

ОТЗЫВ

официального оппонента, д.б.н., профессора Романовой Юлии Михайловны о диссертационной работе Лапенковой Марины Борисовны **«Новые перспективы применения микобактериофагов для диагностики и лечения туберкулезной инфекции»**, представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

Конец 20 и начало 21 века ознаменовались ростом заболеваемости туберкулезом во всем мире, включая и высокоразвитые страны: каждый год регистрируют 8 млн. новых случаев этого тяжелого заболевания, около 3-х млн. человек каждый год умирает от туберкулеза. Изменился и характер течения болезни: с каждым годом наблюдается рост случаев первичного туберкулеза, вызванного штаммами, устойчивыми к нескольким антибактериальным препаратам. Лечение таких больных невозможно по обычным схемам антибиотикотерапии, инфекционный процесс протекает тяжело и скоротечно. Рутинная диагностика и типирование микобактерий туберкулеза микробиологическими методами занимает от 3 недель до 3-х месяцев, что негативно сказывается на эффективности терапии. Несмотря на то, что исследования, связанные с изучением туберкулеза, будь то изучение инфекционного процесса, разработка вакцинных препаратов, или разработка молекулярно-генетических методов экспресс диагностики туберкулеза, определения лекарственной устойчивости и типирования штаммов микобактерий туберкулеза интенсивно развиваются и финансируются, они не теряют своей актуальности и по сей день.

В этой связи и представленная диссертационная работа Лапенковой М.Б. по разработке лабораторных методов и экспериментальных препаратов для повышения эффективности диагностики и лечения туберкулезной инфекции на основе применения микобактериофагов такой социально значимой инфекции как туберкулез, является вполне актуальной.

Фаговую терапию стали применять еще до открытия антибиотиков при лечении заражения крови, инфекций мочеполовых трактов, хирургических и кожных инфекций, перитонитов, колитов, отоларингологических инфекций. Хотя первые (и часто небезуспешные) попытки применить бактериофаги для

борьбы с инфекциями были сделаны еще в 1919 г., практически сразу же после открытия этих вирусов, фаговая терапия строилась на чисто эмпирической основе и без должного понимания биологии фаговой инфекции и специфики взаимодействия популяций бактерий и бактериофагов. Во многом по этой причине результаты плохо воспроизводились и в 1930-40-е гг. большинство западных ученых отказались от этой идеи. И поскольку это совпало с открытием пенициллина, а позднее многих других антибиотиков, энтузиазм в отношении фаготерапии быстро угас. Работы по выделению и использованию фагов в лечении ряда заболеваний продолжали проводиться лишь в СССР, Грузии, Польше. Между тем эффективность исследований по биологии бактериофагов постепенно возрастала. С развитием молекулярно-биологических технологий многие бактериофаги были всесторонне изучены и послужили модельными биологическими системами, способствовавшими успешному развитию молекулярной биологии и генетики. К возврату интереса по практическому использованию бактериофагов в медицине и других хозяйственных отраслях привел назревающий кризис, вызванный в последние два десятилетия повсеместным распространением резистентных к антибиотикам патогенных бактерий. Широкое применение антибиотиков в терапии бактериальных инфекций привело к резкому снижению эффективности антибиотикотерапии. Многие изоляты патогенных бактерий, выделенные от больных и в госпиталях, отличаются множественной лекарственной устойчивостью, и достаточно быстро приобретают устойчивость к новым антибиотикам с широким спектром действия. Распространению вновь появившейся резистентности у бактерий способствуют различные способы горизонтального переноса генов, включая участие мобильных генетических элементов и способности возбудителей существовать в организме в виде биопленок. Появившаяся в последние два десятилетия проблема борьбы с множественно резистентными к антибиотикам патогенными бактериями обусловила необходимость поиска и разработки новых методов лечения

инфекций, вызываемых такими бактериями. В настоящее время подобного рода исследования в разных направлениях проводятся во многих лабораториях мира. Наряду с поиском новых подходов в эти же годы началось возрождение интереса к фаговой терапии, которая получила новые возможности, благодаря применению и разработке новых молекулярно-биологических технологий. Вышесказанное еще раз свидетельствует об актуальности диссертационной работы Лапенковой М.Б.

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов исследования», «Результатов и обсуждения», «Заключения» «Выводов» и «Списка цитируемой литературы».

Во «Введении» достаточно полно определена проблематика исследований и четко сформулированы цель и задачи диссертационной работы.

