

федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный исследовательский центр  
эпидемиологии и микробиологии  
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)



123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Тел: 8 499-193-30-01

Факс: 8 499-193-61-83

№ \_\_\_\_\_

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

<http://www.gamaleya.org>

E-mail: [info@gamaleya.org](mailto:info@gamaleya.org)



**УТВЕРЖДАЮ**

Директор ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф.

Гамалеи Минздрава России

Академик РАН, доктор биологических  
наук, профессор

\_\_\_\_\_ А.Д. Гинцбург

«15» \_\_\_\_\_ 2023 г.



**ОТЗЫВ**

ведущей организации на диссертационную работу Масейкиной  
Алены Александровны на тему «Влияние новых абиотических факторов –  
производных замещенных аминокислот – на некоторые условно-  
патогенные микроорганизмы», представленную на соискание степени  
кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология

**Актуальность темы диссертационной работы**

Широкое распространение лекарственной устойчивости среди  
патогенных и условно-патогенных бактерий представляет собой одну из  
основных проблем, с которой столкнулась медицинская микробиология в

первой четверти XXI века. Бесконтрольное применение антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве, неправильное использование и злоупотребление антибиотиками в отношении людей, крупного рогатого скота и сельскохозяйственных культур привело к появлению патогенных бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам, делающей возбудителей резистентными к стандартной антибиотикотерапии. Особенно широкое распространение устойчивые штаммы получили среди условно-патогенных бактерий, таких как *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* и др., которые вызывают заболевания среди групп риска, нозокомиальные инфекции, инфекции, связанные с повреждениями мягких тканей, в том числе, послеоперационные осложнения. В последние годы отмечается существенное увеличение смертности благодаря распространению штаммов с множественной антибиотикорезистентностью среди этих и других групп микроорганизмов: по прогнозам, к 2050 году общее число смертей благодаря полирезистентным бактериям может достичь 10 миллионов в год.

Для предотвращения такого развития событий во всем мире ведутся активные работы по поиску новых соединений, обладающих антимикробной активностью. Существенным препятствием на пути разработки новых лекарственных препаратов является то, что токсичные для бактерий соединения также часто оказываются токсичными для человека и животных, что ограничивает круг классов химических веществ, среди которых можно выявить новые кандидатные вещества с антибактериальной активностью.

Индол и его производные входят в состав многих биомолекул, консервативных для широкого круга или даже всех живых организмов, как например, гормон млекопитающих и птиц серотонин или незаменимая аминокислота триптофан. Вхождение в состав биологических молекул является свидетельством адаптации биологических систем к индолу и его производным и отсутствию у них неспецифической токсичности, что делает индольные производные привлекательными мишенями для разработки новых биологически активных препаратов.



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

Целью диссертации Масейкиной А.А. была оценка антибактериального потенциала нового класса синтетических соединений – хлорсодержащих производных замещенных аминокинолов. Для достижения этой цели автором была собрана представительная коллекция клинических изолятов патогенных и условно-патогенных бактерий, включающая более 150 штаммов *S. aureus*, *Streptococcus spp*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, на которых, а также на типовых штаммах означенных видов была доказательна продемонстрирована антибактериальная активность четырех кандидатных веществ: 2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамида (лабораторный шифр Т1), 2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1H-индол-6-ил)ацетамида (лабораторный шифр Т4), 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-1H-индол-6-ил)ацетамид (лабораторный шифр Т7), монохлорацетат 2,3-диметил-1H-индол-7-аммония (лабораторный шифр Т12). Были определены значения минимальной подавляющей концентрации (МПК), которые оказались в ряде случаев ниже, чем у препаратов сравнения с хорошо известными антимикробными свойствами, таких как хлорид бензалкония, диоксидин, хлоргексидин, и других. Эти данные уже свидетельствуют о том, что в работе были получены значимые для науки и практики результаты. Далее автор исследовал механизмы активности кандидатных препаратов и выявил дозозависимые изменения в морфологии и проницаемости клеточной стенки, которые, судя по всему, и являются причиной бактерицидной активности тестируемых соединений. Так автор показал снижение поглощения красителя кристаллического фиолетового клеточной стенкой *S. aureus* ATCC 6538-Р и *E. coli* ATCC 25922 в присутствии соединений Т1, Т4, Т7 и Т12, которые дозозависимо влияют на проницаемость клеточной стенки в концентрациях 1,96; 7,9; 31,3; 125,0 и 500,0 мг/л. Используя сканирующую электронную микроскопию (СЭМ), автор продемонстрировал морфологические изменения клеточной стенки бактериальных клеток *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli* под воздействием хлорсодержащих производных

