

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Коломиеца Владислава Михайловича, профессора кафедры клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО

«Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ о научно-практической ценности диссертации Захарова Андрея Владимировича «Эффективность лечения туберкулеза легких с устойчивостью возбудителя к изониазиду и экспериментальное обоснование эффективности применения наночастиц серебра», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности:

14.01.16 – фтизиатрия; 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Актуальность исследования

В результате реализации национальных программ по борьбе с туберкулезом в большинстве стран отмечается стабилизация эпидемической ситуации, однако уровень пораженности остается высоким и необходима интенсификация всего комплекса противоэпидемических мероприятий. В стратегии ликвидации туберкулеза, утвержденной резолюцией Всемирной ассамблеи здравоохранения в 2014 г. и поддержанной Всемирной организацией здравоохранения по программе Целей устойчивого развития на 2016-2030 гг., одним из основных таких мероприятий является повышение эффективности лечения туберкулеза. Диссертационное исследование Захарова А.В. как раз и посвящено одной из главных проблем современной фтизиатрии – повышению эффективности лечения туберкулёза, приоритетно с лекарственной устойчивостью возбудителя. Разработка и внедрение новых антибактериальных препаратов с включением их в новые режимы лечения представляется крайне актуальным, интересным и многообещающим для науки и практики.

В клиническом разделе диссертации представлен всесторонний анализ распространения и патогенеза туберкулёза, вызванного возбудителем с устойчивостью к изониазиду при сохранённой чувствительности к рифампи-

цину. Выбор спектра устойчивости, ассоциированной с изониазидом, не случаен. С одной стороны – это малоизученный раздел, с другой – изониазид был выбран модельным препаратом для дальнейших экспериментальных исследований по изучению наночастиц и их совместному применению с химиопрепаратами. В литературе возможности использования подобных препаратов для лечения лекарственно-устойчивого туберкулёза с подобным спектром устойчивости возбудителя (ЛУ МБТ) освещены явно недостаточно. С целью повышения эффективности лечения туберкулеза в диссертации предлагается использовать наночастицы серебра. Научному обоснованию эффективности и безопасности их применения в лечении туберкулеза с лекарственной устойчивостью МБТ к изониазиду при сохраненной чувствительности к рифампицину посвящен экспериментальный раздел исследования. Следует отметить, что экспериментальные исследования проводились на бактериологическом материале, полученном от больных, представленных в клиническом разделе. Это в известной степени дает основание прогнозировать повышение эффективности лечения при использовании наночастиц в клинической практике. Подобный алгоритм исследований, избранный А.В.Захаровым для своей диссертационной работы, позволяет аргументировать выводы и в целом актуальность и значимость диссертационного исследования.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертация А.В.Захарова представляет собой результат открытого и интервенционно-диагностического исследования, которое является вполне репрезентативным. Обоснованность и объективность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, определяется комплексным использованием всех современных методов диагностики и лечения, четким определением цели и задач исследования, методически грамотно решаемых для достижения цели. Целью исследования, как отмечалось выше, явилось повышение эффективности лечения туберкулёза с лекарственной устойчивостью возбудителя к изониазиду (НЛУ МБТ) при сохра-

ненной чувствительности к рифампицину путем использования наночастиц серебра, эффективность и безопасность применения которых научно обоснована и доказана в эксперименте. Для достижения цели автор сформулировал 7 взаимосвязанных задач. Первые 3 задачи касаются клинического раздела исследования и 4 – ориентируют на комплексное изучение наночастиц серебра при их использовании как противотуберкулёзного средства.

Для сравнительной оценки клинико-рентгенологических особенностей и эффективности лечения туберкулёза при устойчивости возбудителя к изониазиду и сохранённой чувствительности к рифампицину проведено ретроспективное изучение 650 историй болезни, в том числе 435 бактериовыделителей с различными спектрами устойчивости МБТ и 215 – с сохраненной чувствительностью возбудителя. Подробно изучены спектры ЛУ МБТ у впервые выявленных больных (новые случаи химиотерапии), при повторном лечении и рецидивах заболевания. В зависимости от характера ЛУ МБТ проведена клинико-рентгенологическая оценка течения заболевания, определены возможности консервативной терапии в указанных группах, изучена эффективность лечения и возможный потенциал ее повышения в разных группах. В экспериментальном разделе на материале более 1,5 тыс. бактериологических посевов проведена оценка ингибирующей активности наночастиц. Дополнительно в иммунологической лаборатории ФГБНУ «ЦНИИТ» исследовалась подавляющая активность и характер взаимодействия наночастиц в обратных мицеллах, синтезированных в институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина с изониазидом и рифампицином. Проводилась комплексная оценка токсикологических свойств наночастиц, в том числе, в условиях хронического эксперимента с изониазидом. Изучение наночастиц серебра как противотуберкулёзного агента проводилось в эксперименте *in vivo* на модели туберкулёза у имбредных мышей. В диссертационной работе использованы современные лабораторные, бактериологические и гистологические методы исследования. Следует подчеркнуть, что был использован принципиально новый для исследования во фтизиатрии метод атомно-силовой микро-

