

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, доцента Ипполитова Евгения Валерьевича 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

Ситуацию по ВИЧ-инфекции в России характеризуют как ухудшающуюся. Ежегодно увеличивается общее число людей, инфицированных вирусом иммунодефицита человека, все чаще в эпидемический процесс вовлекаются женщины и дети. Это тот контингент пациентов, который требуют пристального внимания и включения всех медицинских и немедицинских ресурсов для увеличения не только продолжительности их жизни, но и повышения ее качества.

Эволюция взглядов о патогенезе ВИЧ-инфекции, а также о функциях нормофлоры дают основания считать, что состояние микробиоты определяет характер течения инфекции и продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных пациентов. С помощью молекулярно-генетических методов уже показано изменение микробиома людей с ВИЧ-инфекцией, которое сохраняется даже при краткосрочном приеме антиретровирусных препаратов. Учитывая основополагающую роль микрофлоры в функционировании макроорганизма, очевидным является поддержание качественного и количественного состава кишечной микрофлоры у ВИЧ-инфицированных.

Филогенетически высокое иерархическое положение в многокомпонентном кишечном сообществе, мутуалистический тип симбиоза бифидобактерий с

макропартнером делает их привлекательными, как объект для поддержания кишечного зубиоза, в том числе и у ВИЧ-позитивных людей.

Однако современные данные свидетельствуют об ограниченном применении бифидосодержащих пробиотических препаратов в когорте ВИЧ-позитивных людей, вследствие опасений возможности их транслокации через слизистую кишечника. Это обусловлено тем, что практически отсутствуют данные о составе и свойствах собственной бифидофлоры ВИЧ-инфицированных, о их способности формировать биопленки на слизистой кишечника и обеспечивать защиту слизистой от активной колонизации условно-патогенными и патогенными микроорганизмами и от бактериальной транслокации. Таким образом диссертационная работа Захаровой Юлии Викторовны, посвященная изучению роли бифидобактерий в регуляции кишечного микробиоценоза при ВИЧ-инфекции, является актуальной и позволяет создать фундаментальную основу для эффективной коррекции микрoэкологических нарушений у пациентов с ВИЧ-статусом.

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

В диссертационной работе представлена структурно-функциональная характеристика бифидофлоры у детей с ВИЧ-инфекцией и характер микрoэкологических нарушений кишечника на разных стадиях заболевания. Выявлены группы риска по развитию выраженных микрoэкологических нарушений, определен качественный и количественный состав ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов, которые обладают широким арсеналом факторов инвазии, что позволяет прогнозировать возможность их транслокации через слизистую кишечника и вовремя предупреждать эти последствия дисбиоза.

Показано, что если при первой степени дисбиоза кишечника у бифидобактерий снижается только антагонизм к условно-патогенным представителям кишечного микробиоценоза, то уже при второй и, особенно, при третьей степени микрoэкологических нарушений регистрируется изменение гидрофобности, специфической адгезии, кислотообразования, антиоксидантных свойств бифидобактерий, что делает очевидным необходимость коррекции кишечной микрофлоры у ВИЧ-инфицированных пациентов, вследствие нарастающей функциональной несостоятельности бифидофлоры.

Захаровой Юлией Викторовной изучены молекулярные механизмы гидрофобности бифидобактерий, которые определяются жирнокислотным составом поверхностных липопротеинов и липотейхоевых кислот. Показано, что факторы инвазии условно-патогенных бактерий, в частности липазы, приводят к структурным и функциональным нарушениям у представителей рода *Bifidobacterium*, что сказывается на их адгезивной способности. Полученные результаты дополняют данные о факторах и механизмах взаимодействия микроорганизмов в смешанных микробных сообществах.

Получены доказательства сохранения мутуалистических взаимоотношений между бифидобактериями и макроорганизмом на фоне течения вирусной инфекции, которое выражается высокой биохимической активностью *Bifidobacterium spp.* и синтезом различных аминокислот. Эти данные расширяют круг синдромов, корректируемых с помощью бифидосодержащих препаратов у ВИЧ-позитивных пациентов.

Разработан авторский способ количественной оценки антиоксидантной активности микроорганизмов *in vitro*, изучена способность бифидобактерий при ВИЧ-инфекции инактивировать токсические формы кислорода, определена одна из мишеней для коррекции функциональных свойств бифидофлоры.

Приведены данные о биосовместимости, а также характеристики биосовместимых пробиотических штаммов с микрофлорой ВИЧ-позитивных детей, что позволяет оптимизировать выбор для них пробиотиков. Предложен новаторский подход в коррекции микрoэкологических нарушений – это модуляция свойств доминантной микрофлоры. С помощью фармакологических препаратов показана *in vitro* возможность восстановления активности таких биологических свойств бифидобактерий, как гидрофобность и антиоксидантные свойства.

