

О Т З Ы В

на диссертационную работу Захарова Андрея Владимировича на тему **«Эффективность лечения туберкулеза легких с устойчивостью возбудителя к изониазиду и экспериментальное обоснование эффективности применения наночастиц серебра»**, представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям: 14.01.16 – фтизиатрия; 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Актуальность исследования Лекарственная устойчивость возбудителя является важной проблемой любой антибактериальной терапии и химиотерапии туберкулёза, в частности. Актуальность лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) в последние годы возрастает в связи с критическими показателями резистентности возбудителя, заставляющими отказываться от ранее эффективных химиопрепаратов. Сегодня практически не применяется стрептомицин, ограничено применение других аминогликозидов, быстрыми темпами нарастает устойчивость к препаратам I ряда, фторхинолонам и другим противотуберкулёзным средствам. Вошедшие в клиническую практику в последнее время противотуберкулёзные препараты позволили повысить эффективность лечения больных туберкулёзом с лекарственной устойчивостью возбудителя, однако, в силу общебиологических закономерностей формирования лекарственной устойчивости этот успех носит временный характер. Таким образом, поиск новых подходов к лечению туберкулёза с лекарственной устойчивостью возбудителя является одной из главных проблем современной фтизиатрии.

Как известно, большинство антибактериальных средств губительно действуют на возбудителя, вмешиваясь в тонкие механизмы физиологии клетки, опосредованные генетическим регулированием. Также известны физические и химические факторы, уничтожающие МБТ. Это различные электромагнитные колебания с различной длиной волны, включая световые спектры и УФО, химические средства дезинфекционного применения,

воздействие лазером, в том числе при эндобронхиальных и эндокавитарных процедурах. Мировая и отечественная литература содержит большое количество публикаций, подтверждающих высокий антибактериальный потенциал наночастиц серебра на самый разнообразный спектр возбудителей, в том числе на лекарственно устойчивые штаммы. В ряде работ отмечается потенцирующий эффект наночастиц на антибиотические средства. Между тем, эффективность применения наночастиц серебра во фтизиатрии не изучено. В связи с этим, исследование А.В. Захарова, посвященное изучению эффективности применения наночастиц серебра (в эксперименте) в терапии туберкулёза, в том числе с лекарственной устойчивостью возбудителя, является весьма актуальным.

Целью исследования явилось повышение эффективности лечения туберкулёза с лекарственной устойчивостью возбудителя к изониазиду при сохраненной чувствительности к рифампицину путем научного обоснования эффективности и безопасности применения наночастиц серебра в эксперименте. Для достижения цели были сформулировано 7 задач, соответствующих основным разделам диссертационного исследования, в том числе первые три касаются клинического раздела исследования, последующие четыре отражают экспериментальную часть работы.

Достоверность и степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций базируется на четкой постановке цели и задач исследования, использованием современных методов исследования, а также тщательным анализом и интерпретацией полученных данных. Объем клинических и экспериментальных наблюдений и полнота проведенных исследований достаточны для получения достоверных и значимых результатов.

Научная новизна исследования:

- впервые в сравнительном аспекте с другими спектрами ЛУ возбудителя изучены клинико-рентгенологические особенности и эффективность лечения туберкулёза лёгких с устойчивостью МБТ к изониазиду при сохранённой чувствительности к рифампицину и установлена частота трансформирования данного спектра в туберкулёз с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя у данного контингента больных в Ярославской области;
- впервые в эксперименте научно доказано бактерицидное действие наночастиц серебра на МБТ, в том числе с лекарственной устойчивостью, а также определен характер повреждений МБТ с использованием атомно-силовой микроскопии;
- впервые в эксперименте *in vitro* доказано значительное усиление противотуберкулёзной активности изониазида и рифампицина при их совместном использовании с наночастицами серебра;
- впервые в эксперименте доказана токсикологическая безопасность использования наночастиц серебра с изониазидом в режиме длительного применения;
- впервые на модели туберкулёза у животных доказано повышение эффективности химиотерапии при использовании наночастиц серебра и рассчитана их эффективная лечебная доза, что, в последующем, позволяет экстраполировать её для человека при установленном уровне безопасности.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведённый анализ клинического течения туберкулёза лёгких с устойчивостью возбудителя к изониазиду при сохранённой чувствительности к рифампицину позволяет прогнозировать развитие заболевания и повышать эффективность его лечения. Экспериментальное обоснование *in vitro* и *in vivo* эффективности и безопасности применения наночастиц серебра в лечении туберкулёза позволяет рекомендовать их для дальнейшего клинического исследования у больных туберкулезом. Научное обоснование альтернативного, физико-