скопии, позволяющий отслеживать характер повреждающего действия на МБТ наночастиц серебра. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программ Microsoft Excel и «Биостатика».

Таким образом, достаточный объем, современные методы исследования и их оптимальная методология обеспечивают обоснование научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Достоверность и новизна

Научная новизна диссертационного исследования подтверждена патентом на изобретение. Идея использовать для повышения эффективности химиотерапии наночастицы серебра является новаторской и диссертантом впервые научно обосновано ингибирующее действие наночастиц на возбудителя. Автором диссертации был впервые выяснен синергический характер взаимодействия на МБТ наночастиц серебра с препаратами изониазидом и рифампицином. Впервые использована атомно-силовая микроскопия для установления характера повреждений МБТ под влиянием наночастиц.

Принципиально важное значение имеет доказанная в эксперименте эффективность применение наночастиц серебра в сочетании с изониазидом в лечении лекарственно-устойчивого туберкулеза, которая была достигнута в 90% случаев против 40% при лечении только изониазидом. К тому же при предлагаемой сочетанной терапии наночастиц+изониазид изменяется характер воспаления, что имеет важное значение для формирования посттуберкулезных изменений и риска рецидива процесса

Результаты диссертационной работы имеют высокую степень достоверности, поскольку базируются на большом объеме клинических и экспериментальных исследований. Для обработки большого объема материала использованы адекватные и соответствующие выбранной цели и задачам исследования методы статистического анализа, что позволило получить достоверные результаты и сделать логичные и в достаточной мере обоснованные выводы и практические рекомендации. Научная работа хорошо иллюстрирована 136 таблицами и 61 рисунком, в том числе цветными фотографиями, что

существенно дополняет достоверность полученных результатов. Следует так же указать, что отдельные таблицы мало информативны и только затрудняют доказательность полученных результатов. По материалам диссертационного исследования опубликовано 42 научных работы, в том числе 14 публикаций в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ. Имеется монография в соавторстве по теме работы, патент на изобретение.

Значимость результатов для развития соответствующей отрасли науки

Значимость диссертации определяется полученными автором экспериментальными данными, доказывающими:

- подавляющую активность наночастиц серебра в отношении лекарственно-чувствительных и лекарственно-устойчивых штаммов возбудителя туберкулёза;
- выраженный синергизм взаимодействия наночастиц серебра с основными препаратами I ряда – изониазидом и рифампицином;
- отсутствие выраженных токсических эффектов при совместном использовании с изониазидом в режимах длительного применения;
- химиотерапевтическую эффективность при использовании наночастиц серебра в лечении экспериментального туберкулёза, индуцированного лекарственно-устойчивыми штаммами возбудителя.

Указанные положения обосновывают наночастицы серебра как новый противотуберкулёзный препарат, имеющий безопасный профиль применения. Полученные в опыте химиотерапии экспериментального туберкулёза эффективные лечебные дозы при безопасном применении позволяют, экстраполируя их на человека, рассчитать эффективную лечебную дозу для клинического применения.

Оценка содержания и оформления работы

Диссертация Захарова А.В. представляет собой завершённое исследование, в котором решены все поставленные автором задачи. Работа изложена на 255 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану и состоит из введения, цели и задач, обзора литературы, материалов и мето-

дов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Материал изложен четко, подробно, хорошим литературным языком.

Во введении содержатся все требуемые по ГОСТу разделы, автор обосновал актуальность исследования, степень ее разработанности, четко сформулировал цели и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, представил методологию и основные положения диссертации, выносимые на защиту, данные по апробации и внедрениям.

