



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



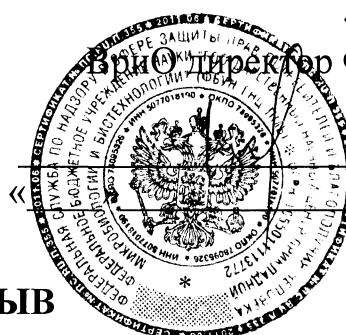
**Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)**

п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, 142279

тел: (4967) 36-00-03, факс: (4967) 36-00-10

e-mail: info@obolensk.org, <http://www.obolensk.org>

ОКПО 78095326 ОГРН 1055011113772 ИНН 5077018190 КПП 507701001



«УТВЕРЖДАЮ»

Врио директора ФБУН ГНЦ ПМБ

д.б.н., профессор

Шемякин И.Г.

2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» о научно-практической ценности диссертационной работы Шубниковой Елены Владимировны на тему: «Влияние физико-химических факторов и форм адаптивной изменчивости на чувствительность патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность избранной темы исследования

В настоящее время, несмотря на существование широкого спектра различных химиотерапевтических препаратов, лечение сапа и мелиоидоза связано со значительными трудностями, которые определяются, в первую очередь, высокой природной устойчивостью микроорганизмов ко многим антибактериальным препаратам. Немаловажное значение в феномене высокой устойчивости патогена имеет также способность *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*, к длительной персистенции в клетках макроорганизма, где они становятся менее

доступными для действия антибиотиков. Кроме того, при оценке результатов определения чувствительности патогенных буркхольдерий к химиопрепаратам следует иметь ввиду влияние физико-химических факторов макроорганизма (рН и температура окружающей среды, концентрация CO₂, сывороточный фактор), которые могут существенно изменять чувствительность бактерий к определенному виду антибактериальных препаратов. Поэтому стандартные методы лабораторных исследований не всегда могут быть достаточными для достоверного определения чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам.

Выбор эффективных химиотерапевтических препаратов основывается на характеристике чувствительности к ним возбудителей инфекционных заболеваний. Принципиально перечень антибактериальных препаратов для терапии сапа и мелиоидоз известен. Схемы лечения апробированы в экспериментальных исследованиях и клинической практике, тем не менее, применение их далеко не всегда позволяет достичь желаемого результата, вследствие чего нередко при острых формах этих инфекций отмечают гибель больных и частое развитие рецидивов после проведенного лечения. Помимо этого, недостаточная терапевтическая эффективность препаратов, активных в опытах *in vitro*, может быть связана с рядом других факторов, проявляющихся в процессе взаимодействия микроорганизма с химиопрепаратами в условиях *in vivo*: постантибиотическим эффектом, повышением антибиотикорезистентности бактерий при формировании биопленки, наконец, прямым воздействием на антибиотик физико-химических факторов внутренней среды макроорганизма. Кроме того, обеспечение успешной терапии сапа и мелиоидоза требует учета особенностей патогенеза, поскольку подбор химиопрепаратов в стандартных условиях рассчитан, в основном, на планктонные клетки, изолированные друг от друга, в то время как бактерии, сохраняющиеся внутри биопленок и клеток макроорганизма, размножаются и вновь распространяются после завершения курса лечения, приводя к развитию хронических форм и рецидивам заболевания.

Проведенное в диссертационной работе Шубниковой Елены Владимировны комплексное изучение чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим

препаратам в связи с влиянием на нее ряда физико-химических факторов и установленных для возбудителей механизмов адаптации, которые проявляют себя в ходе инфекционного процесса в макроорганизме, является актуальным, позволяя с большей объективностью подойти к отбору эффективных химиопрепаратов для адекватной терапии сапа и мелиоидоза.

Цель исследования - изучение физико-химических факторов и форм адаптивной изменчивости патогенных буркхольдерий, влияющих на их чувствительность к химиотерапевтическим препаратам. Задачи исследования сформулированы четко, полностью отражают структуру диссертационного исследования и достаточны для достижения поставленной цели.

Новизна исследования полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Новизна исследования и полученных автором результатов заключается в проведении сравнительной оценки чувствительности *B. mallei* и *B. pseudomallei*, наряду с *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia thailandensis*, к химиопрепаратам в стандартных условиях и условиях, моделирующих характер взаимодействия микроорганизма с макроорганизмом *in vitro*. При этом установлены значительные различия в антибиотикочувствительности буркхольдерий, зависящие от влияния физико-химических факторов среды (рН, температуры, наличия 5 % двуокиси углерода в атмосфере и белков плазмы крови в питательной среде).

