

Отзыв официального оппонента на диссертацию Рогачёвой Елизаветы Владимировны на тему «Антибактериальные свойства новых химических соединений природного и синтетического происхождения в отношении бактерий группы ESKAPE», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 - «микробиология»

Актуальность. В последние десятилетия избыточное и нерациональное использование антимикробных препаратов (АМП), социальные и экономические факторы, ускорили распространение устойчивых к АМП бактерий, определив безуспешность их использования. В последние три года наблюдается «пандемия» устойчивости к АМП, которая усилилась из-за повсеместного и бесконтрольного использования АМП при терапии пациентов с COVID-19.

Устойчивость к АМП прогнозируется как одна из самых серьёзных угроз для здоровья человека. По расчётам CDC, если ситуация не изменится коренным образом, то общее число смертей от бактериальных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) к 2030 году составит около 10 млн., что превышает общее число смертей в совокупности из-за сердечных и онкологических заболеваний на данный момент.

Подсчитано, что в 2019 г. зарегистрировано 4,95 млн. смертей, связанных с устойчивостью к АМП. При этом шесть патогенов ответственны за более чем 250 тыс. смертей, связанных с устойчивостью к АМП: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*. Распространение резистентных штаммов наблюдается повсеместно. Наибольшую обеспокоенность вызывает распространение в Российской Федерации штаммов *A. baumannii* и *K. pneumoniae*. При осложнённых формах COVID-19 в 30-50% случаев у пациентов, находившихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), выделялись штаммы *A. baumannii* с МЛУ, практически не поддающиеся лечению АМП.

Несмотря на то, что научно-исследовательский конвейер постепенно пополняется новыми АМП, только один из каждых четырёх новых АМП представляет собой принципиально новый класс АМП. Ни один АМП не активен в отношении критических (по мнению ВОЗ) патогенов ESKAPE. Это требует поиска новых подходов к лечению пациентов.

Известен целый ряд веществ с антибактериальным действием: природного происхождения (растительные, животные, минеральные, микробные), синтетического происхождения (большинство АМП).

Многие из них уже оказались малоэффективными для борьбы с нозокомиальными штаммами группы ESKAPE, как большинство АМП, или дорогими, со сложной технологией получения и высокой токсичностью, как многие пептиды. Для решения глобальной проблемы антибиотикорезистентности бактерий необходима разработка новых соединений антибактериальной направленности (преантибиотиков).

Необходимо обеспечить систематический поиск и разработку новых АМП, эффективных в отношении приоритетных патогенов с МЛУ, в связи с чем, поиск, разработка и изучение антибактериальных свойств новых соединений различной природы вносит существенный вклад в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации. В связи с этим диссертационное исследование Рогачёвой Елизаветы Владимировны «Антибактериальные свойства новых химических соединений природного и синтетического происхождения в отношении бактерий группы ESKAPE» следует признать актуальным, оправданным как с теоретических, так и, прежде всего, с практических позиций.

Основные результаты работы и их новизна.

- Впервые выявлены антибактериальные свойства нановолокон на основе куркумина и гиалуроновой кислоты в отношении бактерий группы ESKAPE (МИК 90 мг/мл).
- Установлено снижение количества бактерий *S. aureus* в $1 \cdot 10^5$ раз под воздействием комплекса «титан (Ti) и серебро (Ag)».
- Определена антибактериальная активность азиринов из группы полусинтетического и синтетического происхождения (МИК для *S. aureus* 4,5 мкг/мл, МИК для *P. aeruginosa* и *E. aerogenes* – 9 мкг/мл).
- Определён механизм биоцидной активности сплава Cu-Zn, полученного путём сонохимической обработки, основанный на комплексе факторов, воздействующих на бактериальную клетку.
- Изучено потенцирование действия меропенема в отношении бактерий группы ESKAPE с помощью синтезированных соединений сульфонамидов со снижением МИК в 66 и 133 раза.
- Показано антибактериальное действие соединений-лидеров на модели экспериментальных животных.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Положения и выводы диссертационной работы обоснованы полностью раскрытой целью научного исследования и выполненными задачами, поставленными для её достижения. Для правильного выбора цели исследования соискателем проанализирован достаточный объём источников литературы (8 отечественных и 232 зарубежных источников). Все данные, полученные в ходе выполнения задач исследования, подвергнуты глубокому теоретическому анализу с учётом уже имеющихся знаний в сфере научных интересов соискателя. Положения, выносимые на защиту, и полученные выводы имеют логическое подтверждение в тексте и иллюстрированы таблицами и рисунками. Каждое положение и вывод имеют смысловое и фактическое обоснование, логично связаны между собой единой целью исследования.