В главе 1 «Обзор литературы» представлен обзор отечественных и зарубежных публикаций, касающихся проблем лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза. Несмотря на длительный срок применения изониазида в практике фтизиатрии, он не потерял своего значения и продолжает сохранять актуальность в режимах лечения и профилактического применения, в том числе у больных с ВИЧ инфекцией. Выводы о значимости проблемы лекарственной устойчивости как о имеющей общебиологические закономерности, позволяет диссертанту утверждать, что создание новых антибактериальных препаратов имеет в большинстве случаев временный успех. Необходим поиск агентов, повреждающих бактериальную клетку иными путями, воздействующих непосредственно на клеточные структуры возбудителя посредством физико-химических механизмов (подобно УФО, или другим аналогичным факторам), но при этом имеющих допустимые токсикологические параметры. Наночастицы с выраженными антибактериальными характеристиками могут найти здесь свое применение. Убедительно показано, что исследования по применению наночастиц серебра во фтизиатрии длительное время отсутствовали и на период начала публикаций автора их не было.

В связи с необходимостью анализа исследуемой проблемы сразу по двум направлениям – фтизиатрия, фармакология и клиническая фармакология, автор рассмотрел большой объем информации, он хорошо ориентируется в проблемах диссертационного исследования..

Глава 2 посвящена материалам и методам, используемым в исследовании. Поскольку работа носит клинико-экспериментальный характер, отдельно рассматриваются материалы и методы клинического и экспериментального разделов. В первом разделе исследования представлены результаты лечения 650 больных туберкулезом легких с различными видами устойчивости возбудителя, с выделением новых случаев химиотерапии, повторного лечения и рецидивов. Клинические изоляты возбудителя, выделенные от больных, явились материалом для экспериментальных исследований, что позволили диссертанту, конечно, *условно* экстраполировать результаты эффективности экспериментов на клинический материал и *рассуждать* о возможной эффективности применения наносеребра в практике. В экспериментальных исследованиях автор использовал наночастицы серебра, полученные электрохимическим методом и биохимическим синтезом в обратных мицеллах. В программу экспериментального исследования входило изучение подавляющей активности наночастиц серебра с использованием бактериологических посевов (1350 посевов), тестирование противотуберкулезной активности наночастиц и определение характера взаимодействия наносеребра с изониазидом и рифампицином. Для выяснения характера повреждения возбудителя при применении исследуемых препаратов использовался метод атомно-силовой микроскопии для оценки их токсикологических свойств, в том числе в режиме хронического эксперимента. Очевидно, что для изучения эффективности предлагаемых нанопрепаратов использование модели экспериментального туберкулеза у 65 мышей линии BALB/c вполне достаточно.

В 3-й главе диссертации обсуждаются особенности клинического течения лекарственно-устойчивого туберкулеза с различной ЛУ МБТ. Как показали исследования, течение туберкулез лёгких с НЛУ МБТ имеет некоторые особенности. Так, в 32,8% больных сформировались фиброзные полости, оставляющие мало шансов на эффективность консервативной терапии. В диссертации отмечается высокий рост ассоциированной с изониазидом ЛУ возбудителя к этамбутолу (60,7%), фторхинолонам (от 19,4% у впервые вы-

явленных больных до 30,2 при повторном лечении), протионамиду (от 14,5% до 27,0%). Большой интерес представляют наблюдения по трансформации изначальной НЛУ МБТ в МЛУ-туберкулёз. По данным исследования, у 53,9% больных с МЛУ-МБТ в дебюте заболевания отмечалась фиксированная устойчивость к изониазиду, при этом чаще наблюдались спектры HSE (43,8%) и HSEK (35,4%). Полученные данные позволяют автору обосновать применение новых препаратов в лечении туберкулеза с НЛУ МБТ.

В 4 главе приводится сравнительный анализ эффективности лечения больных с различной ЛУ МБТ. В диссертации обращается внимание на то, что заживление деструкций у 38,3% больных с НЛУ МБТ не отвечает тому обстоятельству, что фиброзные деструкции имелись лишь у 32,8% и позволяли рассчитывать на консервативное закрытие полостей более чем у половины больных. Очевидно, что наряду с другими аспектами, для повышения эффективности требуется поиск новых путей потенцирования химиотерапии, какие автор и предлагает в следующих главах диссертации.

В 5 главе содержатся результаты исследования подавляющей активности наночастиц серебра в изолированном варианте и в сочетании с изониазидом в эксперименте *in vitro*. Общая подавляющая активность наночастиц серебра как на изоляты НЛУ МБТ, так и МЛУ-штаммы составила более 70% и практически не зависела от спектра резистентности МБТ. Указанное обстоятельство наводит на предположение, что антибактериальное действие наночастиц имеет иной механизм действия, независимый от характера лекарственной устойчивости возбудителя. Подтверждены данные литературы, что минимальная подавляющая и бактерицидная концентрации наночастиц находятся в интервале 2,5 – 10 мкг/мл.

