

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук, руководителя отдела микробиологических и иммунологических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации Сухиной Марины Алексеевны 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

Продолжающийся рост антибактериальной резистентности микроорганизмов диктует необходимость поиска новых противомикробных препаратов. А обеспечение фармацевтического рынка новыми противомикробными препаратами является одним из наиболее актуальных направлений современной науки. Нехватка новых антибиотиков ввиду низких темпов их разработки ставит под угрозу глобальные усилия по сдерживанию распространения резистентных возбудителей. Кроме того, большинство разрабатываемых в настоящее время антибиотиков не обладает значительными преимуществами перед противомикробными средствами, применяемыми на данный момент.

С учетом вышесказанного и высоких темпов распространения возбудителей, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, очевидна необходимость в поиске альтернативных противомикробных средств, обладающих активностью в отношении резистентных штаммов микроорганизмов. В этой связи, эндолизины бактериофагов, выбранные в качестве объектов исследования в рецензируемой работе, являются одним из перспективных направлений для изучения. Согласно литературным данным, эндолизины обладают активностью в отношении резистентных штаммов, в том числе и грамотрицательных бактерий, менее токсичны по сравнению с антибиотиками и демонстрируют зачастую более широкий спектр

противомикробной активности по сравнению с бактериофагами, препараты на основе которых уже представлены на российском фармацевтическом рынке.

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

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

В ходе выполнения диссертационного исследования Воробьевым А.М. впервые определен спектр противомикробной активности рекомбинантных эндолизиннов LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11 в отношении 120 штаммов грамотрицательных микроорганизмов, показан широкий спектр активности рекомбинантных эндолизиннов и доказана перспективность их использования для разработки противомикробных препаратов.

Впервые изучена совместимость рекомбинантных эндолизиннов с различными вспомогательными веществами, используемыми для разработки препаратов в форме геля, разработана готовая лекарственная форма рекомбинантных эндолизиннов для применения на раневой поверхности, разработаны и предложены аналитические методики контроля качества лекарственной формы по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность». Разработана технология производства геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами. Кроме того, автором проведено изучение стабильности готовой лекарственной формы согласно требованиям Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания, подтвержден срок хранения 6 месяцев при температуре от +2 до +8 °С.

Результаты определения безопасности разработанной готовой лекарственной формы свидетельствуют об отсутствии острой, субхронической токсичности и местнораздражающего действия. Проведено определение иммуногенности при курсовом применении готовой лекарственной формы, для чего разработана иммуноферментная тест-система

для определения антител класса G в сыворотке крови животных, согласно результатам исследования, лекарственная форма при применении в полости абсцесса не вызывает образования антител.

В диссертационной работе Воробьева А.М. впервые представлены данные, характеризующие эффективность применения готовой лекарственной формы рекомбинантных эндוליзинов *in vivo*. Изучение эффективности проведено на инфекционной модели некробактериоза у кроликов, согласно полученным результатам, животные, получавшие лечение разработанным гелем, показали достоверное увеличение продолжительности жизни в среднем на 65%, достоверное более низкую температуру тела и замедлении скорости развития абсцесса более, чем на 50%. Проведенное исследование показывает эффективность разработанного лекарственного средства на основе рекомбинантных эндוליзинов бактериофагов.

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. обусловлена большим объемом проведенных исследований, а также использованием современных методов исследований и статистической обработки данных. Результаты, полученные автором, свидетельствуют о решении поставленных задач и согласуются с данными литературы по выбранной тематике. Положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации научно обоснованы и отражают проведенные исследования.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Данные о противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов, полученные Воробьевым А.М. в ходе выполнения диссертационного исследования, обосновывают их перспективность для разработки противомикробных препаратов и дополняют уже известные данные об этом классе ферментов.

Результаты определения совместимости рекомбинантных эндолизинов с различными компонентами лекарственных форм могут быть использованы при дальнейшей разработке новых противомикробных препаратов на основе эндолизинов бактериофагов.

Разработанный автором гель для нанесения на раневые поверхности после прохождения всех испытаний и регистрации в установленном законодательством порядке дополнит перечень препаратов для терапии инфекций, вызванных резистентными возбудителями.

Аналитические методики, предложенные автором, составленный лабораторный регламент и проект нормативной документации вносят большой вклад в унификацию и стандартизацию различных этапов производства и контроля качества препаратов на основе рекомбинантных эндолизинов.

Алгоритм разработки иммуноферментной тест-системы для определения наличия антител класса G в сыворотке крови животных может стать основой при разработке аналогичных тест-систем для контроля иммуногенности новых противомикробных препаратов на основе рекомбинантных эндолизинов в процессе доклинических испытаний и других исследований.

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 биотехнологических препаратов, анализу риска здоровью населения.

Разработанная в ходе выполнения диссертационного исследования технология производства готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов внедрена в работу предприятия АО «Бинофарм» (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 11 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, 7 – в материалах конференций (тезисы).

