

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Фроловой Яны Николаевны
на тему «Биологические свойства биоплёнок штаммов
Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺
по специальности 03.02.03 – «микробиология»,
03.01.06 – «биотехнология» (в том числе бионанотехнологии)
на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Актуальность избранной темы. Несмотря на тот факт, что в последние годы благодаря проводимой вакцинопрофилактике отмечается низкий уровень заболеваемости дифтерией, циркуляция возбудителя дифтерии не прекращается, особенно в закрытых коллективах. Отечественными учёными (Костюкова Н. Н., Маркина С. С. и др.), равно как и зарубежными (Neal, Efstratiou, Vegue, 2010), доказано, что наличие антитоксических антител, даже защитных уровней, не предотвращает колонизацию микроорганизмами и создание условий для носительства *C. diphtheriae*.

Кроме основного фактора патогенности (токсигенности) представители *C. diphtheriae* обладают целым рядом патогенных свойств. Глубокое изучение геномов штаммов *C. diphtheriae*, ответственных за последнюю эпидемию дифтерии в странах СНГ в 1993-1995 г. г., позволило D'Afonseca в 2012 г. обновить данные о более чем 900 белках, кроме известных 1000, и добавить 370 новых, считавшихся ранее гипотетическими. В то же время, среди дополненных 13-ти островов патогенности (Iwaki, 2010) описан один, отвечающий за горизонтальный перенос генов вирулентности (Cerdeno-Tarraga, 2003). Анализ данных мультилокусного секвенирования штаммов *C. diphtheriae* (Viguetti, 2012) подтвердил предположение о существовании различных клановых комплексов, обеспечивающих целый ряд патогенных свойств микроорганизма. Исследованиями Ton-Than (2006), Ott (2010) и в особенности полногеномными исследованиями Trost (2012), показан высокий уровень вариации генов вирулентности и их экспрессии среди штаммов *C. diphtheriae*. Это подтверждает необходимость углублённого изучения биологических свойств штаммов *C. diphtheriae*, проведённое автором.

Помимо дифтерии её возбудитель может служить причиной целого ряда других заболеваний: эндокардитов, остеомиелитов, артритов (Puliti, 2006; Hirata, 2008). Способность *C. diphtheriae*, в том числе нетоксигенных, проникать в клетки хозяина, вызывать некроз и апоптоз макрофагов, описанная Bertuccini и Hirata в 2004 г., значительно осложняют лечение таких больных и требуют новых подходов к диагно-

стике и тактике терапии.

Вместе с тем в настоящее время опасность для общества представляет бактерионосительство штаммов *C. diphtheriae*, которое теоретически можно было бы объяснить возможностью формирования биоплёнок возбудителем дифтерии. Однако экспериментальных работ на эту тему крайне мало. Лишь в клинических исследованиях Gomes (2009) и Sabbatini (2010) выявлено формирование биоплёнок *C. diphtheriae* на катетерах и стенках клапанов сердца. Учитывая, что с одной стороны, обычно биоплёночная культура более устойчива к антибактериальным препаратам, чем планктонная, а с другой стороны, в последние годы рядом отечественных и некоторыми зарубежными исследователями (Pereira, 2008; Farfour, 2012) отмечается рост доли резистентных штаммов среди *C. diphtheriae*, в том числе обладающих множественной устойчивостью, крайне необходимы экспериментальные исследования, помогающие понять механизм формирования бактерионосительства при дифтерийной инфекции.

Все перечисленные моменты позволяют подчеркнуть важность и своевременность выбранной Яной Николаевной Фроловой темы исследования, как для лабораторной диагностики, так и для открывающейся перспективы в выборе профилактических и лечебных мероприятий.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Положения и выводы диссертационной работы обоснованы полностью раскрытой целью научного исследования и решёнными задачами, поставленными для её достижения. Для правильного выбора цели исследования автором диссертационной работы проанализирован достаточный объём источников литературы (всего 186: 66 отечественных, 120 зарубежных). Все данные, полученные в ходе выполнения задач исследования, подвергнуты глубокому теоретическому анализу с учётом уже имеющихся знаний в сфере научных интересов автора. Положения, выносимы на защиту, и полученные выводы имеют логическое подтверждение в тексте и хорошо иллюстрированы рисунками и таблицами. Каждое положение и вывод имеют достаточную смысловую и фактическую аргументацию и логично связаны между собой единой целью исследования.

