

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе  
ФГАОУ ВО РНИМУ

им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Профессор РАН

Д.В. Ребриков



» 2023 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Козлова Андрея Владимировича «Клинико-лабораторная оценка инфекционных осложнений, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями у пациентов с муковисцидозом» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: **3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, 1.5.11. Микробиология**

### Актуальность темы выполненной работы

Муковисцидоз или кистозный фиброз является наиболее часто встречаемым наследственным заболеванием и остается значимой медико-социальной проблемой. Вследствие появления таргетной терапии, внедрения в практику новых методов диагностики, лечения и профилактики произошло значительное увеличение продолжительности жизни пациентов с муковисцидозом во всем мире, и в том числе в Российской Федерации. Тем не менее, следует отметить, что именно инфекционные осложнения в нижних дыхательных путях, вызванные преимущественно неферментирующими грамотрицательными микроорганизмами, остаются основной причиной смертности среди больных муковисцидозом. Распространение таких патогенов, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans* и бактерий *Burkholderia cepacia* complex, а также появление новых микроорганизмов, роль которых в развитии осложнений инфекционно-воспалительного характера у больных муковисцидозом пока не установлена, но возможна, актуализирует необходимость регулярного микробиологического

мониторинга с оценкой видового разнообразия возбудителей в данной группе пациентов.

Микробиологические исследования являются важным звеном медицинской помощи больным муковисцидозом. Так, регулярный посев мокроты или отделяемого носоглотки позволяет выделить и идентифицировать потенциального возбудителя, оценить его количество и клиническую значимость для пациента, провести тесты на чувствительность к антимикробным препаратам и предопределить эрадикационную терапию. Однако, зачастую, инфекционно-воспалительный процесс в легких больных муковисцидозом характеризуется хроническим течением с периодическими обострениями, сопровождающимися резким ухудшением состояния пациента. В связи с этим, актуальным становится поиск новых критериев, позволяющих оценить тяжесть течения инфекционно-воспалительного процесса в легких больных муковисцидозом. Также в современной медицине является перспективным направлением разработка и внедрение методов превентивного и персонализированного подхода, позволяющего предупредить ухудшение состояния пациента. Так, при работе с больными муковисцидозом оценка изменения количества железа и железосвязывающих белков в мокроте может служить предиктором обострения инфекционного процесса, однако, ввиду отсутствия критериев интерпретации полученных результатов, необходимым становится также разработка критериев оценки изменения данных аналитов для каждого пациента персонально. Для решения данной задачи необходимо применение методов клинической лабораторной диагностики, а исследование искомых лабораторных показателей должно быть валидировано, общедоступно, с возможностью проведения в короткий срок.

Таким образом, диссертационное исследование Козлова Андрея Владимировича, посвященное клинико-лабораторной оценке инфекционных осложнений, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями у пациентов с муковисцидозом, является актуальным и перспективным.

## **Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и практических рекомендаций**

Научная новизна представленной работы не вызывает сомнений. На основании анализа литературы, автором предложено использование показателей обмена железа в мокроте, а именно определение количества свободного железа, ферритина и трансферрина с помощью биохимических методов исследования. Для осуществления этого был разработан и предложен метод преаналитической подготовки образцов мокроты для последующего биохимического анализа.

Впервые валидированы методики биохимического исследования для определения содержания железа, ферритина и трансферрина в мокроте. По результатам валидации автором рассчитаны коэффициенты критической разницы для данных показателей, что позволяет оценить клиническую значимость их изменений при динамическом наблюдении.

В диссертационном исследовании Андрея Владимировича показано значение железа для метаболизма неферментирующих грамотрицательных бактерий. В экспериментальной части работы доказано, что добавление органической соли железа при приготовлении плотных питательных сред повышает показатель их продуктивности. На основании этого автором была разработана питательная среда для выделения и культивирования бактерий из *Burkholderia cepacia* complex.

