

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук по специальности 14.01.09 – инфекционные болезни, 14.02.02 – эпидемиология, руководитель лаборатории профилактики и диагностики инфекционных заболеваний, главный научный сотрудник ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Сельковой Евгении Петровны на диссертационную работу Лапенковой Марины Борисовны на тему: «Новые перспективы применения микобактериофагов для диагностики и лечения туберкулёзной инфекции», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Актуальность диссертационной работы

В последние годы в связи с распространением лекарственной устойчивости бактериальных возбудителей, вопрос о применении бактериофагов в терапии туберкулезного заболевания является одним из глобально обсуждаемых.

Ликвидация туберкулеза как распространенного заболевания к 2035 г. является одной из ключевых задач Всемирной организации здравоохранения. И этот план борьбы с туберкулезом как одной из главных проблем общественного здоровья активнейшим образом поддерживается в Российской Федерации.

Однако, несмотря на тенденцию снижения заболеваемости туберкулезом, распространение множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) микобактерий туберкулеза среди впервые выявленных и ранее лечившихся пациентов возрастает и эта проблема представляет собой одну из наиболее опасных в борьбе с туберкулезом в глобальном масштабе. В Российской Федерации уровень МЛУ среди впервые заболевших составляет 27%, а среди ранее лечившихся – более 50%.

В то же время, проблема применения, в частности, литических микобактериофагов, для лечения туберкулеза, несмотря на большую актуальность практически не изучена.

В научной литературе особое внимание уделяется способам лекарственного транспорта, т.е. доставки микобактериофагов в зоны туберкулезного воспаления. Однако, конкретных эффективных решений до сих пор не было предложено.

В связи с этим, тема диссертации М.Б. Лапенковой «Новые перспективы применения микобактериофагов для диагностики и лечения туберкулёзной инфекции» и предложенные перспективы решения задачи применения литических микобактериофагов для лечения туберкулеза являются чрезвычайно актуальными.

С другой стороны, в представленной диссертационной работе освещаются и новые подходы к повышению эффективности ускоренного фенотипического определения лекарственной чувствительности/устойчивости клинических штаммов микобактерий туберкулеза на основе применения микобактериофагов, что также является актуальной проблемой. При этом известные молекулярно-генетические методы определения лекарственной устойчивости с определением специфических ДНК мутаций, далеко не для всех специфических препаратов являются достаточно эффективными.

В связи с изложенным, актуальность диссертационной работы М.Б. Лапенковой не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций сформулированных в диссертации

Основные положения, выносимые на защиту, выводы и характеристики полученных результатов обоснованы представленными данными исследований, проведенных автором диссертационной работы.

Достоверность исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность полученных автором результатов исследований не вызывает сомнений, в том числе, потому что проведены на достаточном числе наблюдений, статистически проанализированы и достоверны.

Научная новизна исследований

Диссертационная работа Лапенковой М.Б. является целостным, самостоятельным научным исследованием, отличающимся своей новизной.

Впервые автором получены липосомы размером 0,4 мк с включенным литическим микобактериофагом D29.

В представленном научном исследовании автором разработана модель и оригинальный метод получения культуры перевиваемых макрофагов RAW 264. 7 из американской коллекции клеточных культур (АТСС), содержащих фагоцитированные МБТ. При использовании этой модели с помощью оригинальной тест-системы ПЦР для количественного анализа ДНК микобактериофага соискатель впервые показала, что липосомный микобактериофаг с большей примерно в 7 раз эффективностью проникает в клетки инфицированных макрофагов, по сравнению с не включенным в липосомы

микобактериофагом, т.е. свободным бактериальным вирусом. Соответственно, ингибирующая микобактерии литическая активность, которая была определена при микробиологических посевах на агаровую питательную среду, липосомного микобактериофага оказалась достоверно выше по сравнению с внелипосомным микобактериофагом.

Впервые в исследовании изучена антимикобактериальная активность микобактериофагов на модели туберкулезной гранулемы *in vitro*, формируемой мононуклеарными клетками крови человека в присутствии МБТ. Полученные результаты на модели, которая в большей степени соответствует туберкулезной инфекции *in vivo*, также подтвердили преимущественную эффективность липосомального микобактериофага. Результаты этих исследований отражены в полученном автором патенте на изобретение «Препарат на основе литического микобактериофага и способ его получения» № 2691439 от 16.08.2018 г.

Значительная часть диссертационной работы М.Б. Лапенковой посвящена разработке модифицированного ускоренного фенотипического метода определения лекарственной чувствительности клинических изолятов МБТ в отношении фактически любых противотуберкулезных лекарств. Метод базируется на использовании клинических изолятов МБТ, получаемых после первого роста в системе Bactec, Becton Dickinson. Разработанная технология по эффективности и точности не уступает признанному и довольно широко распространенному методу – импортной системе Bactec MGIT. Однако, по заключению авторов новой методики, она является существенно более экономичной и ускоренной до 5 дней по сравнению с системой Bactec MGIT. Заслуживает особого внимания, что эта технология позволяет создать новый отечественный набор реагентов, себестоимость которого, в пересчете на один тест определения лекарственной чувствительности к одному препарату, может быть не менее, чем в 4-5 раз ниже существующей в настоящее время стоимости.

