

**Отзыв**  
**официального оппонента доктора медицинских наук, профессора**  
**Червинца В.М. на диссертацию Фроловой Я.Н., «Биологические свойства**  
**биоплёнок штаммов *Corynebacterium diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*», представленную**  
**на соискание ученой степени кандидата биологических наук по**  
**специальностям 03.02.03 – «микробиология» и 03.01.06 – «биотехнология» (в**  
**том числе бионанотехнологии).**

**Актуальность темы**

Несмотря на то, что заболеваемость дифтерией в настоящее время регистрируется на спорадическом уровне, благодаря проводимой вакцинопрофилактике, данная инфекция продолжает оставаться важнейшей проблемой здравоохранения. Дифтерия по-прежнему встречается, как в Российской Федерации, так и в благополучных европейских странах. Проводимая вакцинация населения противодифтерийными препаратами, не препятствует формированию бактерионосительства, а лишь поддерживает скрытое течение эпидемического процесса.

Применение стандартной терапии не всегда дает желаемые результаты, что обусловлено невозможностью полной элиминации возбудителя и, как следствие, не только формированием лекарственной устойчивости *Corynebacterium diphtheriae*, но и длительной циркуляцией штаммов в организме человека.

Известно, что главную роль в развитии заболевания дифтерией играет дифтерийный токсин, однако первые этапы инфекции обусловлены, прежде всего, поверхностными структурами бактериальной клетки *C. diphtheriae*, которые, вероятно, принимают участие в формировании возбудителем биоплёнки. Биоплёнки микроорганизмов являются одной из причин развития многих хронических заболеваний. Так, дифтерийное бактерионосительство, вероятно, может быть связано со способностью токсигенных штаммов коринебактерий формировать биоплёнки. Благодаря существованию в виде микробных сообществ, бактериальные клетки выживают в присутствии высоких концентраций

антибактериальных препаратов, количество которых превышает их минимальную подавляющую концентрацию в сотни раз. Поскольку отдельные клетки бактерий менее защищены, чем бактерии в составе биоплёнки, антибактериальный препарат, высокоактивный *in vitro* при исследовании в испытаниях *in vivo*, в отношении биоплёнок оказывается не эффективным. Вероятно, поэтому трудности, возникающие при санации бактерионосителей, связаны с процессом биоплёнкообразования у *C. diphtheriae*. Дальнейшее изучение механизмов формирования биопленок коринебактериями открывает перспективы для разработки новых подходов к эффективному лечению и профилактике дифтерийного бактерионосительства и дифтерии.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

Проведенные автором исследования, отраженные в диссертационной работе, содержат принципиально новые данные, характеризующие особенности биологических свойств (культуральных, ферментативных, токсигенных) биоплёночных культур штаммов *Corynebacterium diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*. Исследована антибиотикочувствительность и выявлены антибиотики, к которым сохранена чувствительность штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* в составе биоплёнки *in vitro*.

Интересными являются результаты, полученные при изучении способности возбудителя дифтерии в составе биоплёнки, индуцировать процессы апоптоза и фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей. Показано регуляторное воздействие нейтрофилокинов (НфК) на данные процессы.

Автором впервые проведена электронно-сканирующая микроскопия однородных микробных сообществ *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, позволяющая изучить морфологию бактериальных клеток внутри сформированной биоплёнки. Полученные результаты в определенной мере расшифровывают патогенетические механизмы формирования дифтерийного бактерионосительства и позволяют предложить новый эффективный метод профилактики бактерионосительства и лечения дифтерийной инфекции.

Принимая во внимание, что особую актуальность в современных условиях имеет профилактика бактерионосительства, а так же лечение больных дифтерией, большое значение для теории и практики имеют новые данные, характеризующие способность возбудителя к биоплёнкообразованию и, как следствие, формирование его лекарственной устойчивости.

Новизна проведенных исследований отражена в 14 научных статьях, в рекомендованных ВАК журналах и 1 патенте на изобретение.

