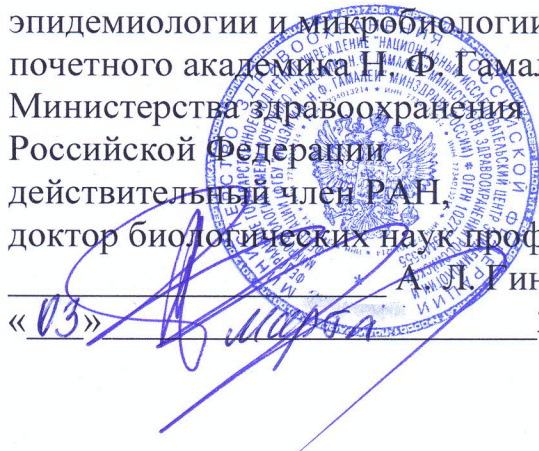


УТВЕРЖДАЮ

Директор федерального
государственного бюджетного
учреждения
«Национальный исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии имени
почетного академика Н. Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
действительный член РАН,
доктор биологических наук профессор
А. Л. Гинцбург
«03» _____ 2025 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

на основании решения заседания отдела медицинской микробиологии и отдела бактериальных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация «Разработка экспериментальной модели сепсиса для оценки эффективности лекарственных средств» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский

центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Черкасова Мария Николаевна, 1991 года рождения, гражданство РФ, окончила ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации в 2015 году по специальности «Медико – профилактическое дело». В 2015–2016 году проходила интернатуру по специальности «Эпидемиология». В 2018 году прошла курс профессиональной переподготовки по специальности «Бактериология».

Была прикреплена с 01.07.2021 г. по 21.02.2025 г. для подготовки и защиты кандидатской диссертации по специальностям 1.5.11 Микробиология и 1.5.22 Клеточная биология к лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов № 4/13/2024 – 58 от 26.12.2024 г. выдана ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

С 2016 года работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации по настоящее время.

Научные руководители:

Жуховицкий Владимир Григорьевич - кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник (ученое звание); ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения

«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Боровая Татьяна Геннадьевна - доктор медицинских наук, профессор, член - корреспондент РАН; главный научный сотрудник лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Текст диссертации был проверен в системе «Антиплагиат» и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

По итогам обсуждения диссертационного исследования «Разработка экспериментальной модели сепсиса для оценки эффективности лекарственных средств», представленного на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.22. Клеточная биология, принято следующее заключение:

- **Оценка выполненной соискателем работы**

Диссертационная работа Черкасовой Марии Николаевны на тему «Разработка экспериментальной модели сепсиса для оценки эффективности лекарственных средств» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 1.5.1. Микробиология и 1.5.22. Клеточная биология является законченной научно – квалификационной работой, содержит новое решение актуальной проблемы – адекватного моделирования септического процесса и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Работа посвящена разработке экспериментальной модели перитонеального синегнойного сепсиса мышей и оценке возможности её использования для оценки эффективности лекарственных средств, направленных на купирование септического процесса.

- **Актуальность темы диссертационного исследования**

Проблема сепсиса сохраняет свою актуальность как для теоретической медицины, так и для практического здравоохранения. По оценкам экспертов ВОЗ, ежегодная заболеваемость сепсисом составляет, в среднем, 838 случаев на 100 тыс. человек (Reinhart K. et al., 2017); при этом, смертность от сепсиса составляет в разных странах от 17,5% до 64,5% (Гоманова Л.И., Бражников А.Ю., 2021). В период с 1990 по 2017 гг. в мире было зарегистрировано около 48,9 случаев сепсиса, 11 миллионов из которых закончились летальным исходом (Rudd K.E., 2020). В РФ отсутствуют крупные исследования, направленные на оценку заболеваемости сепсисом и смертности от него (Руднов В.А. и соавт., 2011). По результатам исследований, проведенных на базе ОРИТ стационаров Санкт-Петербурга, частота встречаемости сепсиса составляла 35 на 100 больных ОРИТ в 2006–2007 гг. и 15 – в 2015 г. (Захватова А.С. и соавт., 2015). Анализируя заболеваемость сепсисом и смертность от него, можно выявить негативную динамику последних лет, которая характерна для США и большинства стран Европы и Азии (Тюрин И.Н. и соавт., 2019). При этом, значительная доля заболеваемости сепсисом приходится на случаи, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), применением цитостатиков в онкологии, иммуносупрессивной терапии в трансплантологии, лечении системных заболеваний (O'Neill J., 2014).