Таким образом, изложенные автором научные положения, сформулированные выводы и практические рекомендации основаны на результатах проведенных ею исследований и логично вытекают из них.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены данные о составе бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных пациентов, формировании у них особого функционального профиля, характеризующегося снижением экспрессии факторов доминантности в биотопе. Эти данные расширяют теоретические представления о роли биологических свойств бифидобактерий в формировании ассоциативного симбиоза в толстом кишечнике. Установлены некоторые механизмы изменения поверхностных свойств бифидофлоры, которые определяют начальные механизмы адгезии и колонизирующую способность микроорганизмов, что важно для разработки методов управления биопленками индигенных микроорганизмов.

Обоснована необходимость поддержания количественного содержания бифидобактерий у детей с ВИЧ-инфекцией, что обусловлено высокой активностью синтеза бактериями незаменимых аминокислот, экзометаболитов, оказывающих выраженное противовоспалительное и антидепрессивное действие, но имеющих

штаммоспецифический характер продукции. Данные сведения перспективны для создания новых пробиотических композиций для пациентов с ВИЧ-инфекцией.

Практическая значимость работы определяется разработанным алгоритмом индивидуального выбора пробиотических штаммов для ВИЧ-позитивных детей, основанного на изучении биологических характеристик аутоштаммов и производственных культур с последующим определением их биосовместимости. Данный алгоритм является универсальным и перспективен для повышения эффективности бактериотерапии при других нозологиях.

Результаты исследований позволили диссертанту обосновать необходимость коррекции не только количества, но и функциональных свойств бифидобактерий. В качестве мишеней Захарова Юлия Викторовна выбирает поверхностные свойства *Bifidobacterium spp.* (это вытекает из полученных результатов), которые определяют гидрофобность, адгезию, бактериально-бактериальные и бактериально-клеточные взаимодействия и антиоксидантные свойства.

Автором получены два патента РФ на изобретение, так как разработан способ получения бифидогенного фактора (патент РФ № 2553513) и количественный способ определения антиоксидантной активности (патент РФ № 2465593), что внесет значительный вклад в процесс разработки метабиотиков с селективным эффектом и в вопросы дальнейшего изучения биологических свойств микроорганизмов.

Материалы исследований и разработки, представленные в диссертационной работе, реализованы в 3 методических рекомендациях, внедренных в практическое здравоохранение на региональном уровне (акты внедрения в работу ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница им. С.В. Беляева» от 13.12.2018 г.; акт внедрения в работу ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая инфекционная больница» от 4.12.2018 г.).

Основные положения диссертационной работы используются в учебном процессе кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации в последипломном обучении специалистов в системе дополнительного и непрерывного образования (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 определяется использованием современных теоретических положений о функционировании микробных сообществ, логически выстроенным планом исследования, который направлен на решение конкретных поставленных задач, оптимальных методологических подходов в проведении экспериментальных микробиологических, хроматографических, спектральных исследований, а также репрезентативной группой пациентов. Большой объем исследований, включающий выделение 1150 кишечных микросимбионтов, проведение 2032 опытов по исследованию биологических свойств микроорганизмов, использование современного программного обеспечения и надлежащего статистического анализа подтверждает значимость полученных результатов. Таким образом, основные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные автором, являются научно обоснованными и достоверными.

Результаты исследований доложены и обсуждены на 12 научно-практических конференциях международного, всероссийского и регионального уровней.

Основное содержание работы достаточно полно отражено 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

Диссертация написана в соответствии с правилами оформления, регламентированными ГОСТ Р 7.0.11 – 2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления» и состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы. Работа изложена на 218 страницах, иллюстрирована 28 таблицами, 17 рисунками.

Во введении представлены актуальность проблемы, степень разработанности темы, цель, задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Диссертантом дана исчерпывающая информация об использованных в работе методах, детально описаны способы подготовки образцов и режимы хроматографических и спектральных исследований, методы статистического анализа результатов.

Литературный обзор информативен, изложен на 31 странице, состоит из четырех разделов и отражает такие вопросы как механизмы доминирования бифидобактерий в кишечном микробиоценозе; ВИЧ-ассоциированные изменения микрофлоры; особенности биологических свойств кишечной микрофлоры у пациентов с ВИЧ-инфекцией, ее роль в патогенезе заболевания; возможности специфической модуляции микробиоты кишечника ВИЧ-инфицированных людей.

Обзор информативен, позволяет сформировать общее представление об актуальности работы, современных достижениях в области изучения микробиоты ВИЧ-позитивных пациентов и определить круг нерешенных вопросов, требующих научных исследований. Таким образом, сформулированные Захаровой Юлией Викторовной цель и задачи, логично вытекают из критического анализа литературы и отражают современные потребности науки и практики в вопросах изучения микробиоты у людей с ВИЧ-статусом.

Результаты собственных исследований Захаровой Юлии Викторовны представлены во второй, третьей, четвертой и пятой главах диссертации. Во второй главе дана общая характеристика кишечного микробиоценоза ВИЧ-позитивных детей, частота и характер микрoэкологических нарушений кишечника на разных стадиях ВИЧ-инфекции. Показано, что с увеличением степени тяжести дисбиоза у бифидобактерий снижается колонизационная, кислотообразующая, антиоксидантная способность, т.е. формируется функциональная недостаточность доминантной микрофлоры, вносящая свою лепту в поддержание и усугубление микрoэкологических нарушений кишечника. На основе инфектологического подхода описаны частота и уровень экспрессии условно-патогенными бактериями факторов вирулентности, теоретически просчитаны риски транслокации бактерий через слизистую кишечника.

