

Отзыв

**официального оппонента на диссертацию Анны Борисовны Шеремет
«Разработка антибактериального лекарственного средства на основе
ингибитора системы секреции III типа *Pseudomonas aeruginosa*»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 03.02.03 – микробиология**

Актуальность избранной темы

История медицины имеет много фактов, подтверждающих, какую огромную роль для сохранения здоровья человечества сыграли периодически появляющиеся новые антибактериальные средства. Последние из них сульфаниламиды и антибиотики. Однако современная статистика заболеваемости указывает на неуклонный рост инфекций, вызванных возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью, которые не может остановить существующий ассортимент антимикробных препаратов. Среди них необходимо отметить синегнойную инфекцию. Это побуждает исследователей проводить поиск препаратов, не кратко, а длительно сдерживающих агрессивный натиск резидентных патогенов без потери их чувствительности. Одним из путей решения проблемы лекарственной устойчивости может стать очередная смена принципов конструирования антибактериальных веществ, чтобы избежать распространения микробов с хорошо известными механизмами резистентности. Например, у патогенных бактерий можно использовать на этапах инфекционного процесса другие чувствительные мишени для успешной разработки профилактических и лечебных средств (адгезию, инвазию, интернализацию с репликацией, биопленкообразование, секреторные системы и др.).

Перспективное направление с блокированием молекулярных механизмов секреции белков, ответственных за вирулентность у микроорганизмов, называют, говоря языком милитаристов, «разоружением агрессора» без гибели клеток.

Сейчас у бактерий известно не менее 9 систем секреции белков вирулентности с разной специфичностью молекул и структурой секреторного аппарата. Одна из них – Система Секреции Третьего Типа (далее ССТТ). ССТТ является микробным инжектором (инжектисомой), структурно сходным у многих таксономически неродственных экзо- и эндо- Gr- патогенов. Она предназначена для введения эффекторных белков в цитоплазму эукариотической клетки с её последующим апоптозом, подавлением иммунного ответа организма, вплоть до генерализации инфекции. Это указывает на значение ССТТ в проявлении вирулентности возбудителя в остром и хроническом инфекционных процессах. Ввиду высокой консервативности структуры ССТТ, возможно создание препаратов как строго селективных по воздействию на конкретных представителей микромира, так и широкоспектральных. В литературе появились сообщения об успехах в этих разработках [Зигангирова Н.А. и др. 2012; Steadman D. Et al. 2014; S. Ruer et al. 2015].

К таким актуальным приоритетным исследованиям следует отнести диссертацию А.Б. Шеремет, посвященную разработке и изучению фармакологического антибактериального средства - ингибитора системы секреции III типа у *Pseudomonas aeruginosa*, одного из критически опасных патогенов (для ожоговых и хирургических больных) с множественной резистентностью. Обоснование актуальности решаемых в работе вопросов с подтверждением этого анализом существующих отечественных и зарубежных публикаций дано в литературном обзоре диссидентом - квалифицированным и эрудированным специалистом. Для выполнения работы необходимо было безошибочно выбрать целевое химическое соединение для воздействия на ССТТ. Таким веществом оказалось низкомолекулярное вещество CL-55, названное затем Фтортиазиноном, принадлежащее к химическому классу тиадиазинонов и синтезированное в лаборатории хламидиозов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ.

Степень обоснования и достоверности полученных результатов

Чтобы к настоящему времени успешно выйти на 2-ю стадию испытаний препарата Фтортиазинон (ФТ), руководителю и диссертанту необходимо было точно поставить цель и задачи исследований с теоретическим (литературным) обоснованием новизны и практической значимости запланированной темы.

В соответствии с планом Шеремет А.Б. получила результаты по детекции ССТТ у клинических штаммов псевдомонад. У всех клинических культур были выявлены, прежде всего, гены основных эффекторных белков ССТТ и, соответственно, их белковые продукты - экзотоксины синегнойной палочки (exoS^+ - ExoS ; exoU^+ - ExoU).

Напоминание: ExoU обладает фосфолипазной активностью, приводящей к нарушению целостности цитоплазматической мембраны и некрозу тканей, а ExoS имеет АДФ-рибозилтрансферазную активность, вызывающую апоптоз и снижающую фагоцитоз.

Методом иммуноблота у 70% изолятов доказана секреция эффекторных белков после индукции процесса снижением концентрации ионов Ca^{++} . Кроме того, цитотоксичность этих белков показана диссидентом на культуре клеток СНО с доминированием ExoU (91,7%) и EsoS (71,4%). Используя 75 клинических изолятов (из них 62% с множественной лекарственной устойчивостью), выделенных из разного биоматериала больных при участии лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, А.Б. Шеремет, применив статистический анализ, оценила способность Фтортиазинона подавлять функциональную активность ССТТ.

