

ОТЗЫВ

официального оппонента, Заслуженного работника высшей школы Российской Федерации, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Царева Виктора Николаевича на диссертационную работу Воробьева Алексея Максимовича «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 диссертационного исследования

Постоянный рост распространённости возбудителей, характерной чертой которых является множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), представляет большую опасность для здоровья и благополучия населения. Частота выявления мультирезистентных и панрезистентных штаммов при гнойной, в том числе, и раневой инфекции в клинической практике за последние 20-30 лет перестала быть исключительным явлением. Очевидно, что современные темпы разработки новых антибиотиков не позволяют в полной мере бороться с данными возбудителями, что ставит перед научным сообществом ряд важнейших задач по поиску новых противомикробных средств, активных в отношении микроорганизмов с МЛУ. На данный момент существует целый спектр новых и весьма перспективных кандидатных антимикробных препаратов, к которым можно отнести противомикробные пептиды, различные средства растительного происхождения, препараты антител, бактериофаги и т. д., однако большей частью они находятся на стадии разработки или клинических испытаний, спектр их весьма ограничен и на российском фармацевтическом рынке они представлены недостаточно.

Рекомбинантные эндолизины бактериофагов, выбранные диссертантом Воробьевым А.М. в качестве объектов исследования, являются логичным и закономерным объектом развития актуального направления современных исследований по внедрению лечебных эффектов бактериофагов в современной медицине. Бесспорными преимуществами рекомбинантных эндолизинов являются: активность в отношении резистентных возбудителей (в том числе и грамотрицательных), широкий спектр противомикробной активности (в отличие от самих бактериофагов), низкая токсичность и иммуногенность. Многие аспекты этой проблемы остаются недостаточно изученными. Основываясь на данных, представленных в научной литературе, рекомбинантные эндолизины бактериофагов можно считать перспективным

направлением для дальнейшего изучения и последующей разработки на их основе новых противомикробных средств.

Таким образом, диссертационная работа Воробьева А.М., направленная на разработку лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов для терапии и профилактики раневых инфекций, является актуальным направлением исследований.

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

Воробьевым А.М. впервые определен спектр противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11 в отношении 120 штаммов грамотрицательных микроорганизмов, показан широкий спектр их действия, а также перспективность их применения в составе противомикробных композиций.

Впервые разработана противомикробная композиция на основе рекомбинантных эндолизинов в форме геля для нанесения на раневые и ожоговые поверхности. Подтверждена стабильность данной композиции в течение 6 месяцев хранения при температуре от +2 до +8 °С. В ходе разработки получены новые данные о совместимости рекомбинантных эндолизинов с различными вспомогательными веществами, разработана технология изготовления лекарственной формы, аналитические методики контроля качества и проведена их валидация согласно требованиям Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания, составлен лабораторный регламент и проект нормативной документации.

В экспериментах *in vivo* показано отсутствие острой, субхронической, хронической токсичности, местнораздражающего действия и иммуногенности разработанного геля при заданном способе применения. В ходе исследований также разработана новая иммуноферментная тест-система для определения наличия антител класса G к рекомбинантным эндолизинам в сыворотке крови животных.

Получены новые данные об эффективности применения разработанного геля на инфекционной модели некробактериоза у кроликов. Применение композиции привело к увеличению продолжительности жизни опытных животных в среднем на 65% и замедлению развития абсцессов более, чем на 50%, что позволяет говорить о ее эффективности.

Научные положения, выводы и практические рекомендации, представленные соискателем, научно обоснованы и логически вытекают из результатов, полученных и обработанных с использованием современных методов исследований.

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

Достоверность результатов диссертационной работы Воробьева А.М. определяется выполненным на должном уровне анализом научной литературы, включая зарубежную, большим объемом проведенных исследований, использованием современных апробированных методов исследований (микробиологических, физико-химических,

биотехнологических и т. д.), грамотно построенным дизайном и адекватной статистической обработкой полученных данных. Положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации научно обоснованы и отражают проведенные исследования.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

В результате выполнения диссертационной работы Воробьевым А.М. обоснована перспективность применения рекомбинантных эндолизиннов для разработки противомикробных препаратов, что будет способствовать дальнейшему развитию данного направления науки.

Данные о совместимости рекомбинантных эндолизиннов с различными вспомогательными веществами могут быть использованы при фармацевтической разработке новых противомикробных препаратов на их основе.

Дизайн исследования, этапность решения поставленных задач, безусловно, могут быть в дальнейшем использованы, как прототип при проведении аналогичных разработок.

Композиция на основе рекомбинантных эндолизиннов в форме геля, полученная в результате выполнения диссертационной работы, после прохождения всех испытаний и установленной процедуры регистрации расширит спектр противомикробных препаратов, представленных на российском фармацевтическом рынке.

Разработанная автором нормативная документация и аналитические методики позволят унифицировать некоторые этапы производства и контроля качества препаратов на основе рекомбинантных эндолизиннов, что упростит дальнейшую их разработку и получение.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях, посвященных проблемам эпидемиологии, разработке, производству и применению новых противомикробных препаратов, а также анализу рисков здоровья населения.

Технология производства готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизиннов, разработанная в ходе диссертационного исследования и оформленная в виде лабораторного регламента, внедрена в работу предприятия АО «Биннофарм» (акт внедрения от 27 июня 2022 г.).