Практические рекомендации лаконично и чётко прописаны в соответствующем разделе работы, выполнимы и могут быть использованы специалистами учреждений различного профиля: научного и лечебно-

профилактического.

Теоретическая значимость полученных соискателем результатов заключается в следующем:

- на основе полученных данных определён механизм антибактериального действия успешных синтезированных соединений, что позволит конструировать улучшенные образцы для борьбы с возбудителями нозокомиальных инфекций;
- в опытах *in vitro* и *in vivo* определены действующие концентрации соединений-лидеров, которые смогут быть переданы для следующего этапа доклинических испытаний;
- методика и программа исследований может быть использована для оценки других разрабатываемых групп соединений антибактериального назначения.

Практическая значимость полученных соискателем результатов заключается в следующем:

- Создана рабочая коллекция штаммов бактерий группы ESKAPE (120 штаммов), охарактеризованная по их отношению к АМП выбора для этиотропной терапии инфекционного процесса, вызванного каждым представителем группы.
- Созданы и зарегистрированы базы данных: База данных резистентных к антибиотикам фенотипов бактерий группы ESKAPE (№ 2021621695), База данных чувствительных к антибиотикам фенотипов бактерий группы ESKAPE (№ 2021622085), База данных фенотипа чувствительности к антибиотикам и бактериофагам и генотипа антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных при нозокомиальных инфекциях (№ 2023621897), База данных генотипа и фенотипа вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных COVID-19 (№ 2023621900).
- Разработан дизайн исследования антибактериальных свойств соединений растительной, минеральной природы и искусственно синтезированных, который может быть использован для оценки других разрабатываемых групп соединений антибактериального назначения.
- Полученные данные используются в процессе преподавания биологии, микробиологии и фармакологии в соответствующих высших учебных заведениях, на курсах повышения квалификации врачей, при проведении научно-практических семинаров.

Полнота изложения основных результатов диссертационной работы. Результаты работы опубликованы в 24 печатных работах, из них 22 статьи в журналах из перечня международных баз цитирования Scopus и Web of Science, 2 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России или РУДН для опубликования результатов диссертационного исследования.

Оценка содержания работы. Диссертация Рогачёвой Е. В. является законченным научно-квалификационным трудом, написана по

общепринятому типу, состоит из введения, обзора литературы, 3 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, приложений. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста, иллюстрирована 26 таблицами и 8 рисунками. Список литературы включает 240 источников, из которых 8 отечественных и 232 зарубежных.

Во введении обоснована актуальность рассматриваемой проблемы, цель и задачи исследования, раскрыты научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, перечислены материалы и методы исследования, сформированы положения, выносимые на защиту, подтверждена степень достоверности и апробация результатов исследования. Во введении автор логично и грамотно обосновывает актуальность работы. Цель и поставленные задачи чётко сформулированы согласно теме диссертации. Цель диссертационного исследования соответствует поставленным задачам. Объём исследований достаточен для решения поставленных задач.

В **обзоре литературы** диссертант даёт характеристику изучаемой проблемы. Обзор литературы представляет анализ современных данных отечественных и зарубежных исследователей по распространённости бактерий с высоким уровнем резистентности к АМП в мире, включая Россию, профили их устойчивости к АМП. Соискатель даёт оценку экономического ущерба от инфекционных заболеваний, бактериальной этиологии. Диссертант характеризует исследуемые соединения растительной, минеральной и синтетической природы с антибактериальной активностью, показывает успехи и неудачи их использования. Соискатель описывает синергизм препаратов с антибактериальными свойствами. Соискатель описывает биологические модели для исследования антибактериальной активности синтезированных соединений *in vivo*. Оценивая обзор литературы, следует отметить, что он основывается на современных научных источниках, изложен логично и позволяет получить достаточно полную информацию о состоянии проблемы, изучаемой диссертантом. Соискатель провёл анализ отечественных и зарубежных источников литературы, имеющих непосредственное отношение к цели и задачам диссертационной работы, что свидетельствует о знании предмета исследования.

