

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Скарлато Сергея Орестовича на диссертационную работу **Балкина Александра Сергеевича** на тему: **«ПОПУЛЯЦИОННАЯ ДИНАМИКА И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ОТВЕТ *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ СВОБОДНОЖИВУЩИМИ ПРОТИСТАМИ *ACANTHAMOEBA CASTELLANI*»**,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки)

Актуальность избранной темы

Диссертационная работа Александра Сергеевича Балкина посвящена важной и весьма актуальной для современной микробиологии и протистологии теме: изучению взаимодействия между сальмонеллами (бактериями, вызывающими гастроэнтериты человека и животных) и гетеротрофными протистами, некоторые виды которых являются резервуарами этих опасных прокариотных патогенов в природе. Следует сразу отметить, что по актуальности избранной темы, масштабу и объему выполненных работ, степени обоснованности научных положений, новизне и достоверности полученных результатов, а также фундаментальной и практической значимости сделанных выводов исследование А.С. Балкина – незаурядное событие в отечественной микробиологической науке.

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

Степень достоверности и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается значительным объемом проведенных исследований и репрезентативностью выборок экспериментального материала, использованием комплекса лабораторных методов и корректной статистической обработкой данных с применением специализированного программного обеспечения. Основные положения, выводы и рекомендации, сформулированные автором, обоснованы и отражают проведенные исследования.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертация А.С. Балкина представляет собой фундаментальное исследование, которое является результатом большой тщательной работы. Диссертацию отличает высокий методический уровень, системность и скрупулезность полученных результатов, достоверность которых не вызывает сомнений. Выводы полностью соответствуют поставленной цели и задачам работы. Можно с уверенностью утверждать, что диссертация выполнена в лучших традициях отечественной микробиологической школы.

Как уже было отмечено выше, результаты представленной работы имеют в равной степени фундаментальное и прикладное значение. Полагаю, что их следует использовать при подготовке курсов лекций и практических занятий по общей и частной микробиологии, протистологии, экологии, молекулярной и клеточной биологии в университетах и медицинских учреждениях России.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом, качества оформления

В целом диссертация А.С. Балкина построена по традиционному плану и состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы (включает 230 источников, в том числе 228 работ на иностранных языках) и списка работ автора, опубликованных по теме диссертации. Текст диссертации, изложенный на 163 страницах, полно и наглядно проиллюстрирован 16 рисунками высокого качества и 5 содержательными таблицами. Подписи к рисункам достаточно информативны, а список литературы оформлен аккуратно и в соответствии с действующими библиографическими правилами и стандартами. Из ознакомления со списком цитированных работ следует, что автор привлек к обсуждению в тексте диссертации разумно сбалансированное количество классических и самых последних научных исследований в рассматриваемой области микробиологии.

Во **Введении** автор убедительно аргументирует актуальность выбранной темы и четко формулирует цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту. Кратко, но убедительно изложены основные результаты, которые были получены диссертантом впервые. Отдельно отмечены ключевые моменты теоретической и практической значимости работы. Здесь уместно отметить, что в работе А.С. Балкина находит подтверждение гипотеза о том, что взаимодействие сальмонелл с протистами служит своеобразной «тренировкой» в поддержании вирулентности этих бактериальных патогенов в окружающей среде.

В **Главе 1 (обзор литературы)** представлены базовые данные о системе, распространении, биологии, практическом значении бактерий *Salmonella*, а также об экспрессии ключевых генов и белков у представителей этого рода как во внешней среде, так и в клетках различных организмов, включая протистов. Специальное внимание было уделено особенностям метаболизма и функционирования систем патогенности в процессе инфекции сальмонелл. Знакомство с этой главой позволяет заключить, что А.С. Балкин является сложившимся, эрудированным и хорошо подготовленным в теоретическом плане специалистом, способным самостоятельно планировать и проводить сложные мультидисциплинарные исследования, решая при этом ответственные научные задачи.

В **Главе 2 (материалы и методы исследования)** приведено подробное описание объектов исследования, схем экспериментов, использованных традиционных и современных бактериологических, микроскопических и молекулярно-генетических методов исследования, а также алгоритмов анализа полученных результатов. Специально следует отметить, что диссертантом был впервые применен новаторский подход к решению проблемы селективного обогащения первичных транскриптов мРНК сальмонелл с помощью метода Capable-Seq. Статистическая обработка данных выполнена с помощью надлежащих пакетов программ. В целом, эта глава не оставляет сомнений в том, что диссертация выполнена на высоком методическом уровне, а использованные подходы и приемы адекватны поставленным задачам.

