



L. PASTEUR

Федеральное бюджетное учреждение науки
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ
им. ПАСТЕРА»

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека
(ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии
имени Пастера)

197101, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14

Телефон (812) 233-20-92, (812) 644-63-17

Факс (812) 644-63-10

E-mail: pasteur@pasteurorg.ru

<http://pasteurorg.ru>

ОКПО 01967164, ОГРН 001037828006314

ИНН/КПП 7813047047/781301001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор
Федерального бюджетного учреждения
науки «Санкт-Петербургский научно-
исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им.
Пастера» Федеральной службы по
надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека

д.м.н., профессор, академик РАН

А. А. Тотолян



2025 г.

24.09.2025 N 1283-25

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Балкина Александра Сергеевича по теме
«Популяционная динамика и транскриптомный ответ *Salmonella enterica* serovar
Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими
протистами *Acanthamoeba castellanii*»,

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки) в совет по защите диссертаций 24.1.445.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

Актуальность избранной темы

Экологическая и эпидемиологическая значимость сальмонелл определяется тем, что они относятся к энтеробактериям, которые способны заражать широкий круг хозяев, включая рептилий, птиц, млекопитающих, человека, и обладают высокой адаптационной способностью выживания во внешней среде и в свободно живущих протистах. Важным является наличие у сальмонелл способности не только выживать, но размножаться в фагосомах эукариот (Amaro F., Martín-González A., 2021). Для этого бактерии выработали уникальную стратегию адаптации, включающую морфологические изменения, повышенную подвижность, биопленкообразование, секрецию токсичных метаболитов и устойчивость к лизосомальному перевариванию (Zhang J. et al., 2014). Поэтому некоторые протисты являются резервуаром сохранения сальмонелл во внешней среде и в условиях такого сосуществования возможно усиление вирулентности и антибиотикоустойчивости бактерий, что создает условия для поддержания эпидемиологической напряженности в отношении данного вида энтеробактерий (Moreno-Mesonero L. et al., 2020). Обращает

внимание, что выработанные сальмонеллами механизмы защиты от переваривания со стороны протистов, используются ими при инфицировании млекопитающих и человека с развитием инфекционного процесса в той или иной форме (острая, хроническая инфекция, бактерионосительство). Это обосновывает актуальность исследований взаимодействия между сальмонеллами и простейшими как модели, позволяющей разрабатывать эффективные способы профилактики и борьбы с сальмонеллезом человека и животных.

На сегодняшний день имеются единичные работы, посвященные изучению механизмов взаимодействия патогенных бактерий, в частности сальмонелл, и свободноживущих протистов, глобальной экспрессии генов сальмонелл внутри фагосом, а также появлению современных методов для эффективного изучения транскриптомов бактерий внутри различных хозяев.

Все вышеизложенное позволяет считать актуальной тему диссертационной работы А.С. Балкина, посвященную анализу популяционных взаимодействий и глобальной экспрессии генов энтеропатогенных бактерий *Salmonella enterica* serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba castellanii*, результаты которой могут быть использованы для разработки принципиально новых стратегий контроля сальмонелл в окружающей среде, обеспечивающих повышение безопасности воды и пищевых продуктов и профилактику инфекционных заболеваний.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна диссертационного исследования заключается в том, что в работе впервые проведен полнотранскриптомный анализ экспрессии генов сальмонелл при фагоцитозе акантамеб с использованием высокопроизводительного секвенирования (NGS). Впервые оценена динамика экспрессии генов сальмонелл, отвечающих за метаболизм, окислительный стресс, системы вирулентности, ингибиторов лизоцима и хемотаксис сальмонелл внутри *Acanthamoeba castellanii* в ключевых точках их взаимодействия. Необходимо отметить, что в работе А.С. Балкина впервые наглядно и обоснованно представлены данные об уникальных способностях сальмонелл выживать и сохраняться в простейших, регулируя вирулентный потенциал посредством активации генов первого островка патогенности сальмонелл, а также жгутикового аппарата и хемотаксиса при фагоцитозе простейшими.

