



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ
им. В.И. Разумовского Минздрава России

А.С. Федонников

« 3 » сентября 2019

ОТЗЫВ

ведущей организации 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 исследования

Диссертационное исследование Захарова А.В. выполнено на одну из самых актуальных тем современной фтизиатрии и клинической фармакологии – повышение эффективности лечения больных туберкулезом с лекарственной устойчивостью возбудителя. По оценкам специалистов, рост резистентности возбудителя наряду с увеличением количества больных с ВИЧ-инфекцией будут определять неблагоприятный эпидемиологический сценарий по туберкулезу в России и мире в ближайшей перспективе. По итогам 2018 года эффективное лечение больных туберкулезом органов дыхания с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ МБТ) было достигнуто в 54,7% случаев. Несмотря на некоторый рост результативности терапии за последние 5 лет (с 39,1% в 2014 году до 54,7% в 2018 году), эффективность лечения больных с МЛУ туберкулезом нельзя признать оптимальной. Внедрение в клиническую практику ряда новых химиопрепаратов и антибиотиков широкого спектра действия (бедаквилин, линезолид, фторхинолоны) повысило эффективность лечения больных с

МЛУ-туберкулезом, однако это не определяет решение проблемы в долгосрочной перспективе по причине неизбежного развития резистентности и к этим препаратам. В условиях прогрессивного роста лекарственной устойчивости возбудителя в Федеральных клинических рекомендациях по лечению туберкулёза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью регламентируется научный поиск средств, потенцирующих действие противотуберкулёзных препаратов, так называемых адьювантов химиотерапии. В диссертационной работе автор предлагает использовать в качестве нового агента противотуберкулёзного действия наночастицы серебра. Несмотря на большое количество исследований по антибактериальному применению наночастиц серебра при широком спектре инфекций, в том числе при лекарственной устойчивости возбудителей, в литературе отсутствуют работы по изучению противотуберкулёзной активности наночастиц серебра. Предложение использовать наночастицы серебра в качестве противотуберкулёзного средства открывает новый подход в поисках путей повышения эффективности лечения современного туберкулёза и, безусловно, является чрезвычайно актуальным как с научной, так и с практической точек зрения.

Несомненную актуальность для современной фтизиатрии и клинической фармакологии представляют и клинические исследования, посвященные туберкулезу, с устойчивостью МБТ к изониазиду при сохраненной чувствительности к рифампицину. Несмотря на выделенный в Федеральных клинических рекомендациях, отдельный 2 режим химиотерапии для больных с данным спектром устойчивости возбудителя, в литературе имеются лишь отдельные публикации по данной теме. Доля больных, получающих 2 режим химиотерапии, по данным официальной статистики составляет по регионам РФ от 5 до 16% (Отраслевые и экономические показатели противотуберкулёзной работы в 2016-2017г.г./под ред. С.А. Стерликова, 2018, И.А.Бурмистрова и др., 2018). Если моноустойчивость к изониазиду не является критической, то

полирезистентность, ассоциированная с изониазидом, представляет серьёзную проблему, как в плане лечения, так и прогноза. В литературе практически не освещены вопросы особенностей клинического течения заболевания при устойчивости к изониазиду и сохранённой чувствительности к рифампицину, эффективности химиотерапии, не изучены спектры лекарственной устойчивости и тенденции формирования МЛУ МБТ на фоне устойчивости к изониазиду. Следует отметить, что несмотря на значительный исторический срок использования изониазида, он, в отличие от стрептомицина, не потерял своего значения в современных схемах химиотерапии и профилактического лечения. Это повышает актуальность диссертационного исследования.

Таким образом, диссертационное исследование содержит решение проблем, представляющих высокую актуальность для современной фтизиатрии и клинической фармакологии как в научном, так и в практическом планах.

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

Диссертация выполнена в ФГБОУ ВО Ярославский государственный медицинский университет МЗ РФ, сформирована по традиционному плану и состоит из введения, цели и задач, обзора литературы по обсуждаемой проблеме, материалов и методов, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций.

Работа выполнена на высоком методическом уровне. Автор полностью обосновал и раскрыл актуальность исследования, его научную и практическую значимость, четко обозначил цель и задачи исследования.

Цель исследования сформулирована, как повышение эффективности лечения туберкулёза с лекарственной устойчивостью возбудителя к изониазиду при сохранённой чувствительности к рифампицину путем научного обоснования эффективности и безопасности применения наночастиц серебра в эксперименте. Для достижения поставленной цели

определены 7 взаимосвязанных задач, определяющих последовательность выполнения исследования и его комплексность. Решение первых трех задач касается клинического раздела диссертации, последующие четыре задачи посвящены экспериментальному обоснованию применения в лечении лекарственно-устойчивого туберкулёза наночастиц серебра, как нового физико-химического агента противотуберкулёзного действия.

