

Отзыв официального оппонента на диссертацию
Шубниковой Елены Владимировны «Влияние физико-химических факторов
и форм адаптивной изменчивости на чувствительность патогенных
буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам», на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность исследования. *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* - патогенные бактерии, вызывающие инфекционные заболевания, – соответственно сап и мелиоидоз. В Российской Федерации отсутствуют эндемичные по этим инфекциям районы, однако вероятность завозных случаев и потенциальная опасность использования этих микроорганизмов в качестве агентов биотерроризма обуславливают интерес отечественных исследователей к изучению их биологии. Выяснение механизмов устойчивости патогенных буркхольдерий к антибактериальным препаратам *очевидно* актуально. Еще более актуально исследование активности химиотерапевтических препаратов в отношении буркхольдерий в опытах, моделирующих физико-химические факторы в условиях существования этих патогенов *in vivo*, а также в составе биопленок и персистирующих внутри клеток эукариот.

Цель работы заключалась в «изучении физико-химических факторов и форм адаптивной изменчивости патогенных буркхольдерий, влияющих на их чувствительность к химиотерапевтическим препаратам». На наш взгляд, она сформулирована не совсем корректно: изучались не сами «факторы» и «формы», а их действие на чувствительность бактерий к химиопрепаратам.

Научная новизна представленных результатов несомненна. Установлены значительные различия в чувствительности *Burkholderia mallei*,

B. pseudomallei, *B. cepacia*, *B. thailandensis* к химиопрепаратам в стандартных условиях и условиях, моделирующих характер взаимодействия микроорганизма с макроорганизмом *in vivo*. Уровень чувствительности зависит от физико-химических факторов среды: pH, температуры, присутствия 5% двуокиси углерода в атмосфере и белков плазмы крови в питательной среде. Доказана способность буркхольдерий к образованию биопленок на абиотических поверхностях. Установлено, что клетки *B. mallei* и *B. pseudomallei* в составе зрелых биопленок высокорезистентны к химиотерапевтическим препаратам, применяемым при лечении сапа и мелиоидоза. Выявлена возможность подавления некоторыми антибактериальными препаратами ранних стадий образования культурами биопленок. Доказана повышенная резистентность патогенных буркхольдерий, интернированных в эукариотические клетки (макрофаги, тетрахимены) к химиотерапевтическим средствам, входящим в стандартные схемы лечения сапа и мелиоидоза; определен наиболее перспективный препарат для лечения - меропенем. Впервые показана высокая эффективность экстренной профилактики и лечения острого экспериментального сапа липосомальными формами меропенема. Приоритетность полученных данных подтверждается двумя патентами, зарегистрированными в Госреестре изобретений Российской Федерации.

Практическая значимость работы. Результаты исследования Е.В.Шубниковой использованы при написании одной из глав методических указаний 4.2.2787-10.4.2. «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика мелиоидоза», утвержденных Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (2010 г.). «Методические рекомендации по созданию селективных сред для возбудителей сапа и мелиоидоза», утверждены директором ВолгНИПЧИ (2010 г.). Материалы диссертационной работы используются при проведении

лекций и практических занятий при подготовке специалистов по особо опасным инфекциям в ВолгНИПЧИ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану: состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы, который включает 282 источника, в том числе, 54 – отечественных авторов и занимает 30 страниц (шестую часть объема диссертации!). Текст иллюстрирован 15 таблицами и 20 рисунками. Материалы исследований были доложены на ряде конференций различного уровня. По теме диссертации опубликовано 14 работ, 6 из которых – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России для опубликования основных результатов диссертации на соискание ученой степени. Исследования выполнены в рамках плановой научной тематики Волгоградского НИПЧИ.

Во **введении** излагается авторское обоснование актуальности выбранного направления исследования, сформулирована цель исследования. Поставлены шесть задач, которые необходимо было решить для ее достижения; их формулировки кратки, иногда до потери информативности. Так, задача 1 «Определить чувствительность буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам различными методами» - совершенно неконкретна, поскольку этой проблемой уже давно занимаются многие отечественные и зарубежные исследователи. Приведена также основная информация по результатам - новизне, теоретической и практической значимости, степени достоверности и апробации. Пять положений, выносимых на защиту, отражают основные результаты и достижения работы. Описана структура диссертации, дана информация о публикациях.

В тридцатистраничном **обзоре литературы** приведены данные научных публикаций, касающиеся разных аспектов исследуемой проблемы. Изложены сведения о чувствительности представителей рода *Burkholderia* к химиопрепаратам различной природы, методах ее оценки, факторах и веществах, влияющих на ее уровень. Описаны разные клинические формы заболеваний, вызванных сапным и мелиоидозным микробами, изложены принципы их химиотерапии. При написании главы использованы источники разных лет публикации, в том числе, самых последних. Елена Владимировна исследования не ограничивает простым изложением фактов и закономерностей, она проводит их тщательный анализ. В целом, этот раздел работы заслуживает положительной оценки. Однако вряд ли было необходимо в «Обзоре литературы» описывать различные методы определения чувствительности к антибиотикам, тем более, что они подробно излагаются и далее, в главах «Собственных исследований».