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Материалы диссертационной работы Воробьева А.М. изложены на 193 страницах машинописного текста, иллюстрированы 58 рисунками и 46 таблицами. Диссертационная работа состоит из введения, основной части, четырех глав собственных исследований, заключения о выполненных исследованиях, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы (133 источника, из которых 34 работы отечественных и 99 иностранных авторов). Оформление диссертации и автореферата полностью соответствует современным требованиям.

В разделе «Введение» обоснована актуальность выбранной темы диссертационного исследования, отражена степень разработанности темы, определены цель и задачи работы, изложены научная новизна и научно-практическая значимость. Подробно изложена методология и методы исследования с использованием современного оборудования.

Сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обоснована достоверность, проведена апробация полученных результатов, обозначены сведения о личном участии автора.

Первая глава посвящена обзору научной литературы по теме исследования. Приведена информация о строении и свойствах эндолизинов бактериофагов, механизме их действия, а также о существующих направлениях в области разработки препаратов на их основе. Представлены данные, характеризующие эффективность применения эндолизинов *in vivo*, а также их комбинаций друг с другом, с антибиотиками и другими ферментами.

Во **второй главе** представлены результаты изучения противомикробных свойств рекомбинантных эндолизинов. Определена чувствительность 120 штаммов микроорганизмов к 5 рекомбинантным эндолизинам, проведено сравнение их спектра активности и выбраны эндолизины для включения в состав готовой лекарственной формы.

Третья глава посвящена разработке состава и технологии изготовления лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов. Обоснован выбор в качестве действующего вещества смеси из трех рекомбинантных эндолизинов, подобраны вспомогательные вещества, обеспечивающие необходимые физико-химические и технологические свойства лекарственной формы, исследован 21 экспериментальный состав, определена совместимость действующих и вспомогательных веществ.

Проведена модификация существующей методики контроля качества по показателю «Специфическая активность» для ее оптимизации под процесс поточного анализа в условиях производства. Разработана аналитическая методика контроля качества по показателю «Подлинность», проведена валидация данных методик по показателям «Специфичность», «Повторяемость (сходимость)» и «Внутрилабораторная прецизионность» для подтверждения их пригодности к проведению контроля качества.

Подобрана упаковка готовой лекарственной формы в виде шприцев и алюминиевых туб с мембраной, составлен проект спецификации, проведены

исследования стабильности лекарственного средства согласно требованиям Государственной Фармакопеи.

На основе данных, полученных при изготовлении лабораторных серий разработанной готовой лекарственной формы составлен лабораторный регламент производства геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами.

В четвертой главе представлены результаты изучения безопасности и эффективности разработанной готовой лекарственной формы *in vivo*. Определена острая, субхроническая токсичность и местнораздражающее действие готовой лекарственной формы как при однократном, так и при курсовом применении. На инфекционной модели некробактериоза у кроликов изучена эффективность применения препарата. Представлен алгоритм разработки иммуноферментной тест-системы для определения иммуногенности готовой лекарственной формы, показано отсутствие гуморального иммунного ответа при применении разработанного лекарственного средства в полости абсцесса. Проведено изучение влияния рекомбинантных эндолизиннов на представителей пристеночной и просветной микрофлоры мышей.

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

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций диссертанта

Выводы научно обоснованы, достоверны и убедительны. Задачи диссертационного исследования выполнены в полном объеме.

Рекомендации, данные автором в результате проведенного диссертационного исследования будут полезны практическому здравоохранению в борьбе с раневыми и ожоговыми инфекциями, вызванными резистентными возбудителями, в том числе и с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи.

Соответствие специальности

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальностям 1.5.6. – биотехнология и 1.5.11. – микробиология. Автореферат 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 имеются незначительные стилистические ошибки.
2. Необходимо было бы обосновать выбор назначения и лекарственной формы разрабатываемого препарата.
3. Рекомендовать использовать гель бактерицидный с рекомбинантными эндолизинами для лечения раневых и ожоговых инфекций лучше после проведения серии доклинических испытаний для определения безопасности готовой лекарственной формы: «Хроническая токсичность», «Аллергизирующее воздействие», «Иммунотоксичность при однократном введении», «Иммунотоксичность при курсовом введении».

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 Гушина 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 № 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.

Официальный оппонент:

Руководитель отдела микробиологических и иммунологических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации (123423, Российская Федерация, г. Москва, ул. Саляма Адиля, д. 2; Телефон +7 (499) 642-54-40; e-mail: marinamari272015@gmail.com)

кандидат биологических наук

30.11.2022

Подпись М.А. Сухиной заверяю:

Сухина Марина Алексеевна

Заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации (123423, Российская Федерация, г. Москва, ул. Саляма Адиля, д. 2; Телефон +7 (499) 642-54-41; e-mail: info@gneck.ru)

доктор медицинских наук

Фролов Сергей Алексеевич