

«Утверждаю»
Руководитель ЕНИИВИ
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
доктор биологических наук
Александр Владимирович Семенов



«18 ноября» 2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической ценности диссертационной работы Воробьева Алексея Максимовича на тему: «Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов для профилактики и лечения раневой инфекции», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6. – биотехнология, 1.5.11. – микробиология

Актуальность темы выполненной работы

Современной мировой проблемой является раневая инфекция в силу локальных и глобальных военных конфликтов, в которые на современном этапе вовлечено человечество, а также высокого уровня распространения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи и увеличения инвазивных медицинских манипуляций, что ставит обсуждаемую проблему на беспрецедентный уровень актуальности. В связи с этим, снижение заболеваемости и смертности от раневой инфекции остается одним из государственных приоритетов в Российской Федерации.

Известно, что этиология раневой инфекции разнообразна, зависит от характера повреждения и локализации инфекционного процесса. Основными общепризнанными патогенами при раневой инфекции являются грамположительные микроорганизмы (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*), при осложненных формах – грамотрицательные (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.* и др.) и грибковые (*Candida spp.* и др.), при закрытых и глубоких травмах – анаэробные

(*Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.* и др.). Как правило, осложненные раневые инфекции включают ассоциации из 2-6 видов. В связи с этим лечение раневой инфекции необходимо проводить под строгим контролем их этиологической структуры.

Пандемия COVID-19 и связанное с ней бесконтрольное применение антимикробных препаратов в качестве средств лечения, антисептики и дезинфекции усугубили проблему устойчивости микроорганизмов, обозначенную в «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года», где к приоритетным биотехнологическим разработкам отнесены препараты бактериофагов. В настоящее время Российская Федерация является мировым лидером по их производству. Ряд работ по использованию бактериофагов в области раневой инфекции опубликованы в России и за ее пределами.

Помимо литических фагов в последние годы ведутся активные исследования в области применения фаговых белков – эндолизинов. В ходе многочисленных экспериментов эти ферменты были экспрессированы, очищены и использованы, в основном, против грамположительных бактерий, которые из-за отсутствия в их клеточной стенке наружной мембраны и значительного слоя пептидогликана (мишени для эндолизинов) оказались чувствительнее к лизису, чем грамотрицательные. Тем не менее, эндолизин-опосредованный лизис грамотрицательных бактерий все-таки возможен, но с помощью пермебилизирующих (повышающих проницаемость клеточных мембран) агентов, в их числе выделяют поликатионные соединения (полимиксин и его производные) и хелаторы (ЭДТА и слабые органические кислоты). Однако полимиксин, ЭДТА и лимонная кислота обладают высокой цитотоксичностью.

Известно, что фаговые эндолизины могут быть получены не только путем естественного выделения, но и генно-инженерными методами, что

открывает возможности для использования широкой линейки новых антимикробных средств.

Таким образом, диссертационная работа Воробьева Алексея Максимовича, посвященная актуальной проблеме, целью которой явилась разработка безопасной и эффективной лекарственной формы препарата для местного применения на основе рекомбинантных эндолизинов с направленностью на грамотрицательные микроорганизмы, возбудители раневой инфекции, имеет высокую значимость.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе впервые представлены данные о противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11 в отношении 120 штаммов грамотрицательных бактерий, включая *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* и *Campylobacter jejuni*. У трех из пяти тестируемых эндолизинов установлена более высокая активность: LysECD7 (70,83 %), LysAm24 (64,17 %) и LysAp22 (55,0 %), что предопределило их включение в состав кандидатов при разработке нового комплексного антимикробного средства.

Впервые разработан состав и технология изготовления геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами. В процессе разработки определена совместимость эндолизинов с компонентами лекарственной формы, подобрана концентрация действующих веществ (1,0 % и 1,5 %) и два оптимальных варианта упаковки (шприцы и алюминиевые тубы), в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации разработан проект нормативной документации на препарат, определены сроки хранения, составлен лабораторный регламент.

Разработана и предложена методика контроля подлинности готовой лекарственной формы препарата методом иммуноэлектрофореза с использованием поликлональной антисыворотки к смеси рекомбинантных эндолизинов, входящих в состав готовой лекарственной формы. Для подтверждения пригодности методики проведена ее валидация в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации.

Автором впервые предложена модификация метода определения специфической противомикробной активности готовой лекарственной формы препарата на основе рекомбинантных эндолизинов в части используемых контролей, питательных сред и микроорганизмов, что повышает достоверность результатов и сокращает сроки производства.