Приоритет исследований по изучению влияния физико-химических факторов на показатели чувствительности буркхольдерий к химиопрепаратам подтвержден патентом на изобретение № 2404252 от 27.04.2009 г. «Способ подбора высокоактивного антибактериального средства для лечения заболеваний, вызываемых патогенными буркхольдериями».

Впервые в России в рамках одной работы продемонстрирована принципиальная способность различных видов буркхольдерий к образованию биопленок на абиотических поверхностях в условиях *in vitro*. Проведена сравнительная оценка антибиотикочувствительности планктонных и биопленочных

культур буркхольдерий и показано, что *B. mallei* и *B. pseudomallei* в составе зрелых биопленок высокорезистентны к химиотерапевтическим препаратам, применяемым при лечении сапа и мелиоидоза. Показана ингибирующая активность антибактериальных препаратов на ранних стадиях образования культурами биопленок.

В настоящей работе впервые в качестве моделей для изучения чувствительности к химиотерапевтическим средствам буркхольдерий, персистирующих в эукариотических клетках, использовали перитонеальные мышинные макрофаги и свободноживущие простейшие вида *Tetrahymena pyriformis*.

Выявлено, что патогенные буркхольдерии, интернированные в эукариотические клетки (макрофаги или простейшие), обладают повышенной резистентностью к химиотерапевтическим средствам, используемым в стандартных схемах лечения сапа и мелиоидоза. Оценка резистентности буркхольдерий, защищенных клетками тетрахимен и макрофагов, позволила сделать заключение относительно наибольшей перспективности меропенема для лечения сапа. Впервые была показана высокая эффективность экстренной профилактики и лечения острого экспериментального сапа липосомальными формами меропенема. Приоритетность исследований подтверждена патентом на изобретение № 2490013 от 06.07.2012 г. «Способ лечения экспериментального сапа».

Таким образом, установленные различия в показателях чувствительности буркхольдерий к антибактериальным препаратам при определении ее в модифицированных условиях, коррелирующих с активностью препаратов *in vivo*, позволили автору отобрать наиболее эффективные из них для проведения адекватного лечения заболеваний, вызываемых патогенными буркхольдериями.

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации

Основная теоретическая и практическая значимость исследования заключается в разработке научно-методической основы и подходов, направленных

на решение задач, связанных с совершенствованием принципов подбора антибактериальных препаратов для лечения сапа и мелиоидоза.

Практическую значимость представляют материалы исследования, использованные при написании методических указаний «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика мелиоидоза. 4.2.2787-10», утвержденных на федеральном уровне 06.12.2010г. Помимо этого, по результатам работы получены патенты на изобретения «Способ подбора высокоактивного антибактериального средства для лечения заболеваний, вызванных патогенными буркхольдериями» № 2404252 от 27.04.2009 г. и «Способ лечения экспериментального сапа» № 2490013 от 06.07.2012 г. Подготовлены и оформлены «Методические рекомендации по созданию селективных сред для возбудителей сапа и мелиоидоза», утвержденные директором ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора В.В. Алексеевым 29.12.2010 г.

Обоснованность и достоверность научных положений,

выводов и заключений

Основные научные положения диссертационной работы, выводы, заключения, сформулированные автором, вполне логичны, теоретически обоснованы и базируются на полученных в ходе исследования данных. Работа выполнена на современном методическом уровне, достоверность представленных результатов не вызывает сомнений, экспериментальные исследования проведены в достаточной повторности, материал подвергнут статистической обработке. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли принципиальное отражение в выводах, вытекающих из существа проделанной работы и соответствуют поставленным целям и задачам.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом,

замечания по оформлению

Диссертация написана в классическом стиле, изложена на 16 страницах и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, четыре главы собственных исследований, заключение, выводы и список литературы, включающий 282 источника, из них 54 на русском и 228 на английском языках. Материалы диссертации широко представлены на научно-практических конференциях и съездах. По теме диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Оформлены заявки и получены два патента на изобретения.

В главе «Обзор литературы» даны как исторические справки и ссылки на проблему заболеваемости сапом и мелиоидозом, так и на проблему антибиотикорезистентности возбудителей. Представлен современный подход к видению этих двух проблем. Рассмотрены также методические подходы к изучению проблемы антибиотикорезистентности и у других видов буркхольдерий.

Позиция автора, связанная с выбором направлений исследований, также основывается на современных генетических исследованиях с применением методов геномного и протеомного анализа. Автором глубоко проанализированы стандартные и новые методы определения антибиотикорезистентности, в том числе, способ ускоренного определения антибиотикочувствительности.

Проведен анализ литературных источников о влиянии физико-химических факторов среды на чувствительность микроорганизмов к химиотерапевтическим средствам. Показано, что этому вопросу уделяется крайне недостаточное внимание.

