

О Т З Ы В
О Ф И Ц И А Л Ь Н О Г О О П П О Н Е Н Т А

на диссертационную работу Беллы Гагиковны Бабаян по теме «Изучение мультирезистентности некоторых видов бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* и ее преодоление синтетическими производными L-винной кислоты», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.00.07 – «Микробиология. биотехнология».

Диссертационная работа Беллы Бабаян на соискание ученой степени кандидата биологических наук посвящена изучению резистентности к антибиотикам (АБ), проявляемой у штаммов некоторых видов бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*, возможных путях ее преодоления, а также биологическим свойствам новых антимикробных соединений – синтетических азотсодержащих производных L-винной кислоты (ВК).

С 2000-х годов Всемирная организация здравоохранения называет антибиотикорезистентность одной из самых серьезных угроз для здоровья человека и животных. По прогнозам ученых, через 10 лет жертвами антибиотикорезистентности каждый год будут более 10 млн человек.

При этом масштаб проблемы в мире неуклонно растет. Обнаруживают все больше патогенных бактерий с устойчивостью сразу к нескольким группам антибиотиков и даже так называемых панрезистентных, т.е. устойчивых ко всем используемым против них препаратам. Т.о., поиск путей борьбы с резистентностью к антибиотикам является весьма актуальной задачей. В настоящее время ученые во многих странах мира ищут вещества или препараты, меняющие сам механизм устойчивости и способные оказывать тот же эффект, что антибиотики, но более безопасно и эффективно.

С этой точки зрения, диссертационная работа Б. Бабаян является своевременной и достаточно актуальной.

В качестве обоснования актуальности автор приводит новейшие данные относительно распространения устойчивости бактерий к антибиотикам и поиску возможных путей борьбы с резистентностью.

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, что во-первых, автор изучила антибиотикоустойчивость более чем 200 штаммов бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*, взятых из коллекции Центра Депонирования Микроорганизмов НПЦ «Армбиотехнология», к 13 представителям известных групп антибиотиков, широко используемых в медицине и сельском хозяйстве. В результате работ Б. Бабаян выявлены различные факторы, обуславливающие пути передачи генов резистентности, особенности адапционных механизмов микроорганизмов в поддержании стабильной устойчивости и способы ее преодоления.

Во-вторых, автором *in vitro* и *in silico* методами впервые изучены биологические и антимикробные свойства 6-ти новых синтетических азотсодержащих производных природной винной кислоты. Показано, что эти соединения оказывают бактерицидное или бактериостатическое действие в отношении мультирезистентных штаммов бактерий родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*. И, наконец, впервые *in vitro* изучена биodeградируемость синтетических производных ВК штаммами почвенных бактерий группы *P. chlororaphis*.

Автором проделана огромная и интересная исследовательская работа. Диссертация написана в традиционной форме, изложена на 147 страницах, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, а также из заключения, выводов, списка литературы, включающего 192 источника, проиллюстрирована 55 рисунками и 34 таблицами.

Представленный литературный обзор свидетельствует о хорошем знании диссертантом предмета исследования и умении анализировать научную литературу. В лит. обзоре обобщены современные представления об антибиотиках, их происхождению и классификации, механизмах воздействия антибиотиков, а также об антибиотикорезистентности микроорганизмов и механизмах устойчивости к различным классам антибиотиков. В этом разделе представлены также классификация представителей родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, ферменты биodeградации ксенобиотиков представителей этих родов и природные антимикробные соединения на основе органических кислот, в частности, винной кислоты.

