

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Рачиной Светланы Александровны 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 специальностям:

14.01.16 – фтизиатрия; 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Актуальность темы диссертационного исследования

Туберкулез представляет собой чрезвычайно актуальную медицинскую и социально-экономическую проблему. Заболеваемость туберкулезом превышает 10 млн. случаев в год, ежегодно от туберкулеза умирает более 1,5 млн. человек. Несмотря на существенное улучшение эпидемиологической ситуации по туберкулезу, мировое сообщество постоянно сталкивается с новыми вызовами при оказании медицинской помощи данной категории больных. Один из наиболее серьезных – глобальное распространение микобактерий туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-МБТ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-МБТ) к противотуберкулезным препаратам. По данным ВОЗ, около 50% мирового потенциала МЛУ-ТБ приходится на Индию, Китай и Российскую Федерацию. Туберкулез легких, вызванный МЛУ-МБТ, отличается частыми неудачами стартовой терапии, более высокой частотой осложнений и менее благоприятным прогнозом.

В последние годы во фтизиатрическую практику вошел ряд новых противотуберкулезных препаратов, например, бедаквилин, деламамид (не зарегистрирован в РФ), в лечении туберкулеза широко используются такие антибиотики, как фторхинолоны и линезолид. Использование новых препаратов позволило повысить эффективность лечения туберкулеза, однако

к ним также отмечено быстрое формирование вторичной резистентности возбудителя. Это диктует необходимость поиска альтернативных подходов к химиотерапии заболевания, особенно в случае выявления МЛУ-МБТ и ШЛУ-МБТ.

В связи с этим исследование потенциальной противотуберкулезной активности наночастиц серебра и из возможного взаимодействия с широко применяющимися в режимах полихимиотерапии препаратами, такими как изониазид и рифампицин, представляется чрезвычайно актуальным. Выраженный антимикробный эффект наночастиц серебра в отношении бактериальных возбудителей и вирусов, в том числе находящихся в составе биопленок, продемонстрирован в ряде зарубежных и российских исследований.

В настоящее время во фтизиатрии определяющим фактором выбора режима химиотерапии является устойчивость МБТ к рифампицину и изониазиду. Вопросы особенностей течения и эффективности лечения туберкулеза легких, вызванного МЛУ-МБТ, широко освещены в современной мировой и отечественной литературе в отличие от туберкулёза, вызванного устойчивыми к изониазиду МБТ при сохраненной чувствительности к рифампицину. Несмотря на относительно небольшую долю такого фенотипа резистентности в общей структуре заболевших, устойчивость МБТ к изониазиду играет существенную роль как в дальнейшей амплификации лекарственной устойчивости возбудителя, так и в ухудшении исходов заболевания.

Таким образом, диссертационная работа Захарова Андрея Владимировича, направленная на изучение особенностей лекарственно-устойчивого туберкулёза легких с резистентностью к изониазиду, а также экспериментальное обоснование эффективности и безопасности нанокompозита, включающего наночастицы серебра и изониазид при лечении туберкулеза, в том числе вызванного МЛУ-МБТ и ШЛУ-МБТ, является актуальной и имеет важное научно-практическое значение.

Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций

Обоснованность и достоверность результатов исследования, научных положений, выводов и практических рекомендаций подтверждается достаточным объемом исследовательской работы, использованием современных методов исследования, адекватных поставленным задачам, корректным анализом и интерпретацией данных.

Научные положения диссертации соответствуют паспортам научных специальностей: 14.01.16 – фтизиатрия и 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология и областям исследования: пункты 2,4 – фтизиатрия, 1,5 – фармакология, клиническая фармакология.

Для решения поставленных задач автор выполнил одномоментное исследование с анализом 650 историй болезни пациентов с верифицированным деструктивным туберкулезом легких и различными фенотипами устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам, тестирование 225 клинических изолятов МБТ для оценки антимикробной активности наночастиц серебра и двух музейных штаммов с известным генотипом, включавшей дополнительную оценку синергизма с рифампицином и изониазидом; провел токсикологические исследования на крысах и мышах *in vivo*, изучил эффективность различных доз наночастиц серебра и нанокompозита, включавшего изониазид с наночастицами серебра на модели туберкулёза у имбредных мышей, с помощью метода атомно-силовой микроскопии изучил потенциальные механизмы антимикробного действия наночастиц серебра на МБТ.