В литературном обзоре также рассмотрены вопросы влияния форм адаптивной изменчивости (формирования биопленок и внутриклеточной персистенции) на чувствительность буркхольдерий к химиопрепаратам. Должное внимание уделено проблеме клинического течения и принципам химиотерапии сапа и мелиоидоза.

В главе «Материалы и методы» представлены штаммы патогенных и непатогенных буркхольдерий, антибиотики, химиотерапевтические средства и другие материалы и методы, позволившие автору адекватно решать поставленные в работе цель и задачи.

В главе 3 «Собственные исследования» показано влияние ряда физико-химических и других факторов на чувствительность буркхольдерий к химиопрепаратам. Вместе с изучением классическими методами антибиотикочувствительности буркхольдерий автор применил и показал адекватность и статистически стабильные результаты с использованием ускоренного метода определения чувствительности патогенов на среде с индикатором бромтимоловым синим. Полученные за 4-6 часов результаты полностью коррелируют со стандартными методами.

Автором показано изменение, как правило, снижение антибиотикорезистентности буркхольдерий при пассировании их через организм восприимчивых животных. Возможность формирования при многократных передачах возбудителя от животных к животным или к человеку, более чувствительной к антимикробным препаратам популяции, должно учитываться в практике лечения сапа.

Показанное автором снижение резистентности культур буркхольдерий к антибиотикам в процессе многократных пассажей через организм животных является результатом ускоренного размножения штаммов с повышенной вирулентностью, связанного с одновременным укорочением lag-фазы и ускорением времени генерации.

В этой же главе автором получены данные, позволяющие считать, что изучение антибиотикочувствительности буркхольдерий в стандартных условиях не может служить единственным определяющим фактором при отборе препаратов для лечения сапа и мелиоидоза. Для оценки эффективности химиотерапевтических препаратов в отношении патогенных буркхольдерий *in vitro* уместно воспроизвести условия, моделирующие характер взаимоотношений микроорганизма с антибиотиком *in vivo*, а именно добавить к среде Мюллер-Хинтона кровь экспериментальных животных и провести культивирование в атмосфере, содержащей 5 % углекислого газа.

В главе 4, посвященной исследованиям, касающихся изучения влияния форм адаптивной изменчивости на чувствительность к химиопрепаратам буркхольдерий,

образующих биопленки, автор получил очень интересные данные. Визуально все четыре вида буркхольдерий легко образуют биопленки в жидких питательных средах (поверхность раздела фаз «жидкость-воздух»). Использование различных видов микроскопий (в том числе и электронной) позволили автору установить, что патогенные буркхольдерии хорошо образуют биопленку в экспериментальных условиях на границе раздела различных сред. Как видно из результатов исследования, биопленочное сообщество, образованное *in vitro*, имеет сложную специфическую ультраструктуру, которая в итоге обеспечивает его высокую выживаемость и устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды. В результате проведенных экспериментов установлено, что биопленочная популяция буркхольдерий повышает свою резистентность к изученным химиопрепаратам более чем в 10 раз по сравнению с планктонными культурами тех же штаммов, о чем свидетельствует достоверное увеличение МПК.

В ходе исследования автором выявлено, что химиопрепараты (меропенем, цефтазидим, ко-тримоксазол, доксициклин, рифампицин, амоксиклав, азитромицин) в терапевтических концентрациях подавляли образование биопленок у всех изученных сапных культур.

Из литературных источников известно, что возбудители сапа и мелиоидоза способны выживать внутри клеток макроорганизма, длительное время персистировать, размножаться и вновь распространяться после завершения курса химиотерапии, вызывая рецидивы и развитие хронических форм заболевания.

Для подтверждения этого положения автор диссертации изучила чувствительность буркхольдерий, интернированных в эукариотические клетки, к ряду химиотерапевтических средств, рекомендуемых для лечения сапа и мелиоидоза. В качестве моделей для оценки чувствительности к химиопрепаратам внутриклеточно персистирующих буркхольдерий были выбраны перитонеальные мышинные макрофаги и простейшие вида *T. pyriformis*, которые в настоящее время широко применяются при изучении биологических свойств бактерий (адгезивности, инвазивности, устойчивости к фагоцитозу и патогенности).

В экспериментах на макрофагах автор подтвердила литературные данные о том, что карбапенемы легче проникают и накапливаются в макрофагах, обеспечивая санацию эукариотических клеток, предотвращая размножение и распространение возбудителей в тканях макроорганизма. Для доксициклина и цефтазидима показано, что они накапливаются в макрофагах в низких концентрациях или инактивируются в них, вследствие этого не оказывают должного бактерицидного действия на персистирующие буркхольдерии. На основании этого автор объясняет наличие определенной активности химиопрепаратов при прямом их воздействии на возбудители сапа и мелиоидоза в экспериментах *in vitro* и отсутствие терапевтического эффекта при лечении экспериментальных инфекций *in vivo*.

