

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации Червинца Вячеслава Михайловича на диссертационную работу Боровковой Екатерины Андреевны «Использование аутопробиотикотерапии для коррекции микробиологических нарушений кишечника», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – микробиология (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Бактерии рода *Lactobacillus* являются неотъемлемым компонентом микробиоты, характеризуются широким видовым разнообразием, наличием важнейших биологических свойств и функциональной пробиотической активностью, благодаря чему оказывают положительное влияние на организм человека. Лактобациллы участвуют в обеспечении колонизационной резистентности, иммунорегуляции, расщеплении питательных субстратов, биосинтетической, детоксикационной функции нормофлоры и др. Культуры *Lactobacillus spp.*, являясь основой многих пробиотических средств коррекции микробиоты, нашли широкое применение в пищевой промышленности и медицинской практике за счёт выраженных антагонистических свойств и широкого спектра продуцируемых метаболитов.

Несмотря на обилие моно- и поликомпонентных пробиотиков, содержащих промышленные биологически активные штаммы *Lactobacillus spp.*, многие из них оказываются неэффективными в коррекции дисбаланса нормофлоры. Одной из причин низкой эффективности пробиотикотерапии может быть несовпадение региона, где были выделены пробиотические микроорганизмы и места проживания потребителя продукта. Поэтому для более эффективной коррекции дисбиотических нарушений следует

применять лактосодержащие пробиотики и функциональные продукты питания, сконструированные на основе лактобацилл конкретного региона.

Другим новаторским подходом к повышению эффективности пробиотикотерапии может быть использование аутопробиотиков, препаратов, основанных на штаммах нормофлоры индивидуума и предназначенных для коррекции его микробиоты.

Таким образом, предметом научного интереса Боровковой Екатерины Андреевны стали актуальные вопросы характеристики биологических свойств и пробиотического потенциала лактобацилл, выделенных из кишечника жителей одного из регионов Российской Федерации, а именно Северо-Кавказского федерального округа, и оценка эффективности аутопробиотикотерапии с использованием аутоштамов *Lactobacillus spp.* в коррекции микрoэкологических нарушений кишечника.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В результате проведённого Боровковой Е.А. диссертационного исследования получены данные о биологических свойствах индигенных штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа разных возрастных групп. Диссертантом выявлено видовое разнообразие лактобацилл, представленное *L.rhamnosus* (53,5%), *L.plantarum* (33,9%), *L.paracasei* (9,6%), *L.fermentum* (2,4%) и *L.brevis* (0,6%), и продемонстрирован пробиотический потенциал, выражавшийся в средней адгезивной активности 76,0% штаммов и высокой антагонистической активности к патогенным и условно-патогенным тест-культурам большинства штаммов *Lactobacillus spp.* (от 59,0% в отношении *S.typhimurium* № 4922 до 100% в отношении *P.aeruginosa* ATCC 27853).

В результате впервые проведённого полногеномного секвенирования *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18 автором описана структура генома и выявлены гены антибиотикорезистентности данных

аутоштаммов. Установлено, что в исследованных геномах не содержатся гены *ermB*, *ermC*, *tetW* и *tetM*, ассоциированные с мобильными генетическими элементами, что определяет безопасность использования аутопробиотиков на основе *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18 с позиции нераспространения детерминант устойчивости к антибактериальным препаратам.

Проведённое автором культуральное исследование микробиоценоза кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа в возрасте от 20 до 60 лет до начала антибактериальной терапии показало наличие нормобиоценоза у 31% лиц и дисбиотических нарушений кишечника I и II степени у 23% и 46% лиц соответственно. Диссертантом охарактеризован микробный пейзаж кишечника добровольцев Северо-Кавказского федерального округа, изменённый под воздействием антибиотиков, и показано снижение содержания протективной микрофлоры, а именно *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *E.coli* более чем на два порядка, повышение количества *Candida spp.*, а также снижение количества условно-патогенных *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.* вплоть до элиминации *Proteus spp.*, *E.coli lac-*, *E.coli hem+* и *Staphylococcus spp.*

Впервые в исследовании с участием добровольцев автором доказана эффективность аутопробиотикотерапии в коррекции микрoэкологических нарушений кишечника, вызванных применением антибактериальных препаратов, выраженная в достоверном повышении и стабилизации содержания *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* и типичных *E.coli*.

