

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Садыковой В.С. на диссертационную работу Маркеловой Натальи Николаевны на тему «Полиантибиотикорезистентность некоторых грамотрицательных бактерий и возможности ее преодоления с помощью эфирных масел», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.03 - микробиология»

Актуальность темы и практическая значимость работы

Внутрибольничные инфекции, называемые также нозокомиальными, являются важной причиной заболеваемости и смертности. Эпидемическому распространению ВБИ способствует формирование и широкое распространение полирезистентных к современным антибиотикам штаммов, отличающихся высокой вирулентностью и повышенной устойчивостью к воздействию факторов окружающей среды, в том числе к дезинфектантам. Внутрибольничные инфекции возглавляют грамотрицательные бактерии, которые требуют минимального количества питательных веществ и способны создавать резервуары, как на предметах больничного обихода, так и в организме больного.

Многие аспекты проблемы ВБИ являются недостаточно изученными: этиологическая структура заболеваемости различается в стационарах разного профиля, а имеющаяся информация о региональных особенностях возбудителей крайне скудна, разрознена и зачастую неактуальна. Исследование гетерогенности популяции бактерий с множественной лекарственной устойчивостью - возбудителей ВБИ необходимы для актуальной молекулярно-эпидемиологической характеристики и обоснованного прогноза эпидемиологической ситуации. Особую тревогу вызывает тот факт, что стремительное увеличение числа заболеваний, вызываемых полирезистентными штаммами, происходит на фоне очевидных трудностей в создании новых антибактериальных препаратов. Число новых антибиотиков, рекомендованных к клиническому использованию, каждый год неуклонно снижается.

В последнее десятилетие лекарственные растения и их компоненты представляют интерес как источники новых антимикробных соединений,

обладающие биологическим действием, позволяющим их рассматривать в качестве потенциальных лекарственных средств. Учитывая то, что у грамотрицательных бактерий лекарственная устойчивость к антибиотикам развивается значительно быстрее, чем у других микроорганизмов, диссертационная работа Маркеловой Н.Н., связанная с исследованием полирезистентности грамотрицательных бактерий и поиском новых антимикробных средств для преодоления их устойчивости крайне актуальна.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Целью работы Маркеловой Н.Н. было провести комплексный мониторинг грамотрицательных бактерий в среде лечебного учреждения и оценить эффективность использования эфирных масел как противомикробных препаратов.

Цель отличается конкретикой, а задачи сформулированы четко и затем успешно решены экспериментально. В работе продемонстрированы возможности современных молекулярных подходов к видовой характеристике и типированию клинических штаммов грамотрицательных бактерий, отдельные методики идентификации отработаны впервые (автором модифицированы методы определения МПК бактерий с построением кинетических моделей роста). Маркелова Н.Н. для решения поставленных задач, использовала также комплекс физико-химических и биохимических методов (газожидкостной хроматографии, МАЛДИ – масс - спектрометрии и др.), который указывает на многопрофильный профессиональный уровень подготовки диссертанта.

Результаты исследований подробно обработаны статистически, в том числе с применением методов математической статистики и теории вероятности.

Полученные диссертантом выводы обоснованы и достоверны, опираются на анализ обширного экспериментального материала и существующую методологическую базу. Помимо выводов, Маркеловой Н.Н. в заключении представлены практические рекомендации на основании полученных результатов микробиологического мониторинга, в частности алгоритм бактериологической диагностики, учитывающий степень неоднородности бактериальных популяций в стационаре, который является

один из важнейших прикладных аспектов данной работы. Также в ходе работы существенно дополнены представления о возможностях анализа антимикробной активности эфирных масел с помощью кинетической модели роста.