Глава 2 «Материалы и методы» позволяет составить представление о том, что автором использованы преимущественно методы классической микробиологии: культивирование микроорганизмов на питательных средах различного состава, определение чувствительности к химиопрепаратам, получение антибиотикограмм, пассирование культур патогенов через организм лабораторных животных, образование биопленок клетками буркхолдерий, определение вирулентности тестируемых штаммов на моделях золотистых хомячков и белых крыс, терапия экспериментального сапа клатратными и липосомальными формами лекарственных препаратов. Кроме того, в экспериментах применяли методы световой и электронной микроскопии. Все данные подвергали статистической обработке.

Работа была проведена с использованием 20 штаммов *B. pseudomallei*, 14 штаммов *B. mallei*, 14 штаммов *B. cepacia*, 5 штаммов *B. thailandensis* и 1 штамма ресничных инфузорий *Tetrahymena pyriformis*. Отметим очень

подробное описание применяемых методических подходов (иногда слишком подробное - на 18 страницах - более 10%). При этом, однако, отсутствует общепринятая суммарная таблица, характеризующая свойства, источники получения и иные необходимые сведения об используемых штаммах.

Глава 3 «Оценка влияния ряда факторов на чувствительность буркхольдерий к химиопрепаратам» - название, на наш взгляд, очень неконкретное. В ней изложены результаты по определению чувствительности четырех видов буркхольдерий к 13 химиотерапевтическим препаратам различной природы. Наиболее высокая их чувствительность установлена к карбапенемам, фторхинолонам, некоторым комбинированным сульфаниламидам и β -лактамам, умеренная – к рифампицину, хлорамфениколу и тетрациклинам. Полученные данные, в основном, подтверждают известные сведения, дополняя их. Ценным является то, что автор не ограничивается использованием в экспериментах стандартных методов, а предлагает оригинальный метод тестирования, позволяющий ускорить время получения результатов. Метод прост и эффективен, он основан на применении плотной глюкозо-триптонной среды с индикатором бромтимоловым синим, меняющим цвет при сдвиге рН среды в кислую сторону, что и происходит при росте буркхольдерий. Многократные пересевы штаммов сапного и мелиоидозного микробов незначительно влияют на уровень их чувствительности к антибактериальным препаратам, а пассирование их культур через организм животных приводит к ожидаемому повышению вирулентности культур, часто сопряженному с понижением устойчивости химиотерапевтическим средствам. Далее приводятся данные по моделированию проведения экспериментов с вариациями некоторых условий, проявляющихся при взаимодействии микроорганизма с химиопрепаратами *in vivo*: температурой, рН среды, а также добавлением 5 % CO₂ в атмосферу, либо крови экспериментальных животных в среду культивирования. Интерпретируя итоги опытов, автор приходит к

заклучению (осторожно формулируя «позволяют предположить»), что объективную оценку эффективности химиотерапевтических препаратов в отношении патогенных буркхольдерий можно получить только корректируя данные, полученные *in vitro* по стандартным методикам, результатами тестирования в условиях, моделирующих взаимодействие микроорганизма с антибиотиком *in vivo*, а именно, с добавлением к среде Мюллер-Хинтона крови экспериментальных животных и культивированием в атмосфере, содержащей 5 % углекислого газа.

Глава 4, название которой почти полностью повторяет название диссертационной работы, состоит из двух подглав, в первой из которых представлены результаты определения чувствительности к химиопрепаратам культур патогенных буркхольдерий в форме биопленок. Вначале Елена Владимировна получала биопленки исследуемых штаммов буркхольдерий, основываясь на способности бактерий колонизировать абиотические поверхности (рост на границе раздела фаз «жидкость - твердое вещество») и в жидких питательных средах (на границе раздела фаз «жидкость - воздух»). Подробно описаны условия формирования биопленок и доказательства их существования. Электронно-микроскопически показано, что биопленки имеют сложную специфическую ультраструктуру, которая в итоге обеспечивает высокую выживаемость буркхольдерий и их устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды. Вполне ожидаемо, установлено, что биопленочная популяция буркхольдерий более чем в 10 раз по сравнению с планктонными культурами, устойчивее к препаратам, применяемым в стандартных схемах лечения (доксциклину, котримоксазолу, цефтазидиму, рифампицину, меропенему). Кроме того, оказалось, что некоторые антибактериальные препараты в концентрациях, достигаемых в тканях макроорганизма при лечении терапевтическими дозами, препятствуют образованию буркхольдериями биопленок. Таким образом, своевременное начало лечения снижает вероятность формирования

возбудителем биопленки и перехода болезни в хроническую форму. Далее в этой же главе представлены данные по чувствительности буркхольдерий, интернированных в эукариотические клетки (перитонеальные мышинные макрофаги), к средствам, рекомендуемых для лечения сапа и мелиоидоза (меропенем, цефтазидим, доксициклин, ко-тримоксазол). Показано, что клетки «интернированных» штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* более резистентны к перечисленным препаратам, чем контрольные культуры, при этом наиболее эффективным был меропенем. Аналогичные заключения были сделаны по результатам опытов с буркхольдериями, персистирующими в клетках простейших (тетрахимены).