Объектом изучения *in vitro* были не только псевдомонады, но и микробы других таксономических групп, для которых не было отмечено ингибирования роста на питательной среде с разными дозами ФТ, т.е. вещество не обладало прямым антимикробным и антимикотическим

действием. Не было также обнаружено влияния ингибитора в тех же дозах на транскрипцию генов, контролирующих эффекторные белки псевдомонад. Однако результаты иммуноблота свидетельствовали о дозозависимом подавлении интенсивности секреции эффекторного белка под действием ингибитора. Кроме того, А.Б. Шеремет выявила дозозависимое снижение цитотоксичности изолятов, более выраженное для вариантов *exoS⁺*. Под действием Фтортиазина убедительно доказан диссертантам дозозависимый эффект восстановления захвата псевдомонад непрофессиональными фагоцитами, опосредованный белком *ExoS*.

Важным экспериментальным аргументом в пользу возможности воздействия на ССТТ с помощью ФТ являются результаты с подавлением формирования биопленок *P. aeruginosa* на культуре клеток почки собаки (MDCK). А.Б. Шеремет обнаружила снижение числа псевдомонад, прикрепившихся к поверхности эпителиальных клеток и последующего ингибирования образования биопленок. Следовательно, подавляя секрецию эффективных белков, можно блокировать опасный этап развития псевдомонадной инфекции – биопленкообразование, существенно снижающее терапевтический эффект от лекарств.

Поскольку у синегнойной палочки жгутик, близкий по структуре к ССТТ, обеспечивает микробу диссеминацию в организме и вовлечение в воспалительный процесс новых биотопов организма, в экспериментах *in vitro* Фтортиазинон был успешно апробирован как средство, сдерживающее подвижность возбудителя. Статистически значимый эффект препарата проявился 4-х и 7-кратно по сравнению с контрольными образцами. Эти данные не относятся к подвижности, связанной с пиями IV типа, которые отличаются по структуре от жгутика, т.е. ингибитор имел определенную специфичность действия, связанную со структурными особенностями мишени.

Одним из важных вопросов диссертационной работы было изучение возможности формирования резистентности у клинических штаммов *P. aeruginosa* к ингибитору ССТГ.

Совокупно об этих экспериментах можно сказать, что Шеремет А.Б. применила принцип длительного пассирования нескольких клинических культур в жидкой среде с разным количеством ФТ и без него. Для контроля использовала Ципрофлоксацин. Данные показали отсутствие формирования резистентных вариантов к ингибитору ФТ, тогда как к Ципрофлоксацину устойчивость возникала уже после 3-х пассажей. Дополнительным доказательством сохранившейся чувствительности псевдомонад к использованному препарату являются эксперименты на модели острой пневмонии у мышей с использованием исходного и пассированного на среде с ингибитором штаммов *P. aeruginosa*. Оказалось, что различий в штаммах не отмечено: величина LD₅₀ у обоих штаммов была одинаковой, а защита с помощью ФТ имела 100 % уровень.

Ключевым разделом диссертации явилось изучение химиотерапевтической эффективности ФТ в отношении антибиотикорезистентных штаммов *P. aeruginosa* с использованием модельных экспериментальных инфекций у мышей. На первых этапах изучения А.Б. Шеремет выбрала лекарственную форму ингибитора в виде таблетки (*per os*), исходя из физико-химических свойств вещества. Далее автор установила терапевтическую дозу и схему введения препарата (50 мг/кг массы человека 2 раза в день) по выживаемости мышей после разрешения животных вариантами клинических изолятов exoU⁺ и exoS⁺. Данные с коэффициентом пересчета были переориентированы на людей в таблетированной форме: 300 мг 2 раза в день для человека массой 70 кг. Следует отметить, что терапевтическую эффективность диссертант изучала на разработанной ею модели острой пневмонии у линейных мышей DBA/2 с применением госпитальных штаммов, различавшихся эффекторными белками ССТГ. Лечение зараженных мышей ингибитором ФТ, в зависимости

от дозы заражения позволило защитить до 100% животных. В процессе этого изучения диссертант определяла накопление возбудителя в органах и крови мышей. Лечение, начавшееся одновременно с заражением, приводило к снижению количества микробов в легком и селезенке. Но у выживших мышей в крови и селезенке микробы присутствовали.

Кроме испытанной схемы лечения был испытан вариант комбинированного применения ФТ с сочетанием профилактического приема препарата (за 2 дня до заражения по 100 мг/кг) и лечением в течение 4-х дней (50 мг/кг 2 раза в день). Выбранная схема оказалась также эффективной, сохраняя до 100% мышей и достоверно снижая бактериальную нагрузку в легочной ткани с полным отсутствием псевдомонад в крови и селезенке. Применение ингибитора при лечении острой пневмонии мышей давало эффект, сопоставимый с гентамицином и ципрофлоксацином. Лечение приводило к полному подавлению бактериемии и существенному элиминированию антибиотикорезистентных псевдомонад из легких.

