

УТВЕРЖДАЮ:

Ректор ФГБОУ ВО РостГМУ
Минздрава России
профессор С.В. Шлык



«11» ноября 2020 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования**

«Ростовский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация Алиевой Анны Александровны на тему: «Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль в патологии и способы подавления» выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии № 2 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В период подготовки диссертации Алиева Анна Александровна обучалась в заочной аспирантуре на кафедре микробиологии и вирусологии №2 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и работала врачом-паразитологом ФКУЗ «Северо-Кавказская ПЧС» Роспотребнадзора.

В 2006 году Алиева А.А. окончила государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ростовский государственный университет» по специальности «Биология».

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2020 году федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего

образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель – Харсеева Галина Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

По результатам рассмотрения диссертации «Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль в патологии и способы подавления» принято следующее заключение:

Актуальность темы исследования

Тема научной работы Алиевой Анны Александровны, представленная в качестве кандидатской диссертации, относится к одной из актуальных проблем микробиологии.

Возбудитель дифтерии *Corynebacterium diphtheriae* характеризуется наличием широкого спектра факторов патогенности, главным из которых является экзотоксин. Характер и механизм воздействия дифтерийного токсина на органы и ткани человека хорошо изучены. Однако исследование начального этапа инфекционного процесса - адгезии возбудителя дифтерии на эпителии входных ворот инфекции - в последние годы вызывает все больший интерес. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae* играет главную роль в колонизации возбудителем эпителия верхних дыхательных путей, что лежит в основе формирования дифтерийного бактерионосительства, без искоренения которого невозможна полная эрадикация дифтерии. Вакцинопрофилактика дифтерии, проводимая в настоящее время во всем мире дифтерийным анатоксином не предотвращает формирования бактерионосительства, так как способствует формированию в организме антитоксических антител, которые не препятствуют адгезии возбудителя на эпителии входных ворот инфекции. Способность к

адгезии в настоящее время рассматривается как один из ведущих факторов патогенности *C. diphtheriae*.

Прикрепление *C. diphtheriae* к слизистой оболочке зева является необходимым условием для дальнейшего развития инфекционного процесса. Адгезивность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* обуславливают поверхностные структуры бактериальной клетки: пили (фимбрии), ковалентно связанные с пептидогликаном; нефимбриальный поверхностный белок 67-72p (или DIP0733), распознающий и специфически связывающийся с рецепторами эритроцитов человека; поверхностный белок DIP1281, способствующий адгезии возбудителя дифтерии на эпителиальных клетках хозяина и инвазии в них; CdiLAM (липоарабиноманнан), локализующийся на поверхности клеточной оболочки *C. diphtheriae* и способствующий связыванию с эпителиоцитами хозяина. Начальный этап инфекционного процесса при заболевании дифтерией и персистенция *C. diphtheriae* в организме при бактерионосительстве связаны с поверхностными белками – адгезинами, которые могут способствовать и инвазии возбудителя в эпителиальные клетки. Для борьбы с дифтерийным бактерионосительством в настоящее время используется антибактериальная терапия, которая не всегда успешна из-за появления штаммов коринебактерий, обладающих резистентностью к антибактериальным препаратам. Помимо этого, известно, что возбудитель дифтерии обладает способностью формировать биопленку, что также осложняет борьбу с носительством. Это говорит о необходимости поиска новых средств, предотвращающих циркуляцию *C. diphtheriae* в популяции, а также в организме бактерионосителей. Антиадгезивная терапия, направленная на прерывание начального этапа инфекционного процесса за счет блокады адгезии и, как следствие, колонизации бактерий на слизистой оболочке входных ворот инфекции, может явиться одним из таких средств.

Существуют различные подходы к ингибированию адгезии микроорганизмов на человеческих клетках. С одной стороны, это создание конкурентных взаимоотношений между рецепторами для адгезинов патогенных

бактерий на человеческих клетках и аналогов этих рецепторов, в роли которых могут выступать сахараиды. Так, известен антиадгезивный эффект маннозы в отношении энтеропатогенной *Escherichia coli*, сиалил-3Р-лактозы – *Helicobacter pylori*, смеси галактозы, маннозы и N-ацетилнейраминовой кислоты – *Pseudomonas aeruginosa*. С другой стороны, для ингибирования адгезии могут применяться аналоги адгезинов – синтетические низкомолекулярные пептиды, гиалуроновая кислота, липотейхоевые кислоты, которые имитируют структуру поверхностных адгезинов бактерий.