Сочетанное применение наночастиц с изониазидом показало мощное взаимное усиление действия с синергическим эффектом. Аналогичное синергическое действие наночастиц серебра было получено на штамм H37Rv с рифампицином. Наночастицы в обратных мицеллах подавляли рост изониазид-

резистентного штамма CN-40. В сочетании с изониазидом на данный штамм возбудителя наблюдалось аддитивное действие.

Результаты исследований по данным атомно-силовой микроскопии позволяют предположить, что характер повреждения возбудителя наночастицами обусловлен повреждением его пептидогликанового слоя и это должно быть учтено при разработке новых лекарственных средств.

В главе 6 тестировались токсикологические параметры наночастиц. В изучаемых дозах, по данным диссертационного исследования, значимого влияния наночастиц на органы и системы экспериментальных животных не выявлено. Результаты токсикологических опытов, по данным гистологического исследования, показали, что наночастицы не оказывали влияния на токсикологические параметры изониазида при его длительном применении.

Диссертант ссылается на факт использования серебросодержащих препаратов в ветеринарии, но для местного применения. На основании их результатов автор обосновывает необходимость дальнейшего изучения токсикологии наносоединений серебра для парентерально применения у человека.

В 7-й главе обсуждаются результаты эксперимента по изучению химиотерапевтической эффективности наночастиц серебра на модели туберкулёза у животных. Наиболее объективный критерий эффективности лечения – выживаемость животных, был максимальным при использовании наночастиц серебра с изониазидом. На момент окончания эксперимента, который регламентировался падежом всех зараженных, не леченных животных, выживаемость мышей, получавших наночастицы с изониазидом, составила 90%. Так же наиболее оптимальными были и все другие критерии эффективности лечения, включая гистологическое исследование органов-мишеней.

Следует отметить, как при исследовании *in vitro*, так и в эксперименте *in vivo* создавались оптимальные концентрации и дозы наночастиц (не всегда максимальные), что весьма характерно для наночастиц (т.н. «дозозависимое действие», связанное с формой, размером, концентрацией и некоторыми другими параметрами наноразмерных агентов).

Проведенное экспериментальное исследование применения наносеребра во фтизиатрии однозначно позволяет заключить: наночастицы серебра проявляют выраженное противотуберкулёзное действие, при этом имеют безопасный профиль применения. Полученные результаты позволяют Захарова А.В. рекомендовать наночастицы серебра для клинического исследования и вместе с тем продолжить работу по тестированию эффективных и безопасных лечебных доз. Перспективы использования наночастиц во фтизиатрии могут быть связаны также с лечением и других микобактериозов,

В заключении отражены основные положения работы. Выводы обоснованы и вытекают из результатов проведенного исследования. Практические рекомендации логичны и обоснованы.

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Работа выполнена на высоком научном уровне, ясно изложена и грамотно написана.

Диссертанту целесообразно уточнить: 1. Какие наиболее приемлимые и возможные пути внедрения результатов проведенного исследования в практику оказания специализированной медицинской помощи при туберкулезе.

2. С учетом полученных результатов возможно ли разрабатывать комбинированные препараты для лечения туберкулеза, включающие наночастицы серебра и антибиотики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Захарова Андрея Владимировича на тему «Эффективность лечения туберкулёза с устойчивостью возбудителя к изониазиду и экспериментальное обоснование эффективности применения наночастиц серебра», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям: 14.01.16 – фтизиатрия, 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований содержится новое решение важнейшей научно-практической проблемы современной фтизиатрии - совершенствования лечения туберкулёза с лекарственной устойчивостью возбудителя путем научного обоснования эффективности и

безопасности применения (в эксперименте) нового противотуберкулёзного средства наночастиц серебра с альтернативным физико-химическим механизмом бактерицидного действия (в эксперименте).

По актуальности, научной новизне, практической значимости, объёму клинических и экспериментальных исследований, научно-методическому уровню, структуре и объёму диссертация Захарова А.В. соответствует п. 9, 10 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук специальностям 14.01.16 – фтизиатрия, 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ

Коломиец Владислав Михайлович

305046 г. Курск. ул. Спортивная 35, т. 8-961-199-05-85, vlacom@mail.ru

«6» 08 2019 г.

*Подпись профессора Коломиеца В.М.
заверяю, зам. начальника управления
персоналом и кадровой ра. Ефреф Колзушина*