В обзоре литературы достаточно подробно представлены современные данные о микобактериофагах и современных возможностях применения бактериофагов для диагностики и лечения инфекционных заболеваний. И хотя литература в последние годы наполнена обзорами, посвященными фаготерапии, автор нашла нишу, в которой она сосредоточилась на фагах и тех возможностях, которые открываются именно при использовании микобактериофагов. Обзор написан хорошо, вполне информативно, легко читается и подготавливает к восприятию данных, полученных автором диссертации. Список цитируемой литературы включает 109 ссылок, большая часть которых представлена работами последних лет – с 2012 по 2019 год. Очень приятно, что ссылки представлены в алфавитном порядке и цитируются в обзоре с указанием фамилий авторов, а не цифрами, как это делается часто в диссертациях. Это добавляет уважения к авторам работ, облегчает чтение обзора и знакомство с цитируемыми работами.

В разделе «Материалы и методы» содержится подробное описание всех использованных в работе штаммов микобактерий и используемого бактериофага и основные методы, примененные автором – микробиологические методы определения биологической активности используемого бактериофага, получение его липосомальной формы, электронно-микроскопические методы визуализации бактериофага и полученной липосомальной формы и молекулярно-биологические методы при разработке мультиплексной системы ПЦР, позволяющей в одной реакции определять наличие микобактериальной и фаговой ДНК. И наконец, автор применяет методы контроля взаимодействия культур микобактерий и фагов в перевиваемых клетках линии мышинных макрофагов и модели туберкулезной гранулемы. Более того, автор проверяет действие изучаемых бактериофагов не только на активно растущих бактериях, но и на некультивируемых или дормантных клетках микобактерий, которые играют важную роль при развитии туберкулезной инфекции. Описание методов исследования занимает 10 страниц текста диссертации, что свидетельствует о тщательности автора и позволяет желающим легко воспроизвести описанные методики.

Экспериментальные исследования автора можно разделить на две части. Объектом исследований автора служит референсный штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, штамм *Mycobacterium smegmatis* mc155 и микобактериофаг D29. Микобактериофаг D29 был выбран автором потому, что он один из 6 описанных видов микобактериофагов обладает только литическим циклом развития, что и делает его пригодным для фаготерапии. При этом автор совершенно справедливо и подробно описывает в обзоре литературы работы других авторов, которые проводились с данным фагом при попытках применения его в терапевтических целях успешно или не очень успешно, ни в коем случае не подчеркивая своего первенства в подобных исследованиях. Тем не менее диссертационная работа посвящена получению модифицированной - липосомной - формы фага и последовательному экспериментальному подтверждению эффективности его действия как в

целях диагностики – выявлению клеток с лекарственной устойчивостью так в перспективе и для лечения и выявления дормантных форм. Для проведения такого комплексного исследования автором была создана методическая база выявления ДНК микобактерий и бактериофагов в двух формах – исходной и липосомной. Этой базой является разработанная мультиплексная система ПЦР в реальном времени, позволяющая одновременно количественно оценивать наличие и взаимодействие микобактерий и фага в экспериментальной системе. В создание такой методической базы входило 1) на основании геномных данных выбрать специфические последовательности для выявления ДНК микобактерий, фага и внутреннего контроля, получить липосомную форму фага, в виде которой фаг мог адресно доставляться к месту локализации возбудителя. Интерес к липосомным формам различных антибактериальных средств в коллективе, в котором выполнена данная работа не случаен, так как еще в 1982 году М.А. Владимирским была опубликована работа, где были представлены результаты сравнительного терапевтического эффекта липосомального стрептомицина при генерализованном экспериментальном туберкулезе у мышей. И вот теперь на новом витке интереса к фаготерапии в данной работе проведен сравнительный анализ диагностической и терапевтической возможности использования липосомальной формы бактериофага D29. Диагностическая возможность – это экспресс-выявление антибиотикорезистентных микобактерий и терапевтическая возможность – это ингибирование роста микобактерий как в активной форме, так и в дормантной или латентной. Во-первых, было показано, что изучаемый бактериофаг может лизировать клинические изоляты вне зависимости от их устойчивости к известным противотуберкулезным препаратам, что было проверено на 15 клинических изолятах с множественной устойчивостью. Для получения более эффективной липосомальной формы бактериофага автором была модифицирована методика получения и очистки липосомального препарата, что подтверждено получением патента на изобретение в 2018 году.