В главе 5 приведены данные, свидетельствующие о том, что для лечения экспериментального сапа и мелиоидоза наиболее эффективны меропенем, доксициклин, ко-тримоксазол, ципрофлоксацин. Впервые показана высокая эффективность экстренной профилактики и лечения острого экспериментального сапа липосомальными формами меропенема.

В Заключение кратко подведены итоги работы, но уделено недостаточное внимание перспективам дальнейших исследований именно: *по выбранному автором направлению*. Шесть **выводов** диссертации основываются на представленном экспериментальном материале и логически завершают проделанную работу. Заметим, однако, что выводы 1 (чувствительность четырех видов буркхольдерий к перечисленному спектру антибиотиков) и 3 (способность патогенных буркхольдерий к образованию биопленок) сформулированы некорректно, поскольку не дают возможности понять – *насколько* они новы и оригинальны.

Большой объем проведенных исследований, их методический уровень, грамотная интерпретация и анализ результатов не оставляют никаких сомнений в их достоверности. Большим достоинством работы является краткость изложения, сочетающаяся с высокой информативностью.

Естественно, работа не лишена недостатков, но исключительно редакционно-стилистического плана.

1. На стр. 25 автор пишет: «...следует продолжать исследования по ... оценке имеющихся методов и разработке новых, более чувствительных и стандартных методик». Утверждение, в принципе, риторическое, но при этом дается ссылка на публикацию 1980-го года! На наш взгляд в данном случае ссылка вообще необязательна.

2. На стр. 66 справедливо утверждается частое использование в практической работе диско-диффузионного метода определения чувствительности бактерий к химиопрепаратам; на стр. 70 автор рекомендует его использование. В чем смысл этой рекомендации?

3. На наш взгляд, нецелесообразно оценивать достоинства и недостатки широко применяемых методов серийных разведений и диско-диффузионного (глава 3): они давно и хорошо известны.

4. Некорректным представляется словосочетание «характер соотношения вирулентности и резистентности...» (с. 76), притом, что смысл его понятен; более адекватен термин «корреляция».

5. Примеры стилистических погрешностей: «Результаты по чувствительности *B.mallei* к хлорамфениколу...» (с.18); «...вид крови не влияет на чувствительность микроорганизмов...» (с. 28); «сокультура» буркхольдерий с тетрахименами (с. 58), «показатели рН окружающей среды...» (с. 110).

Вопросы, возникшие при рецензировании:

1. Что такое «постантибиотический эффект» (с. 5)?
2. Непонятны рассуждения автора по поводу детерминант устойчивости мелиоидозного микроба к полимиксину В (с. 20, абз.2), основной мишенью действия которого являются фосфолипиды

цитоплазматической мембраны микроорганизма. Какое отношение к его действию имеет липополисахарид?

3. Если принять точку зрения автора, что в биопленках может проходить селекция клеток микроорганизмов, обладающих полиантибиотикорезистентностью (нам это представляется маловероятным), тогда какова природа селектирующего агента?

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не снижают теоретической и практической ценности диссертации. Научные положения, выводы и рекомендации обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Автореферат и научные публикации отражают основное содержание работы.

Все изложенное позволяет заключить, что диссертация Е.В. Шубниковой выполнена на высоком методическом уровне, является законченной научно-исследовательской квалификационной работой, в основу которой положен большой фактический материал по разработке перспективного направления – определению критериев выбора и оценке терапевтической эффективности химиопрепаратов для лечения сапа и мелиоидоза. Соответствие рецензируемого исследования специальности 03.02.03 «микробиология» убедительно обосновано целью, задачами, методическими подходами, полученными результатами, положениями, выносимыми на защиту и выводами.

В целом, по значимости и актуальности поставленной проблемы, уровню методического подхода к её разрешению, научно-практическому значению результатов представленная работа соответствует критериям пп. 9, 10, 11 и 13 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., как завершенная научно-квалификационная работа, в которой дано решение задачи, имеющей важное значение в области микробиологии, а её

автор – Елена Владимировна Шубникова - заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Попов Юрий Алексеевич,
доктор биологических наук, профессор
Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Российский научно-исследовательский
противочумный институт "Микроб»,
отдел образовательных программ
и подготовки специалистов, заведующий отделом
410005 г. Саратов, ул. Университетская, 46.
Тел. 845-2-51-52-30; E-mail – rusrap1@microbe.ru

Ю.А. Попов

25.05.2015г

Подпись заведующего отделом, профессора Ю.А. Попова

Заверяю

Начальник отдела кадров
ФКУЗ Российского научно-исследовательского
противочумного института "Микроб»

К.В. Бычков
К.В. Бычков