Однако необходимо указать и на определенные проблемы, связанные с использованием антиадгезивных средств. Так, большинство патогенных бактерий во время инфекционного процесса экспрессирует на своей поверхности сразу несколько различных типов адгезинов. При этом процесс адгезии, помимо адгезинов, может быть обусловлен и другими факторами, такими как гидрофобность и липофильность клеточной поверхности, сила механических взаимодействий. В связи с этим, в качестве эффективных средств антиадгезивной терапии необходимо использовать вещества с широким спектром блокирующей активности относительно всех факторов адгезии инфицирующего микроорганизма. В этом отношении интерес представляет иммуномодулятор азоксимера бромид, обладающий разнообразной фармакологической активностью, в том числе, иммуномодулирующей, мембранопротекторной, детоксицирующей, антиоксидантной.

Таким образом, поставленная диссертантом цель – определение роли адгезии штаммов *C. diphtheriae* в патологическом процессе при дифтерии и способов ее подавления – является актуальной.

Научная новизна работы

Впервые дана характеристика адгезивно-инвазивного потенциала планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на клеточной линии Нер-2. Впервые определен уровень и характер цитопатического действия планктонных и биопленочных (120- и 720-

часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на культуре клеток СНО-К1. Впервые проведен анализ взаимосвязи адгезивных, инвазивных и цитопатических свойств планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и их возможной роли в развитии патологического процесса при дифтерии. Впервые определен характер воздействия факторов врожденного и адаптивного иммунитета на адгезивность и инвазивность планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. Исследовано воздействие азоксимера бромиды на адгезивные и инвазивные свойства планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. На основе полученных результатов исследования получен патент РФ на изобретение (№ 2672862 от 20 ноября 2018г.).

Практическая значимость работы

Полученные результаты позволяют расширить представления о возможных механизмах и роли процесса адгезии возбудителя в развитии патологического процесса при дифтерии. Установлено, что на ранних стадиях дифтерии существенную роль играют адгезия и инвазия *C. diphtheriae*. В последующем, при формировании биопленки, адгезивность коринебактерий увеличивается, а инвазивность и уровень токсинопродукции снижаются. Высокий уровень в сыворотке крови анитоксических антител и лактоферрина, низкое содержание антибактериальных антител, а также широкий спектр сывороточных белков, обладающих способностью ингибировать апоптоз и связывать тяжелые металлы, в том числе и железо, предрасполагает к повышению адгезивной активности планктонных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, что приводит впоследствии к формированию бактерионосительства. Эти данные имеют важное значение для расшифровки механизмов патогенеза манифестированных форм дифтерийной инфекции и бактерионосительства и могут быть использованы при разработке соответствующих подходов к их лечению. Установленный факт выраженной антиадгезивной активности азоксимера бромиды в отношении не только

планктонных, но и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на клетках карциномы фарингеального эпителия Нер-2 позволяет рассматривать его как препарат для неспецифической профилактики и терапии дифтерии на ранних стадиях патологического процесса.

Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций

О достоверности полученных результатов работы свидетельствует достаточный объём проведённых исследований по изучению способности к адгезии и инвазии на культуре клеток Нер-2 планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae*, а также уровня и характера их цитопатического действия по отношению к культуре клеток СНО-K1. Исследование проведено с использованием бактериологических, культуральных, микроскопических, иммунологических, физико-химических и статистических методов исследования, характеризующихся высокой специфичностью и чувствительностью. Комплексное исследование планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae* позволило получить результаты, сопоставимые с данными литературы, что свидетельствует об их достоверности.