Результаты работы имеют значение для решения ряда теоретических вопросов клинической микробиологии, однако в большей степени представляют практическую ценность и направлены на прикладное использование. Предложенные автором методические решения делают реальным их использование в практических лабораториях для характеристики локальной (сезонной, возрастной) структуры популяции/субпопуляции возбудителей и идентификации циркулирующих в лечебных учреждениях штаммов или групп штаммов резистентных грамотрицательных бактерий.

Оценка новизны и достоверности

С использованием комплекса современных лабораторных тестов изучены внутрибольничные штаммы грамотрицательных бактерий являющихся основными возбудителями инфекций. Впервые соискателем на основе бактериологического мониторинга выявлены экологические и физиолого-биохимические особенности внутрибольничных изолятов грамотрицательных бактерий, показана определенная видовая специализация, в зависимости от пола и возраста инфицированных людей, а также сезонная специфика возникновения очагов инфекции. Установлено, что *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* - основные возбудители внутрибольничных инфекций в системе бактериального видового состава лечебных учреждений. Общими чертами для этих бактерий являлись способность к неспецифической колонизации биотопов пациентов и выделение их из очагов воспаления в виде монокультур или ассоциаций между собой.

Проведен фенотипический и молекулярно-генетический анализ антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий стационара, предложены и апробированы дополнительные критерии для их микробиологической характеристики, а также разработана система комплексной оценки антибиотикоустойчивости штаммов. Получены новые данные об антибиотикорезистентных субпопуляциях *Acinetobacter baumannii*, которые представляют собой 3 морфологических типа, несущих ген β -

лактамазы типа ОХА-40 и различаются по чувствительности к нетилмицину, тобрамицину, тигециклину и *Pseudomonas aeruginosa*, несущих ген металлолактамазы.

Важным и обладающим элементами новизны являются результаты по антимикробной активности эфирных масел розы крымской, эвкалипта, мяты, лаванды и отдельных соединений – спиртов, выделенных из этих комплексов. На кинетической модели роста в модифицированной методологии показана зависимость кривой роста от концентрации эфирных масел. Впервые установлено антибактериальное действие эфирных масел и их компонентов в отношении грамотрицательных полирезистентных изолятов видов *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и определены минимальные подавляющие концентрации: 1,95 мкл/мл для эфирного масла розы крымской в отношении всех тест-объектов; 0,97 мкл/мл для эвкалипта – *Acinetobacter baumannii*; 0,24 мкл/мл для цитраля – *Stenotrophomonas maltophilia*.

В **Главе 1** (литературный обзор) дана современная таксономическая классификация грамотрицательных бактерий видов *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, особенности их микроморфологии и факторы вирулентности. Описаны механизмы антибиотикоустойчивости бактерий, а также пути их преодоления. Обзор выполнен на основании 213 литературных источников, подавляющее большинство из которых – иностранные.

В **Главе 2** (Материалы и методы исследования) подробно описаны объекты и методология проводимых автором исследований. Автором грамотно продуман набор современных молекулярных методов, позволяющий не только определить видовую идентификацию бактерий, вызывающих ВБИ в разных отделениях стационаре, но и провести их молекулярно-генетический анализ генов резистентности резистентности госпитальных штаммов с помощью ПЦР в реальном времени.

В **Главах 3 -5** отражены основные результаты исследования.

В **Главе 3** изучен бактериальный профиль хирургических и реанимационных отделений стационара, определены доминирующие патогены, их сезонность и приуроченность к определенным биотопам. Показано, что госпитальные популяции *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* неодинаковы. Так *A. baumannii* и *S. maltophilia*

более однородны по биохимическим свойствам, чем популяции *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*.

В **Главе 4** исследована чувствительность внутрибольничных штаммов к широкому спектру применяемых антибиотиков разной химической природы и установлена гетерогенность популяций. Полирезистентность развивается в условиях больничного комплекса за счет селекции антибиотикоустойчивых бактерий, обладающих различными механизмами резистентности.