По результатам работы Андрея Владимировича даны практические рекомендации для специалистов клинико-диагностических лабораторий, пульмонологов, педиатров и бактериологов. Новизна и оригинальность методик, использованных автором при проведении исследований, подтверждается тремя патентами РФ на изобретения.

## **Достоверность результатов проведенных исследований, научных положений, выводов и рекомендаций**

Диссертация Андрея Владимировича Козлова является законченной научно-квалификационной работой. В ней четко отражены и обоснованы

актуальность, научная новизна и практическая значимость проведенного исследования.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли подтверждение в сделанных выводах, которые отвечают поставленным в исследовании цели и задачам.

Достоверность результатов работы определяется использованием обоснованных, комплексных, современных методов к проведению микробиологических и лабораторно-диагностических исследований. Достаточный объем выборки и использование актуальных методов статистической обработки полученных результатов позволяют считать научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертации обоснованными.

Материалы диссертации обсуждены на 9 международных и всероссийских конференциях, что свидетельствует о всестороннем анализе материалов работы российскими и зарубежными специалистами.

### **Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы**

Представленная диссертационная работа обладает несомненной теоретической и практической значимостью. Результаты, представленные Козловым А.В. расширяют возможности методологии проведения биохимических исследований различного биологического материала. По результатам серии лабораторных экспериментов автором разработан алгоритм стандартизации преаналитического этапа для последующего биохимического анализа мокроты, а также проведен комплекс валидирующих мероприятий для подтверждения достоверности полученных результатов исследования.

В работе Козлова А.В. показана практическая значимость регулярного мониторинга микробиологического статуса пациентов с муковисцидозом. Так, установлено, что большая часть (51%) микроорганизмов из группы неферментирующих грамотрицательных бактерий были представлены клинически значимыми патогенами *Burkholderia cepacia* complex, что

подчеркивает необходимость проведения быстрого и качественного микробиологического исследования.

В экспериментальной части диссертационной работы автором проведены расчеты и определены коэффициенты персональной разницы для ферритина в мокроте, что позволяет врачу-клиницисту персонализировано оценить динамику течения инфекционно-воспалительного процесса в легких у больных муковисцидозом.

Практические рекомендации по клинико-лабораторной оценке инфекционных осложнений, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями у пациентов с муковисцидозом представляют материал для повседневной работы врачей клинико-диагностических и микробиологических лабораторий и могут быть использованы врачами клинических специальностей, при определении клинической значимости изменения показателей обмена железа в мокроте. Данный факт подтверждается внедрением данных рекомендаций в учебный процесс и их использованием в научно-исследовательской деятельности кафедр медицинских университетов, а также использованием в практической деятельности клинико-диагностических и микробиологических лабораторий Самарской области.

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертационное исследование изложено на 160 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, который включает 26 отечественных и 132 зарубежных библиографических источников. В работе содержится 20 таблиц и 29 рисунков.

Во введении обосновывается актуальность темы, цель и задачи исследования, приводится научная новизна и практическая значимость работы, формулируются положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящен подробному анализу отечественных и зарубежных источников по изучаемой проблеме. Излагаются современные данные об этиологии и распространенности муковисцидоза, описан патогенез развития инфекционных осложнений в легких больных муковисцидозом, дана информация о роли железа в метаболизме неферментирующих грамотрицательных бактерий, приведены данные об опыте определения различных метаболитов в мокроте.

Глава «Материала и методы» включает описание современных лабораторных и микробиологических методов исследования, использованных в работе и подтверждающих достоверность полученных результатов.

В 3 главе описывается видовая структура микробиоты, выделенной в ходе исследования из нижних дыхательных путей больных муковисцидозом Самарской области. Автором проводится разделение выявленных микроорганизмов на группы по степени клинической значимости, отдельно проанализирована доля неферментирующих грамотрицательных бактерий и распространенность патогенов, представляющих наибольшую опасность для пациентов с муковисцидозом.