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

Достоверность результатов диссертационной работы Боровковой Е.А. обусловлена рациональным дизайном исследования, большим объёмом фактического материала, использованием современных микробиологических и молекулярно-генетических методов исследования, сертифицированного и

поверенного оборудования, корректной статистической и биоинформационной обработкой данных.

Положения, выносимые на защиту, чётко аргументированы. Выводы научно обоснованы, подтверждены полученными экспериментальными данными и соответствуют содержанию работы.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость диссертационной работы Боровковой Е.А. заключается в том, что данные, полученные в результате изучения биологических свойств и пробиотического потенциала индигенных штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа, могут быть использованы для создания новых и эффективных региональных пробиотиков.

Проведённая автором оценка состояния микробиоценоза кишечника до и после антибактериальной терапии, а также после аутопробиотикотерапии в комплексе с созданием индивидуального аутопробиотического препарата на основе индигенных *Lactobacillus spp.* определяет новый методологический подход к коррекции дисбиотических нарушений в контексте персонафицированной медицины.

Практическая значимость диссертационной работы Боровковой Е.А. заключается в том, что в ходе проведения исследования получены и депонированы в базу данных GenBank NCBI полногеномные нуклеотидные последовательности штаммов *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18.

Предложенный автором алгоритм микробиологического мониторинга состава микрофлоры кишечника и коррекции микрoэкологических нарушений с помощью аутопробиотиков на основе *Lactobacillus spp.* позволяет выявлять возможную степень дисбиотических нарушений кишечника, устанавливать качественные и количественные изменения микрофлоры кишечника под воздействием различных факторов, выделять,

отбирать и сохранять перспективные аутоштаммы *Lactobacillus spp.* для создания на их основе индивидуальных аутопробиотиков.

Доказанная эффективность аутопробиотикотерапии в коррекции микробиоценоза кишечника, нарушенного применением антибиотиков, расширяет область применения данной методики, которая также может быть использована для профилактики и устранения побочных эффектов использования нестероидных противовоспалительных препаратов, гормонотерапии и др.

Результаты диссертационного исследования Боровковой Е.А. внедрены в лечебно-диагностическую работу Пятигорской городской поликлиники № 1 (Пятигорск, Россия) и Кисловодской городской специализированной инфекционной больницы (Кисловодск, Россия).

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Полученные автором диссертации результаты доложены на 6 научно-практических конференциях и в достаточном объеме представлены в открытой печати: 3 статьи в рецензируемых изданиях, 1 публикация в другом издании, 5 тезисов в рецензируемых изданиях, 1 – в материалах конференций.

Оценка содержания, завершённости и оформления диссертации

Структура диссертационной работы Боровковой Е.А. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, включающего 207 источников, из которых 71 – отечественных, 136 – зарубежных авторов, приложения. Материалы диссертации изложены на 156 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 19 таблицами и 16 рисунками.

В разделе «**Введение**» автор излагает актуальность темы исследования и степень её разработанности, формулирует цель и задачи исследования, описывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследования, личное участие в получении результатов, представляет положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробацию результатов.

В первой главе «**Обзор литературы**», состоящей из четырёх подразделов, Боровкова Е.А. описывает структуру и функции микробиоты кишечника с акцентом на бактерии рода *Lactobacillus*, приводит данные негативного воздействия антибиотиков на микробиоту кишечника и возможности использования аутопробиотиков для восстановления и/или коррекции дисбиотических нарушений кишечника. Раздел информативен, содержит большое число публикаций за последние 10 лет, написан лаконично и легко читается.

