

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Ганнесена Андрея Владиславовича по теме «СТРУКТУРА И СОСТАВ МОНО- И МУЛЬТИВИДОВЫХ БИОПЛЕНОК МИКРООРГАНИЗМОВ КОЖИ И ПРИРОДНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ: ДЕЙСТВИЕ НА НИХ КОСМЕТИКИ И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – микробиология

Диссертационная работа Ганнесена Андрея Владиславовича посвящена изучению биопленок, формируемых микробиотой кожи и анализу воздействия на них косметических средств и других биологически активных соединений.

Наши знания о физиологии микроорганизмов в значительной степени сформировались в результате изучения суспензионных или планктонных культур микроорганизмов. Однако сегодня общепризнанным является тот факт, что в природных условиях микроорганизмы находятся в виде структурированных сообществ - мультивидовых биопленок, содержащих клетки, погруженные во внеклеточный матрикс. В пленочном состоянии поведение клеток и их физиология отличается от таковых у суспензионных культур. В настоящей работе на примере биопленок, формируемых микробиотой кожи, включая бактерии *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes*, *Micrococcus luteus* и *Kytococcus schroeteri* проведен анализ особенностей формирования биопленок и исследовано влияние на них косметических средств и других биологически активных соединений.

1. Актуальность темы диссертации

Актуальность темы диссертационной работы, прежде всего, обусловлена необходимостью поиска новых соединений, обладающих антибиопленочной активностью. Известно, что патогенные микроорганизмы, формирующие биопленки в организме человека, являются причиной более 60% всех хронических инфекций. При этом в составе биопленок микроорганизмы обладают повышенной устойчивостью к биоцидам, включая антибиотики, а также неблагоприятным факторам среды. Поэтому поиск веществ, препятствующих формированию биопленок, является актуальной задачей с точки зрения разработки стратегии борьбы с возбудителями различных заболеваний.

2. Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.

На основании проведенной работы автором сформулировано 5 выводов. Все выводы диссертационной работы Ганнесена А. В. основаны на большом экспериментальном материале, полностью отражают результаты работы и соответствуют

поставленным в диссертации задачам. Для достижения цели и решения задач диссертант использовал широкий круг микробиологических, оптических (фазово-контрастная, эпифлуоресцентная и сканирующая микроскопия), молекулярно-генетических методов (молекулярная идентификация изолятов, флуоресцентная гибридизация *in situ*, компьютерный поиск гомологий), а также биохимических и масс-спектрометрических методов. Такое широкое разнообразие методов обеспечило получение надежных результатов.

Используемые в данной работе методы формирования биопленок и изучения их свойств в полной мере соответствуют современному мировому уровню исследований в данной области науки. Они характеризуются высокой надежностью и воспроизводимостью, что обеспечивает достоверность каждого результата работы. При этом достоверность выводов диссертационной работы не вызывает сомнений.

Диссертационная работа обладает несомненной новизной как в области формирования биопленок представителями микробиоты кожи, так и в области особенностей поведения клеток в составе биопленок. На примере биопленок *S. aureus*, *M. luteus* и *K. schroeteri* продемонстрировано, что никлозамид является перспективным антибиопленочным агентом. Обнаружено, что косметические средства (ТБУ™ и PS291®) подавляют рост биопленок *S. aureus* и *C. acnes*, не проявляя при этом токсического эффекта. Установлен удивительный факт влияния эндогенных соединений (натрийуретические пептиды, НУП) человека на рост биопленок грамположительных микроорганизмов микробиоты кожи человека. Таким образом, впервые показано, что НУП обладают широким спектром действия не только на клетки самого организма, но также способны воздействовать на микроорганизмы – комменсалы человека, что существенно усложняет картину взаимодействия микроорганизмов с хозяином. Кроме того, впервые проведено детальное исследование тотального протеома матрикса биопленок *C. acnes* - одного из видов кожных бактерий человека, выявлены ключевые компоненты матрикса и представлена гипотеза об их роли в биопленках.

3. Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики.

Научная ценность результатов диссертационной работы связана с изучением особенностей формирования биопленок, формируемых микробиотой кожи. Опираясь на результаты исследования биохимического состава матрикса биопленок автор обосновал роль каждого из компонентов в структуре матрикса и патогенезе. Выявлена новая мишень воздействия косметических средств на биопленки: косметические средства

модифицируют способность бактериальных клеток к адгезии и, тем самым, препятствуют формированию биопленок. Это открывает уникальные перспективы в создании косметических препаратов нового поколения. Диссертационная работа Ганнесена А. В. обладает значительной ценностью для практики. Полученные результаты о стимуляции роста биопленок субингибиторными концентрациями антибиотика азитромицина и об антибиопленочной активности никлозамида могут быть использованы для борьбы с патогенными микроорганизмами. Обнаружено новое свойство натрийуретических пептидов НУП регулировать состав микробиоты кожи, открывает большие перспективы в антибактериальной терапии, эндокринологии и клинической практике.

4. Содержание диссертации.

Диссертационная работа Ганнесена А. В. построена по традиционному плану, изложена на 227 страницах, состоит из введения, обзора литературы, глав, описывающих материалы и методы исследований, результаты и их обсуждение, выводов и списка литературы, включающего 437 источников, а также обширного приложения на 40 страницах. В целом диссертация носит завершённый характер, отлично иллюстрирована, содержит 38 рисунков в основном тексте и 16 в дополнении, а также 10 таблиц.

Цели, задачи, актуальность, научно-практическая значимость проводимого исследования описаны во введении к диссертационной работе. В обзоре литературы Ганнесен А. В. детально рассматривает всю информацию, касающуюся микробиоты кожи человека и обсуждает роль важнейших представителей, включая бактерии *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Kytococcus*, *Staphylococcus*, *Cutibacterium acnes*. Особое внимание уделено биопленкам, формируемым микроорганизмами кожи человека и, в частности, бинарным биопленкам, а также организации и компонентам матрикса биопленок. Представленный обзор литературы свидетельствует, что диссертант хорошо знаком с литературой, прекрасно ориентируется в предмете изучения и способен к критическому анализу и выявлению проблем и нерешенных вопросов, что позволяет на основе анализа литературы сформулировать цели и новые задачи по изучению биопленок. Замечание к этому разделу связано с отсутствием выделенного раздела, посвященного косметическим препаратам и натрийуретическим пептидам и их воздействию на микробиоту человека. Автор представил эти материалы в составе разделов, посвященных отдельным видам бактерий, однако на наш взгляд это затрудняет восприятие материала.

Раздел диссертации, связанный с описанием материалов и методов, содержит детальное описание всех использованных для исследования биопленок методов, что

позволяет использовать разработанные подходы другими исследовательскими коллективами. Все задачи, предусмотренные диссертационной работой (действие антибиотика азитромицина и препарата никлозамида на рост культур и биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека, влияние косметики Термальной воды Уриаж™ (ТВУ) и олигосахарида PS291® (тефлозы) и натрийуретических пептидов на рост планктонных культур и биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека, биохимический состав матрикса биопленок) выполнены в полном объеме. В работе были использованы оптимальные методы исследования для обеспечения достоверности и обоснованности полученных результатов. Замечание к этому разделу связано с использованием коммерческих косметических продуктов, неизвестного состава. В настоящей работе было показано, что эти препараты обладают выраженной антиплочной активностью, однако неопределенный состав этих препаратов не позволяет соотнести обнаруженную активность с каким-либо компонентом косметических средств.

Экспериментальная часть работы разделяется на две неравные части: исследование влияния биологически активных соединений разной природы на рост планктонных культур и биопленок, формируемых бактериями микробиома кожи и близких к ним видов (*Pseudomonas chlororaphis*) и изучение биохимического состава матрикса биопленок *Cutibacterium acnes* – представителя кожной микробиоты.