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 (акт внедрения от 12 июля 2022 г.).

По теме диссертации Воробьева А.М. опубликовано 13 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, 7 – в материалах конференций (тезисы), получено 2 патента на изобретение РФ.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа Воробьева А.М. изложена на 193 страницах машинописного текста, иллюстрирована 58 рисунками и 46 таблицами. Структура работы включает введение, основную часть, состоящую из четырех глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы (133 источника, из которых 34 работы отечественных и 99 иностранных авторов). Оформление диссертации и автореферата полностью соответствует ГОСТ 7.0.11-2011.

В разделе «**Введение**» приведено обоснование актуальности темы диссертационного исследования, данные о степени ее разработанности, цель и задачи работы, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Описаны методы исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, обоснована достоверность полученных результатов и их апробация, указаны данные о личном участии автора в выполняемых работах.

В **первой главе** собственных исследований представлен обзор научной литературы. Рассмотрены как отечественные работы, так и зарубежные. Представлены данные о различиях в строении эндолизинов бактериофагов, варианты их классификации, механизмы действия. Рассмотрены существующие на данный момент разработки в изучаемой области, приведены результаты исследований разработанных препаратов как *in vitro*, так и *in vivo*. Примечательно, что более 47 % литературных источников составляют научные публикации за последние 5 лет, что позволяет получить максимально полное представление по существу вопроса.

Вторая глава посвящена изучению спектра противомикробной активности 5 рекомбинантных эндолизинов на 120 штаммах грамотрицательных бактерий. Оценены различия в спектре действия бактериофагов и полученных из них эндолизинов, показана перспективность применения рекомбинантных эндолизинов в качестве противомикробных агентов. В исследование включён круг патогенов, являющихся приоритетными возбудителями гнойной, в том числе, раневой инфекции.

В **третьей главе** описан процесс разработки состава и технологии изготовления лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов. Обоснован выбор действующих и вспомогательных веществ, изучены физико-химические и технологические свойства экспериментальных составов, обоснован выбор первичной упаковки готовой лекарственной формы. Представлены результаты разработки и валидации аналитических методик контроля качества и определения стабильности разработанного состава, разработан проект спецификации, составлен лабораторный регламент получения геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами.

Четвертая глава посвящена описанию и анализу результатов изучения безопасности и эффективности разработанной готовой лекарственной формы *in vivo*. В ходе изучения острой, субхронической, хронической токсичности и

местнораздражающего действия показано отсутствие негативного влияния на экспериментальных животных при заданном способе применения. Доказана эффективность применения разработанного геля на инфекционной модели некробактериоза у кроликов. Изучено влияние рекомбинантных эндолизинов на представителей нормофлоры.

В заключении автором проведен анализ полученных данных и их сопоставление с литературными источниками как отечественных, так и зарубежных авторов.

Выводы научно обоснованы, соответствуют поставленным цели и задачам исследования, являются логическим завершением диссертационной работы.

Соответствие специальности

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальностям 1.5.6. – биотехнология и 1.5.11. – микробиология. Автореферат логичен в изложении, хорошо иллюстрирован, соответствует ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

В процессе ознакомления с диссертационной работой возникли следующие **вопросы и замечания**:

1. В тексте работы встречаются единичные опечатки, незначительные грамматические и стилистические ошибки.

2. Учитывая микробиологическую направленность настоящего оппонирования, хотелось бы уточнить, при каких условиях и как проводилось культивирование и экспериментальное исследование штамма *Fusobacterium necroforum*, используемого в работе для моделирования экспериментального некробактериоза у кроликов?

3. Отмечалась ли перекрёстная активность каких-либо эндолизинов в отношении грамотрицательных аэробных и анаэробных бактерий или все они были строго специфичны в отношении взятых в исследование видов?

Отмеченные вопросы и замечания не носят принципиального характера и не снижают положительную оценку диссертационной 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 и 1.5.11. – микробиология, выполненная под руководством кандидата фармацевтических наук, доцента Ануровой Марии Николаевны и кандидата биологических наук Гущина Владимира Алексеевича, является законченной научной работой, в которой представлено новое решение актуальной задачи – разработка нового противомикробного препарата на основе рекомбинантных эндолизинов бактериофагов.

Диссертационная работа по актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, практической значимости 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 от 30.07.2014 №723, от 21.04.2016 №335, 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168, от 26.05.2020 №751, от 20.03.2021 №426, от 11.09.2021 №1539, от 26.09.2022 №1690, от 26.01.2023 №101, от 18.03.2023 №415), 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.

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (127473, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр.1; Телефон +7(495) 609-67-00; e-mail: nikola777@rambler.ru)

Заслуженный работник высшей школы РФ, доктор медицинских наук, профессор

15.08.2023

В.Н. Царев

Царев Виктор Николаевич

Подпись В.Н. Царева заверяю:

Ученый секретарь ученого совета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (127473, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр.1; Телефон +7 (495) 684-32-72; e-mail: msmsu@msmsu.ru)

Заслуженный врач России, Заслуженный работник высшей школы РФ, доктор медицинских наук, профессор



Васюк Васюк Юрий Александрович