Значимость для развития соответствующей отрасли науки результатов, полученных автором диссертации

Результаты исследования вносят весомый вклад в фундаментальное понимание экологии, эволюции и механизмов выживания сальмонелл, раскрывая их сложные взаимодействия с простейшими как ключевым фактором экологической устойчивости. Данные о схожести арсенала вирулентности, используемого для противодействия фагоцитоза амебами и профессиональными фагоцитами, дополняют гипотезу о том, что взаимодействие с простейшими служит «тренировкой» и поддерживает вирулентный потенциал сальмонелл в окружающей среде. Успешное применение метода Capable-Seq для анализа транскриптома внутриклеточных бактерий при взаимодействии с немодельными эукариотами (*A. castellanii*), для которых затруднено удаление рибосомальной РНК хозяина, открывает новые возможности для изучения симбиотических (включая патогенные) взаимодействий бактерий с широким кругом эукариот. Практическая значимость заключается в открытии перспектив для разработки принципиально новых стратегий контроля сальмонелл в окружающей среде, направленных на разрыв звена «патоген-простейшее», что необходимо для повышения безопасности воды, пищевых продуктов и профилактики заболеваний.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения, выносимые на защиту, сформулированные выводы и предлагаемые рекомендации базируются на результатах диссертационного исследования. Все этапы экспериментальной работы изложены в тексте диссертации доступно и в полной мере, в связи с чем достоверность результатов не вызывает сомнений. Таким образом, положения, выносимые на защиту, аргументированы, выводы подтверждены экспериментальными данными и соответствуют поставленной цели, задачам исследования, содержанию представленной работы.

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикаций в рецензируемых журналах

Степень достоверности результатов, полученных при проведении исследования, подтверждается тем, что все экспериментальные исследования проведены в необходимых биологических повторностях, с использованием современных бактериологических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов на сертифицированном оборудовании. Для проведения биоинформатического и статистического анализов использовались актуальные программы и алгоритмы, рекомендованные для конкретного типа полученных данных. Первичная научная документация проверена комиссией (акт проверки от 30.04.2025 г.).

Диссертационное исследование выполнено в рамках тем государственного задания Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уро РАН и грантов научных фондов. Темы государственного задания: «Симбиотические системы эукариот различного эволюционного уровня с прокариотами, и их значение в медицине и экологии» (№ гос. регистрации АААА-А19-119011890039-8); «Симбиотические системы эукариот различного эволюционного уровня с прокариотами, и их значение в медицине и экологии» (№ гос. регистрации 0334-2019-0010). Фрагменты исследования выполнены в рамках проектов, поддержанных грантами РФФИ №19–315–50031 и РНФ № 22-14-00317.

Материалы диссертационной работы были доложены на: международной конференции «XVII International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-living Amoebae» (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 (Рим, 2018) – стендовый доклад; 39-й конференции немецкого протистологического общества (Кайзерслаутерн, 2020) – стендовый доклад; X Российской научной конференции с международным участием посвященной 300-летию Российской академии наук, Десятилетию науки и технологии (Оренбург, 2023) – устный доклад. Апробация работы состоялась 5 июня 2025 г. на заседании Ученого совета ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (протокол № 7 от 05.06.2025 г.).

По теме диссертации опубликовано опубликовано 7 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами Web of Science или Scopus (Scopus Q1, WOS Q1; Scopus Q2, WOS Q3; Scopus Q3, WOS Q4); 1 работа в научных изданиях из перечня ВАК, 3 работы в научных изданиях, индексируемых в РИНЦ.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационной работы А.С. Балкина вносят весомый вклад в фундаментальное понимание экологии, эволюции и механизмов выживания сальмонелл, раскрывая их сложные взаимодействия с простейшими как ключевым фактором

экологической устойчивости. Материалы работы, позволившие установить схожесть арсенала вирулентности сальмонелл, обеспечивающих выживание их при фагоцитозе в амебах и профессиональных фагоцитах, дополняют гипотезу о том, что взаимодействие с простейшими служит «тренировкой» и поддерживает вирулентный потенциал сальмонелл в окружающей среде. Применение метода Carvable-Seq для анализа транскриптома внутриклеточных бактерий при взаимодействии с немодельными эукариотами (*A. castellanii*), для которых затруднено удаление рибосомальной РНК хозяина, открывает новые возможности для изучения симбиотических (включая патогенные) взаимодействий бактерий с широким кругом эукариот. Полученные диссертантом результаты открывают перспективы для разработки новых стратегий контроля сальмонелл в окружающей среде, направленных на разрыв звена «патоген-простейшее», что может способствовать повышению безопасности воды, пищевых продуктов и профилактики заболеваний.

