

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора Червинца Вячеслава Михайловича на диссертационную работу Алиевой Анны Александровны «Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль в патологии и способы подавления», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология

### Актуальность темы диссертационного исследования

Возбудитель дифтерии *Corynebacterium diphtheriae* характеризуется наличием широкого спектра факторов патогенности, главным из которых является экзотоксин. Проводимая в настоящее время вакцинопрофилактика дифтерии формирует только антитоксический иммунитет, который защищает от развития клинически манифестированных форм, но не предотвращает адгезию и колонизацию возбудителем слизистых оболочек рото- и носоглотки с последующим развитием бактерионосительства. Для борьбы с дифтерийным бактерионосительством используется антибактериальная терапия. Однако появление штаммов коринебактерий, обладающих резистентностью к антибактериальным препаратам, диктует необходимость поиска новых средств, препятствующих циркуляции *C. diphtheriae* в популяции и, в частности, в организме бактерионосителей. Одним из таких средств может явиться антиадгезивная терапия, направленная на прерывание инфекционного процесса на начальном этапе вплоть до его прекращения за счет блокады адгезии и, как следствие, колонизации бактерий на слизистой оболочке входных ворот инфекции.

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.

Все вышеизложенное дает основание говорить об актуальности исследования Алиевой Анны Александровны, касающегося изучения роли адгезии *Corynebacterium diphtheriae* в развитии патологического процесса при дифтерии и способов ее подавления.

#### **Обоснованность и достоверность научных положений и выводов**

Диссертационная работа Алиевой А.А. выполнена на сертифицированном оборудовании с использованием современных методов исследования. В рамках данной диссертационной работы были опубликованы 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 от 20 ноября 2018г. (Бюл. № 32). Научные положения диссертации апробированы на 8 научных конференциях, материалы которых опубликованы в различных сборниках.

Значительное количество зарубежных источников, цитированных в обзоре литературы, свидетельствует о научном кругозоре автора диссертации. При обсуждении полученных результатов соискатель, опираясь на проанализированные литературные источники, дает логическое объяснение результатов исследования. Выводы соответствуют цели и задачам работы. Работа характеризуется высоким методическим уровнем получения и обработки данных, а также анализа полученных результатов, что подтверждает обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций.

### **Научная новизна**

Автором впервые дана характеристика адгезивно-инвазивного потенциала планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и его роли в формировании патологического процесса. Установлено, что на ранних стадиях *C. diphtheriae*, обладая высокой адгезивной и инвазивной активностью, прикрепляется к эпителиальным клеткам, проникает в них, а затем, на более поздних, при сохранении выраженной способности к адгезии и постепенном снижении инвазивности, выходит из клеток и формирует биопленку.

Автором впервые установлено, что высокий адгезивно-инвазивный потенциал не продуцирующих токсины штаммов коринебактерий способствует развитию острого воспалительного процесса в респираторном тракте (патент на изобретение РФ «Способ отбора пациентов в группу риска по развитию фолликулярной ангины» № 2672862 от 20 ноября 2018г.).

Автором впервые установлено, что уровень и характер цитопатического действия планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на культуре клеток CHO-K1 различен: у планктонных культур цитопатическое действие более выражено и проявляется истончением и удлинением клеток, у биопленочных – менее выражено и характеризуется округлением клеток.

Автором впервые установлено, что под воздействием факторов врожденного и адаптивного иммунитета у больных с манифестированными формами

дифтерии адгезивная активность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* понижается, тогда как у бактерионосителей, напротив, повышается (в 1,5-2 раза), что предрасполагает к формированию биопленки и уменьшению выделения токсина за ее пределы.

Автором впервые установлен подавляющий (в десятки и сотни раз) дозозависимый эффект азоксимера бромида на адгезивные и инвазивные свойства планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

### **Практическая значимость исследования**

Полученные сведения о факторах патогенности коринебактерий (адгезивность, инвазивность, цитопатическое действие) используются для характеристики патогенных свойств коринебактерий в лаборатории клинической микробиологии МБУЗ «Городская больница № 20 города Ростова-на-Дону» (Акт внедрения МБУЗ «Городская больница № 20 города Ростова-на-Дону» от 18.06.2020г.) – Межведомственный уровень внедрения.

В бактериологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» используются данные, характеризующие адгезивно-инвазивный потенциал нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* и недифтерийных коринебактерий для установления их этиологической значимости в развитии патологического процесса (Акт внедрения ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» от 15.06.2020 г.) – Межведомственный уровень внедрения.

Установленный факт выраженной антиадгезивной активности азоксимера бромида 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.

## Краткая характеристика основного содержания диссертации

Диссертационная работа Алиевой А.А. представляет собой законченный, логически выстроенный научный труд и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 190 цитируемых работ, из которых 40 – российских и 150 – зарубежных источников. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 19 таблицами, объем диссертации составляет 156 страниц.

В обзоре литературы (глава I) дается всесторонняя характеристика адгезивных и инвазивных свойств *C. diphtheriae*, а также современные подходы к подавлению адгезивной активности микроорганизмов.

Вторая глава диссертации посвящена описанию используемых материалов и методов, содержит сведения о современных бактериологических, физико-химических, молекулярно-биологических, культуральных, микроскопических, а также иммунологических методах исследования.

Третья глава собственных исследований посвящена изучению патогенных свойств планктонных и биоплёночных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae*: адгезивности, инвазивности и цитопатического действия. Кроме того, в данной главе автор рассматривает изучение адгезивных и инвазивных свойств штаммов недифтерийных коринебактерий, а также дает сравнительный анализ интенсивности процессов адгезии и инвазии штаммов недифтерийных коринебактерий выделенных от различных контингентов обследованных.

Четвертая глава собственных исследований посвящена изучению влияния факторов естественного и искусственного происхождения на адгезивные и инвазивные свойства планктонных и биоплёночных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae*, таких как сыворотка крови различных контингентов обследованных (бактерионосителей, больных дифтерией ротоглотки токсической формы, больных дифтерией ротоглотки локализованной формы, привитых и непривитых АКДС и АДС-М препаратами), препараты комплемента, лактоферрина и антитоксина диагностического дифтерийного, а так же азоксимера

бромида. Кроме того, в данной главе приведены результаты электрофоретического исследования в полиакриамидном геле в денатурирующих условиях образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных пациентов и определение сывороточных белков с помощью масс-спектрометрического метода (MALDI-TOF MS).

В разделе Заключение четко отражены все этапы исследования и представлены основные результаты.

Положения, выносимые на защиту, и выводы диссертационной работы соответствуют сформулированной цели и задачам работы, полностью отражают суть проведенных экспериментов, обоснованы достаточным фактическим материалом и являются логическим завершением представленной диссертационной работы. Основное содержание работы отражено в 19 публикациях, в том числе в четырех статьях, опубликованных 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.

Диссертационная работа хорошо оформлена, достаточно иллюстрирована наглядными рисунками и таблицами, изложена понятным литературным языком.

Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертационной работы.

Принципиальных замечаний диссертация не вызывает. В процессе ознакомления с диссертацией возник вопрос:

**Как Вы объясните увеличение способности к адгезии как у планктонных, так и у биопленочных культур всех исследованных штаммов коринебактерий к 8- и 18-му ч культивирования?**

### Заключение

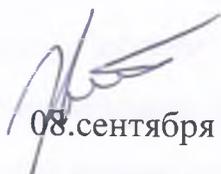
Диссертационная работа Алиевой А.А. на тему «Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль в патологии и способы подавления» является законченной научно-квалифицированной работой, в которой содержится вклад в решение

актуальной научной задачи - определение роли адгезии токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в патологическом процессе при дифтерии и способов ее подавления.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, объему выполненных исследований, достоверности полученных результатов и внедрению результатов исследования диссертационная работа Алиевой Анны Александровны соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335, от 02 августа 2016 года № 748, от 29 мая 2017 года № 650, от 28 августа 2017 года № 1024, от 01 октября 2018 года № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а её автор Алиева Анна Александровна заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук,  
профессор



Червинец Вячеслав Михайлович

08.сентября 2020 г.

Почтовый адрес места работы: 170100, город Тверь, улица Советская, д. 4.

Телефон: +7 (4822) 32-17-79, адрес электронной почты [info@tvigma.ru](mailto:info@tvigma.ru), [chervinets@mail.ru](mailto:chervinets@mail.ru)

Подпись доктора медицинских наук, профессора Червинца Вячеслава Михайловича заверяю:

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

кандидат биологических наук, доцент Шестакова Валерия Геннадьевна

