

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук
Лукьянова Дмитрия Александровича
на тему: «Поиск новых антибиотиков. Изучение механизма действия
репомиицина, тетраценомицина X и аурапланина»
по специальностям 1.4.9 – «биоорганическая химия», 1.5.3 –
«молекулярная биология»

Открытие и успешное использование антибиотиков в лечении инфекционных заболеваний привело к существенному увеличению средней продолжительности жизни мирового сообщества. Однако эффективность антибиотиков даже последних поколений постоянно снижалась из-за распространения опасных штаммов патогенных микроорганизмов с множественной устойчивостью. Поэтому потребность в новых эффективных антибиотиках является насущной проблемой современной науки. Следовательно, поиск новых антиинфекционных препаратов является острой необходимостью. С каждым годом становится все более очевидно, что для удовлетворения медицинских потребностей в антибиотиках следующего поколения требуется рационализировать подходы к разработке способов получения новых химических структур.

В последние десятилетия большинство крупных фармацевтических компаний отказались от разработки новых противомикробных препаратов или значительно снизили объем инвестиций в эту область. Так, в 2019 году из пула проектов по доклинической разработке новых противомикробных средств, направленных на борьбу с резистентностью, 81% приходился на малые и средние фармацевтические компании, 12% — на академические институты и лишь только 3% исследований проводилось крупными компаниями. Причинами кризиса стали существенный рост финансовых

издержек, ужесточение требований к разрабатываемым средствам, длительные сроки клинических исследований, высокие риски, а также и безрезультативность долговременных целенаправленных поисков новых классов антибиотиков, проводимых этими компаниями.

Поэтому следует приветствовать, что такой важной проблеме, как поиск новых антибиотиков на Кафедре химии природных соединений Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, уделяется должное внимание.

Диссертация Лукьянова Дмитрия Александровича, представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук, посвящена актуальной проблеме - поиску новых антибиотиков, ингибирующих синтез белков на рибосоме современными эффективными методами, разработанными ранее на Кафедре химии природных соединений Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. В основе метода лежит использование двойной репортерной системы, в которой штамм бактерии *E. coli* $\Delta tolC$, трансформирован определенной плазмидой ДНК pDUALREP2. При нарушении работы рибосомы запускается синтез флуоресцентного белка, например *Katushka2S*, деятельность которого можно визуализировать (оранжевый цвет). Другая часть репортерной системы ориентирована на клеточную реакцию на стресс, как SOS-ответ при повреждении ДНК. При этом запускается синтез белка TurboRFP (зеленый цвет). В результате применения метода по цвету флуоресценции можно одновременно сортировать действия антибиотика по механизму ингибирования биосинтеза белка или биосинтеза ДНК.

При помощи указанной двойной репортерной системы диссертантом был проведен высокопроизводительный анализ (скрининг) большого количества образцов ранее не изученных смесей или соединений с целью поиска среди них антибактериальных веществ, с выявлением тех из них, которые ингибируют биосинтез белка и/или вызывают SOS-ответ на повреждения ДНК.

Для подтверждения способности выделенного антибиотика ингибировать синтез белка диссертантом также была использована бесклеточная система трансляции *in vitro*, основанная на изучении влияния повышения концентрации антибиотика на экспрессию люциферазы светлячка (Fluc). Была также исследована и подтверждена способность выбранных в работе соединений ингибировать рост патогенных бактерий в условиях *in vitro*, оценена их токсичность на нормальных клетках человека. Подробно изучены молекулярные мишени двух новых антибактериальных соединений репомидина и аурапланина, определен механизм действия известного антибиотика тетраценомицина X.

Для изучения молекулярного механизма действия антибиотика во время трансляции проводился тоупринтинг, позволяющий отследить положение рибосомы на мРНК *trpL-2Ala* с использованием обратной транскрипции. Дополнительно применялся метод тоупринтинга с другой матрицей – мРНК *ErmBL*. Результаты убедительно проиллюстрированы фотографиями гель-электрофореграммами фрагментов ДНК.

