

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Российской академии наук Перуновой Натальи Борисовны 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

Актуальность представленной работы обусловлена двумя основными моментами. Во-первых, накоплением данных о роли микробного фактора в формировании здоровья и патологии человека. Изучение этого вопроса может быть осуществлено за счет симбиотического подхода, где в ассоциативном симбиозе человека важная роль отводится доминантной микробиоте – бифидобактериям. Несмотря на то, что вопрос о значении бифидобактерий для организма человека был поднят И. И. Мечниковым и его школой еще на рубеже прошлого столетия, изучение данной группы микроорганизмов до сих пор привлекает внимание исследователей и врачей различных специальностей. Это связано с тем, что бифидофлора имеет широкий спектр ферментов, антимикробных соединений, метаболитов и обладает иммуностропной активностью, а также способностью формировать колонизационную резистентность, подавляя воспалительные реакции и апоптоз. Появляются работы, способствующие пониманию физиологической роли, особенностей функционирования бифидофлоры в условиях кишечного микросимбиоза, направленных на поддержание гомеостаза микробиоты и макропартнера.

Во-вторых, актуальность исследований обусловлена выбранной диссертантом патологией (ВИЧ-инфекция). В настоящее время существует достаточно информации о возбудителях оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных пациентов, приводящих к нарушению питания и задержке развития детей с ВИЧ-инфекцией, однако данные об особенностях функциональных

свойств и биокоммуникативной активности доминантной микробиоты кишечника (бифидобактерий) при данной патологии малочисленны. Кроме того, несмотря на широкое применение и наличие положительных эффектов от приема пробиотических препаратов при различных нозологиях, использование их у ВИЧ-инфицированных пациентов довольно ограничено, что отражает отсутствие фундаментальной базы для их применения. В связи с этим, диссертационное исследование Захаровой Юлии Викторовны своевременно, актуально и отражает потребности как практического здравоохранения, так и фундаментальных знаний в области медицинской микробиологии и нового развивающегося направления - инфекционной симбиологии.

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

Новизна диссертационной работы Захаровой Юлии Викторовны обусловлена комплексным подходом в оценке роли бифидобактерий при ВИЧ-инфекции с позиции ассоциативного симбиоза человека. Результаты работы свидетельствуют о сохранении численности бифидобактерий в микросимбиозе дистального отдела толстого кишечника ВИЧ-позитивных пациентов, но при этом снижается их колонизирующая активность, симбиотические свойства (антиоксидантная активность) и способность регулировать качественно-количественный состав микросимбиоза (антагонистическая активность).

Показано, что многокомпонентные ассоциации условно-патогенных микроорганизмов не оказывают прямого антагонистического действия в отношении бифидобактерий, но факторы вирулентности ассоциативной микробиоты приводят к молекулярным перестройкам оболочек и липотейхоевых кислот, снижая адгезию и аутоагрегацию бифидофлоры. Полученные материалы расширяют современные представления о механизмах и характере взаимодействия микросимбионтов в

многокомпонентных микробных сообществах, что может иметь значение в формировании гомеостаза биотопа кишечника при эубиозе и дисбиозе.

Интерес представляют материалы, свидетельствующие о высокой активности аминокислотного баланса бифидобактерий, что может отражать сохранение интегративных связей доминантной микробиоты с организмом хозяина, направленных на поддержание обменных процессов при ВИЧ-инфекции. Также установлено наличие провоспалительной и антидепрессивной активности супернатантов бифидобактерий у пациентов на разных стадиях ВИЧ-инфекции. Данные изменения носят штаммоспецифический характер, что обуславливает дальнейшее развитие исследований в направлении персонализированной медицины и поиска штаммов, пригодных для создания пробиотических препаратов для ВИЧ-инфицированных пациентов. Решению этой проблемы также способствуют новые данные о биосовместимости пробиотических бактерий с фекальными изолятами от детей с ВИЧ-статусом, что позволяет объяснить низкую эффективность пробиотикотерапии у ВИЧ-инфицированных пациентов и необходимость персонализированного подхода при бактериотерапии. На основе разработанного автором алгоритма подбора пробиотического штамма и показанной *in vitro* возможности коррекции биологических свойств бифидобактерий созданы предпосылки для проведения клинических испытаний эффективности различных способов и средств коррекции кишечных микробиологических нарушений у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

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

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в том, что в ней представлены данные о механизмах межмикробных взаимодействий бифидофлоры с условно-

патогенными бактериями в условиях инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита человека. Фундаментальность работы обусловлена симбиотическим подходом, в котором комплексное исследование биологических свойств бифидофлоры у ВИЧ-позитивных детей позволило установить у них снижение антагонистической активности доминантной микробиоты и сохранение их биосинтетической активности, что представляется важным для дальнейшего изучения бифидобактерий в качестве микробного «регулятора» гомеостаза при ВИЧ-инфекции.