На всех этапах работы автор использовал современные лабораторные и инструментальные методы. Исследования с экспериментальными животными проводились в соответствии с нормами и документами, а также этическими принципами, регламентирующими проведение данного вида научных работ.

Обсуждение результатов исследования выполнено с анализом достаточного количества оригинальных работ отечественных и зарубежных авторов, опубликованных преимущественно за последние 5 лет. Положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации вытекают из полученных результатов исследования, научно аргументированы, четко согласуются с целью и задачами исследования.

Достоверность и новизна полученных результатов

Достоверность исследования базируется на большом объеме клинических и доклинических экспериментальных исследований, выполненных по единому плану в соответствии с целью и задачами диссертационной работы. Автором впервые во фтизиатрии проведены экспериментальные исследования по оценке противотуберкулезной активности наночастиц серебра в качестве монотерапии и при комбинированном применении (нанокомпозит с изониазидом и наночастицами серебра). Впервые изучена субпопуляция пациентов с туберкулёзом лёгких, вызванным устойчивыми к изониазиду МБТ при сохранённой их чувствительности к рифампицину, что позволяет прогнозировать течение заболевания и повышать эффективность лечения. Подробно изучены фенотипы антимикробной резистентности МБТ, ассоциированной с устойчивостью к изониазиду, установлена тенденция нарастания лекарственной устойчивости к отдельным противотуберкулезным препаратам в процессе терапии.

Проведенные экспериментальные исследования *in vitro* позволили оценить потенциальную противотуберкулезную активность наночастиц серебра, что позволяет в известной степени моделировать и прогнозировать эффективность их клинического применения как в монотерапии, так и при назначении в составе комбинированных режимов, в частности, в сочетании с рифампицином и изониазидом. Впервые проведены исследования противотуберкулезной эффективности применения наночастиц серебра на модели туберкулёза у животных, а также их острой, подострой и

хронической токсичности, позволяющие рассчитать потенциально эффективную и безопасную дозу для человека. С помощью атомно-силовой микроскопии впервые изучен потенциальный механизм повреждающего действия наночастиц серебра на МБТ. Автором (в соавторстве) получен патент на изобретение по теме диссертации.

Научно-практическая значимость результатов диссертационного исследования для развития соответствующей отрасли науки

Полученные автором результаты диссертационного исследования представляют большой научно-практический интерес, поскольку открывают перспективы для развития нового направления в решении ведущей проблемы современной фтизиатрии – повышении эффективности химиотерапии туберкулёза легких, вызванного МЛУ-МБТ и ШЛУ-МБТ. Автором подтверждено наличие противотуберкулезной активности наночастиц серебра *in vitro* в отношении МБТ с различными фенотипами резистентности, в том числе МЛУ; выявлен синергизм наночастиц серебра и основных противотуберкулезных препаратов – изониазида и рифампицина в отношении музейного штамма МБТ H37Rv. Автор подтвердил низкую токсичность наночастиц серебра и нанокompозита, включавшего наночастицы серебра и изониазид при использовании в дозах, обеспечивающих достаточный противотуберкулезный эффект.

Полученные Захаровым А.В. результаты, свидетельствующие об альтернативном, физико-химическом механизме ингибирования МБТ наночастицами серебра, могут послужить основой для исследования их эффективности при сопутствующей туберкулёзу инфекционной патологии другого генеза, а также заболеваний, вызываемых нетуберкулёзными микобактериями. Наночастицы серебра и нанокompозиты с различным перспективе использоваться в предоперационной подготовке больных туберкулёзом.

Основные положения диссертационного исследования Захарова А.В. используются в научной работе и учебном процессе на профильных кафедрах

Ярославского государственного медицинского университета, а также в практической работе ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая туберкулёзная больница».

Структура и содержание диссертации

Диссертация Захарова А.В. изложена на 255 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов, результатов и обсуждения собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 437 наименований, в том числе 164 отечественных, указателя сокращений. Работа иллюстрирована 136 таблицами и 61 рисунком.