Практические рекомендации

Учитывая данные о повышении адгезивной активности токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в составе биопленки, для назначения эффективного лечения дифтерии и санации бактерионосителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae* следует рассмотреть возможность использования антиадгезивной терапии. Для неспецифической профилактики и как дополнительный препарат для лечения дифтерии возможно использовать препарат АЗБ, обладающий выраженной как антиадгезивной, так и иммуномодулирующей активностью. Использование АЗБ может способствовать снижению циркуляции штаммов возбудителя дифтерии в популяции благодаря его антиадгезивному действию.

Конкретное личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, автором лично проведено моделирование процессов, мониторинг основных параметров, аналитическая и статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: постановка задач, способы их решения, обсуждение результатов в научных публикациях и докладах и их внедрение в практику.

Сведения о внедрении и предложениях о дальнейшем использовании полученных результатов

Результаты исследования внедрены в работу:

- кафедры микробиологии и вирусологии №2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России,
- лаборатории бактериологических методов исследования ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» Роспотребнадзора,
- МБУЗ «Городская больница № 20 города Ростова-на-Дону».

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По теме диссертации опубликовано всего 19 научных работ, из них – 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, включая 3 статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и системы цитирования Scopus, 1 – в переводном Российском журнале. Получен патент на изобретение РФ № 2672862.

1. Харсеева Г.Г. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль поверхностных структур и механизм формирования / Г.Г. Харсеева, А.А.

Алиева // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. - 2014. - №4. - С. 109-117.

2. Алиева А.А. Адгезивная активность *Corynebacterium diphtheriae* / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Л.П. Алексеева, Н.А. Воронина // Проблемы медицинской микологии (приложение). – Санкт-Петербург, 2015. – Т.17. – № 2 – С. 37.

3. Алиева А.А. Адгезивные свойства типовых и биопленочных культур возбудителя дифтерии / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Я.Н. Фролова, А.В. Лабушкина, Н.А. Воронина // Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (микробиология, биотехнология, эпидемиология, паразитология). Сб. научн-практ. работ Межрегиональной научной-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2015. – С.13-14.

4. Воронина Н.А. Гемолитическая активность штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, О.И. Сылка, А.В. Лабушкина, А.А. Алиева // Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (микробиология, биотехнология, эпидемиология, паразитология). Сб. научн-практ. работ Межрегиональной научной-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2015. – С.27-29.

5. Харсеева Г.Г. Адгезивная активность штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / Г.Г. Харсеева, А.А. Алиева, А.В. Лабушкина // 90 лет в авангарде микробиологической науки в Беларуси. Сб. трудов Республиканской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 125-летию со дня рождения Б.Я. Эльберта. – Минск, 18 декабря 2015. – С.169-172.

6. Алиева А.А. Воздействие иммуномодулятора полиоксидония на адгезивные свойства возбудителя дифтерии. / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Э.Л. Алутина, О.И. Сылка, С.Ю. Тюкавкина // Воздушно-капельные инфекции: микробиология, эпидемиология, биотехнология. Сб. научно-практических работ V Межрегиональной научно-практической конференции. - Ростов-на-Дону, 2016. – С.3-4.

7. Алиева А.А. Взаимодействие штаммов *Corynebacterium diphtheriae tox⁺* с культурой клеток Нер-2 / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева // Сборник материалов 3-ей итоговой научной сессии молодых ученых РостГМУ. - Ростов-на-Дону, 1 июня 2016. - С. 20-21.
8. Алиева А.А. Влияние способности к биопленкообразованию на адгезивную активность *Corynebacterium diphtheriae* / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Я.Н. Фролова, Н.А. Воронина, О.И. Сылка // Проблемы медицинской микологии (приложение). – Санкт-Петербург, 2016. – Том 18. – № 2. – С. 36.
9. Харсеева Г.Г. Способность к адгезии типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / Г.Г. Харсеева, А.А. Алиева, О.И. Сылка, С.Ю. Тюкавкина, Л.П. Алексеева // Альманах клинической медицины. - 2017. - Том 45. - № 2. - С. 154-158.
10. Харсеева Г.Г. Методология исследования процесса инвазии недифтерийных коринебактерий / Г.Г. Харсеева, А.А. Алиева, Н.А. Воронина // Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний в Ростовской области. Материалы региональной научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2017. - С.161-162.
11. Алиева А.А. Способность к адгезии и инвазии токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева // Сборник материалов 4-ой итоговой научной сессии молодых ученых РостГМУ. – Ростов-на-Дону, 1 июня 2017. - С. 9-10.
12. Алиева А.А. Факторы патогенности недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Э.О. Мангутов, С.Н. Головин // Клиническая лабораторная диагностика. - 2018. - Том 63. - № 6. – С. 375-378.
13. Алиева А.А. Адгезивные и инвазивные свойства недифтерийных коринебактерий / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Э.О. Мангутов, Н.А. Воронина,