5-,6-,7-аминоиндолов в концентрации 500,0 мг/л. Бактерицидный тип антимикробного действия испытуемых соединений с использованием классической методики определения (отсутствие видимого роста культуры *S. aureus* ATCC 6538-Р в течение 5 сут) и с использованием разработанного в ходе исследования метода оценки коэффициента оптической плотности жидкой питательной среды при культивировании микроорганизмов с антимикробными веществами ( $KD < 1$ ).

Анализируя токсические механизмы действия, для трех соединений автор показал отсутствие мутагенных свойств тестируемых соединений **T4**, **T7** и **T12** *in vitro* на штаммах *S.typhimurium* TA98 и *S.typhimurium* TA100 и дозозависимая мутагенная активность соединения **T1** на обоих тестерных штаммах (превышение над спонтанным фоном мутирования в 2,46 и 2,06 раз соответственно). Кроме того, автор выявил воздействие на ДНК прокариотической клетки (*E. coli*) соединений **T1** и **T12** в концентрациях 500,0 мкг/диск и 1000,0 мкг/диск и незначительный ДНК-повреждающий эффект (не более 50%) у T4 и T7. Полученные данные свидетельствуют о различиях в активности соединений. Все результаты были получены впервые.

### **Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы**

Теоретическая значимость результатов диссертации неоспорима, т.к. получены подробные данные о морфологическом, физиологическом и бактерицидном эффекте новых химических соединений на бактериальные клетки. Эти данные позволяют углубить знания о молекулярных механизмах действия антимикробных средств, влиянии различных химических структур на их эффективность и специфичность действия.

В ходе оценки антибактериальных свойств тестируемых препаратов автором был разработан новый способ определения типа противомикробного действия соединения, защищенный патентом РФ №2687264. Разработанные в ходе выполнения диссертации оригинальные способы получения трифторацетатов замещенных 6-аминоиндолов и монохлорацетатов



замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов, обладающих противомикробным действием, также защищены патентами РФ (№2721833 и №2724605, соответственно). Всего Масейкиной А.А. получено 4 патента, что свидетельствует о высокой практической значимости результатов диссертации.

#### **Личный вклад автора**

Автор непосредственно участвовал во всех этапах диссертационного исследования, самостоятельно написал рукопись диссертации и автореферат, принимал основное участие в подготовке научных публикаций. С учетом многоплановости экспериментального исследования, некоторые экспериментальные исследования автор выполнял в сотрудничестве с более опытными специалистами, что не умаляет вклада самого автора в полученные результаты.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Полученные Масейкиной А.А. результаты и выводы демонстрируют перспективность и необходимость продолжения разработок новых антимикробных препаратов на основе производных замещенных аминокислот, а разработанные способы синтеза новых соединений важны для практического осуществления таких исследований. Разработанный метод определения типа противомикробного действия соединений может быть использован для тестирования новых антимикробных молекул, независимо от их класса.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация Масейкиной А.А. соответствует п. 4, 5, 12 паспорта специальности 1.5.11 – Микробиология.

#### **Соответствие диссертации научному направлению**

Работа выполнялась в соответствии с Паспортом научных направлений ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева» (Решение НТС, протокол №1 от

09.02.2018г.) и с научной тематикой «Исследование чувствительности микроорганизмов к традиционным антимикробным средствам и поиск новых соединений с противомикробной активностью» кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им Н. П. Огарева».

### **Достоверность и апробация результатов исследования**

Результаты были получены с использованием репрезентативной выборки типовых и клинических изолятов и современных объективных методов исследования. Проверка статистических гипотез осуществлялась на допустимом в медико-биологических исследованиях 5 % уровне значимости.