Диссертационная работа имеет следующие разделы:

1. Репомидин

В рамках диссертации показано, что новое производное пирролоимидазолия репомидин подавляет рост репортерного штамма *E. coli JW5503 ΔtolC* с плазмидой *pDUALREP2* и индуцирует экспрессию гена *Katushka2S*, свойственную трансляционным ингибиторам. Методом тоупринтинга точно установлено место остановки этого ингибитора трансляции в Р-сайте - кодоны 1-AUG (M), 2-UAU (Y), 8-CAG (Q). Однако ингибирование репортерного штамма репомидином происходит в концентрациях, которые почти на порядок выше значений концентраций, вызывающих гибель нормальных человеческих клеток, поэтому практической ценности репомидин не представляет.

2. Широкий скрининг

Среди 101 штамма актинобактерий из мангровых растений описано семь новых видов, 63 штамма отобраны для скрининга, и 31 штамм показал положительные результаты как минимум на одном тесте двойной репортерной системы. Антибактериальная активность соединений, выделенных из штамма эндофитных *Streptomyces sp.* 2BBP-J2 из мангровых растений была изучена методом диффузии в агар на панели бактерий “ESKAPE” (наиболее распространенных высоковирулентных возбудителей, устойчивых к антибиотикам).

Эти активные соединения оказались известными, ценными для практического применения антибиотиками стрептограминовой группы (виргиниамицины M2, M1 и его 16-гидроксипроизводное). Кроме того, было открыто и родственное им новое соединение «бейлунмицин».

Также интересным исследованием явилось изучение актиномицетов из пустыни Такла-Макан. С помощью репортерной системы, а также линейки бактерий “ESKAPE” из штамма *Saccharothrix sp.* 16Sb2-4 были выделены и охарактеризованы спектральными данными 16-членные макролиды альдгамицины H, K, G и свалпамицин B. Интересно отметить, что альдгамицины в 90-ые годы были получены и запатентованы фирмой Eli Lilly, но из другого рекомбинантного штамма *Streptomyces lavendulae*.

Таким образом, с помощью двойной репортерной системы, автору удалось охарактеризовать серию новых продуцентов, обнаружить в них известные антибиотики стрептограмины и альдгамицины, а также новый антибиотик бейлунмицин. Важно отметить, что новые штаммы, продуцирующие известные и применяемые в медицине и сельском хозяйстве антибиотики, представляют не только научный, но и практический интерес.

3. Тетраценомицин X

Интересным разделом в работе оказалось установление механизма действия известного антибиотика тетраценомицина X. Для тетраценомицина X впервые показано, что он в высокопроизводительном скрининге с использованием метода двойной репортерной системы проявил себя в качестве ингибитора биосинтеза белка. Установлено, что, несмотря на высокую цитотоксичность и структурное сходство с интеркалятором антрациклиновым антибиотиком доксорубицином, антибиотик не вызывает SOS ответа на реперной системе, который ответственен за ингибирование биосинтеза ДНК. Установлен сайт связывания антибиотика - Р-сайт. Место связывания отличается от сайтов связывания тетрациклина и тиострептона, но близко к сайту связывания эритромицина.

4. Аурапланин.

Большое внимание было уделено автором изучению нового антибиотика аурапланина, также отобранного двойной репортерной системой. Антибиотик был выделен из штамма *Actinoplanes* sp. VKM Ac-2862, установлена его структура с применением методов высокоэффективных масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Похвально, что подробные картинки ЯМР-спектров с отнесением всех атомов приведены в приложении к диссертации. Интересно, что структура аурапланина содержит тетраеновый фрагмент, как например в полиеновых макролидах - антибиотиках нистатине и натамицине, которые взаимодействуют с мембранами, содержащими стерины. Аурапланин проявил активность в отношении двух штаммов *E. coli* *AtolC* и *Arthrobacter* sp., а также клинически значимого штамма *Mycobacterium tuberculosis*, МИК для которого составил 7,1 мкг/мл. К сожалению, избирательность антибиотика не велика, поскольку значение его цитотоксичности в отношении нормальных клеток человека оказалась всего в 1,5 – 2 раза больше, чем в отношении бактерий.