В опытах с простейшими на модели «тетрахимена - буркхольдерия» автор, как и ряд исследователей у нас в стране и зарубежом, показала, что в сокультурах рост микроорганизмов подавляется концентрациями химиотерапевтических препаратов в десятки раз превышающими исходные МПК для планктонных взвесей. Таким образом, буркхольдерии сохраняют свою жизнеспособность в интернированном состоянии в эукариотических клетках, находившихся в среде, содержащей антибиотики в бактерицидной концентрации для внеклеточных бактерий *B. mallei* и *B. pseudomallei*.

В главе 5, касающейся терапевтической эффективности химиопрепаратов при лечении экспериментального сапа и мелиоидоза, автором получено подтверждение теоретических и экспериментальных данных о том, что из отобранных препаратов для терапии сапа у высокочувствительных к мелиоидозной и сапной инфекции золотистых хомячков наиболее эффективными оказались ко-тримоксазол в суточной дозе 100 мг/кг., а также ципрофлоксацин в суточной дозе 50 мг/кг и доксициклин в суточной дозе 50 мг/кг. И эти же препараты оказались не эффективными при лечении экспериментального мелиоидоза (летальность животных составляла 80-100%).

Ранее автором отмечено, что резистентность буркхольдерий к изученным химиотерапевтическим препаратам достоверно повышается при определении чувствительности к ним в модифицированных условиях, близких к среде

препаратов и разработке схем лечения людей при сапе и мелиоидозе. Повышение эффективности терапии и профилактики данных инфекций может быть достигнуто за счет применения наиболее активных химиопрепаратов и их комбинаций с препаратами, повышающими активность клеточного звена иммунной системы, такими как GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, а также препятствующими образованию биопленок *in vivo*.

Оценивая диссертацию в целом, считаем необходимым отметить, что по актуальности проблемы, содержанию представленных материалов, методическому уровню, научной новизне и практической значимости она может быть расценена как завершённое исследование. Работа изложена достаточно убедительно, хорошо иллюстрирована, личный вклад соискателя в выполнении экспериментов и обобщении результатов исследований несомненен.

Принципиальных замечаний по существу и оформлению диссертационной работы Шубниковой Елены Владимировны нет. Однако необходимо отметить ряд недочётов.

В главе «Материалы и методы», к сожалению, автор не показала использование в своей работе отечественных питательных сред. По всей вероятности, это связано с рекомендациями зарубежных методов, на которые автор ссылается.

Недостаточно убедительно озвучено положение утверждающее, что проделанная работа может лечь в основу продолжения исследований по подбору наиболее эффективных химиотерапевтических препаратов и разработке схем лечения людей при сапе и мелиоидозе.

В списке литературы не очень корректно дана интернет ссылка в 157 источнике (Growing *Burkholderia pseudomallei* in Biofilm Stimulating Conditions Significantly Induces Antimicrobial Resistance [электронный ресурс] / C. Sawasdidoln , S. Taweechaisupapong , R.W. Sermswan et al. // PLoS One. – 2010. - Vol. 5, № 2. – e9196. - Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0009196>. - Загл. с экрана.).

Некоторые неточности в изложении и интерпретации экспериментальных данных (очень большой разброс процента выживаемости и некоторые другие) в целом не влияют на существо работы и её ценность как научно-практического труда.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата оформлено в соответствии с требованиями стандарта и полностью соответствует основным положениям диссертации и его прочтение дает полное представление о проделанной работе.

Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертации автором опубликованы 14 работ, из них 6 статей в рецензируемых журналах. Получены два патента на изобретения.

Заключение

Диссертационная работа Шубниковой Елены Владимировны «Влияние физико-химических факторов и форм адаптивной изменчивости на чувствительность патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам» является законченным научно-квалификационным исследованием, имеющим теоретическое и практическое значение, и полностью соответствует требованиям п. 9 положения ВАК «О порядке присуждения ученых степеней и званий» (Постановление правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор Шубникова Елена Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании Ученого совета ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», от 26 мая 2015, протокол № 4.

Светоч Эдуард Арсеньевич

Доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий отделом молекулярной микробиологии



Адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховской р-н, п.Оболенск.
Тел. 8(4967) 36-00-10; факс 8(4967) 36-00-10 info@obolensk.org
Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Подпись Светоча Э.А. заверяю
Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ПМБ,
доктор биологических наук
Тел.-8(4967)-36-00-69, E-mail: kolombet@obolensk.org



Л.В. Коломбет