

О Т З Ы В

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Ильина Вячеслава Константиновича на диссертационную работу Александровой Натальи Александровны «Взаимодействие энтерококков, кандид и мукозальных эпителиоцитов в экспериментальных системах», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология

Актуальность работы

Актуальность работы определяется тем, что проблема кандидозных инфекций, поражающих буккальный эпителий, а также вагинозов грибковой этиологии является острой и требует разработки средств профилактики и лечения, в том числе основанных на пробиотических микробных культурах. Стоит отметить, что в настоящее время для лечения и профилактики рецидивирующего вульво-вагинального кандидоза совместно с противогрибковыми антибиотиками применяются и пробиотические препараты, в состав которых чаще всего входят лактобациллы. Однако, известно, что и другие представители нормальной микробиоты способны оказывать негативное влияние на развитие кандидоза. Известно, что в состав ряда пробиотических препаратов для коррекции дисбактериоза кишечника входят бактерии рода *Enterococcus*, однако их антагонистический потенциал в отношении микромицетов изучен недостаточно. Антикандидозный эффект, присущий ряду бактерий может быть связан с различными антагонистическими механизмами, в том числе и опосредованно через взаимодействие с эпителиальными клетками. Поэтому изучение всех сторон взаимоотношений кандид и пробиотических препаратов на основе *Enterococcus spp.* является актуальным, как экспериментальное обоснование применения пробиотических средств на основе энтерококков в качестве средства профилактики и лечения стоматитов и вагинозов грибковой этиологии. Представлен широкий спектр данных такого взаимодействия, начиная с определения фунгицидного действия продуктов метаболизма энтерококков в отношении грибных культур *Candida spp.*, а также влияние

метаболитов *Enterococcus spp.* на адгезию к эпителиальным клеткам, заканчивая исследованием антагонизма на уровне вагинального биотопа.

В диссертации четко сформулированы цель и задачи исследования.

Основной целью явилось изучение взаимодействий энтерококков и кандид в различных экспериментальных системах с мукозальными эпителиоцитами.

Для решения указанной цели были поставлены адекватные задачи, для решения которых использовались различные методы исследования: бактериологические, молекулярные, а также эксперименты в системах *in vivo*, в том числе на лабораторных животных.

Научная новизна результатов исследования, выводов и рекомендаций

В ходе работы был разработан метод оценки экспрессии Toll-подобных рецепторов TLR-2 и TLR-4 на буккальных эпителиоцитах для оценки потенциала патогенности возбудителя и состояния колонизационной резистентности биотопа.

Впервые определено изменение уровня экспрессии TLR-2 и TLR-4 под влиянием продуктов метаболизма *Enterococcus spp.*.

Дана оценка антифунгальной активности ряда коллекционных штаммов *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*, и получены результаты о чувствительности культур кандид к бактериоцинам энтерококков.

Впервые доказан антиадгезивный эффект продуктов метаболизма энтерококков в отношении грибов рода *Candida* в системах с эпителиальными клетками.

Установлена зависимость между количественным содержанием энтерококков и кандид в вагинальном биотопе у женщин репродуктивного возраста, что позволяет получить представление о колонизационной резистентности урогенитального тракта у этой группы лиц.

Показано, что комплекс секреторных продуктов энтерококков обладает антикандидозной активностью на уровне вагинального биотопа.

Практическая значимость

1. Создана экспериментальная тест-система «кандиды - буккальные эпителиоциты» для интегральной оценки антикандидозной активности пробиотических штаммов.

2. Создана коллекция штаммов *Enterococcus spp.* и *Candida spp.*, которая будет использована в дальнейших исследованиях кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России.

3. Разработанные методы применяются в научно-исследовательской работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России (г. Нижний Новгород).

4. Полученные в ходе исследования данные используются в учебно-методической работе кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России.

Структура работы

Диссертация изложена на 124 странице машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, шести глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературных источников. Диссертация содержит 14 таблиц и 19 рисунков. Библиографический указатель включает 232 источника литературы, в том числе - 110 отечественных и 122 зарубежных авторов.

Во введении представлены актуальность и степень разработанности темы исследования, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология исследования. В данной главе для формулирования актуальности исследования были использованы современные отечественные и зарубежные литературные источники.