Выбор цели и постановка задач, сочетание подходов классической микробиологии и современных методов молекулярной биологии, а также *in silico* методов молекулярного докинга предопределили результативность экспериментальных исследований. Экспериментальные исследования представлены в последовательном и тщательном изложении собственных результатов. Диссертант провел кропотливую и трудоемкую работу по изучению антибиотикоустойчивости к 13 АБ, генов, ответственных за резистентность и их передаваемости, а также механизмов устойчивости к различным классам антибиотиков у природных почвенных бактерий рода *Pseudomonas* (условно-патогенных бактерий, непатогенных почвенных представителей, фитопатогенных представителей), условно-патогенных представителей рода *Stenotrophomonas*, фитопатогенных представителей рода *Xanthomonas*. Изучение антибиотикоустойчивости трех родов показало преобладание резистентных штаммов среди всех видов и подвидов исследованных бактерий, вне зависимости от их плазмидного состава. Оказалось, что не все обнаруженные плазмиды участвуют в проявлении и передаче резистентности к рассмотренным 13 АБ. Плазмиды, несущие гены резистентности к одному или более АБ, демонстрируют стабильную репликацию в реципиентах из родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Stenotrophomonas*. В то же время, все обнаруженные плазмиды, вне зависимости от видовой принадлежности штамма, а также участия плазмид в формировании и передаче резистентности, демонстрируют стабильность при длительном

хранении штаммов и их культивации на полноценных средах без контактов с какими-либо антибиотиками.

Для выявления причин стабильности обнаруженных плазмид, проявляющих резистентность к АБ, у всех исследуемых штаммов бактерий родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Stenotrophomonas* были изучены их биодegradационные свойства. С этой целью было проведено качественное определение ферментов биодegradации: экстрацеллюлярных липаз и полифенолоксидаз - тирозиназы и лакказы. Исследования показали, что биодegradационные свойства изученных бактерий трех родов, определяемые экстрацеллюлярными полифенолоксидазами и липазами, не имеют значительного вклада в поддержании стабильности плазмид, определяющих мультирезистентность к АБ.

Автором было исследовано воздействие 6 новых синтетических производных ВК: бензил- фенил-, циклогексил-замещенных иминов и комплексных аминосолей ВК на резистентных и чувствительных к АБ представителях родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*. Результаты показали большой антимикробный эффект новых производных ВК по сравнению с природными производными.

Определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) для 6-ти новых производных ВК показало, что их значения варьируют в зависимости от штамма и вида бактерии, а также различий функциональных групп в соответствующем производном. Оказалось, что МИК фенил-производных ВК в большинстве случаев выше, чем в случае циклогексил- и бензил-производных ВК.

Согласно данным, полученным автором, новые производные ВК демонстрируют значительную антибактериальную активность, проявляя бактериостатическое и бактерицидное действие, как в отношении резистентных к АБ, так и в отношении чувствительных штаммов бактерий, условно-патогенных для человека и животных, а также в отношении фитопатогенных представителей родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*. Фенил-производные демонстрируют преимущественно бактериостатическое действие, как в форме комплексной соли, так и в виде имида, в то время как циклогексил- и бензил-замещенные производные демонстрируют бактерицидный эффект. Автор предполагает, что новые производные ВК действуют на мишень, отличную от действия антибиотика и не проявляют синергии или антагонистического эффекта к рассмотренным 13 антибиотикам.

Показано, что резистентность к новым производным ВК проявляют в основном представители непатогенных почвенных представителей группы *P. chlororaphis*. Резистентность к данным соединениям не обусловлена плазмидами и не передается путем межвидового горизонтального переноса генов. Некоторые непатогенные штаммы, резистентные к новым производным ВК, способны к их биодegradации, утилизируя данные соединения в качестве источника углерода. Автор считает, что можно судить об относительной потенциальной экологической безопасности описанных соединений.

Согласно результатам *in silico* и *in vitro* экспериментов, механизм активности данных соединений не связан с кислотностью ВК, а обусловлен действием функциональных групп в составе производных ВК. Вероятно, он обусловлен связыванием циклических и ароматических функциональных групп имидов и комплексных аминосолей ВК с аминокислотами в составе определенных сигнальных молекул мембран бактерий, а также факторов транскрипции определенных белков, таких как белки формирующие биофильм.

Большой интерес вызывает глава «Заклучение», где в доступной форме и посредством аргументации современными представлениями в данной области, оцениваются собственные результаты.