В **Главе 5** проведена оценка антимикробного действия эфирных масел, их индивидуальных компонентов, а также композиций ЭМ с антибиотиками, применяемыми в клинической практике для лечения инфекций, вызываемых изучаемыми видами грамотрицательных бактерий. Сравнительная оценка биологической активности масел позволила выявить образцы с широким спектром противомикробной активности и избирательно воздействующие на определённые виды устойчивых к антибиотикам грамотрицательных бактерий.

Результаты исследований и основные положения диссертационной работы достаточно широко представлены в 17 публикациях (в том числе пяти статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и двух в зарубежных изданиях) и неоднократно обсуждались на научных конференциях различного уровня. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

Однако, несмотря на несомненные многочисленные достоинства работы, имеются некоторые замечания и уточнения:

1. Из главы 2 (методики) не ясно, как именно проводилась стандартизация вносимых доз эфирных масел при использовании диско-диффузионного метода на твердых питательных средах, который, по литературным данным, считается неточным для определения бактерицидного действия эфирных масел и их составляющих. Содержащиеся в составе эфирных масел летучие компоненты могут испаряться во время инкубации, что делает очень трудной для стандартизации оценку их действия. Различные способы дисперсии различных масел в питательной среде могут также способствовать погрешностям.

2. В диссертационной работе отсутствуют испытания на токсичность изучаемых эфирных масел и рекомендуемых соискателем композиций на теплокровных животных и даже на клетки млекопитающих. Между тем, несмотря на то, что эфирные масла относятся к классу малотоксичных соединений, по литературным данным известно, что некоторые компоненты, например, цитраль могут связываться с белками сыворотки крови животных, вызывая острую токсичность и гибель в концентрации 5,6 г/кг. Кроме того, имеются сведения, что такие альдегиды как ментол, цитраль оказывают местнораздражающее действие и вызывают аллергические ожоги на коже людей.
3. Несмотря на заявленную как практическая значимость (соискателем сочетания антибиотиков- β -лактамов и аминогликозидов с эфирными маслами (синергетические комбинации масел мяты и др.) не совсем понятно, как именно планируется применять совместно рекомендуемые синергетические комбинации эфирных масел и антибиотиков: наружно в качестве антисептиков или другими способами (например, традиционно используемая для эфирных масел ингаляционная терапия)? Следовало бы указать конкретно в практических рекомендациях способы использования таких композиций.

Отмеченные небольшие замечания ни в коей мере не снижают качества диссертационного исследования и полученных результатов, не влияют на общую оценку работы и носят рекомендательный характер.

Заключение

Диссертация Маркеловой Натальи Николаевны

«Полиантибиотикорезистентность некоторых грамотрицательных бактерий и возможности ее преодоления с помощью эфирных масел», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.03 - микробиология», по актуальности темы, современному методическому уровню экспериментов, научной новизне и практической значимости результатов, объему выполненных исследований, в которых

получены научно-обоснованные и статистически достоверные данные о видовом составе и является законченной научно-квалификационной работой. Работа имеет существенное значение для расширения знаний в медицинской микробиологии и соответствует критериям, предъявляемым в п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Маркелова Н.Н. заслуживает присуждения ученой степени кандидата наук по специальности «03.02.03 - микробиология».

Ведущий научный сотрудник
лаборатории химических исследований
биологически активных соединений
микробного происхождения,
доктор биологических наук,



В.С. Садыкова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»
РАН

Подпись д.б.н., доцента Садыковой В.С. заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИНА»

к.ф.н.