Теоретические и практические рекомендации лаконично и чётко прописаны в

соответствующем разделе работы, выполнимы и могут быть использованы специалистами учреждений различного профиля: научного, диагностического и лечебного.

Достоверность и новизна, полученных результатов. Достоверность полученных результатов основана на большом объёме проведённых исследований, выполненных на высоком методическом уровне. Так, в работе использованы культуры музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, полученного из ГИСК им. Л. А. Тарасевича, и циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*, выделенного от больного с диагнозом «локализованная форма дифтерии», предоставленного бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» г. Ростова-на-Дону.

Соискателем использован целый ряд классических и современных методов исследования. Основные биологические свойства (морфологические, культуральные, ферментативные, токсигенные) изучены с помощью бактериологического метода. Детальное изучение структуры биоплёнок музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* проведено с использованием современного электронно-микроскопического метода. Молекулярно-генетические методы позволили диссертанту определить наличие *tox⁺* гена у изучаемых штаммов *C. diphtheriae* и секвенировать их по 16S рРНК с помощью сертифицированных диагностических наборов. Кроме того, в работе проведены современные биотехнологические исследования по моделированию процесса биоплёнкообразования штаммами *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺* согласно стандартной методике Р. L. Watnick, et. al. (2000).

Все полученные автором результаты статистически обработаны с помощью современных компьютерных программ, выбор метода обработки соответствовал объёму и формату проведённых исследований. Положения и выводы основаны на достоверных статистических данных.

Теоретическая и практическая значимость полученных автором результатов.

Теоретическая значимость результатов исследования заключается в следующем:

- Впервые при помощи сканирующей электронной микроскопии изучен механизм формирования биоплёнки токсигенным штаммом *C. diphtheriae in vitro*. Полученные данные расширяют представления о возможных механизмах длительной персистенции токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в организме.

- Впервые изучена способность возбудителя дифтерии в составе биоплёнки индуцировать процессы апоптоза и фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей, также показано регуляторное воздействие нейтрофилокинов на данные процессы.
- Впервые исследованы основные биологические (культуральные, ферментативные, токсигенные) свойства биоплёночных культур *C. diphtheriae gravis tox⁺*, а также антибиотикочувствительность штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* в составе биоплёнки *in vitro*.

Практическая значимость результатов исследования заключается в следующем:

- Разработана методология получения экспериментальной модели биоплёнки *C. diphtheriae gravis tox⁺*.
- Впервые разработан и внедрён в практику способ определения минимальной подавляющей концентрации антибактериального препарата (патент РФ на изобретение № 2491348 от 27.08.2013 г.), позволяющий более точно подобрать необходимый антибиотик, что позволит повысить эффективность санации бактерионосителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.
- Результаты, свидетельствующие о стимулирующем воздействии нейтрофилокинов на макрофаги (повышение их переваривающей активности и устойчивости к апоптогенному эффекту возбудителя дифтерии), могут быть использованы для разработки подходов к коррекции иммунного ответа с помощью цитокинов у бактерионосителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, что будет способствовать восстановлению естественной резистентности организма.

Результаты диссертационной работы Яны Николаевны внедрены в практику работы лаборатории бактериологических методов исследования ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» (имеется акт внедрения); используются при чтении лекций и проведении практических занятий со студентами, интернами, ординаторами, курсантами факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов на кафедре микробиологии и вирусологии № 2 ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России (имеется акт внедрения).

Оценка содержания диссертации, её завершенность. Материалы диссертаци-

онной работы изложены на 118 страницах печатного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, собственных исследований, отраженных в 3-х главах, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка цитируемой литературы из 186-ти источников. Работа иллюстрирована 13-тью таблицами и 13-тью рисунками. Каждый раздел диссертации логично перетекает в следующий. Обращает на себя внимание тщательное оформление диссертации, чёткий, лаконичный научный стиль. Таблицы и рисунки наглядно представляют результаты и их анализ. Все поставленные автором задачи выполнены в полном объёме.