Практическая значимость работы определяется разработанным способом получения бифидогенного фактора (патент на изобретение РФ № 2553513 «Способ получения бифидогенного фактора» от 20.06.2015 г.), перспективного для создания новых пребиотических препаратов, способных предотвращать транслокацию условно-патогенной микробиоты через стенку кишечника.

Разработанный количественный способ определения антиоксидантной активности микроорганизмов (патент на изобретение РФ № 2465593 «Способ количественного определения антиоксидантной активности микроорганизмов» от 27.10.2012 г) может быть использован в качестве модели для изучения влияния микросимбионтов на организм человека и будет востребован в научно-исследовательских лабораториях при изучении микробиоты различных биотопов тела человека и отборе новых пробиотических штаммов бактерий.

Предложенные подходы по коррекции микрофлоры у ВИЧ-инфицированных детей физиологичны и основаны на естественных симбиотических связях бифидобактерий с макроорганизмом. Автором разработан универсальный алгоритм выбора пробиотического препарата для ВИЧ-инфицированных детей, что соответствует понятиям современной персонифицированной медицины и открывает перспективы для повышения эффективности и расширения показаний пробиотикотерапии.

Результаты исследований Ю.В. Захаровой, представленные в диссертационной работе, реализованы в 3 методических рекомендациях, внедренных в практическое здравоохранение на региональном уровне.

Основные положения диссертационной работы используются в педагогическом и научно-исследовательском процессе на кафедре 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 результатов работы Ю. В. Захаровой определяется использованием обоснованных, адекватных и оптимальных подходов в проведении экспериментальных микробиологических, хроматографических и спектральных исследований. Все работы выполнены с использованием современного и поверенного оборудования, обладающего широкими возможностями, что позволило всесторонне изучить свойства микроорганизмов. Большой объем выборки, использование современного программного обеспечения и надлежащего статистического анализа подтверждает достоверность полученных результатов. Полученные результаты по микрофлоре ВИЧ-инфицированных пациентов сопоставимы с мировыми данными и дополняют их.

Основное содержание работы 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.

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

Оценка содержания, завершения и оформления диссертации

Диссертационная работа Захаровой Юлии Викторовны написана по традиционному плану со строгим и логическим изложением данных собственных исследований, стандартным построением графиков и рисунками, что облегчает восприятие материала. Работа изложена на 218 страницах, иллюстрирована 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.

Последовательность глав соответствует порядку решаемых задач, а сформулированные положения и выводы логично вытекают из результатов исследования. Содержание диссертации полностью отражено в автореферате.

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.

Диссертантом проанализировано 224 литературных источника, из которых 110 отечественные, 114 – зарубежные. Обзор литературы включает 4 раздела. В первом разделе проанализированы данные о факторах доминирования бифидофлоры в кишечном микробном сообществе. Во втором разделе обзора приводятся данные об изменениях микрофлоры у ВИЧ-инфицированных людей. В третьем разделе рассматриваются немногочисленные данные об особенностях биологических

свойств различных представителей микробиома ВИЧ-позитивных людей и о роли микрофлоры в прогрессировании ВИЧ-инфекции. Четвертый раздел обзора литературы дает представление о способах, методах и эффективности коррекции микрофлоры пациентов с ВИЧ-статусом.

В целом, проведенный Захаровой Юлией Викторовной критический анализ современной литературы, позволяет составить представление не только об актуальности темы исследования, но и о нерешенных вопросах в возможностях использования бифидобактерий для поддержания микробиологического равновесия кишечника ВИЧ-инфицированных пациентов и снижения у них рисков развития вторичных бактериальных инфекций.

В главе 2 «Характеристика кишечного микробиоценоза ВИЧ-инфицированных детей» представлены данные о качественном и количественном составе кишечной микрофлоры у ВИЧ-позитивных детей, в том числе на разных стадиях заболевания. Среди детей определены группы риска по развитию микробиологических нарушений третьей степени с формированием многокомпонентных ассоциаций условно-патогенных микросимбионтов. Представлены данные о биологических свойствах бифидобактерий и определена их роль в кишечном микробиоценозе у ВИЧ-инфицированных пациентов. Показано, что изменения биологических свойств бифидофлоры нарастают с усугублением степени дисбиоза кишечника, что позволяет обосновать необходимость ранней коррекции кишечного микробиоценоза у данной категории пациентов. В целом результаты второй главы позволяют решить первые две задачи и сформировать представление о микрофлоре детей с ВИЧ-статусом и особенностях биологических свойств бифидобактерий.

В главе 3 «Молекулярные основы структурно-функциональных характеристик бифидобактерий при ВИЧ-инфекции» диссертантом представлены данные, демонстрирующие механизмы взаимодействия бифидобактерий с условно-патогенными бактериями кишечного микробиоценоза человека. Установлено, что в основе снижения антагонистического типа взаимодействия бифидобактерий лежит

снижение частоты и уровня продукции лизоцима и органических кислот. Продемонстрировано воздействие липаз стафилококков на состав жирных кислот оболочек бифидобактерий, что ведет к нарушению первичных механизмов бактериально - клеточных взаимодействий и снижению численности (КОЕ/г) бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных пациентов. Показано, что изменение состава жирных кислот бифидобактерий снижает их способность к инаktivации токсических форм кислорода, что также негативно сказывается на их содержании в кишечнике. Таким образом, приведенные в 3 главе Захаровой Юлией Викторовной данные демонстрируют материальную основу взаимодействий доминантных и ассоциативных микросимбионтов и дополняют имеющиеся данные о механизмах развития микрoэкологических нарушений биотопa дистального отдела толстого кишечника человека.

4 глава «Метаболическая активность бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей» решает пятую задачу диссертационного исследования. На основе хроматографических методов исследования установлена высокая метаболическая активность бифидобактерий, изолированных из кишечника ВИЧ-инфицированных детей. Показано, что бифидобактерии продуцируют незаменимые для детей аминокислоты, что актуально для борьбы с «вастинг»-синдромом и перспективно для создания продуктов функционального питания для ВИЧ-инфицированных пациентов. Впервые показано, что бифидобактерии принимают участие в катаболизме триптофана по кинурениновому пути, что косвенно может свидетельствовать о влиянии бифидобактерий на течение ВИЧ-инфекции. В экспериментах на животных установлены штаммоспецифические противовоспалительные и психотропные эффекты экзометаболитов бифидобактерий, не зависящие от ВИЧ-статуса пациентов.

В 5 главе «Фундаментальные и прикладные аспекты управления популяцией и биологическими свойствами бифидобактерий при ВИЧ-инфекции» обоснованы два подхода в коррекции микрофлоры путем восстановления качественно-

количественного состава бифидофлоры за счет введения экзогенных пробиотических штаммов и бифидогенных факторов. Вследствие низкой биосовместимости и возможности развития феномена «пробиотик против микрофлоры хозяина» Захаровой Юлией Викторовной обоснована целесообразность индивидуального выбора пробиотического препарата для ВИЧ-инфицированных пациентов, последовательность действий которого описан в данной главе. Второй подход проводится с учетом физиологии микробной клетки и предполагает коррекцию биологических свойств бифидобактерий (гидрофобность и антиоксидантные свойства), т.е. восстановление их функциональной активности доминантной микробиоты в кишечном микросимбиозе.

В разделе «Заключение» автор анализирует полученные данные, проявляя научную компетентность, тактичность и способность к теоретическому обобщению.

Диссертация завершается семью выводами, которые полностью соответствуют поставленной цели и задачам, соответствуют её содержанию и базируются на принципах доказательной медицины. Таким образом, диссертационная работа Захаровой Юлии Викторовны может быть квалифицирована как законченное исследование. Результаты могут быть использованы для снижения у ВИЧ-положительных пациентов риска развития вторичных бактериальных инфекций и увеличения продолжительности жизни.

Соответствие специальности

Содержание работы, выполненной Захаровой Юлией Викторовной, полностью соответствует специальности 03.02.03 – микробиология. В целом, диссертация Захаровой Юлии Викторовны является самостоятельным, законченным исследованием, с хорошей доказательной базой и грамотно изложенными результатами.

Замечаний по диссертации нет. Дискуссионные вопросы, возникшие в ходе рецензирования, указывают на актуальность проведенных исследований и не

снижают высокой научной и практической ценности выполненного исследования.

Отдавая должное проделанной работе и оценивая ее положительно, хотелось бы узнать мнение автора по следующим вопросам:

1. Как Вы оцениваете перспективу дальнейших фундаментальных исследований и прикладного использования штаммоспецифических особенностей биологических свойств бифидобактерий у пациентов с ВИЧ-инфекцией?

2. Какова дальнейшая перспектива применения изученного Вами бифидогенного фактора в качестве пре- и синбиотика у ВИЧ-инфицированных пациентов?

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 роли микробиоты в формировании патологии человека (ВИЧ-инфицированные пациенты) и разработке подходов эффективной коррекции микробиологических нарушений кишечника, имеющее важное значение для медицинской 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

Ведущий научный сотрудник (с исполнением обязанностей заведующего лабораторией) лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук,

доктор медицинских наук, профессор РАН



Перунова Наталья Борисовна

Адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел. +7(3532) 77-59-08, e-mail: perunovanb@gmail.com

Подпись доктора медицинских наук, профессора РАН Перуновой Натальи Борисовны заверяю:

И.о. ученого секретаря Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

кандидат биологических наук



Шуплова Елена Александровна

«10» февраля 2020 года