Раздел «**Результаты собственных исследований**» состоит из трёх глав и начинается с характеристики биологических свойств и пробиотического потенциала 159 индигенных штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа с помощью методов классической микробиологии. Диссертантом представлены результаты идентификации лактобацилл, полученные с использованием биохимических и молекулярно-генетических тестов. Для изучения пробиотического потенциала и биобезопасности лактобацилл были определены адгезия к эритроцитам человека 0 (I) группы Rh+, используемым в качестве клеточных моделей, антагонистическая активность к тест-культурам *P.aeruginosa* ATCC 27853, *S.sonnei* «S-форм» № 4385, *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923 и *S.typhimurium* № 4922 и антибиотикорезистентность к 9 наименованиям антибактериальных препаратов.

Боровковой Е.А. был выявлен средний показатель адгезии (СПА), который составил $3,01 \pm 0,03$ у большинства штаммов ($n=121$), что

соответствует средней адгезивности. По данным автора видовая принадлежность штаммов *Lactobacillus spp.* не влияла на степень адгезии к эритроцитам ($p=0,90836$).

Исследование диссертантом антагонистической активности выявило, что большинство исследуемых штаммов в выборке проявило сильную степень антагонизма в отношении всех индикаторных культур, которая также не зависела от видовой принадлежности штаммов *Lactobacillus spp.* ($p=0,60787$).

В результате определения чувствительности лактобацилл к антибиотикам было выявлено, что 100% штаммов *L.rhamnosus*, *L.plantarum*, *L.paracasei* и *L.fermentum* проявляли чувствительность к ампициллину, клиндамицину, тетрациклину, эритромицину и хлорамфениколу и резистентность к гентамицину и ванкомицину. К бензилпенициллину и ципрофлоксацину были устойчивы 100% штаммов *L.rhamnosus*, *L.plantarum* и *L.paracasei* и чувствительны 100% штаммов *L.fermentum*.

В главе 3 представлена молекулярно-генетическая характеристика трёх аутоштаммов *Lactobacillus spp.* Диссертант проанализировал геномы, провёл поиск генов антибиотикорезистентности и сопоставил данные фенотипической и генотипической устойчивости к антибиотикам *L.paracasei* 347-16, *L.plantarum* 123-17 и *L.plantarum* 83-18. На основании полученных данных Боровковой Е.А. был сделан вывод о безопасности аутопробиотикотерапии с использованием вышеперечисленных аутоштаммов, поскольку выявленные детерминанты устойчивости к фторхинолонам, аминогликозидам, гликопептидам и тетрациклину характерны для лактобацилл и не были ассоциированы с мобильными генетическими элементами.

В главе 4 описана динамика основных культивируемых представителей микрофлоры кишечника под воздействием антибиотиков и аутопробиотикотерапии, изученная с участием добровольцев в возрасте от 20 до 60 лет, давших обязательное информированное согласие на исследование.

В начале главы приведена схема посева фекалий, в соответствии с которой проводилось культуральное исследование микробиоценоза кишечника. Изложены этапы алгоритма микробиологического мониторинга состояния микробиоценоза кишечника добровольцев, согласно которым для каждого добровольца было проведено четырёхкратное исследование микробиоценоза кишечника (до и после антибактериальной терапии, после аутопробиотикотерапии и спустя три месяца после применения аутопробиотиков), выделен и сохранен аутоштамм *Lactobacillus spp.* для создания кисломолочного аутопробиотика и проведена оценка эффективности аутопробиотикотерапии в коррекции микрoэкологических нарушений кишечника, вызванных применением антибактериальных препаратов.