Для объяснения патогенеза сепсиса, своевременного его выявления и диагностики ранних стадий, а также эффективного лечения международное академическое сообщество неоднократно пересматривало и обновляло определение сепсиса (Gary T., 2016). Если первая Согласительная Конференция «Сепсис-1» (1991) выделяла 4 стадии развития септического процесса, то современная концепция «Сепсис-3» (2016) различает лишь сепсис и септический шок, дифференцирующиеся по клиническим и лабораторно-инструментальным критериям (Bone R.C., 1992; Gül F., 2017). При этом, несмотря на проведение несколько Консесусных конференций, до сих пор не

удается дать универсального определения термина «сепсис», как не удаётся установить надёжные морфологические его критерии (Levy M.M., 2001).

Наряду с клиническими, инструментальными и клинико-лабораторными исследованиями, одним из приоритетных направлений изучения мультидисциплинарной проблемы сепсиса является экспериментальное моделирование. Среди существующих разновидностей моделей сепсиса различают инъекционные, хирургические, ожоговые, респираторные модели, каждая из которых имеет свои достоинства и ограничения (Lewis A.J., 2016; Murando F., 2019).

Одним из наиболее часто встречающихся в условиях многопрофильного стационара патогенных микроорганизмов является *Pseudomonas aeruginosa* – синегнойная палочка (Liao C., 2022; Morin C.D., 2021), входящая в состав группы ESKAPE наряду с такими патогенными, характеризующимися множественной устойчивостью к антибактериальным средствам, микроорганизмами, как *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter* spp. Данная группа бактерий отнесена ВОЗ к “критической” группе патогенов, для борьбы с которыми требуется создание новых эффективных антибиотиков (Qin S., 2022).

Клинические изоляты *Pseudomonas aeruginosa*, с высоким коэффициентом постоянства встречающиеся при бактеремии, характеризуются выраженным патогенным потенциалом – в частности, наличием широкого спектра экзотоксинов (A, U, S, T, Y), большинство из которых являются эффекторными белками системы секреции III типа (Horna G., 2021). Вместе с тем, патогенный потенциал каждого отдельного штамма складывается не только из комбинации собственных ему экзотоксинов (Лазарева А.В., 2015; Шеремет А.Б., 2020; Morin C.D., 2021) но и протеолитических ферментов, сидерофоров, экзолизина, липаз, белков, индуцирующих апоптоз, пигментов и др. (Pendleton J.N., 2013; Qin S., 2022), Представительный набор факторов патогенности в сочетании с высоким уровнем приобретённой антибиотикорезистентности делает *Pseudomonas aeruginosa* практически неуязвимой для действия

бактериостатических и бактерицидных препаратов, а в случае развития сепсиса с высокой вероятностью обуславливает летальный исход. Поскольку в рамках экспериментальных моделей сепсиса значительно (по сравнению с клиническими исследованиями) расширяются возможности анализа, *Pseudomonas aeruginosa* может рассматриваться как кандидатный микроорганизм для моделирования септического процесса – в частности, в рамках модели перитонеального сепсиса мышей.

Диссертация выполнена в соответствие с плановой научной тематикой лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России в рамках следующих Государственных заданий: «Механизмы системной воспалительной реакции и пути её коррекции при сепсисе» (2016-2018 гг.), «Разработка препарата для патогенетической терапии септических состояний при геморрагических лихорадках различной природы» (2017-2019 гг.), «Изучение молекулярных механизмов вирулентности условно-патогенных возбудителей инфекционных заболеваний для создания лечебно-профилактических биопрепаратов с использованием хромосомной инженерии прокариотических и эукариотических микроорганизмов» (2021-2023).