Во введении автор обосновал актуальность диссертации, четко сформулировал цель и задачи исследования, представил степень разработанности темы, обосновал научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, методологию и методы исследования, изложил основные положения, выносимые на защиту, представил апробацию полученных результатов. Во введении отражено соответствие научных положений диссертации паспортам научных специальностей, внедрение результатов, личный вклад автора и публикации по теме диссертации.

В обзоре литературы автор подробно освещает эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу в мире и Российской Федерации, анализирует потенциальные механизмы и распространенность устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам, последствия инфицирования МЛУ-МБТ и ШЛУ-МБТ и пути преодоления вторичной резистентности у данного возбудителя. Подробно освещается вопрос антимикробной активности наночастиц серебра, анализируются выполненные доклинические и клинические исследования по микробиологической активности препарата, перспективы их применения в современной медицине. Указывается на актуальность дальнейшего исследования безопасности наночастиц и необходимости определения оптимальных режимов терапии инфекций различной этиологии. Представлены данные, свидетельствующие о

возможном потенцировании наночастицами антибактериальных препаратов, результаты исследований по применению наночастиц серебра при туберкулёзе верхних дыхательных путей у человека.

Во 2 главе приводится материал и методы клинических и экспериментальных исследований. Материалом для клинического раздела работы явились 650 историй болезни пациентов с верифицированным туберкулёзом лёгких с бактериовыделением и разным профилем чувствительности к противотуберкулезным препаратам (в том числе устойчивостью к изониазиду при сохраненной чувствительности к рифампицину). Экспериментальные данные базировались на исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Материалом для оценки антимикробной активности наночастиц серебра послужили 225 клинических изолятов МБТ и музейные штаммы с известным профилем чувствительности. Для исследования потенциальных механизмов противотуберкулезного действия наночастиц серебра автор использовал атомно-силовую микроскопию. Токсикологическая оценка наночастиц серебра и нанокompозита выполнялась на белых нелинейных мышах и белых крысах обоего пола. Изучение эффективности проводилось на экспериментальной модели туберкулеза, эксперимент включал 68 мышей-самцов имбредной линии BALB/c.

В главах 3-7 приводятся результаты собственных исследований. В частности, в главе 3 анализируются особенности течения туберкулёза лёгких при устойчивости МБТ к изониазиду и сохранённой чувствительности к рифампицину в сравнении с инфицированием МЛУ-МБТ и лекарственно-чувствительным туберкулёзом. Дается подробная клинко-рентгенологическая характеристика заболевания при возбудителях с различными фенотипами устойчивости, а также чувствительных штаммах МБТ. Приводится детальный анализ профиля резистентности МБТ к противотуберкулезным препаратам и их динамики в разных группах. В частности, автор приводит данные, свидетельствующие о том, что у 53,9%

больных с МЛУ-МБТ в дебюте заболевания наблюдалась устойчивость к изониазиду при сохраненной чувствительности к рифампицину.

В 4 главе анализируется эффективность лечения туберкулёза лёгких при различных спектрах устойчивости возбудителя по двум основным критериям – абациллированию и заживлению полостей деструкций в лёгочной ткани. По данным исследования, устойчивость к изониазиду снижает эффективность лечения по сравнению с чувствительным туберкулёзом, в среднем, на 20%. Автор также аргументирует положение о том, что по критерию заживления деструкций при туберкулезе легких, вызванном устойчивыми к изониазиду изолятами (но не МЛУ-МБТ), сохраняются значительные резервы для консервативной терапии.

В 5 главе представлены и обсуждаются результаты экспериментальных исследований противотуберкулезной активности наночастиц серебра, в том числе совместно с противотуберкулезными препаратами и в обратных мицеллах. Показано, что наночастицы серебра оказывали значимое подавляющее действие на штаммы МБТ с различными фенотипами устойчивости, в том числе при наличии резистентности к изониазиду и рифампицину. При совместном использовании наночастиц серебра с изониазидом выявлена тенденция к более существенному подавлению роста МБТ. Обнаружен выраженный синергизм наночастиц серебра с изониазидом и рифампицином против музейного штамма МБТ H37Rv. Совместное применение наночастиц серебра в обратных мицеллах с изониазидом против изониазидорезистентного штамма МБТ CN-40 выявило аддитивное действие. Показано изменение морфометрических показателей МБТ под влиянием наночастиц серебра, что сопровождается повреждением клеточной стенки и может лежать в основе их противотуберкулезного действия.