В рамках выполнения первой задачи получены очень интересные научные результаты, позволившие выявить новые мишени для создания антибактериальных препаратов, действующих на биопленки. В их числе: подавление систем глобальной регуляции метаболизма – QS, вовлеченных в процесс стимуляции роста пленок при низких концентрациях антибиотика азитромицина; подавление биосинтеза компонентов матрикса, играющего защитную роль в отношении биоцидов и стрессовых факторов; изменения свойств поверхности клеток, что подавляет рост биопленок, изменение баланса численности микроорганизмов кожи от более опасного *S. aureus* к менее опасным *C. acnes* и *S. epidermidis*, а также использование собственных продуктов метаболизма человека, не обладающие прямым антибактериальным действием (НУП), которые могут регулировать рост бинарных и моновидовых сообществ микроорганизмов кожи. В совокупности эти находки позволяют сформировать новые подходы к разработке антибактериальных средств. Единственное замечание к этой части работы связано с оценкой влияния косметики «Термальная вода Уриаж™» (ТВУ), которая добавляется к культурам в большом количестве (30%). В работе делается вывод о том, что ТВУ30% значительно снижает общее количество биомассы биопленок. Однако как следует из рис.

22, стр. 101, эффекты ТВУ30% и физиологического раствора (30%) схожи. Физиологический раствор, по-видимому, за счет разбавления приводит к снижению роста биопленок. В этой связи представляется правильным оценивать эффект ТВУ30% не по сравнению с контролем, а с учетом влияния разбавления.

В рамках выполнения второй задачи впервые проведено детальное исследование протеома матрикса *C. acnes* RT5 – компонента микробиома кожи человека. В матриксе идентифицировано свыше 400 белков, среди которых выявлено большое число ферментов-гидролаз, специфичных к различным субстратам, а также других ферментов, обеспечивающих высокий каталитический потенциал матрикса биопленок. При исследовании состава матрикса *C. acnes* RT5 получены новые знания, необходимые для понимания того как функционируют биопленки, а также для поиска новых эффективных лекарственных препаратов, блокирующих формирование матрикса.

Экспериментальная часть работы хорошо иллюстрирована многочисленными графиками, фотографиями. Необходимо отметить, что результаты экспериментов порой представлены с избыточной детализацией. Как результат этого – большой объем диссертационной работы, которая к тому же напечатана мелким шрифтом, что затрудняет восприятие результатов работы. Кроме того, в тексте присутствуют опечатки (стр.7 и 95).

В целом замечания к экспериментальной части работы не носят принципиального характера и свидетельствуют о высоком качестве выполнения экспериментальной работы.

5. *Опубликование результатов диссертации в научной печати.*

Результаты и выводы диссертационной работы Ганнесена А. В. в полном объеме представлены в печатных работах – 4-х статьях, опубликованных в российском научном журнале (Микробиология), входящем в Перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ. Материалы диссертации неоднократно представлялись на международных и отечественных конференциях, что нашло отражение в 11 тезисах докладов.

6. *Содержание автореферата.*

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

7. *Заключение.*

Диссертационная работа Ганнесена А. В. «Структура и состав моно- и мультитивидовых биопленок микроорганизмов кожи и природных местообитаний: действие на них косметики и некоторых других биологически активных соединений» представляет

собой законченное исследование, результаты которого имеют важное значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов микробиологии и фармацевтики.

Диссертация отвечает всем требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.02.03 – «микробиология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ганнесен Андрей Владиславович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «микробиология».

Директор

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра

«Курчатовский институт»

(117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1)

www.genetika.ru, тел. 8 (495) 315-12-47,

e-mail оппонента: yanenko@genetika.ru

доктор биологических наук, профессор



А.С. Яненко

Подпись д.б.н., профессора Яненко А.С. заверяю

Ученый секретарь

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра

«Курчатовский институт»

Кандидат химических наук



С.В. Яроцкий

«04» ноября 2018 г.