Фтортиазинон, применяясь по 100 мг/кг 2 дня до заражения и 1 раз после заражения *P. aeruginosa* значительно снижал продукцию ИЛ-6 в крови мышей с острой пневмонией, что свидетельствовало об ограничении системного воспаления. Для других изученных цитокинов по сравнению с контролем различия были недостоверны. Диссертант делает вывод об ограничении патологического воспалительного процесса с помощью ингибитора ФТ.

Итак, на основании большого экспериментального материала, полученного в контролируемых условиях с использованием современных методов, автор научно и статистически обоснованно сформулировала основные положения для защиты, выводы, а также практические рекомендации.

Диссертант лично выполняла все основные этапы исследования, начиная с литературного поиска. Она не только адаптировала известные методы для

своих экспериментов, но и разработала оригинальные, например, модель острой псевдомонадной экспериментальной пневмонии у линейных мышей.

Здесь также уместно сказать, что А.Б. Шеремет представила диссертацию в классическом формате. Считаю, что по объему, структуре и иллюстративному материалу (фото, таблицы, рисунки) эту работу следует отнести к эталонам высокого уровня. Отмечены лишь случайные компьютерные замещения букв. Замечаний по существу диссертации не имеется.

В автореферате диссертант включила основополагающие результаты исследования, которые также были публично представлены на научных конференциях и в 4-х публикациях в журналах, включая рекомендованные ВАК.

Нами не выявлено заимствований из работ других авторов.

Новизна исследования

Диссертационные исследования выполнены с новым синтезированным в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ химическим низкомолекулярным соединением, фармакологический потенциал которого в отношении *Pseudomonas aeruginosa* не изучался. Ингибирование в опытах *in vitro* функциональной активности ССТТ под действием ФТ, проявившееся как у лекарственно устойчивых, так и у чувствительных клинических изолятов, показало отсутствие формирования резистентных вариантов псевдомонад к исследуемому препарату. На моделях экспериментальных инфекций на животных ФТ эффективно подавлял инфекционный процесс, вызванный резистентными изолятами возбудителя.

Все это относится к научным приоритетам. К новациям работы относится также доказательство подавления биопленкообразования на поверхности эукариотических эпителиальных клеток под действием ФТ, снижение цитотоксичности псевдомонад, а также восстановление фагоцитоза непрофессиональными фагоцитами, нарушенного эффекторными белками

возбудителя. Воздействие ФТ на продукцию противовоспалительных цитокинов выявило ограничение системного воспаления.

Установленная среди клинических культур распространность секреторного аппарата эффекторных белков у псевдомонад и его чувствительность к ФТ подтвердила перспективность ССТТ как мишени в предотвращении инфекционного процесса даже при лекарственно резистентных патогенах.

Доказательствами новизны результатов являются 1 патент № RU2624846 С1 и положительное решение о выдаче авторского свидетельства на изобретение № 2020111713 от 29.10.2020 г.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций

Полученные А.Б. Шеремет приоритетные научные сведения направлены на решение важных практических вопросов по борьбе с инфекциями, в том числе, вызванными лекарственно устойчивыми патогенами, обладающими ССТТ. Подавление вирулентности у *P. aeruginosa* (в дополнение к неродственным сальмонеллам и хламидиям) через воздействие на ССТТ оригинального препарата Фтортиазинон по разработанным дозам и схемам показывает широту терапевтических возможностей, не зависящих от резистентности к антибактериальным препаратам. Экспериментальные результаты диссертанта представлены в качестве доказательного материала в наборе документов для получения разрешения на проведение клинических исследований по оценке фармакологических свойств ФТ при применении на людях.

Заключение о соответствии работы требованиям

«Положения о присуждении ученых степеней»

Диссертация Шеремет Анны Борисовны «Разработка антибактериального лекарственного средства на основе ингибитора системы секреции III типа *Pseudomonas aeruginosa*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 –

микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная задача по подавлению антивирулентным препаратом Фтортиазинон инфекционных процессов, вызванных *P. aeruginosa*, включая лекарственноустойчивые бактерии, обладающие системой секреции III типа. Работа имеет существенное значение для микробиологии. По актуальности темы, объему выполненных исследований, современному методическому уровню экспериментов, научной новизне и практической значимости статистически обработанных результатов, а также по оформлению работа соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335; от 02.08.2016 г. № 748; от 28.08.2017 г. № 1024; от 10.11.2017 г. № 1093), а диссидент Шеремет Анна Борисовна заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент: профессор, д.б.н.,
зав. лабораторией микробиологических
питательных сред ФГБНУ НИИВС им.

И.И. Мечникова

E-mail: b.larus@mail.ru

Л.П. Блинкова

«29» апреля 2021 г.

Подпись Блинковой Л.П. удостоверяю

Ученый секретарь ФГБНУ НИИВС им.

И.И. Мечникова, к.м.н.

С.Н. Жирова