химического механизма противотуберкулёзного действия наночастиц серебра и доказанный синергизм их взаимодействия с химиопрепаратами целесообразно использовать как в стартовых режимах лечения с неуточнённой лекарственной устойчивостью, так и при установленной резистентности возбудителя.

Личное участие соискателя в получении результатов Автор принимал непосредственное участие на всех этапах исследования – постановке и формулировании цели и задач научной работы, планировании и непосредственном проведении клинических и экспериментальных исследований, проведении научного и статистического анализа полученных результатов, формулировке выводов и практических рекомендаций. Автор самостоятельно готовил и обсуждал в научных публикациях результаты научных исследований. Диссертация и автореферат написаны автором лично.

Структура и объем диссертации Диссертационная работа Захарова А.В. построена по традиционному плану, изложена на 255 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций. Список литературы включает 273 иностранных и 164 отечественных наименований. Работа проиллюстрирована 136 таблицами и 61 рисунком.

Во Введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, сформулированы цель, задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, степень разработанности темы исследования, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов, соответствие диссертации паспорту научной специальности, внедрение результатов исследования, публикации и личный вклад автора в получение научных результатов, а также сведения о структуре и объеме диссертации.

В Обзоре литературы представлено современное состояние проблемы лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза, в том числе к изониазиду, и основные направления преодоления резистентности МБТ. Подробно дается оценка наночастиц серебра как антибактериального агента, а также представлены токсикологические риски наночастиц. Следует отметить, что к началу диссертационного исследования публикации о противотуберкулёзном действии наночастиц серебра в литературе практически отсутствовали. На основании высокого антибактериального потенциала наночастиц серебра и скудности исследований по его применению во фтизиатрии автор формулирует актуальность работы с целью повышения эффективности лечения современного лекарственно-устойчивого туберкулёза. Представленный анализ литературы свидетельствует об актуальности избранной темы исследования.

В Главе 2 подробно описываются материалы и методы клинических и экспериментальных исследований. Работа выполнялась в ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» МЗ РФ. Клиническая часть базируется на ретроспективном анализе 650 историй болезни пациентов с туберкулёзом лёгких, пролеченных в Ярославской областной клинической туберкулёзной больнице за период 2009-2015 г.г., в том числе, 214 больных с устойчивостью МБТ к изониазиду при сохранённой чувствительности к рифампицину, 221 больной – с МЛУ-ТБ и 215 пациентов с сохраненной чувствительностью возбудителя ко всем химиопрепаратам. Автор также выделяет больных с новыми случаями химиотерапии, повторным лечением и рецидивами, что повышает значимость исследования. В экспериментальной работе использовались наночастицы серебра, полученными методом электрохимического растворения металла, а также наночастицы в обратных мицеллах. Подавляющая активность наночастиц изучалась на 117 клинических изолятах возбудителя *in vitro*, при этом проведен анализ более тысячи бактериологических посевов. Также

проводились исследования по ингибированию возбудителя наночастицами в иммунологической лаборатории ЦНИИТ на музейном штамме H37Rv и изониазид-резистентном штамме *M. tuberculosis* CN-40. Высокоинформативной методикой, повышающей достоверность исследования, является используемая автором атомно-силовая микроскопия. Большой объем исследований проведен по изучению токсикологических характеристик наночастиц в исследованиях *in vivo*. Изучение химиотерапевтической эффективности наночастиц на модели лекарственно-устойчивого туберкулёза у мышей является интегрирующим исследованием по эффективности применения нанопрепаратов с противотуберкулёзной целью.