• **Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации**

Автор самостоятельно спланировал исследование, разработал дизайн и протоколы экспериментов, определил сроки их выполнения, осуществил подбор штаммов Ра и их фенотипическую и генотипическую характеристику, разработал экспериментальную модель сепсиса, выполнил бактериологические, молекулярно-биологические, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, морфометрические, электронномикроскопические исследования. Автором самостоятельно разработана схема введения лекарственного средства Астрабионорм и оценка его эффективности, а также статистическая обработка и анализ результатов исследования.

- **Степень достоверности результатов проведенных исследований**

Необходимый уровень достоверности и обоснованность полученных результатов подтверждены достаточным количеством животных, экспериментов и наблюдений, проведенных с использованием современных методов, соответствующих поставленным цели и задачам. Полученные в результате работы данные были статистически обработаны методами, позволяющими проводить анализ данных в биологических исследованиях. Представленные в диссертации научные положения, обсуждения результатов и выводы обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Для сравнительного анализа привлечено достаточное количество данных отечественной (19 источников) и зарубежной (250 источников) литературы.

Отмеченное выше позволяет считать полученные результаты достоверными, сделанные выводы обоснованными и вытекающими из результатов проведенных исследований.

Фактический материал, проанализированный в диссертации полностью соответствует первичной документации.

- **Научная новизна результатов проведенных исследований**

Впервые разработана надёжно воспроизводимая модель синегнойного сепсиса способом внутрибрюшинного заражения мышей разными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* клинического происхождения, различающимися по присутствию генов экзотоксинов U и S, набору факторов вирулентности, механизму цитотоксического эффекта. Впервые исследована и сопоставлена динамика высевок возбудителей сепсиса из перитонеальной жидкости, крови и гомогенатов печени, почек, легких, селезенки, надпочечников в ходе развития септического процесса вплоть до терминальной стадии; установлен факт раннего обсеменения бактериями упомянутых органов. Доказана целесообразность ранней бактериологической диагностики bacteremii при синегнойном сепсисе.

Впервые охарактеризованы детали и различия гистологических изменений исследованных органов в зависимости от штаммовой принадлежности возбудителя синегнойного сепсиса. В обеих моделях в тканях надпочечников выявлена высокая оптическая плотность мРНК провоспалительных цитокинов (интерлейкина-1-бета, интерлейкина-6, фактора некроза опухоли) наряду с деструкцией клеток столбчатой части пучковой зоны, производящей кортикостероиды, тенденцией к снижению площади и гибели клеток клубочковой зоны, производящей провоспалительные минералкортикоиды, деструкцией и дегрануляцией клеток мозгового вещества.

Впервые доказано эффективное (практически полное) подавление в условиях *in vitro* лекарственным средством под условным лабораторным названием «Астрабионормом» подвижности и размножения *Pseudomonas aeruginosa*, а в условиях *in vivo* – эффективность терапии экспериментального синегнойного сепсиса мышей, вызванного *Pseudomonas aeruginosa* при отсутствии токсического эффекта «Астрабионорма» как в зонах введения, так и для организма животных в целом.

- **Практическая значимость проведенных исследований**

Доказанная возможность высева *Pseudomonas aeruginosa* из крови инфицированных животных уже в первые 15 минут после инфицирования обосновывает целесообразность проведения бактериологического исследования крови в самые ранние сроки развития сепсиса – даже при отсутствии выраженных клинических проявлений. Полученные данные о гистологических изменениях органов дополняют существующие представления о патогенезе сепсиса как полиорганной патологии, детализируют патогенетические особенности сепсиса в зависимости от свойств штамма *Pseudomonas aeruginosa* – в частности, от наличия генов *exoU* и *exoS*.

Доказанная эффективности лечения экспериментального синегнойного сепсиса мышей лекарственным средством под условным внутрिलाбораторным названием «Астрабионорм», действующим началом которого являются

микродозы альдегида муравьиной кислоты, открывает перспективу дальнейшего исследования влияния «Астрабионорма» на развитие септического процесса, а также на возможность использования его в клинической практике.