В главе **«Материалы и методы исследования»** представлены материалы, методы, объём проведённых исследований (всего 5154 исследований), описан дизайн исследования. Соискателем использованы следующие методы исследования: бактериологический метод, масс-спектрометрический метод идентификации микроорганизмов MALDI-ToF MS, методы определения чувствительности к АМП, полногеномное секвенирование штаммов *K. pneumoniae* и *S. aureus*, сканирующая электронная микроскопия, использованы биологические модели *in vivo*, статистический анализ. Представленные в работе лабораторные,

микробиологические методы исследования спланированы, современны, адекватны поставленным задачам. Статистическая обработка полученных результатов исследований проведена с помощью корректных методов статистической обработки. Все полученные данные обработаны с использованием коммерческих пакетов стандартизированных программ «Statistica 12.6, SPSS Statistics для Windows 7.0». Для первичной подготовки таблиц использован программный пакет Excel. Статистический анализ количественных признаков проведён с использованием параметрических методов: расчёт среднего арифметического - \bar{x} , ошибки среднего - Sx , среднеквадратичного отклонения - σ , критерий Фишера - сравнений дисперсий двух независимых выборок. Отличия между выборками, распределёнными по нормальному закону, оценивались по параметрическому критерию Стьюдента.

В третьей главе соискатель даёт оценку чувствительности изученных штаммов бактерий к официальным АМП, характеризует их фенотип и генотип. Выявлено, что 66,5% штаммов обладают генетическими и фенотипическими факторами антибиотикорезистентности. Установлено, что наибольшим набором генов антибиотикорезистентности обладают штаммы *K. pneumoniae* (37 генов) и *S. aureus* (10 генов). Доля штаммов с МЛУ среди *K. pneumoniae* составила 60%, среди *S. aureus* - 40%. Соотнесён набор генов антибиотикорезистентности с фенотипическими профилями устойчивости.

В четвёртой главе приведена характеристика новых антибактериальных веществ и чувствительности клинических изолятов бактерий из собственной коллекции к ним. Соискателем исследовано 250 соединений из 20 групп различного происхождения (природные, минеральные, синтетические) в 1572 экспериментах, 18 из которых являлись соединениями-лидерами и отобраны для дальнейшей оптимизации, 1 вещество рекомендовано для исследований *in vivo* на биологических моделях. Диссертантом впервые описано действие нановолокон куркумина на грамотрицательные патогены. Соискателем подтверждена гипотеза биоцидной активности образцов, одновременно выделяющих ионы меди и цинка. Соискателем проведена оптимизация аналогов нитрофурана и выделен новый антибактериальный агент N-циклогексил-2-(5-нитрофуран-2-ил)имидазо[1,2-а]пиридин-3-амин (соединение 4а), показавший хороший антибактериальный профиль против *E. cloacae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* (МИК 0,25, 0,06, 0,25, 0,25 мкг/мл, соответственно). Соискателем обнаружены соединения азириновой кислоты, ингибирующие рост *S. aureus* в концентрациях даже более низких, чем Сульфаметоксазол.

Пятая глава посвящена результатам изучения антибактериального действия вещества-лидера 2*H*-азиринов-2-карбоновых кислот на биологической модели мышах. Установлено, что пик развития инфекционного процесса у мышей приходился на 7-й день заражения, в то время как при лечении АМП и антибактериальным веществом отмечается положительная динамика и снижение КОЕ при высевах с раневой поверхности с первого дня (65 и 73

КОЕ/мл для АМП и вещества соответственно).

В заключении обсуждаются полученные результаты исследования. **Выводы и практические рекомендации** являются логическим завершением диссертационной работы, выполненной на современном научно-методическом уровне, соответствуют поставленным задачам и цели исследования, в полной мере отражают полученные результаты. В заключении обобщены полученные соискателем результаты и проведено их сравнение с данными других исследователей, что позволило сформулировать итоги работы, целиком и полностью вытекающие из содержания диссертационного материала.

