

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Шеремет Анны Борисовны
«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

1. Актуальность темы диссертации

Лекарственная устойчивость бактериальных патогенов в настоящее время рассматривается в качестве важнейшей проблемы глобальной системы здравоохранения. При этом одним из наиболее значимых клинически значимых микроорганизмов с множественной резистентностью к антибиотикам является синегнойная палочка – *Pseudomonas aeruginosa*, включенная Всемирной организацией здравоохранения в число «патогенов критически высокого приоритетного уровня для разработки новых эффективных препаратов» [Global priority list of antibiotic resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, 2017].

Перспективным направлением решения данной проблемы считается разработка антимикробных препаратов, основанных на новом принципе действия – ингибировании факторов вирулентности у целевых микроорганизмов без развития бактерицидных или бактериостатических эффектов. При этом ожидаемым преимуществом их использования должно стать отсутствие «селективного давления» на популяцию возбудителя, исключающее возможность образования новой генерации резистентных форм. Актуальность разработки подобных препаратов отражена в «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года» (Распоряжение Правительства Российской Федерации № 2045-р; 2017 год).

Интересной мишенью для создания антивирулентных препаратов представляется бактериальная система секреции III типа (ССТТ), организованная как своеобразный «молекулярный шприц», инъецирующий эффекторные белки микроорганизма в цитоплазму эукариотической клетки организма-хозяина. При этом мутации, приводящие к нарушению функций ССТТ, вызывают снижение или полную утрату вирулентности.

В этой связи тема диссертационного исследования Шеремет Анны Борисовны, целью которого стало изучение механизма действия ингибитора системы секреции III типа бактерий в отношении *P. aeruginosa*, а также создание его основе лекарственного средства «Фтортиазинон» с оценкой

эффективности на модели экспериментальной инфекции, вызванной антибиотикорезистентными штаммами псевдомонад, является безусловно актуальной и соответствующей современным тенденциям развития мировой и отечественной науки в обсуждаемой отрасли научного знания.

2. Достоверность и новизна результатов и выводов

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения и определяется достаточным количеством экспериментов и наблюдений, проведенных с применением современных микробиологических, генетических и гистологических методов, адекватных целям и задачам диссертационного исследования. Эксперименты грамотно спланированы и выполнены, а обработка их результатов в большинстве случаев осуществлена с привлечением методов статистического анализа.

Оценивая новизну проведенного исследования, представляется необходимым выделить два ключевых момента:

1) На разнообразных моделях *in vitro* и *in vivo* показано выраженное защитное действие исследуемого низкомолекулярного ингибитора ССТТ, заключающееся в подавлении секреции эффекторных белков-токсинов *P. aeruginosa*, снижении цитотоксичности данного возбудителя в культуре клеток и блокировании острого инфекционного процесса, что сопровождается повышением выживаемости инфицированных лабораторных животных.

2) Действие ингибитора ССТТ не приводило к развитию резистентности к данному антимикробному препарату, а сам данный ингибитор демонстрировал свои защитные свойства вне зависимости от устойчивости *P. aeruginosa* к традиционным антимикробным препаратам.

Научная новизна полученного результата подтверждена патентом РФ на изобретение № RU 2624846, а также материалами заявки на изобретение № 2020111713, в отношении которой 29.10.2020 г. Федеральным институтом промышленной собственности принято решение о выдаче патента.

3. Ценность полученных результатов для науки и практики

Диссертационное исследование Шеремет Анны Борисовны органично сочетает фундаментальный и практически ориентированный аспекты. Полученные новые результаты о биологической активности соединения 4-(3-этокси-4-гидроксибензил)-5-оксо-5,6-дигидро-4Н-[1,3,4]-тиадиазин-2-(2,4-дифтор-фенил)-карбоксамиды явилось обоснованием для разработки оригинального препарата «Фтортиазинон» (в форме таблетки 300 мг), реализующего новый механизм действия - подавление ССТТ патогенных

бактерий и предназначенного для терапии инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами *P. aeruginosa*. Полученные экспериментальные данные позволили подготовить пакет документов для получения разрешения на проведение клинических испытаний и начать исследования по изучению безопасности, фармакокинетики и эффективности препарата «Фтортиазинон».

4. Содержание диссертации

Диссертация А.Б. Шермет изложена на 200 страницах машинописного текста, включающего разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных экспериментальных исследований, обсуждение, заключение и выводы. Диссертация достаточно полно иллюстрирована 17 таблицами и 47 рисунками, а также содержит список цитируемой литературы по обсуждаемому вопросу, включающий 165 источника, из которых отечественных публикаций – 13, иностранных публикаций – 152.