В 6 главе представлены результаты изучения острой, подострой, хронической токсичности наночастиц серебра и нанокompозита, включавшего изониазид, а также исследование их кожно-резорбтивного,

аллергогенного и иммунотоксического действия. Автор не выявил значимой токсичности исследуемых доз препаратов, а также изменений в органах и тканях подопытных животных под влиянием наночастиц серебра. При этом наночастицы серебра в режиме хронического опыта не повышали токсичность изониазида.

В 7 главе автор приводит результаты изучения эффективности наночастиц серебра на экспериментальной модели туберкулёза у животных. Как показали исследования, лучшие показатели в достижении критериев эффективности лечения наблюдались при использовании нанокompозита с наночастицами серебра и изониазидом. Данные подтверждались результатами гистологических исследований лёгочной ткани с морфометрической оценкой патологических изменений.

В разделе “Заключение” автор обобщает выполненные исследования и основные результаты, анализирует их с учетом опубликованных ранее работ, обсуждает перспективы дальнейших разработок в области оптимизации исходов лечения туберкулеза, вызванного МЛУ-МБТ и ШЛУ-МБТ.

Выводы диссертационной работы сформулированы четко и в целом соответствуют поставленным задачам. Практические рекомендации вытекают из результатов исследования и подчеркивают наличие обоснованных данных о высокой противотуберкулезной эффективности и низкой токсичности наночастиц серебра и нанокompозита, включавшего изониазид, что определяет целесообразность дальнейших клинических исследований как в группе с впервые выявленным туберкулезом и неизвестной чувствительностью возбудителя, так и в случае инфицирования МЛУ-МБТ и ШЛУ-МБТ.

По теме диссертации опубликовано 42 печатных работы, в том числе, 14 работ в журналах, включённых в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий», рекомендуемых ВАК, из них 1, входящая в международные базы данных. Имеется патент на изобретение и монография в соавторстве по теме диссертации.

Принципиальных замечаний по выполненной Захаровым А.В. диссертационной работе нет, однако есть несколько замечаний по оформлению диссертации, которые не носят принципиального характера:

1. В работе встречаются грамматические ошибки, громоздкие неудобные таблицы.
2. Недостаточно подробно для разнообразия представленных переменных написан раздел по статистической обработке данных, в том числе анализу различий, полученных при сравнении малых выборок.
3. В обсуждении результатов исследования напрашивается более детальный анализ данных, полученных другими российскими и зарубежными авторами в изучаемых предметных областях и их сравнение с данными, полученными диссертантом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Захарова А.В. 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 завершённой научной квалификационной работой, в которой в результате проведенных автором исследований содержится решение важной научно-практической проблемы – совершенствование лечения туберкулёза легких с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя к противотуберкулезным препаратам путем исследования особенностей течения туберкулеза легких, ассоциированного с устойчивыми к изониазиду изолятами и экспериментального обоснования эффективности и безопасности применения наночастиц серебра в монотерапии туберкулеза и в комбинации с другими противотуберкулезными препаратами.

По актуальности, научной новизне, практической значимости, объему клинических и экспериментальных исследований, научно-методическому уровню, структуре и объему 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 по специальностям 14.01.16 – фтизиатрия, 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент:

профессор кафедры внутренних болезней
с курсом кардиологии и функциональной
диагностики им. академика В.С. Моисеева
медицинского института ФГАОУ ВО
«Российский университет дружбы народов» (РУДН)
доктор медицинских наук Рачина Светлана Александровна

Подпись Рачиной Светланы Александровны заверяю

Ученый секретарь Ученого совета
медицинского института РУДН
к.фарм.н., доцент



Т.В. Максимова

Шифр специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Адрес: 117292, российская Федерация, г. Москва, ул. Вавилова, д. 61, ГКБ
им. В. В. Виноградова Департамента здравоохранения г. Москвы, корп. 1.
Тел.: +7 (495) 103-46-66
e-mail: rachina_sa@rudn.university

«__5__» _сентября__ 2019 г.