В третьей главе диссертантом представлены данные, демонстрирующие механизмы формирования многокомпонентных ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов у ВИЧ-положительных пациентов, а также молекулярную основу их взаимодействий. Установлена низкая частота антагонистического типа симбиоза бифидобактерий с условно-патогенными микроорганизмами, обусловленная низкой частотой и уровнями продукции лизоцима и органических кислот. Вследствие высокого содержания и уровня синтеза условно-патогенными микросимбионтами

факторов вирулентности у бифидобактерий изменяются их поверхностные свойства, обусловленные количеством и составом жирных кислот, что ведет к нарушению гидрофобности, аутоагрегации, антиоксидантной способности и падению титров бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных пациентов. Таким образом, приведенные в 3 главе Захаровой Юлией Викторовной данные дополняют в целом имеющиеся данные о механизмах развития микробиологических нарушений и генезе их прогрессирования.

В четвертой главе диссертантом демонстрируются данные, свидетельствующие о высокой активности метаболизма аминокислот у бифидофлоры ВИЧ-позитивных детей, которая в 2,5 раза выше, чем у детей группы сравнения. Бифидобактерии в больших количествах продуцируют серин, пролин, лизин, фенилаланин, что демонстрирует компенсаторный механизм со стороны индигенной микрофлоры, направленный на поддержание нормального белкового обмена у детей с ВИЧ-инфекцией. Показано, что бифидобактерии участвуют в продукции триптофана, который по данным литературы оказывает влияние на мукозальный иммунитет и характер течения ВИЧ-инфекции, что позволяет бифидобактерий рассматривать как патогенетически значимых микросимбионтов.

В пятой главе приведены возможные способы нивелирования кишечного дисбиоза у ВИЧ-инфицированных пациентов. Представлены следующие подходы: восстановление количественного уровня бифидофлоры с помощью биосовместимых пробиотических штаммов и/или коррекция их биологических характеристик. Возможность воздействия на биологические свойства бифидобактерий при ВИЧ-инфекции продемонстрирована в опытах *in vitro* с помощью фармакологических препаратов с мембранопротекторными свойствами и лизоцима. Показано изменение состава жирных кислот поверхностных структур бифидобактерий и восстановление их гидрофобности, определяющей начальные

механизмы адгезии и аутоагрегации. Этот подход можно использовать как универсальный для нормализации микробиоценозов, в случае сходных дисфункций со стороны бифидофлоры.

В разделе «Заключение» автор тщательно анализирует полученные данные, проводит их оценку и сопоставление с данными мировой литературы, касающейся вопросов изучения микробиоценозов ВИЧ-инфицированных пациентов и возможностей коррекции у них кишечных дисбиозов.

Выводы убедительны, достоверны, соответствуют результатам исследования и дают ответ на все поставленные задачи.

Таким образом, диссертационная работа Захаровой Юлии Викторовны может быть квалифицирована как завершённое научное исследование. Значение исследования состоит в возможности использования результатов диссертации для борьбы с вторичными бактериальными инфекциями у ВИЧ-инфицированных людей, что позволит повысить их качество жизни.

Соответствие специальности

Диссертационная работа, выполненная Захаровой Юлией Викторовной, полностью соответствует формуле специальности 03.02.03 – микробиология со следующими областями исследований (в полном объеме или частично) по пунктам: выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов (пункт 2 паспорта специальности); морфология, физиология, биохимия, генетика микроорганизмов (пункт 3); сапрофитизм, паразитизм, симбиоз микроорганизмов (пункт 6).

В ходе рецензирования возникли следующие вопросы:

1. Почему, по Вашему мнению, происходит снижение специфической адгезии бифидобактерий при воздействии на них этилметилгидроксипиридина сукцината?

2. Известно, что любой пробиотический штамм уже охарактеризован по биологической активности и соответствует фармакопейным стандартам. С какой целью необходимо изучать биологические свойства пробиотических штаммов при выборе их для ВИЧ-инфицированных пациентов?

Замечаний по диссертации нет. Возникшие вопросы носят уточняющий характер и указывают на актуальность проведенных исследований. Они ни в коем случае не снижают высокой 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 - определение роли бифидобактерий в кишечном микробиоценозе 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

Профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук, доцент

Ипполитов Евгений Валерьевич

Адрес: 127473, субъект Российской Федерации, г. Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1, тел. +7(495) 609-67-00, e-mail: msmsu@msmsu.ru

Подпись доктора медицинских наук, доцента Ипполитова Евгения Валерьевича заверяю:

ученый секретарь ученого совета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук, профессор



Васюк Юрий Александрович

«17» февраля 2020 года