Введение содержит обоснование актуальности проведенного исследования, включающие описание широты распространения и патогенетическую значимость ССТТ *P. aeruginosa*, а также сведения об истории обнаружения и известной биоактивности 4-(3-этокси-4-гидроксибензил)-5-оксо-5,6-дигидро-4Н-[1,3,4]-тиадиазин-2-(2,4-дифторфенил)-карбоксамид. Этот же раздел включает формулировку цели и задач диссертационного исследования, ее научную новизну и практическую значимость, а также основные положения, выносимые на защиту и кратко раскрывающие суть полученного результата.

Обзор литературы достаточно хорошо структурирован и позволяет получить исчерпывающие представления о молекулярной организации ССТТ, её генетическом контроле, механизме действия и роли в патогенезе бактериальных инфекций. Имеющимся замечанием является ошибка на рисунке 3 (стр. 35): обозначение «кольцо *внутренней* мембраны PscC» неверно; ниже в тексте приведено правильное описание «кольцо *наружной* мембраны, образованное N-концевыми доменами белка PscC». Существенным по объему фрагментом литературного обзора является раздел «Мишени и механизм действия ингибиторов ССТТ», систематизирующий данные о соединениях с обсуждаемым вариантом биологической активности. Безусловно, охватить весь объем современной информации по данному вопросу представляется невыполнимой задачей, однако в тематическом обзоре всё-таки хотелось бы увидеть данные о гвадиномине В (англ. – guadinomine В), часто называемом наиболее сильным известным

ингибитором ССТТ грамотрицательных бактерий [Iwatsuki M, et al. Guadinomines, Type III secretion system inhibitors, produced by *Streptomyces* sp. K01-0509. I: taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot* (Tokyo). 2008 Apr; 61(4): 222-229; Iwatsuki M, et al. Guadinomines, Type III secretion system inhibitors, produced by *Streptomyces* sp. K01-0509. II: physico-chemical properties and structure elucidation. *J Antibiot* (Tokyo). 2008 Apr; 61(4): 230-236.].

Для проведения экспериментальных исследований автором использован обширный перечень классических и современных лабораторных технологий *in vitro* и *in vivo*, достаточно подробное описание которых представлено в главе «*Материалы и методы*». В то же время в данном разделе диссертанту следовало бы привести структурную формулу исследуемого ингибитора CL-55, присутствующую в открытых источниках, но никак не отраженную в материалах диссертации и автореферата.

Глава «*Результаты собственных исследований*» начинается с раздела «Характеристика эффекторных белков ССТТ у клинических изолятов *P.aeruginosa* и изучение активности ССТТ», представляющего новые экспериментальные данные о частоте встречаемости генов *exoU+* (менее широко распространенных) и *exoS+* (превалирующих) у российских нозокомиальных изолятов; доказательства более высокой цитотоксичности *exoU+* изолятов в сравнении с *exoS+* изолятами; повышенную частоту множественной лекарственной устойчивости среди *exoU+* относительно *exoS+* вариантов. Совокупность полученных данных еще раз подтверждает патогенетическое и клиническое значение ССТТ, а также представления о ней как перспективной мишени для нового поколения антимикробных препаратов.

Следующий раздел «Изучение действия ингибитора CL-55 на ССТТ *P. aeruginosa* в условиях *in vitro*» содержит доказательства того, что ингибитор CL-55 дозозависимо подавляет транслокацию эффекторных белков ExoT и ExoY, в связи с чем существенно снижает цитотоксичность *P. aeruginosa* в культуре клеток. При этом важным для понимания механизма действия CL-55 являются данные о том, что он не влияет на транскрипцию эффекторных белков ССТТ, одновременно негативно воздействуя на ассоциированную со жгутиком подвижность псевдомонад. Интересным является и факт увеличения интернализации бактерий в присутствии ингибитора, однако, интерпретация диссертантом данного эффекта как однозначно позитивного (применительно к непрофессиональным фагоцитам) представляется спорной. Более того, это вступает в противоречие с текстом диссертации (стр. 153; Рисунок 46), где в качестве перспективных механизмов для подавления

инфекционного процесса указываются «...адгезия, инвазия, *интернализация* и внутриклеточная репликация, система коммуникации бактерий, секреторные системы, токсины, и образование биопленок». Неожиданными являются и данные об ингибирующем эффекте CL-55 на процесс биопленкообразования, у *P. aeruginosa* тесно связанного с феноменом плотно-зависимой коммуникации (англ. – quorum sensing; QS). При этом современные данные [Pena RT et al. Relationship between quorum sensing and secretion systems. Front Microbiol. 2019;10:1100. Published 2019 Jun 7. doi:10.3389/fmicb.2019.01100] указывают на то, что QS у *P. aeruginosa* негативно контролирует ССТТ, в связи с чем совместное ингибирование системы секреции и биопленкообразования выглядит парадоксально и требует более глубокого исследования и анализа.