На примере некробиоза кроликов, обусловленного *F. necrophorum*, автором впервые представлены данные, характеризующие положительный эффект от использования геля на основе рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22 на течение инфекционного процесса у животных опытной группы в виде снижения температуры тела, уменьшения площади абсцесса и увеличения периода выживания относительно контрольной группы. В ходе эксперимента по оценке острой и субхронической токсичности, а также местно-раздражающего действия и иммуногенности впервые определен профиль безопасности готовой лекарственной формы разработанного препарата. Создана оригинальная иммуноферментная тест-система на наличие IgG-антител к LysECD7, LysAm24 и LysAp22.

Сформулированные автором положения, выводы и практические рекомендации имеют научное обоснование и подтверждены результатами экспериментальных исследований.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа выполнена в рамках государственного задания Министерства Здравоохранения Российской Федерации «Создание лекарственных средств на основе эндолизинов и исследование их специфического действия» (№ госрегистрации 0373100122119000013).

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

Данные о противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов в отношении ряда актуальных для медицины грамотрицательных микроорганизмов, представленные в диссертационной работе, получены впервые и свидетельствуют о возможности разработки новых противомикробных препаратов, полученных на их основе.

Новые знания о совместимости рекомбинантных эндолизинов с различными вспомогательными веществами могут быть использованы для разработки новых антимикробных средств.

Методика контроля подлинности готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов путем иммуноэлектрофореза, разработанная в ходе выполнения диссертационного исследования, позволит обеспечить стандартизацию методов контроля качества препаратов.

Оригинальная иммуноферментная тест-система для определения IgG антител к эндолизинам в сыворотке крови животных будет в дальнейшем востребована в рамках доклинических испытаний новых лекарственных средств на основе эндолизинов.

Разработанные автором лабораторный регламент и проект нормативной документации по получению геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами в дальнейшем могут быть востребованы при масштабировании их промышленного производства.

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Достоверность работы Воробьева А.М. обеспечена прозрачностью и доступностью данных исследования, значительным объемом экспериментальных данных, наличием информации об источниках литературы для обоснования методологических подходов, используемых при выполнении работы, сочетанием большого спектра современных методов (микробиологических, иммунологических, биотехнологических и статистических).

Разработанная технология производства готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов внедрена в работу предприятия АО «Биннофарм». Модифицированная аналитическая методика контроля качества разработанного геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами по показателю «Специфическая активность» внедрена в работу Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

По теме диссертации Воробьева А.М. опубликовано 11 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, 7 публикаций в сборниках научных трудов и материалах конференций (тезисы).

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Разработанные в результате выполнения диссертационной работы Воробьева А.М. технология изготовления готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов и аналитические методики могут быть использованы фармацевтическими предприятиями для производства и контроля качества противомикробных препаратов на основе рекомбинантных эндолизинов.

Разработанная готовая лекарственная форма геля на основе рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22 после прохождения всех необходимых испытаний и регистрации в установленном законодательством Российской Федерации порядке, включая проведение дополнительных исследований по оценке эффективности в отношении актуальных микроорганизмов - возбудителей раневой инфекции, может быть рекомендована в качестве лекарственного средства при сочетанной антимикробной терапии.

Соответствие специальности

Тема диссертации, цели, задачи, основные положения и выводы, сформулированные автором, соответствуют специальностям 1.5.6. – биотехнология, 1.5.11. – микробиология.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертация изложена на 193 страницах машинописного текста, иллюстрирована 58 рисунками и 46 таблицами. Работа представлена следующими структурными элементами: введением, основной частью, состоящей из четырех глав собственных исследований, заключением, выводами, практическими рекомендациями, разделом о перспективах дальнейшей разработки темы, в рукописи имеется список сокращений с условными обозначениями и список литературы (133 источника, из которых 34 работы отечественных и 99 иностранных авторов).

Содержание работы в целом соответствует поставленной цели. Выводы соответствуют задачам исследования.

Автореферат оформлен, согласно требованиям, соответствует структуре и содержанию диссертации.

