

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО
«Ростовский государственный
медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор



С. В. Шлык
2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической ценности диссертации Рогачевой Елизаветы Владимировны «Антибактериальные свойства новых химических соединений природного и синтетического происхождения в отношении бактерий группы ESKAPE», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки)

Актуальность темы выполненной работы.

Проблема антибиотикорезистентности стала особенно актуальной в XXI веке. Устойчивость к антибиотикам прогнозируется как одна из самых больших угроз здоровью человека в будущем. Ежегодно в мире регистрируется около 700 тыс. смертей, обусловленных антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов. При этом бактерии с высокой скоростью приобретают и используют механизмы резистентности к антимикробным препаратам.

Актуальность темы представленной работы обусловлена прежде всего тем, что разработка новых антибиотиков в последние годы оказалась крайне затруднительной. Если в 1980-1985 гг. было предложено 15 новых антибиотиков, то в последующие годы количество зарегистрированных

препаратов уменьшалось каждые 5 лет в два раза и закончилось разработкой всего одного препарата в 2015 году. В этой связи Международный Координационный Совет по антибиотикорезистентности в своем обращении к Генеральному Секретарю ООН в апреле 2019 г. представил ситуацию в мире об угрозе, связанной с резистентностью микробов к антибиотикам, и предложил несколько путей решения этой проблемы. Одним из них является разработка новых средств лечения, эффективных против инфекций с множественной лекарственной устойчивостью.

Таким образом, разработка и изучение новых соединений природного и синтетического происхождения в отношении бактерий группы ESKAPE (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacterales*) являются актуальными, а научная новизна исследовательской работы Е. В. Рогачевой «Антибактериальные свойства новых химических соединений природного и синтетического происхождения в отношении бактерий группы ESKAPE» несомненна. Результаты диссертационной работы, полученные при комплексных исследованиях, позволили выявить новое антимикробное вещество для терапии бактериальных инфекций. Они могут послужить основой для выбора рациональной схемы этиотропной терапии бактериальных инфекций, что позволит снизить риск развития устойчивости и возникновения новых механизмов резистентности.

Связь диссертационной работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа Рогачевой Елизаветы Владимировны выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и представляет собой

решение актуальной научной задачи по предотвращению развития лекарственной устойчивости бактериальных патогенов ESKAPE, а также их терапии у пациентов, имеющей важное значение для практического здравоохранения.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Впервые изучено антибактериальное действие соединений растительной, минеральной природы и искусственно синтезированных в отношении бактерий группы ESKAPE. Выявлены антибактериальные свойства нановолокон на основе куркумина и гиалуроновой кислоты в отношении бактерий из группы ESKAPE (минимальная ингибирующая концентрация (МИК) - 90 мг/мл), которые не были описаны ранее. На примере сплава Cu-Zn, полученного путем сонохимической обработки с образованием фракций, расшифрован предполагаемый механизм биоцидной активности соединения. Определены группы лидирующих соединений с антибактериальным действием в отношении бактерий группы ESKAPE, изучены их минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для каждого бактериального патогена. Установлено снижение количества бактерий *S. aureus* в $1 \cdot 10^5$ раз при использовании комплекса «титан (Ti) и серебро (Ag)». Выявлена 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). Изучена возможность потенцирования действия карбапенемов на примере меропенема в отношении бактерий группы ESKAPE с помощью синтезированных соединений сульфонамидов. Показано антибактериальное действие соединений-лидеров на модели экспериментальных животных.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационном исследовании Рогачевой Е. В. была использована вариационная статистика с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующими попарными сравнениями с поправкой Геймса-Хоуэлла. Методологическая и теоретическая база исследования актуальны, объем обследованных пациентов достаточен для достоверных результатов, которые были получены с помощью соответствующей статистической обработки данных. За период выполнения работы собрано 119 единиц биологического материала от амбулаторных и стационарных больных в рамках рутинных микробиологических исследований (29 образцов мокроты, 8 образцов крови, 11 – мочи, 19 мазков из зева, 14 – из носа, 6 – из наружного слухового прохода, 7 – из женского урогенитального тракта, 4 – из мужского урогенитального тракта, 21 образец раневого отделяемого). В исследование вошли 120 бактериальных изолятов группы ESKAPE. Всего изучено 250 соединений из 20 групп различного происхождения (природные, минеральные, синтетические). Дизайн работы соответствует целям и задачам.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Выявление соединений-лидеров в группах растительной, минеральной природы и искусственно синтезированных с описанным механизмом антибактериального действия расширяет представление о возможностях конструирования новых образцов для борьбы с возбудителями нозокомиальных инфекций.

