

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук Купряшиной Марии Александровны на диссертационную работу Масейкиной Алены Александровны «Влияние новых абиотических факторов – производных замещенных аминокислот – на некоторые условно-патогенные микроорганизмы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.05.11 – микробиология.

Актуальность диссертационного исследования

Устойчивость к противомикробным препаратам – это кризис общественного здравоохранения, который, по прогнозам, к 2050 году станет причиной 10 миллионов смертей в год. На сегодняшний день феномен замены восприимчивых патогенов более устойчивыми штаммами продолжается, а клинические изоляты все чаще приобретают множественную лекарственную устойчивость. Поначалу фармацевтическая промышленность могла обеспечить поток противомикробных средств, эффективных против резистентных бактерий, но за последние два десятилетия было разработано лишь несколько новых препаратов. Учитывая, что для установления эффективности и безопасности антимикробных препаратов требуется более 10 лет, существует острая необходимость в получении и исследовании новых соединений, обладающих противомикробной активностью.

Диссертационная работа Масейкиной А.А. посвящена сравнительному анализу эффективности антимикробного действия синтезированных хлорсодержащих производных замещенных аминокислот. Исследования в этой области крайне важны с точки зрения как фундаментальной науки, так и прикладного использования. Известно, что индольные алкалоиды служат основой природных и синтетических физиологически активных веществ. У ароматических аминов присутствует аминогруппа в бензольной части молекулы, которая предоставляет возможность получать различные производные с ее участием. Именно эта возможность применяется в поиске и

синтезе новых соединений с биологической активностью. Предлагаемый в диссертационном исследовании подход является одним из способов преодоления антибиотикорезистентности микроорганизмов, который закреплен в Российской Федерации на законодательном уровне. Особое внимание в диссертационной работе Масейкиной А.А. заслуживают исследования безопасности использования полученной новой группы антимикробных соединений.

Актуальность изложенной выше темы обусловлена очевидной необходимостью создания и исследования особенностей действия новых антимикробных агентов, имеющих высокий противомикробный потенциал и, в тоже время, обладающих низкой токсичностью по отношению к макроорганизму.

Структура и содержание диссертации

Работа Масейкиной А.А. построена по общепринятой схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы и списка цитируемой литературы, включающего 221 источник. Работа изложена на 153 страницах, оформлена в соответствии с требованиями ГОСТа и хорошо иллюстрирована (содержит 36 рисунков и 14 таблиц).

Во **введение** диссертант описала актуальность и степень разработанности темы исследования, обозначила цель и задачи работы, обосновала научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, степень достоверности и апробации результатов исследования, сформулировала положения, выносимые на защиту, предоставила информацию о личном вкладе, количестве публикаций по теме диссертации, структуре и объеме диссертации.

Обзор литературы занимает 23 страницы, состоит из трех разделов, посвященных аспектам устойчивости микроорганизмов к антибиотикам,

методике прогнозирования биологической активности *in silico* и характеристике алкалоидов – производных индола, как потенциальных биологически активных соединений.

Материалы и методы исследования изложены на 21 странице, в которых описаны исследуемые соединения, препараты сравнения, используемые музейные и опытные штаммы микроорганизмов, необходимые питательные среды для выращивания и условий хранения микроорганизмов. Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных биоинформатических, микробиологических, биохимических и физикохимических методов исследования, что не позволяет сомневаться в достоверности полученных данных. Такой комплексный методический подход позволил достичь высоких результатов не только в выделении и очистке ферментов, но и в изучении их свойств и биологических функций.

Результаты исследований состоят из 7 разделов: «Биологическая активность хлорсодержащих производных замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов», «Характеристика микроорганизмов полученной рабочей коллекции», «Исследование антимикробной активности исследуемых соединений», «Исследование воздействия исследуемых соединений на клеточную стенку прокариот», «Оценка морфоструктурных повреждений бактериальных клеток под воздействием исследуемых соединений», «Оценка типа противомикробного действия исследуемых соединений», «Исследование мутагенных и ДНК-повреждающих свойств тестируемых соединений *in vitro*». В первом разделе автор *in silico* прогнозирует потенциальную биологическую активность исследуемых соединений. Результаты показывают, что наиболее часто встречающиеся молекулярные механизмы тестируемых соединений – это ингибирование псевдолизина и системы омптинов. Второй раздел посвящен подробной характеристике микроорганизмов рабочей коллекции, включающей в себя результаты чувствительности полученных изолятов к традиционным антимикробным препаратам, анализу этих данных с помощью онлайн платформы AMRcloud. Все полученные микроорганизмы, как

отмечает Алена Александровна, были различны по своей чувствительности к традиционным антимикробным препаратам и были использованы в дальнейшем исследовании. В третьем разделе с помощью рутинных методов определяется противомикробная активность исследуемых соединений с лабораторными шифрами Т1-2, Т4-13. Диссертант отмечает антибактериальное действие соединений как в отношении грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. В четвертом разделе при оценке воздействия отобранных исследуемых соединений с лабораторным шифром Т1, Т4, Т7 и Т12 на клеточную стенку микроорганизмов. Пятый раздел содержит данные о явных морфологических изменениях клеточной стенки бактериальных клеток рабочей коллекции (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*) под воздействием хлорсодержащих производных 5-,6-,7-аминоиндолов в концентрации 500.0 мг/л. В шестом разделе автор работы определяет тип противомикробного действия. Результаты данного исследования показывают, что соединения Т1, Т4, Т7 и Т12 обладают бактерицидным типом действия. В седьмом разделе диссертационной работы автор изучает мутагенные и ДНК-повреждающие свойства тестируемых соединений. Полученные результаты свидетельствуют о том, что Т1, Т4 и Т7 не обладают ДНК-повреждающим эффектом, однако, автором выявлена мутагенность соединения с лабораторным шифром Т1. Соединение с лабораторным шифром Т12 демонстрирует ДНК-повреждающий эффект.