В **Главе 3** представлены убедительные доказательства разработки оптимальной модели сокультивирования амёб *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) с вирулентным штаммом сальмонеллы *S. enterica* serovar Typhimurium 14028s, с которой стало возможным проведение успешных экспериментов, запланированных в ходе выполнения диссертации. В частности, разработанная модель оказалась адекватной для оценки экспрессии генов сальмонелл на различных сроках взаимодействия с амёбами методами транскриптомного анализа и ПЦР в режиме реального времени.

В **Главе 4** изложены результаты изучения транскриптома сальмонелл на ранней стадии взаимодействия с протистами *Acanthamoeba castellanii*. Так, диссертантом было убедительно показано подавление экспрессии генов цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования, и, напротив, активация генов глиоксилатного цикла, системы хемотаксиса, биосинтеза жгутикового аппарата и некоторых других. В результате автору удалось получить приоритетные данные, доказывающие существование специфичных для сальмонелл паттернов метаболизма и вирулентности, которые необходимы для внутриклеточного выживания этих бактерий в клетках протистов и высших эукариот.

В **Главе 5** изучена динамика экспрессии генов *Salmonella* Typhimurium на различных этапах инфекции *Acanthamoeba castellanii*. К безусловной заслуге автора следует отнести создание модели, отражающей поэтапное заражение акантамеб сальмонеллами. При этом удалось выяснить, участие каких генов определяет успешность выживания сальмонелл в клетках акантамеб, а также снижение экспрессии каких других ключевых генов может свидетельствовать об адаптации сальмонелл к внутриклеточным условиям внутри протиста.

В разделе **Заключение** автор демонстрирует умение делать реалистичные обобщения и давать адекватные оценки выполненным экспериментам, а также высказывает смелые суждения. Так, была экспериментально подтверждена резервуарная роль акантамеб, впервые осуществлена оценка полного транскриптома сальмонелл при фагоцитозе свободноживущими протистами с использованием высокопроизводительного секвенирования. На основе этих транскриптомных данных сальмонелл на ранней стадии инфекции акантамеб была выполнена реконструкция основных метаболических и функциональных систем *Salmonella* Typhimurium, принимающих участие в инфекции *A. castellanii*. В целом, в этом разделе рельефно представлена научная новизна всей работы. Некоторые же уникальные наблюдения и выводы диссертанта требуют дальнейшего углубленного осмысления и широкого обсуждения в контексте общих представлений о резервуарной роли свободноживущих протистов для патогенных бактерий.

Выводы сформулированы достаточно четко и конкретно, хотя местами и несколько многословно. Они полностью отражают основные достижения А.С. Балкина, соответствуют цели и задачам диссертации, дают исчерпывающие ответы на поставленные в ней вопросы. Основные положения, вынесенные на защиту, можно считать доказанными.

В главе **Перспективы** дальнейшей разработки темы приведены 4 направления исследований, которые представляются А.С. Балкину наиболее перспективными.

Учитывая теоретическую и практическую значимость сформулированных направлений, можно согласиться с этим выбором диссертанта и признать эти исследования весьма актуальными.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Полученные автором результаты полностью отражены в 7 печатных работах, которые были опубликованы в рецензируемых профильных отечественных и международных изданиях высокого уровня. В том числе, 3 статьи были опубликованы в журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus, а одна из них вышла в журнале категории Q1. Результаты диссертации были успешно апробированы на 6 престижных научных конференциях высокого уровня, включая VIII Европейский конгресс по протистологии (Рим, 2019). На этом конгрессе мне довелось лично наблюдать и оценить тот интерес и положительный отклик коллег, который вызвал доклад А.С. Балкина. Исследования по диссертации проводились в рамках плановых тем государственного задания для Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН и при поддержке грантов РФФИ и РНФ.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертации, а сама диссертация, несомненно, соответствует выбранной специальности – 1.5.11. Микробиология (биологические науки).

Замечания и вопросы

Возражений принципиального характера, касающихся материала диссертации, методической стороны, качества наблюдений, сути и техники экспериментов, а также обсуждения результатов не возникает. В целом, работа выполнена на высоком уровне, грамотно и современно. Однако все же следует в порядке дискуссии задать ряд вопросов и сделать несколько частных замечаний.

В диссертации убедительно показана способность сальмонелл длительное время занимать внутриклеточную нишу в акантамебах, которые фактически выполняют функцию переносчика (промежуточного резервуара) этого бактериального патогена в широкий круг хозяев, включая человека. Вместе с тем, как выяснилось, сальмонеллы проявляют только слабо выраженный цитотоксический эффект в отношении этих амёб, который, тем не менее, усиливается в ходе последующего размножения сальмонелл. В этой связи можно ли полагать, что в данном случае наблюдаются первые этапы установления симбиотических отношений между акантамебами и сальмонеллами? Результаты исследования А.С. Балкина позволяют, на мой взгляд, более детально обсудить эту важную проблему, чем это сделано в работе.