Для изучения динамики микрофлоры кишечника под влиянием антибиотиков и аутопробиотикотерапии Боровковой Е.А. были проанализированы 15 показателей, отражающих состояние интестинального микробиоценоза, которые включали бактерии облигатной (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *E.coli*) и факультативной микрофлоры (*Clostridium spp.*, *E.coli* hem+, *E.coli* lac-, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *S.aureus*, коагулазонегативные *Staphylococcus spp.*, *Candida spp.*). В результате анализа качественных и количественных изменений микрофлоры кишечника добровольцев, вызванных приёмом антибиотиков по назначению клиницистов, автором сделан вывод о негативном влиянии антибиотикотерапии, заключавшемся в снижении количества и процента высеваемости облигатных бактерий и повышении количества факультативных условно-патогенных микроорганизмов. Далее автором установлено позитивное влияние аутопробиотикотерапии на облигатную микрофлору кишечника добровольцев всех анализируемых групп, выраженное в статистически достоверном увеличении количества бифидобактерий, лактобацилл и типичных *E.coli*.

В разделе «**Заключение**» автор анализирует и сопоставляет с данными литературы полученные результаты, которые показывают потенциальную возможность использования индигенных *Lactobacillus spp.* в качестве аутопробиотиков за счёт доказанной биологической безопасности и пробиотического потенциала исследованных штаммов. Диссертантом впервые с участием добровольцев показана эффективность использования аутопробиотикотерапии для коррекции микробиологических нарушений кишечника при дисбиозах, вызванных применением антибактериальных препаратов.

Выводы диссертационной работы достоверны, убедительны, соответствуют поставленным цели и задачам.

В разделе «**Практические рекомендации**» приведены предложения по идентификации, изучению антибиотикорезистентности, криоконсервации штаммов *Lactobacillus spp.* Рекомендовано использование культурального метода для исследования микробиоценоза кишечника и выделения компонентов индигенной микробиоты для создания индивидуальных аутопробиотиков.

Автор также обозначил перспективы дальнейшей разработки темы исследования.

Структура и содержание диссертации, научные положения, полученные результаты, выводы и рекомендации в необходимом объёме представлены в автореферате и полностью соответствуют тексту диссертации. Оформление диссертации и автореферата соответствует ГОСТ 7.0.11-2011.

Соответствие специальности

По тематике, методам исследования, основным положениям и выводам, сформулированным автором, диссертация полностью соответствует специальности 1.5.11. – микробиология (биологические науки).

Принципиальных замечаний по диссертации нет. В рукописи имеются отдельные стилистические погрешности и опечатки, которые не снижают научной и практической ценности диссертации.

Замечания и вопросы:

1. К трактовке результатов определения адгезивной активности лактобацилл следует подходить осторожно, так как в работе применялась устаревшая методика В.И. Брилис (1986).
2. Каковы трудности внедрения аутопробиотиков в клиническую практику и способы их преодоления?

Заключение

Диссертационная работа Боровковой Екатерины Андреевны на тему: «Использование аутопробиотикотерапии для коррекции микробиологических нарушений кишечника», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – микробиология (биологические науки), выполненная под руководством доктора медицинских наук, доцента Алиевой Елены Васильевны, является завершённой научно-квалификационной работой и содержит решение актуальной научной задачи – оценка эффективности аутопробиотикотерапии в коррекции дисбиотических нарушений кишечника, вызванных применением антибактериальных препаратов, и изучение биологических свойств индигенных штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа.

Диссертационная работа Боровковой Екатерины Андреевны по актуальности, новизне и практической значимости отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., № 426 от 20.03.2021, с изменениями, внесенными

Постановлением Правительства РФ № 751 от 26.05.2020 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор, Боровкова Екатерина Андреевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.11. – микробиология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России)
170100, Тверь, ул. Советская, д. 4, +7(4822)321779; e-mail: chervinets@mail.ru,

доктор медицинских наук,
профессор
22.10.2021 г.

Червинец Вячеслав Михайлович

Подпись В.М. Червинца заверяю:

Учёный секретарь учёного совета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России)
170100, Тверь, ул. Советская, д. 4, +7(4822)321779; e-mail: info@tvigma.ru,

доктор медицинских наук,
доцент



Шестакова Валерия Геннадьевна