В клинической части диссертации детально разрабатывается мало освещенный в литературе туберкулёз лёгких, вызванный M. Tuberculosis (МБТ), устойчивыми к изониазиду, при сохраненной чувствительности к рифампицину. В экспериментальном разделе на модели клинических изолятов возбудителя, полученных от рассматриваемых больных, изучается эффективность применения наночастиц серебра, как нового противотуберкулёзного агента, повышающего эффективность лечения. Таким образом, оценка эффективности применения наночастиц в эксперименте может в известной степени прогнозировать возможную эффективность внедрения наночастиц серебра в практику.

Следует отметить взаимосвязь клинического и экспериментального разделов исследования, поскольку экспериментальные исследования проводились на клинических изолятах возбудителя, выделенных от изучаемых больных, что косвенно позволяет прогнозировать эффективность применения наночастиц в практической работе.

Решаемые в исследовании задачи, основные положения диссертации, выводы и практические рекомендации полностью соответствуют теме исследования. Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам. Достоверность полученных результатов подтверждается корректным использованием современных методов статистической обработки полученных данных.

Таким образом, обоснованность и достоверность результатов диссертационной работы базируется на большом клиническом и экспериментальном материале, использовании современного лабораторного

и исследовательского оборудования, объективных методах статистической обработки полученных материалов.

Достоверность и научная новизна

Диссертационное исследование Захарова А.В. обладает научной новизной. Впервые во фтизиатрии предложено и экспериментально обосновано *in vitro* и *in vivo* бактерицидное действие наночастиц серебра на МБТ, включая лекарственно-устойчивые штаммы. Автор, используя современные объективные методики, впервые *in vitro* обосновал усиление противотуберкулёзной активности основных противотуберкулёзных препаратов - изониазида и рифампицина при их совместном использовании с наночастицами серебра. Объективные данные эффективности применения наночастиц в повышении результативности лечения туберкулёза содержатся в результатах эксперимента на модели лекарственно-устойчивого туберкулёза у животных. Следует особо отметить, что впервые во фтизиатрии для оценки морфологических изменений возбудителя под влиянием противотуберкулёзных агентов использовалась атомно-силовая микроскопия, позволившая определить характер повреждения. Для получения объективных результатов исследования наряду с широким спектром лабораторных методик, применялись патоморфологические исследования.

Новые данные, позволяющие прогнозировать течение туберкулёза и повышать эффективность лечения при устойчивости возбудителя к изониазиду и сохраненной чувствительности к рифампицину, получены при анализе клинического материала. В частности, показан опережающий рост резистентности к этамбутолу в этой группе больных, при этом колебания показателя у впервые выявленных больных и повторных случаев лечения весьма незначительный, 58,1% и 61,9% соответственно ($p > 0,05$). В исследовании продемонстрировано, что более половины бактериовыделителей с исходной устойчивостью к изониазиду, в дальнейшем становятся носителями МЛУ МБТ. Автором показано, что

фиброзные полости в легких, не имеющие терапевтической перспективы, наблюдаются при устойчивости МБТ к изониазиду у 32,8% больных, при этом заживление деструкций отмечается только у 38,3% пациентов. Очевидно, что здесь имеются значительные резервы повышения эффективности химиотерапии и предлагаемые автором нанопрепараты могут сыграть существенную роль в их реализации.

Таким образом, предложенные автором наночастицы серебра с выраженной противотуберкулёзным действием, является новым направлением в повышении эффективности химиотерапии туберкулёза, в том числе с лекарственной устойчивостью возбудителя.

Результаты диссертационного исследования имеют высокую степень достоверности, что подтверждается комплексностью и значительным объемом проведенных исследований, а также использованием современных методик. Объем выполненной работы достаточен для докторской диссертации. Проведенные автором клинические исследования и полученные результаты базируются на анализе 650 материалов историй болезни бактериовыделителей с различными спектрами лекарственной устойчивости возбудителя, пролеченных в ГБУЗ ЯО «ЯОКТБ» за период 2009-2015 г.г., в том числе, 214 больных с ЛУ МБТ к изониазиду и другим препаратам, при сохранённой чувствительности к рифампицину, 221 больной – с МЛУ туберкулезом и 215 больных, выделяющих МБТ с сохранённой чувствительностью к химиопрепаратам. В работе также выделяются различные группы больных по отношению к ранее проводимому лечению (новые случаи, повторное лечение, рецидивы), что расширяет научный потенциал исследования и позволяет получить объективные данные. Экспериментальный раздел диссертации содержит результаты более 1,5 тысяч бактериологических исследований. В исследованиях *in vivo* для изучения токсичности наночастиц серебра и нанокompозита было задействовано более 400 экспериментальных животных. Достоверность диссертации повышает, как уже отмечалось, использование в исследовании

атомно-силовой микроскопии и патоморфологических методов изучения материала.