В главе «Материалы и методы исследования» охарактеризованы объекты, объем и методы исследования. Диссертационная работа имеет

большой спектр методов исследования. В ходе работы применялись микробиологические методы исследования, получение продуктов метаболизма энтерококков и их отдельных фракций, оценка адгезии кандид на буккальных эпителиоцитах, получение клеточной суспензии *Candida spp.*, получение буккальных эпителиоцитов, искусственная колонизация *Candida spp.* на эпителиоцитах. Уровень экспрессии Toll-подобных рецепторов (TLR) буккальных эпителиоцитов оценивался методом проточной цитофлуориметрии. Для оценки взаимодействия энтерококков и кандид *in vitro* был применен метод совместного культивирования энтерококков и кандид на двухслойном агаре, а также оценка жизнеспособности кандид после обработки метаболитами энтерококков. Для оценки взаимоотношений энтерококков и кандид в системах *in vivo* проводилось определение содержания микроорганизмов (энтерококков, кандид, лактобактерий) в вагинальном содержимом у женщин, а также моделирование и оценка течения экспериментального вагинального кандидоза у крыс на фоне введения энтерококков. Все полученные результаты подвергались статистической обработке результатов.

Глава «Обзор литературы» посвящена оценке публикаций, посвященных морфо-функциональным особенностям кандид и факторам, влияющим на развитие кандидоза, морфо-функциональным особенностям и механизмам бактериального антагонизма энтерококков и участию эпителиоцитов в обеспечении колонизационной резистентности слизистых оболочек.

Раздел «Результаты собственных исследований» содержит 5 глав (Главы 2-6). Глава 2 посвящена исследованиям влияния продуктов метаболизма энтерококков на адгезивность кандид в экспериментальной тест-системе с буккальными эпителиоцитами. В главе 3 описано влияние метаболитов энтерококков на жизнеспособность и рецептор - зависимую активность буккальных эпителиоцитов. Глава 4 посвящена изучению влияния энтерококков на жизнеспособность кандид в экспериментах *in vitro*.

В главе 5 показано изменение TLR-зависимой активности буккальных эпителиоцитов у больных кандидозом полости рта, в сравнении со здоровыми донорами. В главе 6 описано взаимоотношение энтерококков и кандид в системах *in vivo*.

Диссертационная работа Александровой Н.А. завершается заключением, выводами, практическими рекомендациями, описанием перспектив дальнейшей разработки темы и списком литературы. Выводы отражают основные результаты работы и соответствуют поставленной цели и задачам исследования.

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 4 работы в изданиях, рекомендованных ВАК, 10 – в сборниках конференций.

При изучении текста диссертации возникает ряд замечаний

1. Положения, выносимые на защиту, логичнее было бы перенести выше по тексту, например, после целей и задач.

2. В формулировке цели работы не указано направление, связанное с вагинозами.

3. В экспериментах по изучению антиадгезивной активности энтерококков было выделено несколько фракций метаболитов энтерококков на основании их молекулярных масс. Позволительно предположить, что при исследовании отдельных энтероцинов и ферментов работа более выиграла бы в практическом плане. Стоит отметить, что получение и исследование отдельных компонентов метаболитов отражено в перспективах разработки темы.

Замечания не носят принципиального характера и не влияют на высокое качество работы.

Заключение

Диссертационная работа Александровой Натальи Александровны «Взаимодействие энтерококков, кандид и мукозальных эпителиоцитов в экспериментальных системах», выполненная под руководством д.б.н., доцента Заславской Майи Исааковны, представляет собой завершённую

научно-квалификационную работу, которая дает экспериментальное обоснование использования энтерококков в качестве пробиотических препаратов для профилактики и лечения кандидозов.

Диссертационная работа Александровой Натальи Александровны «Взаимодействие энтерококков, кандид и мукозальных эпителиоцитов в экспериментальных системах», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований полностью соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор Александрова Наталья Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология.

Заведующий отделом санитарно-гигиенической безопасности человека в искусственной среде обитания Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра РФ Института медико-биологических проблем РАН, доктор медицинских наук, профессор

Тел. 4991950025 Моб. 9265263879
Эл. Почта riton2004@bk.ru, ilyin@imbp.ru
адрес 123007 Москва, Хорошевское шоссе 76а

Ильин Вячеслав Константинович

22.01.2018г.

Подпись Ильина В.К. заверяю

Ученый секретарь ГНЦ РФ ИМБП РАН
Доктор биологических наук

М.А. Левинских