Доказанная экспериментальным путем эффективность синергетического антибактериального действия новых химических соединений и официальных антибиотиков позволит разработать комплексный лекарственный препарат с низкой концентрацией ингредиентов и антибактериальной эффективностью.

В опытах *in vitro* и *in vivo* определены действующие концентрации соединений-лидеров из разных групп (растительной, минеральной природы и искусственно синтезированных), которые могут быть использованы при проведении доклинических испытаний полученных соединений.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии во всех этапах выполнения диссертационного исследования: изучении литературы по теме исследования, написании плана работы, постановке экспериментов, исследовании проб и выделенных штаммов, анализе полученных результатов, написании публикаций, подготовки докладов, патентов, баз данных, оформлении диссертации.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Использование результатов исследовательской работы позволит на основе понимания изученных причинно-следственных связей предугадывать отношение выделенных бактерий к препаратам растительного, минерального или искусственного происхождения. Так, можно предположить, что при выделении резистентных к антибиотикам штаммов *S. aureus* с высокой долей вероятности будут эффективны препараты на основе серебра, экстракта пихты, депсипептидов. В отношении бактерий *K. pneumoniae* и *A. baumannii* можно ожидать антибактериальный эффект с использованием препаратов на основе куркумина и азиринов. Таким образом, полученные данные позволяют прогнозировать возможность применения альтернативных препаратов в случае выделения резистентных к антибиотикам штаммов бактерий.

Определение МИК у соединений-лидеров может быть использовано для назначения лечебной дозы соответствующих препаратов антимикробной направленности. Информация о спектре и уровне устойчивости бактерий

группы ESKAPE должна служить основой для выбора рациональной схемы этиотропной терапии бактериальных инфекций, что позволит снизить риск развития устойчивости и возникновения новых механизмов резистентности.

Оценка содержания диссертации и ее завершенность

Опубликованные работы и содержание автореферата полностью соответствуют основным положениям текста диссертационной работы.

Работа оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к рукописям диссертации. Структура диссертации состоит из следующих основных разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Собственные исследования» представлены 3 главами, «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Объем диссертации – 156 страниц машинописного текста. Работа иллюстрирована 8 рисунками, 26 таблицами. Библиографический список содержит 240 источников, из них – 8 ссылок на публикации отечественных авторов и 232 – иностранных авторов.

Во введении освящена актуальность исследования и степень разработанности темы, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту и данные об апробации работы.

В первой главе проведен обзор литературы отечественных и зарубежных исследователей по представленной проблематике: распространенность бактерий группы ESKAPE с множественной лекарственной устойчивостью, их резистентность к антимикробным препаратам. Освещено влияние пандемии новой коронавирусной инфекции на усугубление проблематики, проведена оценка частоты инфицирования нозокомиальными патогенами и размеров экономического ущерба в разных странах, в том числе в Российской Федерации. Обширно охарактеризованы исследуемые диссертантом соединения с антибактериальной активностью, показаны успехи и неудачи использования.

Во второй главе описаны материалы и методы, используемые при выполнении исследований. Помимо классических бактериологических методов были применены масс-спектрометрический метод идентификации микроорганизмов MALDI-TOF, полногеномное секвенирование штаммов *K. pneumoniae* и *S. aureus*, сканирующая электронная микроскопия, использованы биологические модели *in vivo*.

В третьей главе дана оценка чувствительности изученных бактериальных штаммов к официальным антибиотикам, охарактеризован 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 мультирезистентных штаммов среди бактерий *K. pneumoniae* составила 60%, среди бактерий *S. aureus* – 40%.

В четвертой главе дана характеристика новых антибактериальных веществ и чувствительности к ним бактериальных изолятов.

