

Отзыв официального оппонента Садыковой Веры Сергеевны, доктора биологических наук, доцента
на диссертацию Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази на тему:
«Изучение механизмов токсичности и клеточной гибели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванных новыми и классическими противогрибковыми препаратами», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность избранной темы

Одной из наиболее важных и нерешенных проблем современной медицины является борьба с грибковыми инфекциями. Поражая людей с ослабленным иммунитетом, подобные инфекции протекают чрезвычайно тяжело, трудно поддаются лечению существующими лекарственными препаратами, и характеризуются высокой смертностью, превышающей в случае глубоких (инвазивных) микозов 50 % от общего количества случаев. Снижение и частая потеря эффективности лечения основными конкурентами из группы азолов и эхинокандинов на потребительском рынке по причине быстро растущей резистентности патогенных грибов к применяющимся препаратам; появление новых особо опасных мультирезистентных видов грибов (*C. auris*) не поддающихся лечению существующими на фармрынке препаратами являются основными движущими факторами к поиску и созданию новых противогрибковых препаратов. Огромным вызовом для клинической медицины явилось появление мультирезистентных возбудителей дрожжевых грибов *Candida auris*, устойчивых одновременно к разным классам противогрибковых препаратов. Необходимы новые высоко активные и малотоксичные противогрибковые антибиотики, обладающие принципиально новой химической структурой и новым оригинальным механизмом действия, способствующим преодолению устойчивости к существующим антимикотикам. Поэтому быстрый и недорогой высокопроизводительный скрининг по механизму действия для лидерных молекул с противогрибковой активностью является одной из необходимых условий в поиске новых лекарственных средств, в связи с чем тематика и задачи, поставленные в диссертации Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази является крайне актуальными.

Достоверность и новизна полученных результатов.

Достоверность полученных результатов, выводов и положений не вызывает сомнений и подтверждается достаточным количеством исследуемого материала, использованием современных методов

исследования. Все полученные автором результаты статистически обработаны с помощью современных компьютерных программ, выбор метода обработки соответствовал объему и формату проведенных исследований. Положения и выводы основаны на достоверных статистических данных.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Целью работы являлось разработка высокоэффективного метода получения характеристик ответа клеток грибов на воздействие веществ с антифунгальной активностью и применение этого метода для характеристики и сравнения механизмов действия известных и новых видов антимикотиков на клетки дрожжей. В задачи работы входило создание коллекции штаммов *S. cerevisiae*, продуцирующих белки, меченные GFP, которая позволит изучить реакции различных внутриклеточных систем; На основе созданной панели тестов провести анализ и сравнения клеточных ответов на различные по механизму действия и химической структуре вещества с антимикотической активностью, для которых известен механизм действия, и для которых механизм действия еще не описан.

Положения и выводы диссертационной работы обоснованы полностью раскрытой целью научного исследования и выполненными задачами, поставленными для ее достижения. Для корректной постановки цели исследования автором диссертационной работы проанализирован достаточный объем источников литературы. Все данные, полученные в ходе выполнения задач исследования, подвергнуты глубокому теоретическому анализу с учетом уже имеющихся знаний в сфере научных интересов автора. Положения, выносимые на защиту, и полученные выводы имеют логическое подтверждение в тексте и хорошо иллюстрированы таблицами и рисунками. Каждое положение и вывод имеют смысловое и фактическое обоснование и логично связаны между собой единой целью исследования. Практические рекомендации лаконично и четко прописаны в соответствующем разделе работы, выполнимы и могут быть использованы специалистами учреждений различного профиля.

Основные положения и выводы диссертационной работы сделаны по результатам экспериментов с применением методов проточной цитометрии, флуоресцентной микроскопии, спектрофотометрии. Первичный анализ исходных данных проводился с помощью программного обеспечения CytExpert (Beckman Coulter). Для анализа полученных данных были использованы пользовательские скрипты Python. Сравнение белка между

обработанными и контрольными клетками проводили с использованием двух метрик: кратного изменения флуоресценции и вычисления z-критерия. Статистический анализ был проведён с использованием различных методов для оценки влияния обработок на измеряемые переменные и проверки надежности полученных результатов.

Ценность для науки и практики результатов работы.