Э.Л. Алутина // Проблемы медицинской микологии (приложение). – Санкт-Петербург, 2018. – Том 20. – № 2. – С. 47.

14.Харсеева Г.Г. Современные подходы к ингибированию адгезии *Corynebacterium diphtheriae* / Харсеева Г.Г., Алиева А.А. // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Орехово-Зуево, 30 ноября 2018. – С. 302-309.

15.Патент на изобретение РФ № 2672862, от 20 ноября 2018. Способ отбора пациента в группу риска по развитию фолликулярной ангины / Харсеева Г.Г., Алиева А.А., Воронина Н.А., Мангутов Э.О. - Бюл. № 32. – 15 с.

16.Алиева А.А. Подавление адгезии типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Л.П. Алексеева, Э.Л. Алутина // Проблемы медицинской микологии (приложение). – Санкт-Петербург, 2019. – Том 21. – № 2. – С. 35-36.

17.Харсеева Г.Г. Адгезивные и инвазивные свойства токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / Г.Г. Харсеева, А.А. Алиева, А.В. Чепусова, Э.Л. Алутина, О.И. Сылка // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2019. – Том. 18. - № 3. – С. 22-27.

18.Харсеева Г.Г. Цитопатическое действие возбудителя дифтерии в составе биопленки / Г.Г Харсеева, А.А. Алиева, Л.П. Алексеева, Э.О. Мангутов, Л.А. Шовкун // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Том 64. - № 11. – С. 681-685.

19.Харсеева Г.Г. Подавление бактериальной адгезии: Современные подходы, проблемы и перспективы / Г.Г. Харсеева, А.Ю. Миронов, А.А. Алиева // Успехи современной биологии. – 2019. – Том 139. - № 5. – С. 506-515.

20.Алиева А.А. Инвазия как фактор патогенности возбудителей коринебактериальной инфекции / А.А. Алиева, Э.О. Мангутов // Известия ГГТУ Медицина. Фармация. Научные труды. - Орехово-Зуево. - 2020. – С. 21-25.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертационная работа «Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль в патологии и способы подавления», представленная Алиевой Анной Александровной, полностью соответствует специальности 03.02.03 – микробиология и соответствует требованиям п. 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, не содержит заимствованного материала без ссылки на автора и рекомендуется к публичной защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Заключение принято на совместном заседании научно-координационного совета «Медико-биологические проблемы» и кафедры микробиологии и вирусологии № 2 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. Присутствовали на заседании 11 человек. Результаты голосования: «за» 11 человек, «против» 0, «воздержалось» 0, протокол № 6/20 от 03.06.2020.

Председатель научно-координационного
совета «Медико-биологические проблемы»,
Заведующий кафедрой биохимии
ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук,
профессор

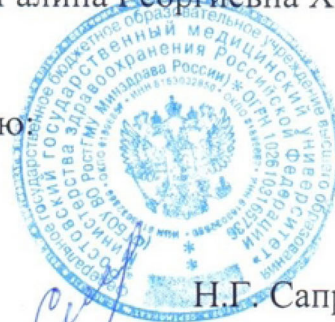
Зоя Ивановна Микашинович

Заведующий кафедрой микробиологии
и вирусологии № 2 ФГБОУ ВО РостГМУ
Минздрава России,
доктор медицинских наук,
профессор

Галина Георгиевна Харсеева

Подпись З.И. Микашинович и Г.Г. Харсеевой заверяю:

Ученый секретарь ученого совета
ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук, доцент



Н.Г. Сапронова