Глава 4 посвящена проведению валидации методик биохимического исследования мокроты. Поэтапное выполнение валидирующих мероприятий позволило оценить приемлемость определения показателей обмена железа в мокроте с использованием биохимического анализатора и гарантировать достоверность полученных результатов.

В главе 5 автором приведены результаты биохимического исследования мокроты и сыворотки крови с определением показателей обмена железа, параллельно с которым проводился бактериологический посев мокроты. Отмечены высокие значения свободного железа и ферритина в мокроте и тенденция к снижению этих показателей в сыворотке крови у пациентов с муковисцидозом, в посевах у которых были выделены неферментирующие грамотрицательные бактерии.

Глава 6 посвящена оптимизации микробиологических исследований материала от пациентов с муковисцидозом. Описаны этапы приготовления и результаты испытания разработанной автором селективной питательной среды с железосодержащей добавкой. Автором показано, что добавление железа (III) гидроксида полимальтозата сокращает сроки культивирования и не влияет на видовую идентификацию методом MALDI-ToF масс-спектрометрии представителей *Burkholderia cepacia* complex.

Заключение содержит обсуждение полученных результатов, выводы конкретно и четко дают ответы на вопросы, поставленные в цели и задачах диссертационного исследования. Практические рекомендации обоснованы и являются логическим итогом работы.

### **Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Полученные Козловым А.В. в ходе выполнения работы результаты, свидетельствуют о возможности использования в клинико-лабораторной практике мокроты в качестве биологического субстрата для биохимического анализа. В частности, автором показано, что предварительное проведение преаналитической пробоподготовки и комплекса валидирующих мероприятий позволяет проводить определение свободного железа, ферритина и трансферрина в мокроте.

Определение коэффициента персональной разницы с помощью полученных значений ферритина в мокроте может служить для врачей клинического профиля (врач-педиатр, врач-пульмонолог) дополнительным критерием в оценке тяжести течения инфекционного процесса в респираторном тракте больных муковисцидозом.

При микробиологических исследованиях использование ростовой добавки для агаризованных питательных сред в виде железа (III) гидроксида полимальтозата позволяет сократить сроки культивирования патогенов *Burkholderia cepacia* complex при работе врачей-бактериологов с клиническим материалом от пациентов с муковисцидозом.

Материалы диссертации можно использовать при подготовке учебных пособий и методических документов для студентов, ординаторов и врачей.

### **Замечания и вопросы**

Принципиальных замечаний по дизайну и структуре диссертационного исследования Козлова Андрея Владимировича нет. В работе имеются единичные стилистические ошибки, которые не влияют на научную и практическую ценность проведенного исследования представителей.

### **Заключение**

Диссертация Козлова Андрея Владимировича на тему: «Клинико-лабораторная оценка инфекционных осложнений, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями у пациентов с муковисцидозом», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, 1.5.11. Микробиология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований решена актуальная задача поиска новых клинико-лабораторных показателей для оценки тяжести течения инфекционно-воспалительных процессов, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями, что имеет существенное значение в лабораторной и микробиологической диагностике инфекционных осложнений в легких больных муковисцидозом.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов, диссертационное исследование соответствует требованиям, установленным пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018 № 1168 с изменениями от 26.05.2020), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, 1.5.11. Микробиология.

Отзыв о научно-практической значимости диссертационной работы Козлова Андрея Владимировича заслушан, обсужден и одобрен на заседании кафедры клинической лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации «15» мая 2023 года (протокол №3).

Заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФДПО  
ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
доктор биологических наук профессор



С.Н. Щербо

Заведующий лабораторией молекулярной микробиологии  
ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
доктор медицинских наук



И.В. Чеботарь

«15» мая 2023 г.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 4  
Тел.: +7 (495) 434-05-43,  
E-mail: [rsmu@rsmu.ru](mailto:rsmu@rsmu.ru)  
официальный сайт организации: <https://rsmu.ru/>