Полученные в диссертационной работе оригинальные данные имеют принципиальное значение для оптимизации профилактики бактерионосителей и лечения больных дифтерией в современных условиях.

**Обоснованность и доступность** выносимых на защиту положений определяется, высокой информативностью использованных методик и достаточным объемом проведенных исследований.

Автором в полном объеме изучена динамика биоплёнкообразования штаммами *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, их биологические свойства (культуральные, ферментативные, токсигенные), определены наиболее эффективные, позволяющие добиться наилучших результатов, антибактериальные препараты.

В работе использованы высокоинформативные, современные методы исследования, свидетельствующие о высоком уровне выполненной работы, достоверности полученных результатов и выводов рецензируемой диссертации.

### **Практическая значимость**

Данные проведенных автором исследований имеют большую практическую значимость. Так, интересными являются результаты, полученные при исследовании антибиотикочувствительности биопленочных культур токсигенного штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, позволяющие определить наиболее эффективные, по данным МПК, антибактериальные препараты. Кроме того, теоретическую значимость имеют результаты, полученные при электронно-сканирующей микроскопии, которые позволяют предположить возможные механизмы формирования бактерионосительства.

### **Объем и структура работы, оценка содержания диссертации**

Диссертационная работа Фроловой Я.Н. имеет традиционное изложение материала и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 118 страниц текста, 13 таблиц, 13 рисунков. Список литературы содержит 186 источников, из них - 66 отечественных и 120 зарубежных. Во введении автор наглядно обосновывает актуальность избранной темы, цель и задачи исследования, выносит на обсуждение положения диссертации, формулирует научную новизну и практическую значимость проведенной работы. Обзор литературы полностью характеризует состояние проблемы в настоящее время, описывает спорные и нерешенные вопросы, логично подводит к цели диссертационной работы. Материалы второй главы содержат подробное описание методик проводимых исследований.

Описание результатов собственных исследований занимает значительную часть работы по объему и отвечает на поставленные цели и задачи. Деление глав на разделы облегчает восприятие предлагаемого научного материала и отражает позицию автора по конкретным изучаемым вопросам. Материалы диссертации изложены автором в наглядной демонстрационной форме и полностью документированы. Результаты проведенной работы позволили разработать обоснованные научные положения и сделать достоверные выводы, которые базируются на значительном фактическом материале. В работе использовались современные методы статистической обработки.

Практические рекомендации изложены конкретно и четко, что делает целесообразным их использование в практике.

### **Основные замечания по диссертационной работе**

Принципиальных замечаний по работе нет.

Несмотря на общую положительную оценку работы в целом, целесообразно было бы обсудить значение процесса биопленкообразования коринебактериями для формирования микробиоценоза ротовой полости бактерионосителей.

Ответы на поставленные вопросы могут быть получены в ходе научной дискуссии.

### **Заключение**

Диссертация Фроловой Я.Н. «Биологические свойства биоплёнок штаммов *Corynebacterium diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*» является самостоятельной и законченной научно-исследовательской работой, в которой на основании полученных оригинальных фактов сформулированы и обоснованы положения, совокупность которых можно справедливо квалифицировать как решение важной теоретической и практической проблемы микробиологии и биотехнологии, имеющей существенное прикладное значение. По своей практической значимости, новизне полученных результатов, объему и репрезентативности материала представленная работа Фроловой Я.Н. соответствует критериям, которым должна отвечать диссертация на соискание ученой степени кандидата наук, изложенным в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – микробиология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

### **Официальный оппонент**

Заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (170100 г. Тверь, ул. Советская, 4, тел 8(4822)32-17-79, [info@tvgma.ru](mailto:info@tvgma.ru))

доктор медицинских наук (03.02.03- микробиология),  
профессор

 Червинцев Вячеслав Михайлович

Подпись доктора медицинских наук,  
профессора В.М. Червинца заверяю  
Ученый секретарь Совета,  
Профессор



Д.А.Миллер