- Создана коллекция штаммов, *S. cerevisiae*, продуцирующих белки, конъюгированные с GFP. Коллекция штаммов стала основой нового метода - SCRAPPY (Single Cell Rapid Assay of Proteome Perturbation in Yeast), позволяющего определить изменения протеома на уровне отдельных дрожжевых клеток. Разработан новый метод оценки механизма действия химических веществ разных классов с противогрибковой активностью. Метод SCRAPPY (Single Cell Rapid Assay of Proteome Perturbation in Yeast; одноклеточный экспресс-анализ изменения протеома дрожжей) даёт возможность проводить анализ на уровне одной клетки, что позволяет получить данные о воздействии различных антимикотиков, которые недоступны или сложно выполнимы с помощью других методов.
- Уникальная возможность нового метода измерять уровни белков на уровне одной клетки способствует выявлению клеточной гетерогенности биологических реакций, которые могут остаться незамеченными при массовом анализе. Это предоставляет важные сведения об адаптации клеток к исследуемым веществам. Метод позволяет в течение короткого времени получить протеомный профиль клеточного ответа на широкий спектр химических веществ, что делает его удобным для масштабного тестирования различных условий применения антифунгальных препаратов.
- С помощью нового предложенного метода впервые были получены сведения о механизмах действия ряда антимикотиков, в частности, впервые получены данные о реакции клеток грибов на тиазолидиновый антимикотик микозидин, который одобрен Минздравом РФ для наружного применения. С помощью разработанного метода установлено, что микозидин приводит к индукции переносчика глюкозы Hxt3, и отсутствие этого белка вызывало чувствительность к этому веществу.
- Впервые охарактеризован механизм действия алкилированных аналогов цитидина. Показано, что вещества SOV4 и SOV8 вызывают увеличение количества белков Hom2 и Ago3, участвующих в синтезе ароматических аминокислот, и белка окислительного стресса Trx2.

- Исследовано новое гибридное соединение L173, состоящее из азольной и тиазолидиновой части. Было продемонстрировано сходство с ответом на азольные, но не тиазолидиновые антимикотики (микозидин), что указывает на то, что активной является только его азольная часть.
- Впервые показано, что широко используемый в медицине и пищевой промышленности натамицин обладает необычным фунгицидным действием, так как приводит к наиболее эффективной гибели клеток при концентрации близкой к МИК, но при концентрации выше МИК его фунгицидное действие становится значительно менее эффективным.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы «материалы и методы», главы «результаты и их обсуждение», заключения, выводов, списка литературы и приложений. Материалы диссертации изложены на 178 страницах машинописного текста, включая 17 таблиц и 31 рисунков. Список литературы содержит 212 работ, в том числе на иностранном языке 208 работ.

В разделе «Введение» обосновывается актуальность проблемы, раскрываются цели и задачи исследования, обозначается научная новизна, теоретическая и практическая значимость, перечисляются материалы и методы исследования, формулируются тезисы, подлежащие защите, подтверждается достоверность исследования и представляется информация. В первой главе автор затрагивает проблему микозов человека и животных, а также фитопатогенных грибов, приводит классификацию современных антимикотиков и противогрибковых средств, в том числе применяемых в клинике, описывает различные механизмы их действия. Отдельно освещены преимущества как модельного организма для исследования механизмов действия перспективных антимикотиков дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а также известные методы оценки механизмов действия антибиотиков: протеомика на основе масс-спектрометрии для разработки новых антифунгальных препаратов и флуоресцентная проточная цитометрия.

В главе 2 и приложениях представлена исчерпывающая информация по объектам и материалам исследования, а также всех используемых автором в диссертационной работе методик, включающих современные микробиологические, микроскопические, молекулярные, а также обширный блок химических исследований, включая масс-спектрометрию.

Результаты диссертации представлены в двух главах Глава 3, Глава 4 и Глава 5. В главе 3 исследуется протеомный ответ различных по структуре и

механизму действия соединений с противогрибковой активностью. Обзор полученных данных показал, что значительное число отобранных белков повышается в ответ на большинство различных изучаемых соединений. Показаны преимущества предложенного соискателем метода тестирования SCRAPPY, в сравнении с традиционными, включая скорость и простоту сбора и анализа данных, низкую стоимость анализа и умеренное потребление новых биологически активных веществ, которые часто доступны в ограниченных количествах.

Соискатель в собственных экспериментах подтверждены известные по литературным данным сведения для азольных соединений. Флуконазол и вориконазол отчетливо повышали уровень Erg3-GFP и Erg10-GFP как и известные азолы, нацеленные на Erg11 и влияющие на липидный обмен. Для туникамицина показано специфическое повышение концентрации белка, который превращает фруктозо-6-фосфат в маннозо-6-фосфат, необходимый для гликозилирования в секреторном пути белков Pmi40 и Pre4. Установлено протеотоксическое окислительное повреждение белков, вызванное туникамицином, на что указывает значительное увеличение концентрации белка Tsa1 – пероксиредоксина, являющегося партнером Hsp70, который облегчает взаимодействие с окислительно поврежденными белками и специфическим увеличением концентрации белков Aha1 и Ydj1. Автор с помощью метода SCRAPPY изучил действие новых производных тиазолидина, для которых ранее были не описаны механизмы: установлено, что микозидин и его 3-бензоильное производное (3В-Мус) и вещество L-173. Как и азолы, они показали увеличение количества транспортера глюкозы Hxt3 (для микозидина только при его низкой концентрации) и переносчика лекарств Pdr5. Полученные данные показали, что большинство исследованных веществ, принадлежащих к разным классам, имеют достаточно четко различимые профили воздействия на клетки дрожжей, в то время как вещества со сходным механизмом действия имеют сходный профиль тепловой карты клеточного ответа (например, пары вориконазол и флуконазол; 11326083 и пиритион; три вещества SOV4, SOV4 и Ala54).