В.И. Пономаренко

СВЕДЕНИЯ

**об официальном оппоненте по диссертационной работе Маркеловой Натальи Николаевны
«Полиантибиотикорезистентность некоторых грамотрицательных бактерий и возможности её преодоления с
помощью эфирных масел», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03. - Микробиология.**

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Учёная степень	Шифр специальности	Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет
Садыкова Вера Сергеевна	Российская Федерация	ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе РАН», ведущий научный сотрудник лаборатории химического изучения биологически активных соединений микробного происхождения	Доктор биологических наук	03.02.12 – микология 03.01.06 – биотехнология	<p>1. Kurakov A.V., Xidirov K.S., Sadykova V.S., Zvyagintsev D.G. Anaerobic growth ability and alcohol fermentation activity of microscopic fungi // Applied biochemistry and microbiology, 2011, Vol. 47, № 2, pp 169-175</p> <p>2. Sadykova V.S., Kurakov A.V., Kuvarina A.E., Rogoznin E.A. Antimicrobial activity of fungi strains of Trichoderma from Middle Siberia/Applied Biochemistry and Microbiology, 2015, Vol. 51, No. 3, pp. 355–361</p> <p>3. Кураков А.В., Коршун В.А., Рогожин Е.А., Громовых Т.И., Куварина А.Е., Баранова А.А. Антимикробная активность штамма <i>T. citrinoviride</i> ВКПМ F - 1228: оптимизация лабораторного культивирования и оценка спектра действия индивидуальных пептаиболов/ Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т 60 № 11 - 12 - С. 3 - 8</p> <p>4. Садыкова В.С., Кураков А.В., Лихачев А.Н., Якушев А.В. Видовой состав и распространение грибов рода <i>Trichoderma</i> в наземных экосистемах бассейна реки Енисей /Микология и фитопатология. 2013. Т.47. Вып.6. С. 389 – 396</p>

					<p>5. Громовых Т.И., Садыкова В.С., Алимова Ф.К. Микромицеты рода <i>Trichoderma</i> Pers.: Научное обоснование использования в технологиях агропромышленного комплекса, 2014. – М.МГУПП. – 189 с.</p> <p>6. Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина А.Е. Рогожин Е.А. Антимикробная активность штаммов грибов рода <i>Trichoderma</i> из Средней Сибири/Прикладная биохимия и микробиология, 2015, Т. 51 № 3. – С. 1-9</p> <p>7. Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина А.Е., Тюрин А.П., Рогожин Е.А., Коршун В.А. Образование штаммом <i>TRICHODERMA CITRINOVIRIDE</i> ТУVI 4/11 антибиотиков пептаиболов /Проблемы медицинской микологии. 2015. Т. 17. № 1. С. 41-46.</p> <p>8. Садыкова В.С., Кураков А.В., Лысенко А.Е. Антимикробная активность видов <i>T. asperellum</i>, <i>T. citrinoviride</i>, <i>T. harzianum</i>/ Успехи медицинской микологии. 2013. Т. 11. С. 365-367</p> <p>9. Лысенко А.Е., Кураков А.В., Садыкова В.С. Поиск антимикотиков среди представителей грибов рода <i>Trichoderma</i>/Успехи медицинской микологии. 2014. Т. 12. С. 417-418</p> <p>10. Громовых Т.И., Айрапетова А.Ю., Ковалева Г.К., Гаврилин М.К Биотехнология мицелия штамма ТУV – 2006 <i>Fomitopsis officinalis</i> – продуцента</p>
--	--	--	--	--	---

					агаарициновой кислоты/ Naukova Prestrzen Europy, 2014.V 32. - PP 74 – 81 11. Sadykova V.S.,Inzhevatkin E.V., Zubareva E.S., Gromovykh T.I., Svirshevskaya E.V. Antitumor activity of Trichoderma metabolites and extracts //Nauka i studia. 2012.-№10 (55), p.17 – 25
--	--	--	--	--	--

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории
 химических исследований биологически активных соединений микробного происхождения,
 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
 имени Г.Ф. Гаузе РАН»
 119021, г. Москва, Б. Пироговская, д.11, стр.1
 02.03.2016 г.

В.С. Садыкова

Список научных трудов Садыковой В.С. заверяю
 Ученый секретарь ФГБНУ «НИИНА», к.ф.н.



В.И. Пономаренко