Материалы раздела «Изучение антимикробной активности CL-55» свидетельствуют об отсутствии у него прямого рост-ингибирующего эффекта, а также не происходящем формировании резистентности к ингибитору в опытах *in vitro* и *in vivo*, что соответствует исходным ожиданиям.

Логичным завершением работы явилось проведенное диссертантом «Изучение химиотерапевтической эффективности антибактериального лекарственного средства, ингибитора системы секреции III типа, для лечения инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами *P. aeruginosa*, на моделях экспериментальных инфекций». Общем замечанием к данному разделу является необходимость статистической обработки ряда полученных результатов (некоторые из них, например, гистологическая картина легких мышей, имеют исключительно описательный характер без использования каких-либо числовых значений).

В главе *Обсуждение результатов* диссертантом последовательно проанализирован каждый из полученных фактов, определено их соответствие современному уровню научного знания в обсуждаемой предметной области, обсуждено их значение для современной медицинской микробиологии, инфектологии, фармакологии и практического здравоохранения.

Работу завершает *Заключение*, в краткой форме обобщающее результаты проведенного исследования и расставляющее наиболее значимые акценты.

Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора, обоснованы и достоверны.

В целом существенных недостатков у оппонируемой работы не выявлено, а указанные замечания никак не умаляют значимость проделанной работы и не изменяют ее общую положительную оценку.

При общей положительной оценке работы у оппонента возникли следующие вопросы:

1) Поскольку заявленной целью работы является «...изучение механизма действия ингибитора системы секреции III типа...», хотелось бы получить разъяснение, к какой из трех групп ингибиторов ССТТ, указанных на стр. 48 текста диссертации и классифицированных по мишеням воздействия, следует отнести исследуемый ингибитор CL-55?

2) Как может быть объяснено совместное ингибирование биопленкообразования и ССТТ при воздействии CL-55, если по имеющимся данным генетический контроль их экспрессии является альтернативным: биопленкообразование индуцируется системой «quorum sensing» *P. aeruginosa* (в частности, системой RhlI/RhlR), в то время как та же система плотностно-зависимой коммуникации негативно влияет на экспрессию регулона ССТТ названного микроорганизма?

5. Опубликование результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертации представлены в 4 печатных работах, в том числе 3 статьях в научных журналах «Молекулярная генетика, микробиология и вирусология» и «BioMed Research International», индексируемых в международных базах научного цитирования Scopus и Web of Science, а также журнале «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия», рекомендуемом ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований.

В списке публикаций отсутствует патент РФ на изобретение № RU 2624846 «Применение 4-(3-этокси-4-гидроксибензил)-5-оксо-5,6-дигидро-4Н-[1,3,4]-гиадиазин-2-(2,4-дифт-орфенил)-карбоксамид для подавления инфекции, вызванной устойчивыми к антибиотикам штаммами *Pseudomonas aeruginosa*, и способ подавления этой инфекции» (Опубликовано: 07.07.2017. Бюл. №19), в котором диссертант указан в качестве одного из соавторов, хотя информация о данном патенте приводится в разделе «Внедрение полученных результатов в практику» в тексте диссертации и автореферата.

6. Содержание автореферата

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертации, замечаний нет.

Заключение

Диссертационная работа Шермет 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 на основании выполненных автором исследований осуществлено решение важной задачи, имеющей теоретическую и практическую значимость. По своей актуальности, научной новизне, практической значимости работа и уровню проведенных исследований диссертационная работа в полной мере соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.13 г., с изменениями в редакции постановлений РФ №335 от 21.04.16 г., № 748 от 02.08.16 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор - Шеремет Анна Борисовна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Ведущий научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Федеральный научный центр биологических систем и
агротехнологий Российской академии наук»,
доктор медицинских наук по специальности 03.02.03. - Микробиология,
профессор

Дерябин Дмитрий Геннадьевич

460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, дом 29
Телефон: +7 903 221 39 63;
Адрес электронной почты: dgderyabin@yandex.ru

Подпись Дерябина Дмитрия Геннадьевича заверяю,
заместитель директора по науке
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Федеральный научный центр биологических систем и
агротехнологий Российской академии наук»,
доктор биологических наук



Е.А. Сизова

2021 года