В Главе 4 соискатель исследует клеточный ответ на воздействие разных антимикотиков по экспрессии гистонов в клетке дрожжей. Благодаря использования проточной цитометрии, которая позволяет исследовать изменения уровня белков в индивидуальных клетках, было изучено влияние всех протестированных соединений на клеточный цикл с помощью количественной оценки содержания в клетках меченого гистона Htb2-GFP.

Установлено, что азолы не изменяли распределение количества гистонов, в то время как тиазолидины (микозидин и 3Мус) и соединения

ионофоров меди (MP и соединение 11326083) вызывали клеточный арест с количеством гистонов, соответствующим 1С, ионофоры меди и микозидин вызывали снижение количества гистонов, что может быть связано с деградацией ДНК в клетках, непроницаемых для йодида пропидия.

Глава 5 посвящена изучению чувствительности новых амидов полиеновых антибиотиков панели мутантов *S. cerevisiae* с делециями генов, участвующих в конечных стадиях биосинтеза эргостерола. Был изучен ряд классических полиеновых антимикотиков и их производные с повышенной растворимостью в воде. Установленные автором различия в механизмах восприимчивости этих мутантов к разным производным соискатель связывает с тем, что различные синтезированные антимикотики проявляют уникальное сродство к различным предшественникам эргостерола. Данные показали, что как пермеабилизирующие полиены (амфотерицин и нистатин), так и непермеабилизирующие полиены (натамицин) демонстрируют различные профили чувствительности у мутантов эргостерола (erg).

Автором в диссертационной работе представлено «Заключение», в котором обстоятельно систематизированы результаты диссертационной работы. Выводы сформулированы четко и обосновано, и полностью отражают представленный экспериментальный материал.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации.

Автореферат Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази полностью соответствует основному содержанию диссертации. Диссертация и автореферат соответствуют всем правилам написания и оформления соответствующих научных работ, установленным в нормативных документах. По теме диссертации опубликованы 12 научных работ, из них 6 в журналах, индексируемых в международных базах цитирования Scopus и WOS, 6 – в иных изданиях, в сборниках научно-практических конференций и материалах форума.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации.

Автором исследования достигнута цель – создана панель штаммов *S. cerevisiae*, продуцирующих белки, меченные GFP, которая позволит изучить реакции различных внутриклеточных систем, на основе которой разработан новый метод выявления механизмов действия антибиотиков и доказана его эффективность для исследования механизмов действия разных классов клинических противогрибковых препаратов и новых перспективных соединений.

Диссертация написана корректным научным языком, текст логично и грамотно изложен, снабжен необходимыми табличными данными и рисунками. В качестве незначительных недостатков работы можно упомянуть встречающиеся многочисленные опечатки, повторы слов и неправильные видовые латинские названия микроорганизмов, встречающиеся по тексту диссертации.

Диссертационная работа Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази. заслуживает высокой оценки, однако есть ряд замечаний, которые не снижают этой оценки, но могут быть полезны автору в последующей работе:

1. Во «Введении» и «Обзоре литературы» соискателю стоило бы более четко разграничить проблему заболеваемости различными микозами, вызываемыми патогенными грибами (Список ВОЗ от 2022 г - WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.), от проблемы потери урожая и заболеваемости растений в сельском хозяйстве, так как список видов фитопатогенных грибов кратен выше. При упоминании лучше разделять такие понятия как «патогенные грибы», «оппортунистические грибы» и «фитопатогенные грибы» и соответственно препараты – противогрибковые и антимикотики, которые используются в медицине и растениеводстве.
2. С. 28 «Обзора литературы» плесневый гриб *Aspergillus fumigatus* ошибочно указан как дрожжи.
3. С. 84 «Результаты» также ошибочно написано, что N4-алкилцитидины используются «для защиты произведений искусства от разложения, вызванного патогенными грибами». На самом деле, видимо, имеются в виду грибы – биодеструкторы, вызывающие порчу предметов искусства.
4. С. 88 на рисунок 19 автор описывает рост колоний гриба под воздействием препаратов как фунгицидное действие. Как именно методически определялось «цидность» препарата по росту дрожжей и в чем тогда отличие от фунгистатического действия?
5. В главе 3 рисунок 17, с.87. Чем автор может объяснить, что при внесении различных концентраций микозидина увеличение количества белков-транспортёров: Pdr5 и Hxt3 наблюдали только в концентрации $\frac{1}{2}$ МИК и действие вещества полностью нивелировалось в больших концентрациях?

Заключение.

Диссертационное исследование Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази «Изучение механизмов токсичности и клеточной гибели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванных новыми и классическими противогрибковыми препаратами» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи, имеющей важное значение для микробиологии, фармацевтики и медицинской химии. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, согласно п. 2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», утвержденного ученым советом РУДН протокол № УС-1 от 22.01.2024 г., а её автор, Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази, заслуживает присуждения ученой степени биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент, заместитель
директора по научной работе ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт по изысканию новых
антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»  Садыкова В. С.

Контактные данные: тел. +7(499) 255-20 -13 e-mail: sadykova_09@mail.ru

Адрес организации: 119021, Москва,
ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых
антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Отзыв Садыковой В.С. заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИНА» к.х.н.



О.В. Кисиль

06.02.2025 г