Среди 211 изученных штаммов почвенных бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* наблюдалась большая вариабельность спектра резистентности к 13 АБ различных классов и поколений, а также преобладали пан-резистентные и/или мультирезистентные штаммы. Это представляет особый интерес, в связи с фактом выделения и депонирования данных штаммов задолго до синтеза и введения в использование большинства из этих АБ. Автор предполагает, что их резистентность, вероятно, определяется наличием генов модификации АБ и эффлюкс системами.

Результаты исследований достаточно полно отражены в «Выводах». Выводы и основные положения диссертации логически вытекают из результатов экспериментов и обоснованы.

Основные положения диссертации опубликованы в 36 печатных работах, из которых 12 тезисов и 24 статьи. Содержание автореферата отражает все основные положения диссертационной работы.

Существенных замечаний по содержанию диссертационной работы не имеется. Однако, в работе присутствуют некоторые неточности и несоответствия. А также есть вопросы и вопрос-пожелание.

1. В автореферате в Табл. 3 и тексте под ней выявлено несоответствие, а именно, в автореферате представлено, что значения МИК фенил-производных для всех изученных штаммов бактерий были значительно выше, по сравнению со значениями для бензил- и циклогексил-производных ВК. Однако в Табл. 3 приведены данные трех штаммов, у которых значения МИК для бензил- и циклогексил-производных ВК выше, чем значения МИК для фенил-производных.
2. В диссертации на стр. 54 выявлена неточность с представленными данными в Табл. 6, а именно, в тексте: «Резистентность к аминогликозидам отмечена у 5 из 52 изученных представителей *P. fluorescens*», а в Табл. 6 резистентность отмечена у шести штаммов.
3. Хотелось бы уточнить, почему в работе не использован более достоверный диско-диффузный тест определения антибиотикорезистентности бактерий.

4. Собираются ли автор и исследовательская группа коммерциализировать полученные синтетические соединения?

Работа Беллы Бабаян, большая по объему и интересная по теме исследования, имеет высокую теоретическую и практическую ценность. Исследовательская работа диссертанта внесла свою лепту в понимании процессов и механизмов антибиотикорезистентности бактерий, а также в борьбе с этой глобальной проблемой. Проведенные в рамках диссертации исследования свойств 6 новых синтетических производных природной винной кислоты показали, что эти соединения перспективны для дальнейшего изучения и потенциального использования в качестве альтернативных мер борьбы с мультирезистентными патогенами. Полученные результаты могут стать предпосылкой для разработки новых антимикробных препаратов против полирезистентных микроорганизмов. Возможными областями применения этих соединений могут быть медицина, фармакология, сельское хозяйство (животноводство, птицеводство, растениеводство), пищевая промышленность и др.

Хочется отметить, что исследования во всем мире внушают надежду на то, что нам удастся не просто вечно бежать на шаг впереди, создавая препараты, к которым у бактерий еще не выработалась устойчивость, но и «поворачивать время вспять» – сопротивляться уже существующим механизмам резистентности, придумывая способы для непосредственной остановки их действия. И тогда пугающая цифра в 10 миллионов смертей в год никогда не станет реальностью.

Считаю, что диссертационная работа является ценным научным вкладом и заслуживает высокой оценки.

Вышеизложенное дает основание заключить, что диссертационная работа Беллы Гагиковны Бабаян по теме «Изучение мультирезистентности некоторых видов бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* и ее преодоление синтетическими производными L-винной кислоты», по своей актуальности, методическому уровню выполнения, объему и достоверности полученных данных, теоретической и практической значимости соответствует требованиям ВАК РА, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.07 – «Микробиология. биотехнология».

Официальный оппонент,
ученый секретарь НПЦ «Армбиотехнология», к.б.н.

А.О. Колоян

Подпись А.О. Колоян заверяю,
зам. директора по вопросам науки, в.в.н.

В.Б. Гогинян

12.12.2023 г.