Автореферат соответствует основным положениям диссертации.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». М.: Стандартинформ. - 2012. Диссертация и автореферат Елизаветы Владимировны соответствует всем правилам написания и оформления соответствующих научных работ, установленным в нормативных документах.

Работа, представленная Рогачёвой Е. В., выполнена на современном методическом уровне. Поставленные соискателем цели и задачи выполнены. Соискателем достигнута цель - изучены антибактериальные свойства новых синтезированных химических соединений природного и синтетического происхождения в отношении бактерий группы ESKAPE. Качество оформления диссертации соответствует нормативным положениям, предъявляемым ВАК РФ к научным работам на соискание учёной степени кандидата наук.

Принципиальных замечаний с точки зрения методики выполнения диссертации, статистической обработки материалов, обоснования выводов и практических рекомендаций нет. В рукописи имеются отдельные стилистические погрешности. Вместе с тем возник ряд вопросов, на которые хотелось бы услышать ответы соискателя:

1. Патентовали ли Вы определённый в эксперименте антибактериальный эффект соединений-лидеров?
2. Какова перспектива дальнейшего доклинического и последующего клинического исследования соединений-лидеров?
3. Какое направление борьбы с патогенами ESKAPE, на Ваш взгляд перспективнее: разработка новых АМП или создание бактериофагов избирательно лизирующих антибиотикорезистентные бактерии, в том числе штаммы патогенов ESKAPE с МЛУ?

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней» по пунктам:

9) Диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение актуальной научной задачи - поиск и изучение веществ с антибактериальной активностью.

10) Диссертация написана автором самостоятельно, обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты. Личный вклад автора в работу составляет более 85%.

11) Основные научные результаты диссертации опубликованы в 2 научных рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК, 22 - в изданиях, входящих в библиографические базы данных Scopus и Web of Science.

14) При использовании методик или полученных ранее отдельных результатов автор диссертации ссылается на автора и источник заимствования материалов.

Заключение

Диссертация Рогачёвой Елизаветы Владимировны на тему «Антибактериальные свойства новых химических соединений природного и синтетического происхождения в отношении бактерий группы ESCAPE», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 - «микробиология», выполненная под руководством доктора медицинских наук Краевой Л. А., является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена актуальная задача микробиологии - поиск и изучение новых антибактериальных препаратов, имеющая существенное значение для микробиологии (биологические науки), обеспечивающая адекватный ответ на возникающие вызовы и биологические угрозы и вносящая важный вклад в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения России и поддержание на должном уровне биобезопасности государства.

По объёму выполненного исследования, его актуальности, методическому уровню, объёму исследований, научно-практической значимости полученных результатов, обоснованности и достоверности выводов, диссертационная работа соответствует п. 2.2 раздела II Положения о присуждении учёных степеней в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов», утверждённого учёным советом РУДН протокол № УС-1 от 22.01.2024 г., а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 - «микробиология».

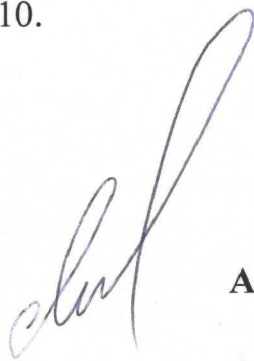
Согласен на сбор, обработку, хранение и размещение в сети «Интернет» моих персональных данных (в соответствии с требованиями Приказа Минобрнауки России № 662 от 1 июля 2015 года), необходимых для работы диссертационного совета ПДС 0300.010.

Официальный оппонент

доктор медицинских наук, профессор,

Руководитель отдела микробиологии
Федерального бюджетного учреждения науки
«Московский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии
им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора
125212, Москва, ул. адмирала Макарова 10
e-mail: prof_mirinov@gabrich.ru

15 апреля 2024 г.



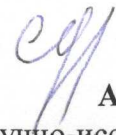
А. Ю. Миронов

Подпись профессора Миронова А. Ю. заверяю.

Учёный секретарь

ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора
кандидат медицинских наук

Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
125212, город Москва, ул. Адмирала Макарова д. 10
Тел. +7(495)452-18-16; факс: +7(495)452-18-30
E-mail: info@gabrich.ru; Site: www.gabrich.ru



А. В. Сафронова