Заключение диссертационного исследования содержит 6 выводов, которые логически вытекают из изложенных результатов, соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Тема и содержание диссертационного исследования соответствует научной специальности 1.5.11 – Микробиология.

Научная новизна

Достоверность и научная новизна проведенных исследований не

вызывают сомнений. В диссертационной работе впервые дана характеристика антимикробного действия новой группы из двенадцати хлорсодержащих производных замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов. Выявлено, что исследуемые соединения оказывают противомикробное действие на исследованные музейные штаммы *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* 43300 ATCC (MRSA), *E. coli* 25922 ATCC, *P. aeruginosa* 27853 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC и опытные штаммы *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa* в различных концентрациях, описаны изменения клеточной стенки бактерий. Диссертантом были получены данные о высокой активности четырех хлорсодержащих производных замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов, превышающей активность препаратов сравнения бензалкония хлорида, диоксидина, хлоргексидина, нитрофурантоина и фосфомицина. Впервые исследованы генотоксичность и мутагенность тестируемых соединений. Перечисленные результаты следует считать приоритетными, что и составляет безусловную новизну и глубину исследования.

Теоретическая и практическая значимость

Несмотря на наличие множества работ по вопросам изучения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам в последние годы наблюдается нехватка исследований по вопросам поиска новых антимикробных агентов и изучения чувствительности условно-патогенных микроорганизмов к ним. Синтез и характеристика новых антимикробных препаратов обосновывает теоретическую значимость работы.

Полученные научные результаты имеют практическое значение, поскольку указывают на возможность применения изучаемых соединений в качестве дезинфицирующих или химиотерапевтических средств.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, результатов и выводов диссертации

Ознакомление с диссертацией свидетельствует о том, что поставленные в ней задачи решены в полном объеме. Работа Масейкиной А.А. характеризуется высокой степенью обоснованности научных положений и выводов. Диссертант подтверждает свои выводы, опираясь на анализ широко круга исследований отечественных и зарубежных авторов, посвященных различным аспектам устойчивости микроорганизмов к существующим антимикробным агентам и поиску новых противомикробных препаратов.

Достоверность диссертационного исследования подтверждается использованием практической базы, в которую входят Распоряжение Правительства РФ, Указ Президента РФ, ресурсы сети Интернет, нормативная и методическая литература, а также личные результаты автора.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, полнота опубликования результатов

При прочтении диссертации не возникает сомнений в ключевом вкладе автора в выполненную работу. Полученные Масейкиной А.А. результаты прошли достаточно широкую апробацию. Материалы диссертации были представлены в форме устных и стендовых сообщений на российских и международных научных форумах и отражены в 15 научных публикациях, из которых 4 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных научных результатов диссертационных работ. Практическая значимость полученных результатов подтверждена получением 3 патентов Российской Федерации на изобретения и 1 патента на полезную модель Российской Федерации.

Замечания и вопросы по диссертации

В целом рукопись работы написана грамотным литературным языком, аккуратно оформлена, содержит богатый экспериментальный материал, хорошо проиллюстрирована. Тем не менее, имеется ряд вопросов и замечаний по оформлению и содержанию работы:

1. Встречаются некоторые незначительные опечатки, грамматические и тавтологические ошибки, стилистические неточности, которые, тем не менее, не умаляют важности исследования, описанного в данной работе.
2. Экспериментальный раздел работы начинается с получения и характеристики микроорганизмов рабочей коллекции (156 штаммов), приводится анализ устойчивости изолятов к антибиотическим средствам. Диссертантом отмечается, что все полученные микроорганизмы были различны по своей чувствительности к традиционным антимикробным препаратам и были использованы в дальнейшем исследовании. Однако из текста диссертации не понятно, какие именно изоляты в дальнейшем были взяты в качестве опытных. Каким образом проводилось групповое сравнение.
3. Чем обоснован выбор препаратов сравнения при проведении экспериментов и концентрационный диапазон исследуемых веществ?
4. В таблице с результатами исследования проницаемости клеточной стенки с использованием кристаллического фиолетового отсутствуют данные для интактных клеток (нулевой контроль). Известно, что кристаллический фиолетовый является пенетрирующим красителем и свободно проходит через клеточную стенку. Данные об изменении проницаемости опытных образцов необходимо представлять в сравнении (либо нормировать) на нулевой контроль.

Высказанные замечания и вопросы не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы как квалификационного научного труда и не ставят под сомнения обоснованность её основных положений и выводов.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

Диссертационная работа Масейкиной Алены Александровны «Влияние новых абиотических факторов – производных замещенных аминокислот – на некоторые условно-патогенные микроорганизмы» является завершённой

научно-квалификационной работой, которая по своей актуальности, методическому обеспечению, новизне, научному и практическому значению, степени апробации и полноте изложения в рецензируемых научных изданиях отвечает требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» , утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013, с изменениями, утвержденными постановлениями Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, и требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией микробиологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук»,

кандидат биологических наук

Купряшина Мария Александровна

13 ноября 2023 г.

Контактные данные:

Телефон: +7(8452)97-04-44

E-mail: kupryashina_m@mail.ru

Подпись Купряшиной Марии Александровны заверяю:

Ученый секретарь

Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук»; 410049, Россия, Саратов, просп. Энтузиастов, 13, тел. +7(8452)97-04-44, e-mail: mail@ibppm.ru

кандидат биологических наук



Селиванова Ольга Геннадьевна