Диссертация построена по традиционному плану: изложена на 255 страницах текста компьютерного набора и состоит из 6 глав собственных исследований с изложением материалов и результатов проведенных исследований, практических рекомендаций, выводов, заключения и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 33 таблицами и 51 рисунком. Библиографический указатель содержит 164 отечественных и 273 иностранных источников. Материалы диссертации достаточно публиковались в открытой печати, докладывались на съездах и конференциях Международного и Всероссийского уровня. По теме диссертации опубликовано 42 научных работы, в том числе 14 статей в журналах, включённых в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий», рекомендуемых ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ для опубликования основных научных результатов диссертации, из них 1, входящая в международные базы данных. Имеется патент на изобретение и монография в соавторстве по теме диссертации.

Значимость результатов для развития соответствующей отрасли науки

В диссертации Захарова А.В. предлагается новое направление в решении важнейшей научно-практической проблемы современной фтизиатрии и клинической фармакологии – повышения эффективности лечения туберкулёза, в том числе с лекарственной устойчивостью возбудителя, за счет использования наночастиц серебра. Обсуждаемая диссертационная работа является многоплановым исследованием. В экспериментах *in vitro* на материале более 1,5 тыс. бактериологических посевов изучена подавляющая активность наночастиц серебра на клинические изоляты МБТ с устойчивостью к изониазиду и МЛУ штаммы. В 1 группе (изоляты с лекарственной устойчивостью к изониазиду) подавление отмечалось в 77,8% случаев, во 2 (МЛУ-штаммы) – в 73,5% ($p > 0,05$). Отсутствие статистически значимой разницы показателей может

свидетельствовать об альтернативном, физико-химическом механизме антибактериального действия. Использование наночастиц серебра в комбинации с изониазидом на штаммы возбудителя с устойчивостью к изониазиду (1 группа) и МЛУ-МБТ (2 группа) обеспечило достоверно значимый прирост по показателю бактерицидного действия (полное и значительное подавление). В 1 группе этот прирост составил 17,2% ($p < 0,05$), во 2 – 18,8% ($p < 0,05$). Однако, общее подавляющее действие комбинации наночастиц и изониазида на штаммы МБТ обеих групп также не имело статистической достоверности. Таким образом, результаты исследований *in vitro* могут свидетельствовать о независимом от спектра лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза альтернативном механизме противотуберкулёзного действия наночастиц серебра. Полученные автором результаты определения минимальной подавляющей и минимальной бактерицидной концентраций наночастиц серебра на лекарственно-устойчивые штаммы МБТ, соответственно 5 и 10 мкг/мл в изолированном варианте, и 2,5 и 5 мкг/мл при комбинированном применении с изониазидом, совпадают с данными, имеющимися в литературе (6,25 – 12,5 мкг/мл, A.Bapu, V.Rathod, 2013).

Результаты высокой противотуберкулёзной эффективности наночастиц *in vitro* подтверждаются данными, полученными автором в совместном исследовании с сотрудниками иммунологической лаборатории ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза». В данном исследовании использовались наночастицы, предоставленные специалистами Института физической химии и электрохимии им. А.Н.Фrumкина. Исследования проводились на музейном лекарственно-чувствительном штамме H37Rv и изониазид-резистентном возбудителе *M.tuberculosis* CN-40. Как показали результаты исследования, наночастицы серебра активно предотвращали рост МБТ, при этом сочетанное применения наночастиц и изониазида продемонстрировало их выраженное синергическое взаимодействие, превосходящее противотуберкулёзную эффективность

наночастиц и изониазида в отдельности. Аналогичное синергическое взаимодействие наночастицы продемонстрировали на музейный штамм H37Rv в сочетании с рифампицином. В исследованиях *in vitro* в 96-луночном круглодонном микроплате наночастиц серебра в обратных мицеллах с изониазидом против изониазид – резистентного штамма *M.tuberculosis* CN-40 было установлено аддитивное взаимодействие. При этом наночастицы подавляли рост резистентного возбудителя. Таким образом, экспериментально достоверно подтверждается выраженное ингибирующее влияние наночастиц серебра в обратных мицеллах как на музейный, лекарственно-чувствительный штамм возбудителя, так и на резистентные МБТ. При этом отчетливо отмечается синергическое взаимодействие наночастиц в обратных мицеллах и химиопрепаратов на чувствительные штаммы МБТ.

Большой интерес представляют результаты атомно-силовой микроскопии возбудителя под влиянием антибактериальных агентов. Метод атомно-силовой микроскопии во фтизиатрии является относительно новым и достаточно информативным. Автором показано что, изменения возбудителя под влиянием нанопрепаратов связаны с повреждением бактериальной стенки, при этом характер изменений совпадает с данными литературы (S.Agnihotri, S.Mukherji, S.Mukherji, 2014).