При сравнительном изучении антимикобактериального эффекта препаратов исходного и липосомального бактериофага в условиях клеточных моделей *in vitro* с внутриклеточным инфицированием микобактериями было показано, что уровень внутриклеточного проникновения липосомального бактериофага в 10-14 раз выше, чем проникновение свободного бактериофага. Аналогичные результаты были получены на модели туберкулезной гранулемы *in vitro*. Количество бактерий в контрольной группе в 2 раза превышало количество бактерий выращенных с свободным фагом и в 10 раз – выращенных с липосомальным фагом. Полученные данные статистически достоверны. Таким образом, впервые показана высокая антимикобактериальная эффективность липосомного препарата бактериофага, что в перспективе имеет большое практическое значение.

Другая часть работы посвящена не менее важной проблеме – использованию бактериофагов для ускоренного фенотипического определения спектра лекарственной резистентности микобактерий в клинических изолятах. Основной принцип такого определения состоит в том, что литические бактериофаги размножаются в микобактериях только при сохранении ими активного метаболизма. При чувствительности клеток к антибактериальным препаратам, метаболизм ингибируется, а при резистентности остается активным. Соответственно, бактериофаги не размножаются на чувствительных бактериях и размножаются на резистентных. Контроль за количеством ДНК бактерий и фагов в экспериментальной модели осуществлялся автором с помощью разработанной им же мультиплексной системы ПЦР в реальном времени. Применение подобной методики ускоряет процесс определения антибиотикорезистентности с 3-х недель до 5 дней. Практическое внедрение такой методики также имеет большую перспективу, тем более что разработанный набор реагентов в 3 раза более экономичный по сравнению с международной системой Bactec MGIT.

Тот же принцип работы разработанной системы контроля за активно растущими микобактериями автор использовала и для выявления dormantных или спящих, то есть метаболически неактивных форм микобактерий. Автор работы в экспериментальных условиях получала dormantные формы микобактерий и использовала для их рекультивации известный, хорошо изученный ранее реактивирующий белок Rpf. Поскольку размножение микобактериофага происходит только при восстановлении метаболизма, то и нарастание количества ДНК фага происходит только, если в образце были dormantные клетки, которые переходят в активное состояние под действием белка Rpf. Такой анализ позволяет выявлять возбудителя туберкулеза при латентных формах инфекции, количество которых составляет по данным ВОЗ 25% от общего населения.

Таким образом, можно сказать, что автором разработан метод определения жизнеспособности популяции, который может отражать уровень устойчивости к антибиотикам, что имеет большое значение как для диагностики туберкулеза, так и для контроля за динамикой лечения.

Надо отдать должное автору, проделавшей сложную и достаточно кропотливую работу, которая в результате сводится к 14 таблицам и 20 рисункам, но специалисту понятно, сколько нужно труда и терпения, чтобы эти таблицы заполнить. Но зато и основные замечания оппонента приходятся как раз на оформление результатов, полученных автором. В некоторых таблицах отсутствуют примечания для определения представленных данных в графах, на рисунках отсутствуют подрисуночные подписи, позволяющие разобраться в представленных кривых. На рис. 19, и так насыщенном представленными кривыми, словом «культура» обозначены кривые для количества ДНК бактерий и для количества ДНК бактериофага. Указанные недостатки не снижают достоверности полученных результатов и практической значимости работы, а лишь могут послужить автору уроком в оформлении результатов, полученных в дальнейшей работе.

Таким образом, можно считать, что представленная автором диссертация является квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи, выполненной с использованием современных методов исследования. Результаты, полученные автором, имеют теоретическое и в перспективе практическое значение. Работа хорошо написана, достаточно полно иллюстрирована, результаты сопровождаются обсуждением. В целом, представленная Лапенковой М.Б. диссертационная работа вполне соответствует требованиям 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»).

Выводы, сделанные автором конкретны и соответствуют полученным данным. Содержание диссертации полностью отражено в 5 публикациях, автореферате и подтверждены патентом. Автор работы, Лапенкова Марина Борисовна заслуживает присвоения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности «микробиология».

Ведущий научный сотрудник
ФБГУ «Национальный Исследовательский Центр
Эпидемиологии и Микробиологии
им. Н.Ф.Гамалеи Минздрава РФ,
доктор биологических наук, профессор,
специальность 03.02.03.»микробиология»


/ Романова Ю.М./

Подпись Романовой Ю.М. заверяю
Зам. Директора Центра,
доктор биологических наук, профессор





/Пронин А.В./