

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Мардановой Айслу Миркасымовны на диссертационную работу Абдулкадиевой Марьям Махдиевны на тему «Анализ и потенциал использования паттернов приповерхностного движения бактерий в микрофлюидических системах», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки)

Актуальность темы диссертационной работы

Наличие или отсутствие подвижности является значимой характеристикой многих видов микроорганизмов. В последние годы интерес исследователей сосредоточен на детальном описании механизмов, позволяющих бактериям перемещаться в разных средах или на биотических и абиотических поверхностях, а также на поиске связи особенностей подвижности с приспособленностью к обитанию в различных экологических нишах, способностью колонизировать живые и неживые объекты, образовывать биопленки.

Основные модели, описывающие движение микроорганизмов, например, модель «пробег-кувырок», маятникообразное движение, известны уже десятки лет. Смена направления движения регулируется химическими сигналами. Для кишечной палочки известно, что частота смены траекторий зависит от концентрации аттрактанта в среде и связывания его с трансмембранными рецепторами, передающими сигнал на молекулярный мотор жгутика. Изменение концентрации и/или частоты раздражителя показало, что хемосенсорная система бактерий обладает чрезвычайной чувствительностью и гибкостью регулирования ответа. Механизмы регуляции движения, описанные на примере кишечной палочки, являются в высокой степени консервативными, но, тем не менее, установлено, что разные виды микроорганизмов, приспособленные к разным условиям обитания, обладают и дополнительными путями регулирования характеристик подвижности. Некоторые возбудители кишечных инфекций, например *L. monocytogenes*, сохраняют подвижность в условиях внешней среды, но утрачивают жгутики при переходе к жизни внутри организма теплокровных организмов. Однако даже те штаммы *L. monocytogenes*, которые теряют жгутики на

поздних стадиях инфекционного процесса, зависят от хемотаксиса и подвижности для первоначальной колонизации желудочно-кишечного тракта.

В этой связи исследование Абдулкадиевой М.М. по анализу характеристик подвижности и оценке их вклада в эффективность адгезии и инвазии сапрофитических и патогенных микроорганизмов на примере сапрофитического и патогенного штаммов кишечной палочки и 4 видов листерий представляется актуальным и фундаментальным.

Также перспективной представляется отработка технологии использования системы анализа паттернов подвижности микроорганизмов для оценки антибиотикочувствительности бактерий. Проблема антибиотикорезистентности среди патогенных и условно-патогенных бактерий является одной из основных проблем современной медицинской микробиологии. Частота распространения штаммов с множественной устойчивостью к антибиотикам, включая наиболее важные - *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* - в отдельных регионах мира, по данным ВОЗ, достигает 70-80 %. В свете этих цифр критически важным становится возможность быстрого выбора антибиотиков, которые могут быть эффективными в конкретном случае для конкретного пациента. Поиск новых подходов для создания быстрых, чувствительных и экономичных экспресс-систем для оценки антибиотикочувствительности клинических изолятов представляется актуальной задачей для специалистов в области медицинской микробиологии. В связи с вышесказанным описанный в диссертационной работе прототип системы анализа паттернов подвижности микроорганизмов для оценки антибиотикочувствительности бактерий представляется интересным и перспективным.

В этой связи, тема диссертационного исследования Абдулкадиевой Марьям Махдиевны на тему «Анализ и потенциал использования паттернов приповерхностного движения бактерий в микрофлюидических системах» решает важную практическую задачу и является, несомненно, актуальной.

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

Автором вынесены на защиту научные положения, которые касаются выявленных различий в паттернах подвижности штаммов *E. coli*, а именно:

энтерогеморрагического штамма ATCC 43890 и пробиотического штамма M17, обеспечивающие различия в паттернах колонизации поверхности эпителиальных клеток HEp-2. Установлено, что среди подвижных листерий четырех видов, имеющих сходные паттерны приповерхностного движения и рисунок адгезии, характеризующийся скоплением бактерий в местах межклеточных контактов, данный рисунок адгезии приводил к повышению эффективности инвазии в 8 раз для патогенного для человека и животных вида *L. monocytogenes*. Доказано, что разработанный прототип системы анализа паттернов подвижности бактерий позволяет детектировать изменения в характеристиках движения микроорганизмов под действием антибиотиков и тем самым дифференцировать чувствительные и резистентные штаммы.