Представленная работа, как справедливо отмечает автор, открывает перспективы для разработки принципиально новых стратегий контроля сальмонелл в окружающей среде. Можно ли уже сейчас, хотя бы в общих чертах, наметить, какие именно «новые стратегии» автор имеет в виду?

Для меня оказалось несколько неожиданным, что у сальмонелл внутри акантамеб была снижена экспрессия генов, кодирующих целое семейство белков

теплового шока и некоторых других белков стресса. Хотелось бы узнать, имеются ли у автора какие-либо объяснения этого явления?

На стр. 13 диссертации написано, что род *Salmonella* включает два вида, *Salmonella bongori* и *Salmonella enterica*. Отмечу, что недавно был выделен третий вид сальмонелл – *Salmonella subterranea* из ураново-загрязненных подземных отложений.

С моей точки зрения диссертацию можно было бы снабдить большим числом иллюстраций (микрофотографий). Несмотря на то, что исследование выполнено преимущественно молекулярно-генетическими методами, дополнительные фотографии объектов исследования оживили бы и украсили работу. Полагаю, что такие фотографии у диссертанта, несомненно, имеются.

На странице 10 диссертации и странице 4 автореферата неверно указан год проведения VIII Европейского конгресса по протистологии. Он состоялся в Риме в 2019 г., а не 2018 г., как написано автором. Кроме того, в **списке работ**, опубликованных по теме диссертации, отсутствуют тезисы доклада А.С. Балкина на этом конгрессе, которые напрямую касаются темы представленной работы.

В подписи к рис. 3.1 (стр. 64 диссертации) и к рис. 1 (стр. 9 автореферата) на графике перепутаны названия осей.

На рис. 3.2 (стр. 66 диссертации) и рис. 2 (стр. 10 автореферата) микрофотография (изображение) помечена буквой «В», а в соответствующей подписи использована буква «Б».

На рис. 3.5 (стр. 71 диссертации) отсутствуют обозначения (А, В, Д) и (Б, Г, Е), приведенные в подписи к этому рисунку.

Рис. 5.4 (стр. 114 диссертации) неверно обозначен как рис. 5.3. Настоящий рис. 5.3 представлен на стр. 106.

При написании длинных и сложных фраз не всегда соблюдены правила согласования отдельных ее сегментов.

Во многих местах диссертации и автореферата ссылки на цитированные работы расположены не в порядке возрастания годов этих работ, а в разнорядной (см. напр., стр. 5, 6, 94 и др. диссертации и стр. 3 автореферата).

В тексте диссертации отсутствует унификация в отношении использования некоторых сокращений. Так, в одном случае применены обозначения «часы» и «минуты», и тут же, рядом идут сокращения «ч» и «мин» (см. напр., стр. 52 и 53).

Сделанные замечания, однако, больше относятся к форме подачи материала, а не к существу проделанной работы. Они носят частный характер и не снижают высокого качества представленной к защите кандидатской диссертации.

Диссертация написана интеллектуально насыщенным и, вместе с тем, легким для восприятия языком. Стилистические огрехи и опечатки редки. Описание сложных методических приемов и результатов читается гладко и с интересом, при этом создается объемное представление о сути проблемы, материале, полученных результатах и практическом значении исследования.

Заканчивая отзыв, резюмирую: диссертация Балкина Александра Сергеевича «Популяционная динамика и транскриптомный ответ *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba*

castellanii», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки), является самостоятельной, завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной проблемы взаимодействия патогенных бактерий и свободноживущих амeboидных эукариот, что имеет существенное значение для фундаментальной микробиологии и практической медицины.

Таким образом, диссертационная работа Балкина Александра Сергеевича «Популяционная динамика и транскриптомный ответ *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba castellanii*» полностью соответствует требованиям п.п. 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 Балкин Александр Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Скарлато Сергей Орестович

доктор биологических наук по специальности 03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией цитологии одноклеточных организмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН), Тихорецкий проспект, дом 4, г. Санкт-Петербург, 194064 Интернет сайт организации: <https://www.incras.ru/> Телефон: +7 (921) 345-22-35 Электронная почта: sergei.skarlato@mail.ru

27.08.2025 г.

Подпись доктора биологических наук, главного научного сотрудника, заведующего лабораторией цитологии одноклеточных организмов ИНЦ РАН
С.О. Скарлато заверяю.

Начальник отдела кадров
27.08.2025 г.



Соловьева Раиса Викторовна