В рамках этой научно-исследовательской работы показан новый формат микробиологического культивирования в присутствии антибиотика – 24 луночный планшет, а также использована оригинальная тест-система количественного ДНК литического микобактериофага на основе ПЦР в реальном времени с одновременным количественным определением ДНК МБТ.

И, наконец, небольшая часть исследований, посвященная использованию литического микобактериофага для определения метаболизма микобактерий, культивируемых в жидкой питательной среде также отличается новизной. При этом также определяется

количественный прирост ДНК микобактериофага при сохранении метаболизма возбудителя.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Полученные автором результаты исследования, очевидно, могут быть использованы для разработки принципиально нового биотерапевтического противотуберкулезного препарата, который может быть создан на основе литического микобактериофага.

На основе результатов научного исследования, проведенных автором по применению микобактериофагов для определения чувствительности МБТ в клинических изолятах к различным противотуберкулезным лекарственным агентам, может быть создан новый эффективный и экономичный отечественный набор реагентов для ускоренного определения лекарственной чувствительности/устойчивости.

Показанная соискателем М.Б.Лапенковой возможность применения литического микобактериофага для оценки метаболизма микобактерий туберкулезного комплекса может являться новым инструментом при исследованиях дормантности микобактерий, возникающей при химиотерапии туберкулезного заболевания.

Кроме того, этот метод может быть использован в научных исследованиях при поиске различных препаратов, предотвращающих реактивацию микобактерий и, соответственно, развитию туберкулезного процесса.

Оценка содержания диссертации и ее завершенность

Диссертационная работа Лапенковой М.Б. написана в традиционном стиле. Изложена на 108 страницах машинописного текста. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, главы результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 109 источников литературы (7 отечественных источников и 102 зарубежные публикации). Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 20 рисунками.

Во введении аргументирована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, практическая значимость результатов.

Первая глава посвящена литературному обзору данных по теме диссертационного исследования. Подробно описана фаготерапия туберкулёза, применение микобактериофагов для фенотипического определения лекарственной чувствительности МБТ в клинических изолятах. Описано использование липосом и препаратов литических микобактериофагов для лечения туберкулёза. Проведена оценка реактивации дормантных МБТ при использовании микобактериофагов.

Во второй главе (материалы и методы) автором дана подробная характеристика культур клеток, а также описание использованных методов на всех этапах работы.

В третьей главе (результаты и обсуждения), в соответствующих подглавах, изложены результаты, полученные в ходе разработки набора для одновременного количественного анализа микобактериофага D29 и МБТ методом ПЦР-РВ. Описаны результаты получения липосом с включенным микобактериофагом. Исследование липосомального препарата микобактериофага проводилось на двух моделях: культуры перевиваемых макрофагов RAW 264. 7 и туберкулезной гранулемы *in vitro*, формируемой мононуклеарными клетками крови человека в присутствии МБТ.

Соискателем в одной из подглав представлены результаты ускоренного фенотипического определения чувствительности МБТ к 4-м препаратам первого и второго ряда.

Кроме того, небольшая часть исследований посвящена реактивации dormantных клеток МБТ.

Результаты научного исследования иллюстрированы графиками и таблицами с отображением статистической обработки, что позволяет оценить достоверность и полноту полученных автором данных.

Заключение и выводы диссертационной работы соответствуют поставленным задачам, их достоверность и обоснованность не вызывает сомнений. В автореферате, объём и форма которого соответствует требованиям ВАК РФ, полно представлены основные положения диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет.

Однако в ходе рецензирования возник следующий вопрос:

1. Как быстро по времени могут быть применимы разработанные и предложенные автором технологии диагностики и терапии туберкулезной инфекции в практическом здравоохранении.

Заклучение

Диссертационная работа Лапенковой Марины Борисовны «Новые перспективы применения микобактериофагов для диагностики и лечения туберкулёзной инфекции», предоставленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является завершённой научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальных задач по применению микобактериофагов для диагностики и лечения туберкулёзной инфекции.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, методическому уровню и достоверности полученных результатов диссертационная работа

полностью соответствует критериям, которые должны отвечать диссертации на соискание ученых степеней, п.9 «Положения о порядке присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. №842 (с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства РФ от 21.04.2016г. №335, от 01.10.2018 №1168 «о внесении изменений в Положение о присуждении степеней»), а ее автор Лапенкова Марина Борисовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник, зав. лабораторией диагностики и профилактики инфекционных заболеваний Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, доктор медицинских наук

Селькова Евгения Петровна

Почтовый адрес места работы:

125215, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

Тел.: 8(495) 380-20-19;

e-mail: selkova.e@mail.ru

Подпись доктора медицинских наук,
Сельковой Евгении Петровны заверяю:

Ученый секретарь Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
кандидат медицинских наук



Сафронова Алла Васильевна