Справедливость всех положений, выносимых на защиту, доказывается подбором адекватных экспериментальных подходов и набором количественных данных, которые были статистически обработаны с использованием значимых критериев достоверности. Объем проведенных исследований соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Выводы основаны на полученных результатах, соответствуют задачам и положениям диссертации. Практические рекомендации сформулированы на основе полученных в работе результатах.

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

Исследуя закономерности в характере приповерхностного движения бактерий, Абдулкадиева М.М. продемонстрировала на примере энтеропатогенного штамма *E. coli* ATCC43890 и пробиотического *E. coli* M17, что направленное коллективное движение сапрофитического штамма M17 в приповерхностном слое коррелировало с увеличением степени адгезии и формированием скоплений бактерий в межклеточном пространстве, что повышало эффективность колонизации биотической поверхности. Движение энтеропатогенного штамма ATCC43890 преимущественно в вертикальной плоскости и короткое время нахождения в слое могло быть связано с более успешным поиском рецепторов для взаимодействия с эукариотической клеткой и реализации патогенных свойств.

Соискателем было впервые установлено, что все 4 вида изученных в работе листерий (*L.monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*) имели сходные паттерны приповерхностного движения и высокие средние скорости (17-27 мкм/с), аналогичные паттернам подвижности штамма *E. coli* M17, что приводило к образованию скоплений бактерий в местах межклеточных контактов и увеличивало эффективность инвазии патогенного вида *L. monocytogenes* в клетки человека HEp-2 в 8 раз.

Абдулкадиевой Марьям Махдиевной в рамках указанной работы был разработан прототип системы анализа паттернов подвижности микроорганизмов и подобраны условия, в которых данную систему можно применять для оценки антибиотикорезистентности, а также для оценки подвижности микроорганизмов в средах с разной вязкостью и концентрацией бактерий.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в расширении представлений о вкладе подвижности в адгезивный и инвазивный потенциал патогенных бактерий. Так, установлено, что патогенные и сапрофитические штаммы кишечной палочки могут иметь разный характер движения вблизи поверхности, что может приводить к отличиям в уровне эффективной адгезии к пластику и эукариотическим клеткам. Для разных видов листерий, патогенных и непатогенных для человека и животных, выявлена связь между подвижностью и успешностью инвазии в клетки хозяев. Описание связи характеристик подвижности с адгезией и инвазией сапрофитических и патогенных штаммов и видов микроорганизмов является слабо развитым направлением микробиологии и биофизики движения, в связи с чем теоретическая значимость работы не вызывает сомнений.

Практическая значимость работы заключается в разработке прототипа анализа паттернов подвижности микроорганизмов вблизи поверхности, который может быть использован для разработки метода экспресс-диагностики чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, что было показано для *L. monocytogenes* и *P. aeruginosa*.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.11 Микробиология. Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 5 и 12 паспорта специальности «Микробиология».

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Материалы диссертации полно представлены в печати. Результаты диссертационной работы опубликованы в 2 статьях в рецензируемых журналах Scopus/WoS и рекомендованных ВАК для публикации к защите, 1 статье в журнале базы данных РИНЦ, а также в 8 тезисах в сборниках трудов конференций, в том числе 1 в международной. Весомый личный вклад соискателя подтверждается тем, что в обеих публикациях в рецензируемых журналах Scopus/WoS он является первым автором.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа Абдулкадиевой М.М. написана по классическому образцу, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы (214 источников, из которых отечественных публикаций – 1, иностранных публикаций – 213). Работа изложена на 120 страницах печатного текста, содержит 5 таблиц и 32 рисунка.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, характеризует новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов.

В «Обзоре литературы» (Глава 1) представлен четкий и лаконичный анализ современных публикаций, посвященных роли подвижности в экологии микроорганизмов и патогенезе инфекционных заболеваний, механизмам и регуляции подвижности, подробно рассматриваются современные данные об особенностях движения бактерий в различных пространствах и средах. В целом при написании «Обзора литературы» автором используется большой массив современной научной литературы и демонстрируются знания по теме

исследований. Обзор содержит информацию, необходимую для обсуждения полученных результатов.