В Главе 3 автор приводит результаты клинических исследований, всесторонне характеризующих туберкулёз лёгких при устойчивости МБТ к изониазиду при сохраненной чувствительности к рифампицину в сравнении с лекарственно-чувствительным и МЛУ туберкулёзом. Приводятся клинико-рентгенологические характеристики каждой группы больных. В разделе подробно анализируются спектры лекарственной устойчивости возбудителя. Изучая динамику формирования МЛУ, автор показал, что у 53,9% больных с МЛУ туберкулезом в дебюте заболевания имелась устойчивость МБТ к изониазиду при сохранённой чувствительности к рифампицину.

В Главе 4 представлены результаты сравнительного изучения эффективности лечения больных с различными спектрами устойчивости МБТ и при сохраненной чувствительности возбудителя. Результаты исследования показали, что устойчивость МБТ к изониазиду снижает основные показатели эффективности (абациллирование и закрытие полостей) в сравнении с лекарственно-чувствительным туберкулёзом на 17-20%, при этом аналогичные показатели в сравнении с МЛУ-ТБ были выше на 15-20%. Автор справедливо замечает, что эффективность лечения туберкулёза при устойчивости к изониазиду по критерию абациллирования ниже 50% и

заживлению деструкций ниже 40% является недостаточной и требует поиска путей для повышения эффективности химиотерапии.

В Главе 5 автор приводит результаты изучения подавляющей активности наночастиц серебра в изолированном варианте и в сочетании с изониазидом на клинические изоляты возбудителя туберкулёза, полученные от больных туберкулезом легких. Отсутствие статистически значимой разницы показателей подавляющего действие наночастиц на штаммы МБТ с различными спектрами резистентности дает основание автору предположить, что ингибирование роста возбудителя под влиянием наночастиц серебра имеет иной, отличный от химиопрепаратов механизм действия. Проведенные в ЦНИИТ совместные тестовые исследования подавления роста возбудителя наночастицами серебра в обратных мицеллах, которые были предоставлены институтом физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, подтверждают высокий антибактериальный потенциал наночастиц на МБТ, в том числе, с лекарственной устойчивостью. В исследовании было показано, что совместное применение наночастиц с изониазидом, а также наночастиц с рифампицином, на музейный штамм возбудителя H37Rv носит выраженный синергический характер взаимодействия. Указанный научный факт может обеспечить существенное повышение эффективности лечения и снизить темпы формирования лекарственной устойчивости возбудителя. Полученные диссертантом результаты атомно-силовой микроскопии в известной мере объясняют возможный универсальный механизм противотуберкулёзной активности наночастиц, связанный с повреждением бактериальной стенки.

В Главе 6 автор анализирует результаты токсикологической безопасности применения наночастиц серебра в экспериментах *in vivo*. Широкое использование нанопрепаратов в современной бытовой практике заставляет особенно пристально относиться к применению наночастиц в медицинских целях. Высокая активность наночастиц, связанная с их особыми физико-химическими параметрами, имеет большие риски

повреждения органов и тканей человека, в первую очередь наиболее уязвимых структур ЦНС. Как показано в исследовании, в изучаемых дозах наночастицы серебра не оказали повреждающего действия на органы и ткани экспериментальных животных. Важно отметить, что не наблюдалось значимых реакций у животных в хроническом эксперименте длительного совместного применения наночастиц с изониазидом, что моделирует возможное применение нанопрепаратов у человека в режимах длительной химиотерапии.