Результаты исследования внедрены в экспериментальную практику научно-исследовательских лабораторий, исследующих патогенетические закономерности сепсиса, а также в учебный процесс факультетов повышения квалификации врачей разных специальностей.

- **Ценность научных работ соискателя ученой степени**

Результаты, полученные по разработке экспериментальной модели сепсиса, позволят применять ее для изучения патогенеза сепсиса, а также для апробирования лекарственных препаратов.

Положительные результаты лечения «Астрабионормом» мышей с экспериментальным сепсисом, позволяют рекомендовать дальнейшее изучение терапевтического эффекта этого препарата на основе сверхмалых доз альдегида муравьиной кислоты, в практическом здравоохранении.

- **Внедрение результатов диссертационного исследования в практику**

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии имени академика З.В. Ермольевой ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России: используются в лекционном курсе по медицинской микробиологии; включены в учебные планы циклов для подготовки ординаторов, циклов профессиональной переподготовки и повышения квалификации врачей по направлению «Бактериология».

Методические материалы внедрены в цикл лекций по изучению патогенеза сепсиса на кафедре инфектологии и вирусологии ИПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России («Сеченовского Университета»).

Методические рекомендации по разработке экспериментальной модели сепсиса внедрены в исследовательскую практику лаборатории биологически активных наноструктур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

- **Этическая экспертиза научного исследования в Локальном этическом комитете (по медицинским и фармацевтическим наукам)**

Работа с лабораторными животными была одобрена комитетом по биомедицинской этике Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол № 66 от 31 октября 2023 г.).

- **Научная специальность, которой соответствует диссертация**

Научные положения диссертации соответствуют паспортам специальностей 1.5.11 – Микробиология и 1.5.22 – Клеточная биология. Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 4, 6 и 12 паспорта специальности «Микробиология» и пунктам 1 и 22 паспорта специальности «Клеточная биология».

- **Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем**

Основные положения диссертации изложены автором в 7 печатных работах, 4 статьи и 1 тезисы из которых опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации основных научных результатов диссертаций.

- **Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на научных конференциях:**

- 25-й Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей», (Санкт-Петербург, 2021);
- VII Российском конгрессе лабораторной медицины (РКЛМ) – (Москва, 2021);
- IX Всероссийский съезд анатомов, гистологов, эмбриологов России с международным участием «Фундаментальная и прикладная анатомия в 21 веке» (Оренбург, 2025).

Заключение совместной научной конференции отдела медицинской микробиологии и отдела бактериальных инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

1. Представленная диссертационная работа Черкасовой Марии Николаевны соответствует всем требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335, от 20 марта 2021 года №426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

2. Рекомендовать представить диссертационную работу Черкасовой Марии Николаевны «Разработка экспериментальной модели сепсиса для оценки эффективности лекарственных средств» после внесения исправлений в соответствии со сделанными замечаниями к официальной защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 1.5.11 – Микробиология (медицинские науки) и 1.5.22 – Клеточная биология (медицинские науки).

Заключение принято на совместном заседании отдела медицинской микробиологии и отдела бактериальных инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Присутствовало на заседании 34 человека.

Результаты голосования: “за” – 34, “против” – нет, воздержавшихся – нет.

Протокол №1 от 25.02.2025.

Диссертант: Черкасова Мария Николаевна

Председательствующий на заседании

доктор биологических наук, профессор,
заведующая отделом медицинской
микробиологии, руководитель лаборатории
хламидиозов

ФГБУ «Национальный исследовательский
центр эпидемиологии и микробиологии
имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи»
Минздрава России

Н. А. Зигангирова

Секретарь заседания

младший научный сотрудник лаборатории
индикации и ультраструктурного анализа
микроорганизмов ФГБУ «Национальный
исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почётного
академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России

А. А. Кузьмина

Ученый секретарь ученого совета

ФГБУ «Национальный исследовательский
центр эпидемиологии и
микробиологии имени почётного
академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России
кандидат биологических наук



Е. В. Сысоятина