Одним из главных параметров химиотерапевтического средства является благоприятный токсикологический профиль. Исследование острой, подострой, хронической токсичности наночастиц серебра в изучаемых дозах в изолированном варианте и в комбинации с изониазидом, а также ряда других токсикологических характеристик наночастиц с использованием рекомендованных методик, включая гистологические исследования, не выявили значимых изменений в органах и системах экспериментальных животных. Вместе с тем, учитывая особые физико-химические свойства наночастиц, их повышенную реакционную активность следует предполагать высокую вероятность отрицательного действия наноагентов на органы и

системы человека, в первую очередь на ЦНС и генетический аппарат клетки. Безусловно, решение вопроса здесь будет происходить в плоскости польза/риск. Для этого необходимо дальнейшие исследования по тестированию нанопрепаратов, выбору оптимальных, малотоксичных доз.

Наиболее важным разделом диссертации является изучение химиотерапевтической эффективности наночастиц на модели туберкулёза у имбредных мышей линии Balb/c. В опыте участвовали 68 животных, в том числе у 3 мышей проводилась верификация развития генерализованного туберкулёза. В группах с лечением использовались – изониазид в дозе 50 мг/кг, наночастицы серебра как монопрепарат и наночастицы в сочетании с изониазидом. Следует учесть, что туберкулёз у животных индуцировался штаммом МБТ, устойчивым к изониазиду, рифампицину и стрептомицину. Как показали исследования, максимальная выживаемость (90%) наблюдалась при комбинированном применении наночастиц с изониазидом. Следует отметить, что наночастицы в монорежиме также обладали протективным действием – выживаемость животных составила 35%. Несмотря на устойчивость возбудителя к изониазиду, ежедневные инъекции препарата в дозе 50 мг/кг также способствовали увеличению показателя выживаемости – 40%. По результатам исследования автора, максимальная эффективность лечения по выбранным критериям (биометрические показатели, индексы бактериоскопии и высеваемости из органов-мишеней, результаты патоморфологического исследования) наблюдалась при совместном использовании наночастиц серебра и изониазида.

Таким образом, результаты эксперимента *in vivo* на модели туберкулёза у животных позволяют заключить, что наночастицы серебра оказывают противотуберкулёзное действие в монорежиме и усиливают противотуберкулёзный эффект при совместном применении с химиопрепаратом.

Основные положения диссертационного исследования используются в преподавании на кафедрах фтизиатрии, клинической фармакологии,

микробиологии с вирусологией и иммунологией ФГБОУ ВО Ярославский государственный медицинский университет МЗ РФ. Основные клинические положения диссертации используются в работе врачами ГБУЗ ЯО Ярославская областная клиническая туберкулёзная больница. По результатам исследования издана 1 монография в соавторстве, оформлен патент на изобретение.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Научно обоснованная в экспериментах *in vitro* и *in vivo* противотуберкулёзная эффективность наночастиц серебра дает основания рекомендовать их для клинического исследования. Продемонстрированная в экспериментах ингибирующая активность наночастиц серебра как на лекарственно-чувствительные, так и на резистентные штаммы, а также синергическое взаимодействие с химиопрепаратами позволяет рекомендовать их для включения в стартовые режимы химиотерапии туберкулёза с неустановленной чувствительностью возбудителя, так и в лечение больных с различными спектрами устойчивости МБТ. Научно доказанное в диссертации взаимное усиление противотуберкулёзной активности при совместном применении наночастиц с химиопрепаратами открывает перспективу повышения эффективности превентивных и противорецидивных курсов химиотерапии (дормантные формы МБТ), в том числе у больных с ВИЧ-инфекцией.

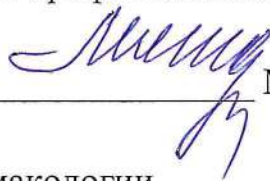
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа 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 выполненных автором многогранных исследований содержится решение важной научно-

практической проблемы – повышения эффективности лечения больных туберкулёзом с лекарственной устойчивостью возбудителя путем научного обоснования эффективности и безопасности применения наночастиц серебра в эксперименте. 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.

Диссертация и отзыв на нее обсуждены на совместном заседании кафедр фтизиатрии и фармакологии ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И.Разумовского МЗ РФ (протокол № 4/1 от 3 сентября 2019 г.).

Заведующий кафедрой фтизиатрии
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ
им. В.И. Разумовского Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор,
Почетный работник высшего профессионального образования РФ,
Заслуженный врач РФ



Морозова Татьяна Ивановна

Заведующий кафедрой фармакологии
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ
им. В.И. Разумовского Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор,



Решетько Ольга Вилоровна

410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112
телефон: (8452) 27-33-70,
E-mail: meduniv@sgmu.ru

Подписи

ЗАВЕРЯЮ:
Начальник ОК СГМУ