В Главе 7 приводятся результаты эффективности применения наночастиц серебра в эксперименте *in vivo* на модели туберкулёза у животных. Проанализирована динамика критериев эффективности лечения у животных при различном использовании наночастиц – как монопрепарата и в качестве нанокompозита в сочетании с изониазидом. По результатам основных критериев, включая бактериологические показатели посевов из органов-мишеней и гистологические данные, наиболее эффективным оказалось совместное использование наночастиц с изониазидом. При использовании в лечении нанокompозита значительно быстрее купировались воспалительные изменения в легочной ткани с преобладанием макрофагально-эпителиоидных клеточных элементов, свидетельствующих о положительной динамике процесса. Таким образом, полученные результаты экспериментальных исследований позволяют говорить о научном подтверждении противотуберкулёзной эффективности наночастиц серебра. Дальнейшее уточнение дозировок и физико-химических характеристик наночастиц серебра открывает перспективу их клинического применения. Возможности применения наночастиц в практике расширяют способы местного и регионарного использования, снижающие возможные токсические эффекты на организм.

В Заключении нашли отражение все разделы диссертационного исследования, объединены наиболее важные данные, полученные автором в

процессе проведения научной работы. Выводы и практические рекомендации соответствуют цели, задачам и вытекают из данных, полученных в результате научного исследования.

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

По материалам диссертации опубликовано 42 печатных работы, в том числе, 14 - в журналах, включённых в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий», рекомендуемых Высшей Аттестационной Комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных научных результатов диссертаций, из них 1, входящая в международные базы данных. Имеется патент на изобретение и монография в соавторстве по теме диссертации.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на международных и национальных конгрессах и научно-практических конференциях различного уровня.

Основные результаты исследования включены в программу преподавания на кафедрах фтизиатрии, клинической фармакологии, микробиологии с вирусологией и иммунологией ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» МЗ РФ. Клинические положения диссертационной работы представлены на врачебных и научных конференциях и используются в работе врачами ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая туберкулёзная больница».

Автореферат диссертационной работы соответствует всем требованиям к его оформлению, а также содержанию и выводам диссертации.

Работа выполнена на высоком современном научном и методическом уровне.

Наряду с указанными достоинствами диссертационного исследования, к работе А.В. Захарова имеются замечания:

1. В тексте диссертации имеются стилистические погрешности, некорректные термины (например «фиброзные деструкции», «деструктивные полости» и пр.), имеются некорректно оформленные таблицы

2. В тексте диссертации отсутствует расшифровка паспорта специальностей.

3. В Главе 2, а также и в последующих главах, в тексте в большинстве случаев не представлены показатели в абсолютных числах, а только проценты.

4. В Главе 2 отсутствуют сведения о статистической обработке результатов.

5. Практические рекомендации, разработанные автором, предполагают применение наночастиц и нанокompозитов серебра у больных туберкулезом. Однако клиническое исследование эффективности и безопасности исследуемых препаратов у больных туберкулезом не проводилось. В связи с этим, представленные практические рекомендации преждевременны и некорректны.

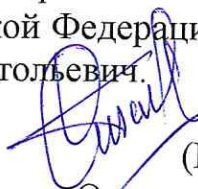
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, 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 завершённой научно-квалификационной работой, в которой в результате проведенных автором исследований содержится решение важной научной и практической проблемы – совершенствование лечения туберкулёза с лекарственной устойчивостью возбудителя на основе применения наночастиц серебра.

По актуальности, научной новизне, практической значимости, объему клинических и экспериментальных исследований, научно-методическому уровню, структуре и объему диссертация Захарова Андрея Владимировича на тему «Эффективность лечения туберкулёза с устойчивостью возбудителя к изониазиду и экспериментальное обоснование эффективности применения наночастиц серебра», представленная к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук, соответствует требованиям п. 9, 10 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335), предъявляемых к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук специальностям 14.01.16 – фтизиатрия, 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой фтизиатрии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор Стаханов Владимир Анатольевич.



(В.А. Стаханов)

Почтовый адрес: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1, телефон: 8(495)4348464, 8(499)1208295, e-mail: rsmu@rsmu.ru, stakhanov03@rambler.ru, ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