В «Материалах и методах» (Глава 2) представлена подробная информация об используемых в работе штаммах микроорганизмов, методах по изучению подвижности, адгезии и инвазии бактерий, современных методах микроскопии. При выполнении работы использованы микробиологические, биологические, культуральные, микроскопические и статистические методы исследования.

Далее следует Глава 3 «Результаты собственных исследований», состоящая из 13 параграфов, в которых приведены основные результаты проведенных исследований. Диссертантом разработан прототип системы анализа паттернов приповерхностного движения бактерий и установлено, что он позволяет дифференцировать подвижные и неподвижные бактерии, выявить различия в характере движения бактерий, достоверно оценить влияние на подвижность бактерий вязкости растворов и концентрации клеток, детектировать даже незначительные изменения средних скоростей бактерий, что позволило провести эксперименты по детальному анализу паттернов движения разных микроорганизмов в зависимости от различных условий. Сравнительный анализ подвижности трех штаммов *E. coli* позволил выявить принципиальные различия в паттернах движения бактерий. Было показано, что эти штаммы с разной эффективностью адгезируют к пластику и эукариотическим клеткам (HEp-2). Получены данные по характеру приповерхностного движения патогенных и сапрофитических штаммов *Listeria* spp, охарактеризована адгезия штаммов *Listeria* на биотической и абиотической поверхностях. Установлено, что характер распределения подвижных и неподвижных штаммов *Listeria* на поверхности клеточной культуры при адгезии различается. Также было установлено, что подвижные листерии более эффективно инвазируют эукариотические клетки. Наконец, показано, что разработанная диссертантом система анализа подвижности бактерий может быть использована для экспресс-диагностики чувствительности к антибиотикам.

В Главе 4 «Обсуждение» М.М. Абдулкадиева подробно анализирует полученные результаты, сопоставляет их с имеющимися в литературе данными и делает выводы о том, что созданный диссертантом подход к анализу данных о

траекториях движения и коллективном поведении бактерий разных видов, позволяет оценить вклад паттернов движения в адгезивный и инвазивный потенциал бактерий, что важно для понимания патогенеза инфекций. Интересным представляется вывод о штаммоспецифических различиях в паттернах движения, что определяет разные стратегии бактерий одного вида при колонизации эукариотических клеток и развитии патологических процессов.

Закключение и выводы соответствуют поставленным задачам, согласуются с полученными результатами, обоснованы и корректны. Автореферат полностью отражает основные результаты и содержание диссертации.

Оценивая диссертационную работу М.М. Абдулкадиевой необходимо отметить, что работа написана хорошим научным языком, аккуратно оформлена, логично изложена и хорошо иллюстрирована.

Однако хотелось бы высказать некоторые **замечания и пожелания**:

- 1) В работе встречаются опечатки различных типов, орфографические ошибки и стилистические погрешности.
- 2) В разделе Материалы и методы отсутствуют ссылки на соответствующие источники, хотя в работе использовались стандартные методы и подходы (гентамициновый метод оценки инвазии, метод оценки подвижности в полужидком агаре и др.); некорректно описаны используемые в работе методы: например, описание пробоподготовки СЭМ, описание методов оценки антибиотикочувствительности штаммов.
- 3) В рисунках часто отсутствуют подписи на оси у (например, рисунки 11, 21, 27-28), подписи к рисункам часто слишком лаконичны. Подписи к рисункам 15 и 16 некорректны и должны быть отредактированы.
- 4) Не представлены данные о влиянии гентамицина на подвижность *L. monocytogenes* EGDe через 60 и 90 минут инкубации, хотя в тексте заявлено об этих экспериментах (стр 83).
- 5) Много замечаний можно высказать по поводу оформления списка использованной литературы. Во-первых, список оформлен не по ГОСТ, во-вторых, по многим источникам информация не полная (например, ссылки 7, 15, 21, 35, 44 и др.). В списке литературы не скошены названия микроорганизмов.

- 6) В Результатах отсутствуют данные, полученные с помощью диско-диффузионного метода, о котором упоминается в Материалах и методах.
- 7) В Материалах и методах указывается, что для сравнения подвижности штаммов *E. coli* M17 и ATCC43890 использовали среду с содержанием 0,3 и 0,5% агара. Однако в параграфе 3.2 не указана концентрация агара в среде (рисунок 12). Этим методом различий в подвижности штаммов не было выявлено, хотя затем диссертантом было установлено, что эти штаммы значительно различаются по своим характеристикам перемещения в жидкой среде (таблица 4). Возможно, различия в подвижности штаммов на полужидкой агаризованной среде не были выявлены из-за высокой плотности среды? Плавательную подвижность лучше исследовать на среде с содержанием агара не более 0,25-0,3%. 0,4-0,8% агар используется для анализа способности к роению.