Соответствие специальности

Диссертационная работа Балкина Александра Сергеевича «Популяционная динамика и транскриптомный ответ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba castellanii*» соответствует паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки) и критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Формулирование основной идеи, планирование работы, формулировка цели и задач, определение методологии и общей концепции, выбор методов исследования, проведение экспериментов, анализ полученных данных, проводились лично А.С. Балкиным или при его непосредственном участии. Написание и оформление статей проводилось соискателем совместно с научным руководителем. Получение и интерпретация экспериментальных данных, анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации осуществлялось А.С. Балкиным лично.

Содержание и оформление диссертационной работы, общая оценка диссертации

Диссертация состоит из следующих основных разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследований», «Результаты собственных исследований», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», включающий 230 источников. Работу иллюстрируют 16 рисунков, 5 таблиц. Общий объем диссертации составляет 163 страницы.

В обзоре литературы проанализированы научные источники информации по теме диссертации: показано, что, несмотря на современные методы диагностики, лечения и профилактики, повсеместно сальмонеллез остается наиболее распространенной зоонозной инфекцией среди людей и животных. Одной из причин неэффективной борьбы с данной инфекцией является существование многочисленного числа сероваров сальмонелл и их уникальные свойства, позволяющие достаточно легко адаптироваться к изменениям внешней среды, реализуя стратегию выживания в свободноживущих протистах, а также в фагоцитарных клетках человека и животных, обеспечивая тем самым ускользание/нейтрализацию факторов врожденного иммунитета. В обзоре представлены современные данные о патогенном и персистентном потенциале сальмонелл, о функциональных системах и клеточных структурах, участвующих во взаимодействии сальмонелл с клеткой хозяина посредством регуляции экспрессии генов репликации бактерий, транспортных систем, устойчивости к окислительному стрессу. Показано, что помимо эпителиальных клеток и макрофагов, сальмонеллы способны колонизировать

нейтрофилы, дендритные клетки и выживать в них, осуществляя метаболическое перепрограммирование, что существенно усиливает их адаптационный потенциал. Особое внимание уделено анализу механизмов размножения энтеробактерий внутри или в присутствии простейших, широко распространенных в естественных и антропогенных системах, что способствует увеличению численности патогенов. Показано, что свободноживущие простейшие могут выступать в качестве резервуара и носителя бактерий, обеспечивая защиту от воздействия антимикробных агентов и, вследствие подвижности простейших, бактерии могут распространяться во внешней среде. Значимость сосуществования сальмонелл в простейших подчеркивается тем, что некоторые виды простейших служат своеобразной «генетической фабрикой», где происходит горизонтальный перенос генов, что приводит к образованию новых бактериальных фенотипов с усиленной вирулентностью. В заключении обзора литературы автором подчеркивается, что несмотря на обширные литературные данные, большая часть механизмов адаптации сальмонелл к условиям внутри клеток простейших остаются неясны, особенно вопросы состояния глобального транскриптома сальмонелл внутри клеток простейших на ранней стадии инфекции и динамика экспрессии отдельных функциональных групп генов на различных этапах инфекции, что в конечном итоге может помочь раскрыть механизмы выживания сальмонелл внутри акантамеб и позволит подтвердить участие островков патогенности, факторов ответа на окислительный стресс, транспорта железа при инфекции различных хозяев, а также выявить специфические особенности экспрессии генов сальмонелл внутри простейших.

В 2 главе представлены объекты исследования, подробно и в полном объеме описаны методология и современные методы исследования, включая молекулярно-генетические, подготовку библиотек для секвенирования, количественную ПЦР в режиме реального времени, биоинформатический анализ данных.

В 3 главе представлены собственные результаты по разработке модели взаимодействия *Acanthamoeba castellanii* с бактериями *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028S, включая анализ динамики жизнеспособности и численности сальмонелл и акантамеб в чистой культуре и при модельной инфекции; подбор оптимальной среды культивирования и определение параметров заражения амев для оценки экспрессии генов на ранних этапах взаимодействия; анализ динамики численности амев и оценку соотношения жизнеспособных и мертвых клеток при длительном сокультивировании с сальмонеллами; анализ динамики численности жизнеспособных сальмонелл при совместном культивировании с амебами на различных сроках инфекции. Заканчивается глава обсуждением результатов на основе сравнения с имеющимися современными литературными сведениями.