В работе исследовано 250 соединений из 20 групп различного происхождения (природные, минеральные, синтетические) в 1572 экспериментах, 18 из которых являлись соединениями-лидерами и были отобраны для дальнейшей оптимизации, 1 вещество рекомендовано для исследований *in vivo* на биологических моделях.

Наилучшие антибактериальные свойства в отношении бактерий группы ESKAPE выявлены среди веществ растительного происхождения у нановолокон на основе куркумина и гиалуроновой кислоты (МИК - 90 мг/мл), среди соединений на основе минералов – у комплекса «титан (Ti) и серебро (Ag)» (снижение количества бактерий *S. aureus* в $1 \cdot 10^5$ раз), среди веществ полусинтетического и синтетического происхождения – у азиринов (МИК для *S. aureus* 4,5 мкг/мл, МИК для *P. aeruginosa* и *E. aerogenes* – 9 мкг/мл).

В пятой главе проведено изучение антибактериального действия вещества-лидера в модельных опытах на лабораторных животных (нелинейные белые мыши обоего пола массой 19-22г). Согласно полученным результатам, как в группе использования антибиотика, так и в группе использования соединения, наблюдали более резкое снижение высеваемых микроорганизмов по сравнению с контролем. Различия в количестве бактерий видны уже через 3 дня эксперимента. К 11 дню эксперимента количество бактерий в группе антибиотика и соединения упало практически до нуля. Убедительно доказана эффективность применяемого соединения (3-фенил-2Н-азиридин-2-карбоновой кислоты) при лечении раневой инфекции, обусловленной штаммом *K. pneumoniae*.

Работа завершается заключением и 4-мя выводами, которые логически вытекают из результатов собственных исследований и обобщают весь объем информации. В заключении отражены перспективы дальнейших исследований и практические рекомендации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Результаты и практическая значимость выводов не вызывают сомнений, цели и задачи соответствуют требованиям.

Принципиальных замечаний к диссертационному исследованию нет. Работа отличается целостностью, соответствием содержания диссертации автореферату, опубликованным научным работам и паспорту научной специальности 1.5.11 Микробиология.

По представленной диссертационной работе имеются следующие вопросы:

1. Каков предполагаемый механизм антибактериальной активности лидирующего соединения 3-фенил-2Н-азиридин-2-карбоновой кислоты в отношении *K. pneumoniae* ?
2. Существует ли взаимосвязь между фенотипическими и генотипическими маркерами антибиотикорезистентности бактерий

группы ESKAPE, выделенных при различных инфекционных процессах?

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты исследования отражены в 24 опубликованных научных работах, 2 из которых – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, в том числе 22 статьи в журналах из перечня международной базы цитирования (WoS и Scopus), 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК РФ и РУДН.

Заключение

Диссертационное исследование Рогачевой Елизаветы Владимировны «Антибактериальные свойства новых химических соединений природного и синтетического происхождения в отношении бактерий группы ESKAPE» является законченной научно-квалификационной работой по специальности 1.5.11 Микробиология, в которой содержится новое решение научной задачи по предотвращению развития лекарственной устойчивости бактериальных патогенов ESKAPE, а также их терапии у пациентов, имеющей важное значение для практического здравоохранения. 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», утвержденного ученым советом РУДН протокол № УС-1 от 22.01.2024 г., а её автор, Рогачева Елизавета Владимировна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология.

Отзыв подготовлен доктором медицинских наук, профессором, заведующим кафедрой микробиологии и вирусологии №2 Харсеевой Галиной Георгиевной. Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры микробиологии и вирусологии №2 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России 22.04.2024 г., протокол № 10.

Председательствующий на конференции:
Заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Ростовский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации;
344022, Российская Федерация, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, переулок Нахичеванский, 29,
тел. +7 (863) 2504190
e-mail: harseeva_gg@rostgmu.ru

доктор медицинских наук
(1.5.11 - микробиология), профессор  Галина Георгиевна Харсеева

Подпись доктора медицинских наук, профессора Харсеевой Галины Георгиевны заверяю:

Ученый секретарь ученого совета
ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор



Н.Г. Сапронова

«24» апреля 2024 г.

МП

344022, Российская Федерация, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, переулок Нахичеванский, 29
тел. +7 (863) 2504200