Вопросы по диссертационной работе

1. При оценке литической активности рекомбинантных эндолизинов с чем связан выбор штаммов *Campylobacter jejuni* и *Salmonella enterica*, а при оценке эффективности новой лекарственной формы инфекционная модель некробактериоза, возбудитель которой (*F. necrophorum*) также как *C. jejuni* и *S. enterica* не относится к ведущим патогенам при раневой инфекции человека.
2. Почему в работе не было проведено сравнительное исследование литической активности бактериофагов ECD7, Am24, Ap22, Si3 и St11, являющихся источниками тестируемых эндолизинов (даны лишь ссылки на литературные данные). В этой связи, с чем Вы связываете более высокий уровень антимикробной активности рекомбинантных эндолизинов относительно бактериофагов их продуцирующих в отношении соответствующих видов микроорганизмов. Например, у фага Am24 активность против *A. baumannii* составляет 56,25 % (по данным А.В. Алешкина, 2016), у аналогичного эндолизина LysAm24 – 90,0 % (по Вашим данным); у фага Ap22 – 56,25 % и LysAp22 – 70,0 % соответственно.
3. Для оценки подлинности препарата на биологической модели при иммунизации кроликов путем 4-х кратного внутривенного введения антигена, вдвое превышающей концентрацию эндолизина в разработанной лекарственной форме, Вами получена поликлональная антисыворотка. При местном применении препарата, Вами установлено отсутствие иммуногенности готовой лекарственной формы. Может ли сформироваться иммунный ответ на введение жидкой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов в условиях их длительного использования или при увеличении концентрации в очаге поражения.
4. Необходимо ли проведение микробиологических исследований с целью определения этиологии инфекционного процесса при внедрении в клиническую практику препаратов на основе рекомбинантных эндолизинов. Какие области инфекционной патологии, кроме раневой инфекции, Вы

считаете наиболее приоритетными для применения рекомбинантных эндолизинов.

Замечания.

1. В разделе теоретической и практической значимости автором указано об «установленной активности изучаемых рекомбинантных эндолизинов в отношении антибиотикорезистентных микроорганизмов», однако результаты исследований по данному разделу в варианте рукописи и в автореферате отсутствуют.

2. В тексте диссертации имеются некоторые стилистические, терминологические ошибки и неточности.

- Стр. 17. *Штамм F. necrophorum №89-5 по своим «органолептическим»..... свойствам.....*

Уместно ли использовать данный термин по отношению к бактериальному штамму;

- Стр. 30. *ESKAPE-патогены устойчивы к большинству применяемых в настоящее время антибиотиков, что говорит о необходимости «эпидемиологического надзора» за антибиотикорезистентностью [26, 29, 33, 34]. По мнению некоторых авторов [7, 11, 43, 60, 124], снизить уровень обсемененности госпитальной среды антибиотикорезистентными бактериями и, следовательно, риск заражения ими пациентов, можно путем введения «эпидемиологического» мониторинга во всех подразделениях ЛПУ.*

Эпидемиологический надзор предусматривает систему мероприятий относительно определенной инфекции, но не отдельного явления, а эпидемиологический мониторинг - динамическое наблюдение за проявлениями эпидемического процесса, прежде всего за заболеваемостью (вероятно, автор имел ввиду микробиологический мониторинг);

- Стр. 36. ... *эндолизины, которые синтезируются бактериофагами, активными в отношении грамотрицательных бактерий (Гр- эндолизины), зачастую имеют «одномерную» глобулярную структуру*

Вероятно, однодоменная структура.

- Стр. 149. В таблице, посвященной данным по термометрии кроликов, а также в сопутствующем тексте не обозначены единицы измерения «°С».

Указанные неточности и замечания в целом не снижают общего положительного впечатления от представленной работы.

Заключение

Диссертационная работа Воробьева Алексея Максимовича на тему «Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов для профилактики и лечения раневой инфекции», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6. – биотехнология, 1.5.11. – микробиология, выполненная под руководством кандидата фармацевтических наук, доцента Ануровой Марии Николаевны и кандидата биологических наук Гущина Владимира Алексеевича, является законченным научным исследованием, содержащим важные решения в области разработки технологии производства и состава новой лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов с антимикробной направленностью на грамотрицательные микроорганизмы, актуальные возбудители раневой инфекции.

Диссертационная работа Воробьева Алексея Максимовича на тему «Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов для профилактики и лечения раневой инфекции» по актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции постановлений Правительства

Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 года, № 748 от 02 августа 2016 года, №650 от 29 мая 2017 года, № 1024 от 28 августа 2017 года, № 1168 от 01 декабря 2018 года, № 751 от 26 мая 2020 года, №426 от 20 марта 2021 года, № 1539 от 11 сентября 2021 года «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Воробьев Алексей Максимович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6. – биотехнология и 1.5.11. – микробиология.

Отзыв заслушан и одобрен на заседании Ученого совета ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 8 от «28» ноября 2022 года).

Отзыв составил:

Заместитель руководителя по научной работе, главный научный сотрудник, руководитель отдела эпидемиологии вирусных инфекций Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Российская Федерация, г. Екатеринбург, ул. Летняя, д. 23, +7 (343) 261-99-47, virus@eniivi.ru)

доктор медицинских наук,
доцент

Захарова Юлия Александровна

Подпись Захаровой Юлии Александровны заверяю:

Ученый секретарь Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Российская Федерация, г. Екатеринбург, ул. Летняя, д. 23, +7 (343) 261-99-47, virus@eniivi.ru)



Михайленко Юлия Александровна