Глава 4 посвящена изучению транскриптома сальмонелл на ранней стадии взаимодействия с *Acanthamoeba castellanii* на основе представления следующих данных: характеристика транскриптомных библиотек и результатов картирования прочтений; транскрипционный профиль сальмонелл внутри фагосом акантамеб; особенности экспрессии генов метаболических путей и функциональных групп генов сальмонелл; экспрессия генов сальмонелл, кодирующих захват железа и ответ на стресс, а также генов патогенности и вирулентности. В данной главе приводятся также результаты ПЦР в режиме реального времени по анализу экспрессии отдельных генов сальмонелл при инфекции *Acanthamoeba castellanii*. 4 глава, аналогично третьей, заканчивается обсуждением результатов исследования.

Глава 5 является логическим продолжением предыдущей главы и посвящена анализу динамики экспрессии генов *Salmonella enterica* serovar Typhimurium на различных этапах инфекции *Acanthamoeba castellanii*. Глава включает материалы по анализу динамики экспрессии генов метаболизма углерода, захвата железа, ответа на окислительный стресс, факторов патогенности, ингибиторов лизоцима и хемотаксиса

методом количественной ПЦР в реальном времени. При обсуждении материалов главы автором анализируются динамика экспрессии генов гликолиза и глиоксилатного цикла, регуляция генов захвата железа и ответа на окислительный стресс на различных сроках инфекции акантамеб, особенности экспрессии генов патогенности и вирулентности сальмонелл на различных сроках инфекции, а также экспрессия генов хемотаксиса и ингибиторов лизоцима при инфекции указанного вида простейших.

В заключении автором проведен анализ полученных данных и их сопоставление с литературными источниками отечественных и зарубежных авторов.

Выводы научно обоснованы, соответствуют поставленной цели, задачам исследования и в полной мере отражают результаты собственных исследований автора.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат оформлен согласно требованиям (ГОСТ 7.0.11-2011) и полностью отражает все необходимые разделы и основные положения, сформулированные в диссертации.

Замечания и вопросы по диссертации

1. Хотелось бы узнать мнение автора относительно эпидемиологической значимости выявленных механизмов взаимодействия сальмонелл и *Acanthamoeba castellanii* в отношении сальмонеллезной инфекции у людей, принимая во внимание быстрое снижение численности сальмонелл в акантамебах, определенное автором при их совместном культивировании.

2. Каким образом проводился подбор антибиотика для совместного культивирования сальмонелл и акантамеб? Почему был выбран препарат из группы аминогликозидов, учитывая, что механизм действия аминогликозидов (нарушение рибосомального синтеза белка) мог повлиять на результат экспрессии генов сальмонелл, в том числе изучаемых автором?

3. По мнению автора, является ли адаптационный потенциал к выживанию во внешней среде уникальным для микроорганизмов рода *Salmonella*, учитывая, что основным резервуаром и источником этих бактерий являются животные?

4. Считает ли автор возможным симбиотическое сосуществование внутри акантамеб бактерий разных видов, и какое эпидемиологическое значение может иметь такой симбиоз?

Заключение

Диссертационная работа 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 завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи по изучению популяционного взаимодействия и глобальной экспрессии генов энтеропатогенных бактерий *Salmonella enterica* serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba castellanii* на ранних стадиях инфекции, что имеет существенное значение для микробиологии.

Таким образом, диссертационная работа Балкина Александра Сергеевича «Популяционная динамика и транскриптомный ответ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba castellanii*» 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 Балкин А.С. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Отзыв на диссертационную работу Балкина Александра Сергеевича «Популяционная динамика и транскриптомный ответ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba castellanii*», составлен доктором медицинских наук (1.5.11. Микробиология) Егоровой Светланой Александровной. Отзыв обсужден и одобрен на заседании Ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 07 от 24.09.2025 г.).



24.09.2025 г.

Егорова Светлана Александровна
доктор медицинских наук (1.5.11. Микробиология),
заместитель директора по инновационной работе,
заведующая лабораторией идентификации патогенов,
Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
197101, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14.
8 812 644-63-17
pasteur@pasteurorg.ru

Подпись руки Егоровой С.А.



ЗАВЕРЯЮ

Начальник отдела кадров
ФБУН НИИ эпидемиологии и
микробиологии имени Пастера



Л.В. Чебакова