На основании сказанного выше можно констатировать, что очень важным достижением автора является установление молекулярных мишеней

новых антибиотиков репомидина, аурапламина и известного ранее тетраценомицина X. Взаимодействие тетрацинамицина X (Рис. 15 и 16) и аурапламина (Рис. 20) с соответствующими сайтами рибосомы иллюстрировано цветными рисунками.

Диссертация и автореферат хорошо проиллюстрированы цветными изображениями индукции двойной репортерной системы *E. coli* $\Delta tolC$ pDualrep2, чувствительной к ингибиторам синтеза белка или соединениям, вызывающим SOS-ответ. Автореферат отражает основное содержание раздела «Полученные результаты и обсуждение». Выводы обоснованы. В шести статьях, опубликованных в высоко рейтинговых изданиях, отражено основное содержание представленной работы. Новизна материала очевидна. Достоверность полученных результатов убедительно характеризуется экспериментами.

Объем исследований, проведенный диссертантом, внушительный, представлен самыми разнообразными физико-химическими, химическими, биохимическими, спектральными и другими самыми современными методами исследований, результаты снабжены соответствующими иллюстрациями. Основные экспериментальные данные получены и обсуждены соискателем лично или при его непосредственном участии. На основании полученных результатов сделаны правильные выводы.

Диссертация содержит введение, литературный обзор, , экспериментальную часть, обсуждение результатов и список цитируемой литературы -193 источника. Полученные сведения доказаны проведением соответствующих экспериментов, являются новыми и не вызывают сомнений.

Однако имеются замечания.

- 1) Не согласна с формулировками в литературном обзоре диссертации (стр. 45, п. 1.3 и стр. 65, п. 1.4) термина «структурно похожие», поскольку представленные структуры в подавляющем большинстве совсем не похожи на структуры антибиотиков тетраценомицина X и соответственно аурапланина.
- 2) Многие формулы антибиотиков изображены в разных форматах по величине: одни мелкие, другие слишком крупные. Это относится к автореферату и к диссертации.
Далее по диссертации. Имеются ошибки в формулах: стр. 51 – нетрадиционное изображение структуры тетрациклина, стр. 50 - в табл. 1 тетрациклин вообще имеет ошибочную формулу, стр. 65 – в структуре тейкопланина отсутствует N-ацильный радикал жирной кислоты, стр. 116 – искажена формула того же тейкопланина.
- 3) Много грамматических ошибок в автореферате и в диссертации в словах, например: сиквинирование (стр. 21, автореферат), конфирмация (стр. 22, а/р.) и др., а также в названиях разных антибиотиков: левофлоксацин (стр. 43, диссер.), тетрацеклин (стр. 50, диссер.), антроциклины (стр. 13, а/р), тиостриптон (стр. 16, а/р.).

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспортам специальностей 1.4.9 – «биоорганическая химия», 1.5.3 – «молекулярная биология» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Лукьянов Дмитрий Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.4.9 – «биоорганическая химия», 1.5.3 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник
Лаборатории химической трансформации ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»

Олсуфьева Евгения Николаевна

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 02.00.10 – Биоорганическая химия

Адрес места работы:

119021, Москва, ул. Б. Пироговская, д. 11.

ФГБНУ «НИИНА», Лаборатория химической трансформации антибиотиков.

Подпись сотрудника Олсуфьевой Е.Н.

ученый секретарь ФГБНУ «НИИНА»

К.х.н. О.В. Кисиль

удостоверяю: