

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Червинца Вячеслава Михайловича на диссертационную работу Захаровой Юлии Викторовны «Роль бифидобактерий в кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

### **Актуальность темы исследования**

Глобализация ВИЧ-инфекции и распространение процесса в виде эпидемии обуславливают высокую социальную значимость заболевания. Общее число людей в мире, живущих с ВИЧ-инфекцией, составляет около 40 млн, 1,7 млн – это дети до 15 лет. Несмотря на использование антиретровирусных препаратов, смертность среди ВИЧ-инфицированных пациентов остается высокой. Однако, пациенты умирают не от вируса, вызвавшего заболевание, а от вторичных инфекционных осложнений и опухолевых процессов, которые развиваются на фоне иммунодефицита. Причиной вторичных инфекций являются условно-патогенные микроорганизмы, которые являются частью микробиома человека.

Наиболее многочисленным и сложным является микробиоценоз кишечника. Иммунодефицитные состояния, отсутствие грудного вскармливания и др. факторы приводят к дисбиозу кишечной микрофлоры детей с ВИЧ-инфекцией, что сопровождается нарушением мукозального иммунитета и увеличением микробной транслокации через слизистую оболочку кишечника. Актуальным является в это время коррекция дисбиоза препаратами пробиотиками.

Бифидобактерии в кишечном микробиоценозе занимают одну из лидирующих позиций по количественному содержанию и функциональной активности. У здорового человека они осуществляют эффективный контроль за эндогенными популяциями условно-патогенных бактерий, а также предотвращают

негативные последствия экзогенной микробной контаминации. Поэтому использование бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных пациентов является привлекательным, естественным и физиологичным способом коррекции дисбиотических нарушений.

Исследования кишечной микробиоты при ВИЧ-инфекции активно проводятся как в зарубежных странах, так и в России и чаще они направлены на изучение качественного состава микробиоценоза. Данные о биологических свойствах бифидобактерий, определяющих их регулирующую функцию по отношению к факультативным представителям кишечного сообщества, немногочисленны, т.е. отсутствует фундаментальная основа, позволяющая разработать конкретные меры по воздействию на кишечный микробиоценоз ВИЧ-инфицированных детей. Видимо поэтому сведения о возможностях коррекции микробиоты у ВИЧ-инфицированных людей противоречивы, тогда как необходимость таких медицинских вмешательств давно назрела.

В связи с этим, диссертационная работа, выполненная Захаровой Юлией Викторовной, посвященная изучению биологических свойств и оценке роли бифидобактерий в кишечном микробиоценозе у детей с ВИЧ-инфекцией, является актуальной и своевременной.

#### **Степень новизны, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В диссертационной работе представлена комплексная оценка биологических свойств бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей, включающая их адгезивный, антагонистический, антиоксидантный и биохимический потенциал. Показано, что при ВИЧ-инфекции формируется специфический биофиль бифидобактерий, характеризующийся снижением их регуляторных воздействий на условно-патогенных представителей кишечного микробиоценоза, что

регистрируется уже при микрoэкологическxх нарушениях второй степени и ведет к формированию многокомпонентных ассоциативных сожительства потенциально патогенных микроорганизмов. Полученные данные позволяют обосновать раннюю коррекцию микрoэкологическxх нарушений у ВИЧ-позитивных детей и прежде всего необходимость восстановления функциональных свойств бифидофлоры.

Показано, что в основе нарушений адгезивной активности *Bifidobacterium spp.* у ВИЧ-инфицированных лежит изменение поверхностных свойств бактериальных клеток как результат взаимодействия с липазами условно-патогенных бактерий. Высокая частота и уровень продукции липолитических ферментов стафилококками и энтеробактериями повышают в 2 раза риски их транслокации через слизистую кишечника, что дополняет сведения о вкладе факультативной микрофлоры в генез вторичных бактериальных инфекций у пациентов с ВИЧ-статусом и обосновывает необходимость селективной деконтаминации условно-патогенной микрофлоры.

Установлено, что бифидобактерии, несмотря на снижение доминирующих регуляторных воздействий на кишечный микробиоценоз в целом, сохраняют симбиотическую интеграцию с макроорганизмом, что проявляется высокой активностью синтеза аминокислот у ВИЧ-инфицированных, в том числе и незаменимых. При этом впервые показано, что бифидобактерии способны расщеплять триптофан до кинуренина – катаболита, влияющего на состояние мукозального иммунитета, что свидетельствует об определенном вкладе бифидобактерий на течение заболевания. Полученные данные определяют возможность использования пробиотических бифидобактерий для нормализации белкового обмена у ВИЧ-позитивных пациентов и являются основой для создания новых пробиотических композиций для данной когорты пациентов.

Приведенные автором данные о низкой биосовместимости бифидофлоры с пробиотическими бифидобактериями, не превышающей 41%, предопределяет персонифицированный подход в коррекции микрофлоры пациентов с ВИЧ-статусом. Разработанная схема выбора биосовместимого пробиотического штамма с учетом биологических характеристик аутоштаммов имеет большое практическое значение для организации клинических исследований по изучению эффективности пробиотиков на характер течения ВИЧ-инфекции.

Показано, что поверхностные и антиоксидантные свойства, которые определяются жирнокислотным составом, могут являться мишенями при коррекции функциональных свойств бифидобактерий, что позволило обосновать возможность применения у ВИЧ-инфицированных пациентов при дисбиозах кишечника препаратов с антиоксидантными и мембранопротекторными фармакологическими эффектами.

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

Впервые проведено комплексное исследование биологических свойств бифидобактерий дистального отдела толстого кишечника у пациентов с ВИЧ-инфекцией, что позволило установить нарушение регулирования бифидофлорой численности условно-патогенных микроорганизмов и прояснить некоторые механизмы развития микробного дисбаланса внутри многокомпонентных микробных сообществ. Показано, что факторы вирулентности микробов-ассоциантов вносят вклад в ослабление доминирующей роли бифидобактерий, так как влияют на поверхностные свойства и адгезивный потенциал последних, что демонстрирует взаимное влияние в системе «доминант-ассоциант». В опытах *in vitro* показан характер изменений биологических свойств бифидофлоры при взаимодействии с условно-патогенными бактериями в зависимости от начального

состояния клеточной стенки, которое определяет различный адаптивный потенциал бифидобактерий.

Автором показан значительный вклад бифидофлоры в аминокислотный обмен у ВИЧ-инфицированных детей, что предопределяет необходимость поддержания численности бифидобактерий у пациентов с данным заболеванием, а также раскрывает перспективы для создания новых пробиотических композиций для поддержания белкового обмена у ВИЧ-позитивных людей.

Предложенный и запатентованный Захаровой Ю. В. способ получения бифидогенного фактора, представляющий собой фрагменты ДНК бифидобактерий, перспективен для разработки иммунобиологических препаратов с селективным эффектом не только для пациентов с ВИЧ-инфекцией, но и с другими заболеваниями, а также он позволяет создавать препараты из аутоштаммов, что важно с точки зрения персонифицированного подхода создания средств коррекции кишечного микробного сообщества.

Безусловно важным является разработка количественного способа оценки антиоксидантных свойств микроорганизмов, который позволил установить изменение способности бифидобактерий у детей с ВИЧ-инфекцией инактивировать токсические формы кислорода и определить одну из биологических мишеней доминантных бактерий, которая может быть скорректирована фармакологическими препаратами.

Результаты исследований позволили автору обосновать необходимость коррекции у ВИЧ-инфицированных детей не только количественного уровня бифидобактерий, но, прежде всего, их биологических свойств, что является новым направлением в методах восстановления микробиологического баланса у людей. Захаровой Ю.В. в опытах *in vitro* показано, что использование мембранопротекторов и антиоксидантов эффективно восстанавливает адгезию бифидофлоры, что дополняет арсенал средств для коррекции микрофлоры.

Материалы исследований и разработки, представленные в диссертационной работе, реализованы в методических рекомендациях, внедренных в практическое здравоохранение на региональном уровне: «Методы исследования биологических свойств микроорганизмов» (утверждены 2.07.2013 г. начальником Департамента охраны здоровья населения Кемеровской области, акт внедрения в работу ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С.В. Беляева» от 13.12.2018 г.), «Бифидобактерии: выделение, идентификация, изучение биологических свойств» (утверждены 3.11.2018 г. начальником Департамента охраны здоровья населения Кемеровской области, акт внедрения в работу ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С. В. Беляева» от 13.12.2018 г.), «Исследование микрофлоры кишечника у ВИЧ-инфицированных детей. Коррекция микробиологических нарушений» (утверждены 9.11.2018 г. и.о. начальника Департамента охраны здоровья населения Кемеровской области, акт внедрения в работу ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая инфекционная больница» от 4.12.2018 г.).

Основные положения диссертационной работы используются кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии в учебном процессе последиplomного образования федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 20.09.2018 г.).

#### **Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях**

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений и обусловлена современными теоретическими положениями, основанными на глубоком анализе литературы, использованием общепринятых методик с

применением классических бактериологических методов, экспериментов на животных, а также современных хроматографических и спектральных методов исследования. Весь материал обработан с использованием адекватных методов статистики с использованием программно-методического комплекса анализа данных, что позволило автору сформулировать выводы на основе принципов доказательной медицины.

Результаты диссертационной работы основаны на большом объеме фактических данных. Выделены 1150 кишечных микросимбионтов, изучены биологические свойства у 119 культур бифидобактерий и 274 культур условно-патогенных микроорганизмов. Проведено более 2 тысяч опытов по исследованию биологических свойств микроорганизмов, что позволило выполнить задачи и достичь поставленной цели – определить особенности жизнедеятельности бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей. Таким образом, основные выводы, практические рекомендации, сформулированные автором, являются достоверными и логично вытекают из результатов исследований.

Результаты исследований доложены на 12 международных, всероссийских и региональных конференциях. Материалы диссертации полно отражены в 36 печатных работах, в том числе в 17 публикациях в изданиях, включенных в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК, 5 – в рецензируемых журналах, 9 – в материалах конференций, в 2 патентах на изобретение РФ, в 3 методических рекомендациях.

### **Оценка содержания, завершения и оформления диссертации**

Структура диссертационной работы Захаровой Юлии Викторовны построена по общепринятому плану. Материалы диссертации изложены на 218 страницах, иллюстрированы 28 таблицами, 17 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов,

практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы.

Во введении представлены актуальность проблемы, степень разработанности темы, цель, задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Диссертантом подробно изложена методология и методы исследования, использованные для достижения цели, определен предмет изучения и дана характеристика материалов исследования. Сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обоснована достоверность полученных результатов.

Обзор литературы основан на 224 литературных источниках, из которых 110 отечественных, 114 – зарубежных. 90% литературных источников имеют пятилетнюю давность, что свидетельствует об актуальности и современности представляемой информации. В обзоре литературы проанализирован большой объем информации о механизмах доминирования бифидобактерий в кишечном микробном сообществе, а также представлены данные о качественном составе, биологических свойствах микрофлоры у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Приводятся данные о влиянии микрофлоры на течение ВИЧ-инфекции и об использовании иммунобиологических препаратов, воздействующих на микрофлору, в комплексной терапии основного заболевания. Из результатов работы с литературой логично вытекают противоречия, требующие решения, что позволило автору сформулировать тему исследования, поставить цель и задачи. Данные литературы также позволили Захаровой Юлии Викторовне обосновать и объяснить собственные результаты исследований, что демонстрирует заключение диссертации.

Во второй главе «Характеристика кишечного микробиоценоза ВИЧ-инфицированных детей» представлены данные о состоянии кишечной микрофлоры у ВИЧ-позитивных детей, в том числе на разных стадиях



заболевания. Показано, что у детей со второй и четвертой стадией ВИЧ-инфекции (по В.И. Покровскому с изм.) часто развиваются микробиологические нарушения III степени. При этом формируются многокомпонентные ассоциации условно-патогенных микроорганизмов, которые активно экспрессируют факторы вирулентности. Представлены данные о функциональных свойствах бифидобактерий, показаны прямые связи между изменением биологических свойств бифидофлоры и степенью дисбиоза кишечника, что позволяет обосновать необходимость ранней коррекции кишечного микробиоценоза у данной категории пациентов.

В третьей главе диссертантом представлены данные, демонстрирующие молекулярные механизмы структурно-функциональных изменений бифидобактерий при ВИЧ-инфекции. Показано, что в основе снижения способности представителей рода *Bifidobacterium* к бактериально-бактериальным и бактериально-клеточным контактными взаимодействиям, лежит изменение жирнокислотного состава полимеров клеточных стенок. Состав жирных кислот также определяет способность бифидобактерий к инактивации токсических форм кислорода, содержание которых регулирует количественный уровень данных микросимбионтов. Автором установлено снижение у ВИЧ-инфицированных детей частоты антагонистического типа взаимодействий и факторов антагонизма бифидофлоры к условно-патогенным представителям кишечного биотопа. Показано, что факторы вирулентности, в частности липазы, факультативных представителей кишечника являются «инструментом» воздействия на поверхностные свойства бифидобактерий, определяемые жирнокислотным составом клеточных структур. Полученные Захаровой Юлией Викторовной данные раскрывают некоторые механизмы изменения биологических свойств доминантных бактерий при ВИЧ-инфекции и определяют необходимость снижения содержания у ВИЧ-позитивных пациентов количества

липазопродуцирующих микросимбионтов.

Четвертая глава посвящена исследованию метаболической активности бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей. По результатам изучения аминокислотного состава экзометаболитов и клеточных лизатов можно косвенно судить об активном участии бифидобактерий в метаболизме аминокислот у ВИЧ-инфицированных пациентов. Диссертантом показано, что бифидобактерии принимают участие в катаболизме триптофана, продукты распада которого оказывают воздействие на мукозальный иммунитет. В экспериментах на животных установлены противовоспалительные, психотропные эффекты экзометаболитов бифидобактерий, изолированных от пациентов, что демонстрирует штаммовую специфичность, которая не зависит от ВИЧ-статуса и объясняет индивидуальные различия в характере течения инфекции и приверженности пациентов к лечению.

В пятой главе «Фундаментальные и прикладные аспекты управления популяцией и биологическими свойствами бифидобактерий при ВИЧ-инфекции» автор обосновывает два подхода в коррекции микрофлоры, вытекающих из результатов исследования – восстановление количественного уровня бифидофлоры, особенно при третьей степени дисбиоза и раннее восстановление их биологических характеристик. Приведены данные по биосовместимости штаммов *Bifidobacterium spp.*, выделенных от детей с ВИЧ-инфекцией, и штаммами, изолированными из коммерческих пробиотических препаратов. Исследованы биологические свойства пробиотических штаммов – способность к адгезии, кислотообразование, длительность восстановления из лиофильного состояния, спектр антимикробной активности. Показано, что совместимость не превышает 41%, что позволило обосновать целесообразность индивидуального выбора пробиотического препарата для ВИЧ-инфицированного ребенка. В связи с тем, что у бифидобактерий с увеличением степени дисбиоза значительно снижается гидрофобность и антиоксидантная активность, в качестве средств для коррекции

биологических свойств бифидобактерий предложены средства с мембранопротекторными антиоксидантными свойствами. В опытах *in vitro* показано, что под влиянием таких веществ у бифидобактерий повышается масса жирных кислот клеточных стенок, особенно ненасыщенных, поэтому увеличивается гидрофобность и антиоксидантный статус. Полученные данные по восстановлению биологических свойств доминантной микрофлоры универсальны, их можно использовать при коррекции дисбиозов кишечника другой этиологии.

В разделе «Заключение» полученные в исследовании данные проанализированы, дана их оценка с использованием сведений из мировой литературы, подчеркнута их социальная и практическая значимость.

Выводы работы достоверны, убедительны, полностью соответствуют поставленным задачам.

Таким образом, диссертационная работа Захаровой Юлии Викторовны может быть квалифицирована как завершённое диссертационное исследование, которое по научно-практической значимости, объёму исследований, новизне и ценности полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Результаты могут быть использованы для разработки мероприятий по улучшению качества и продолжительности жизни пациентов с ВИЧ-инфекцией и снижения у них риска развития вторичных бактериальных инфекций. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационного исследования.

#### **Соответствие специальности**

Диссертационная работа Захаровой Юлии Викторовны полностью соответствует специальности 03.02.03 - микробиология, так как проведено исследование микроорганизмов на популяционном уровне, изучены их симбиотические связи, а также функциональные характеристики.

В процессе изучения диссертационной работы возник ряд вопросов:

1. Чем объясняется высокая частота и количественные уровни представителей семейства *Enterobacteriaceae* у детей с ВИЧ-инфекцией?

2. Аутоагрегацию микроорганизмов традиционно связывают с поверхностными белками. Как можно объяснить, что после воздействия липаз стафилококков, точкой приложения которых являются липидсодержащие структуры, у бифидобактерий снижается способность агрегироваться?

Поставленные вопросы не снижают общей высокой оценки научной и практической ценности рецензируемой работы.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Юлии Викторовны Захаровой на тему «Роль бифидобактерий в кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, доцента Левановой Людмилы Александровны, содержащей решение актуальной научно-практической проблемы - изучении основ жизнедеятельности бифидобактерий во взаимодействии с факультативной кишечной микрофлорой у ВИЧ-инфицированных детей и разработке подходов эффективной коррекции микробиологических нарушений кишечника, имеющее важное значение для микробиологии.

Диссертационная работа Захаровой Юлии Викторовны «Роль бифидобактерий в кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей» по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям пункта 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением

Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации N 335 от 21 апреля 2016 года, N 748 от 2 августа 2016 года, N 650 от 29 мая 2017 года, N 1024 от 28 августа 2017 года, N 1168 от 01 октября 2018 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор – Захарова Юлия Викторовна, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

**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,

доктор медицинских наук, профессор  Червинец Вячеслав Михайлович

Адрес: 170100 г. Тверь, ул. Советская, д.4

Тел.+7(4822) 32-17-79. Факс +7(4822) 34-43-09, e-mail: info@tvigma.ru

Подпись доктора медицинских наук, профессора Червинца Вячеслава Михайловича заверяю.

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кандидат биологических наук, доцент Шестакова Валерия Геннадьевна

« 10 » февраля 2020 года