При оппонировании работы возникли следующие **вопросы**:

1. Почему для оценки адгезии и инвазии бактериальных штаммов (в том числе кишечных патогенов) Вы выбрали линию эпидермоидной карциномы гортани человека HEp-2? Использовали ли Вы другие клеточные линии?
2. Не оценивали ли Вы способность штаммов к коаггрегации в жидкой среде?
3. С какими клеточными структурами/молекулами может быть связаны различия в адгезии бактерий к клеткам эпителия помимо наличия жгутика (подвижности)? Не оценивали ли Вы вклад других структур (фимбрий разных типов, поверхностных белков, углеводных структур и др.) в адгезивный потенциал исследуемых бактерий?
4. На странице 93 Вы пишете, что для листерий характер подвижности был связан с вирулентностью. При этом утверждается, что все исследуемые штаммы (патогенные и непатогенные) демонстрировали сходные характеристики подвижности. Объясните, что Вы имели в виду.
5. Согласно данным, представленным на рисунке 26, МИК гентамицина для штамма *L. monocytogenes* EGDe равна 10 мкг/мл. Почему Вы инкубировали бактерии при такой высокой концентрации гентамицина как 100 мкг/мл? Не логичнее бы было проверить действие более низких концентраций антибиотика на подвижность бактерий?

6. Проверяли ли Вы действие антибиотиков других классов на подвижность бактерий? Можно ли ожидать, что антибиотики других классов также будут влиять на подвижность бактерий, как и гентамицин? Насколько универсальным может быть предлагаемый Вами экспресс-метод определения антибиотикочувствительности с помощью разработанной Вами системы анализа подвижности бактерий?

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Полученные в работе данные важны как в фундаментальном, так и в практическом отношении, могут быть рекомендованы к использованию в учебном процессе при подготовке специалистов биологического и медицинского профиля. Представляется интересной и перспективной дальнейшая разработка экспресс-диагностики антибиотикочувствительности бактерий на основе системы анализа паттернов подвижности микроорганизмов.

Отмеченные недостатки не противоречат научным положениям, сформулированным в диссертации, научной новизне полученных результатов и не снижают общей положительной оценки работы.

Заключение

Диссертационная работа Абдулкадиевой М.М. на тему «Анализ и потенциал использования паттернов приповерхностного движения бактерий в микрофлюидических системах», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (Биологические науки), выполненная под руководством научного руководителя кандидата биологических наук Сысолятиной Елены Владимировны и научного консультанта доктора химических наук Станишевского Ярослава Михайловича, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальных научных задач по созданию прототипа системы анализа подвижности микроорганизмов вблизи поверхности и использованию данного прототипа для изучения вклада подвижности в адгезию и инвазию патогенных и сапрофитических микроорганизмов, а также для оценки антибиотикочувствительности подвижных бактерий на примере *L.monocytogenes* и *P.aeruginosa*. Таким образом, диссертационная работа Абдулкадиевой М.М.

«Анализ и потенциал использования паттернов приповерхностного движения бактерий в микрофлюидических системах» по своей актуальности, новизне и практической значимости соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 и последующих редакций Постановлений Правительства РФ (№335 от 21.04.2016; №748 от 02.08.2016; №1024 от 28.08.2016; 1168 от 01.10.2018; №426 от 20.03.2021; 1539 от 11.09.2021; №1690 от 26.09.2022; от 26.01.2023 N 101; от 18.03.2023 № 415; от 26.10.2023 №1786), а ее автор Абдулкадиева Марьям Махдиевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология (биологические науки).

Отзыв подготовил

доктор биологических наук,

профессор по кафедре микробиологии ИФМиБ Марданова Айслу Миркасымовна

«13» января 2024 г.

«Отзыв заверяю»



Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Юридический адрес: Юридический адрес 420008, Россия, РТ, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18.

Телефон 8 843 233 71 09

Веб-сайт <http://www.kpfu.ru>

E-mail public.mail@kpfu.ru