Результаты диссертации представлены в 15 научных публикациях, из которых 4 – это статьи в научных изданиях, входящих в базы цитирования Scopus/Wos и перечень ВАК, что полностью соответствует требованиям по публикациям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Материалы диссертации представлены на Всероссийской научной конференции с международным участием «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019), ежегодном Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии «Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2018, 2020), ежегодных научных конференциях «Огарёвские чтения» ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва» (Саранск, 2016; 2017; 2018; 2019; 2021; 2023), межрегиональной научно-практической конференции «Клинические лабораторные исследования: современные стандарты, перспективы развития» (Рязань, 2020).

### **Содержание и оформление диссертационной работы**

Диссертация Масейкиной А.А. написана по классическому образцу и включает введение, обзор литературы, экспериментальная часть, включающая в себя материалы и методы исследования, результаты исследования и обсуждения результатов, заключение и список использованных источников, содержащий 221 источник, среди которых 55 российских и 166 зарубежных.



Объем диссертации составляет 153 страниц машинописного текста. Результаты представлены в 36 рисунках и 14 таблицах.

Во введении отражена актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и задачи исследования, отмечены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Сформулированы основные положения выносимые на защиту, отмечена степень достоверности результатов, отражен личный вклад автора.

В обзоре литературы проанализированы научные публикации по аспектам, касающимся темы диссертации, включая механизмы и эволюцию устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, подходы, используемые при поиске новых мишеней для антибиотиков; методы прогноза биологической активности *in silico*; и общую характеристику алкалоидов – производных индола.

В экспериментальной части в отдельной главе представлены материалы и методы исследования, включая использованные штаммы, бактериологические методы, методы оценки морфоструктурных повреждений, методы учета повреждений ДНК и мутаций, и методы статического анализа.

В главе 3 экспериментальной части представлены результаты и их интерпретация, включая оценку биологической активности хлорсодержащих производных замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов; характеристику микроорганизмов полученной рабочей коллекции; исследование антимикробной активности исследуемых соединений; исследование воздействия исследуемых соединений на клеточную стенку протестированных штаммов бактерий; оценку морфоструктурных повреждений бактериальных клеток под воздействием исследуемых соединений; исследование мутагенных и ДНК-повреждающих свойств тестируемых соединений *in vitro*.

В главе 4 представлено Заключение, обобщающее и структурирующее сделанные экспериментальные наблюдения.

Сделанные выводы и основанные на них выносимые на защиту научные положения, соответствуют полученным результатам, научно доказаны и соответствуют цели и задачам работы.

В целом, замечаний к оформлению диссертации, как и качеству представленных результатов, нет. Некоторое неприятие вызывает использование в названии диссертации термина из области микробной экологии – абиотические факторы - для обозначения синтезированных соединений, тестируемых в качестве антимикробных. Также, в некоторых случаях текст диссертации включает выражения лабораторного жаргона и просто не вполне корректные выражения. Но таких выражений немного, и они ни в коем случае не умаляют достоинств диссертации.

### **Заключение**

Диссертационная работа А.А. Масейкиной «Влияние новых абиотических факторов – производных замещенных аминокислот – на некоторые условно-патогенные микроорганизмы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология, выполненная под руководством доктора медицинских наук, доцента, Степаненко Ирины Семеновны, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи по поиску и характеристике кандидатных соединений с антимикробными свойствами на основе производных замещенных аминокислот, имеющей существенное значение для медицинской микробиологии. Таким образом, диссертационная работа А.А. Масейкиной «Влияние новых абиотических факторов – производных замещенных аминокислот – на некоторые условно-патогенные микроорганизмы» 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), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Масейкина Алена Александровна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология.

Ведущая организация подтверждает, что соискатель не является ее сотрудником и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе ведущей организации или в соавторстве с ее сотрудниками.

Отзыв ведущей организации заслушан, обсужден и одобрен на Ученом Совете ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России 26.10.2023 (протокол № 7/общ от 26.10.2023).

Отзыв подготовила  
доктор биологических наук,  
заведующий лабораторией экологии  
возбудителей инфекций ФГБУ  
НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи  
Минздрава России

Ермолаева Светлана Александровна

Подпись заведующей лабораторией экологии Ермолаевой Светлана Александровны заверяю. Ученый секретарь ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России кандидат биологических наук Сысолятина Елена Владимировна



Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России)  
Россия, г. Москва, 123098, ул. Гамалеи 18. Тел. +7-499-193-3001  
. Факс +7-499-193-6183, Email: info@gamaleya.org