По теме диссертационной работы опубликовано всего 14 научных работ, из них – 6 тезисов и 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России, 1 работа - в зарубежной печати. В публикациях содержится полный объём информации, касающейся темы диссертации. Получен патент РФ на изобретение № 2491348 от 27. 08. 2013 г. «Способ определения минимальной подавляющей концентрации антибактериального препарата».

Соответствие автореферата основному содержанию диссертации. Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». М.: Стандартинформ. – 2012. Диссертация и автореферат Яны Николаевны соответствует всем правилам написания и оформления соответствующих научных работ, установленным в нормативных документах.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации. Неоспоримым дополнительным достоинством диссертации Яны Николаевны является то, что эта работа имеет большое значение не только для биологических, но и медицинских наук. Востребованность в результатах работы, проведённой автором, многократно возрастает в связи со следующим:

- 1) Соискателем показано, что биоплёнкообразование интенсивнее протекает на гидрофильных поверхностях. Поскольку оболочки клеток в организме человека, в том числе слизистых клеток, состоят из белков, имеющих гидрофильные свой-

ства, и фосфолипидов, обращённых гидрофильными участками наружу, то вся поверхность слизистого эпителия гидрофильна, что способствует при наличии необходимого строительного материала формированию биоплёнок. Более того, гидрофильность тканей, как известно, повышена у детей, лиц с заболеваниями почек, сердечно-сосудистой системы, сахарным диабетом, гормональными нарушениями и просто лиц, предпочитающих углеводную диету, т. е. у большинства населения. Поэтому вероятность развития биоплёнок, а возможно, и формирования носительства штаммов *C. diphtheriae* возрастает при наличии циркуляции возбудителя среди населения.

- 2) Формирование биоплёнок в эксперименте с максимумом на 4-5-ые сутки свидетельствует о том, что больной, обращающийся за медицинской помощью, как это часто происходит, именно в данные сроки безуспешного лечения, требует повышенного внимания в плане диагностики как на предмет наличия биоплёночной культуры *C. diphtheriae*, так и определения чувствительности к антибиотикам, которая может быть снижена из-за возможного формирования биоплёнок на слизистом слое эпителия, особенно в лакунах миндалин и пазухах носа.

Недостатки в содержании и оформлении диссертации не выявлены.

Вопросы для дискуссии:

1. Чем Вы объясните более высокую интенсивность образования матрикса у музейного штамма, чем у циркулирующего?
2. Как Вы предлагаете на практике определять чувствительность выделенного биоплёночного штамма к антибиотикам?

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным «Положение о присуждении учёных степеней» по пунктам:

10) Диссертация написана автором самостоятельно, обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты. Личный вклад автора в работу составляет более 80%.

11) Основные научные результаты диссертации опубликованы в 3-х рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, в одном зарубежном издании, имеется 1 патент на изобретение РФ.

14) При использовании методик или полученных ранее отдельных результа-

тов автор диссертации ссылается на автора и источник заимствования материалов.

З а к л ю ч е н и е:

Диссертация Фроловой Яны Николаевны на тему: «Биологические свойства биоплёнок штаммов *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺*», выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Харсеевой Г. Г. и доктора медицинских наук, профессора Миронова А. Ю., представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 — «микробиология» и 03.01.06 — «биотехнология» (в том числе бионанотехнологии), является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи — моделирования процесса биоплёнкообразования и изучение основных биологических свойств *C. diphtheriae gravis tox⁺* в составе биоплёнки, имеющей существенное значение для соответствующей отрасли знаний, а именно: показан механизм формирования биоплёнки токсигенным штаммом *C. diphtheriae in vitro*, изменение чувствительности возбудителя к антибиотикам в составе биоплёнки и способность индуцировать процессы апоптоза и фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей, а также регуляторное воздействие нейтрофилокинов на данные процессы, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24. 09. 2013 года, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 — «микробиология», 03.01.06 — «биотехнология» (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент,
Краева Людмила Александровна,
доктор медицинских наук, 03.02.03 — «микробиология»,
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14,
тел. 7 (812) 498 09 39, 7 (904) 610 21 54,
lykraeva@yandex.ru

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии
имени Пастера, ведущий научный сотрудник
04.08.2015.

Подпись Л.А.Краевой удостоверяю
заместитель директора института
член-корреспондент РАН, профессор



Lydia Kraeva

Л. А. Краева

A.A. Totolyan

А.А.Тотолян