоядных амёб, имеющей важное значение для развития микробной экологии и микробиологии в целом. Содержащиеся в работе результаты и выводы свидетельствуют о наличии у автора необходимых

знаний и квалификации для ведения научно-исследовательской деятельности на высоком профессиональном уровне.

Работа полностью соответствует требованиям п. 9-14 Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки), а ее автор, Балкин Александр Сергеевич, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук.

Официальный оппонент, доктор биологических наук (03.02.03 Микробиология, 03.02.07 Генетика), Заведующий лабораторией экологии возбудителей инфекций федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.18; Тел.: +7-499-190-4375; E-mail: drermolaeva@mail.ru



Ермолаева Светлана Александровна
10.09.2025 г.

Личную подпись д.б.н. зав. лаб. ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России С.А. Ермолаевой заверяю:

Ученый секретарь
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России



к.б.н. Сысолятина Е.В.