

О Т З Ы В

официального оппонента доктора биологических наук, доцента Стояновой Лидии Григорьевна 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 темы

В последние годы организм человека подвергается воздействию целого комплекса неблагоприятных факторов, влияющих на нормальное функционирование основных систем жизнедеятельности и приводят к ухудшению эпидемиологической ситуации, увеличению числа инфекционных заболеваний. Излишнее, а порой и бесконтрольное применение химиотерапевтических препаратов сопровождается снижением иммунитета и увеличением количества патогенных и условно-патогенных микробов. Количество инфекционных заболеваний, отличающихся затяжным и хроническим течением, источником которых являются условно-патогенные микроорганизмы, увеличивается. Мукозальный кандидоз одно из распространенных грибковых заболеваний, возникающих у иммунокомпроментированных пациентов.

Микромицеты рода *Candida* относят к факультативной нормобиоте слизистых оболочек человека. Известно, что данные дрожжи могут быть причиной возникновения оппортунистической инфекции. Для лечения кандидозов традиционно применяют антимикотические антибиотики и химиопрепараты, обладающих рядом побочных эффектов, в частности, относительно высокой токсичностью. Что накладывает ограничение на длительность их приема.

Еще одной проблемой использования противогрибковых препаратов является приобретенная (вторичная) резистентность кандид, которая в последнее время носит глобальный характер и имеет тенденцию к прогрессированию. Это связано с важной ролью, которую играет микробиота в жизнедеятельности макроорганизма, а также с повсеместно наблюдаемыми изменениями экологии микроорганизмов, повлекшими нарастание удельного веса заболеваний,

вызываемых микробами-оппортунистами. Противостоять изменениям микробного состава организма под воздействием экологических, лекарственных, хирургических и других стрессовых агентов можно, обогатив микробиоту желудочно-кишечного тракта полезными микроорганизмами, вносимыми извне (пробиотиками).

В связи с этим большой интерес представляет изучение видового разнообразия и структуры сообщества симбиотических микроорганизмов человека. Изучение антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами - представителями нормальной микробиоты человека является основой для разработки пробиотических препаратов, применяемых для лечения и профилактики дисбактериозов различной этиологии.

Бактерии рода *Enterococcus* обладают широким спектром антимикробной активности, высокой ферментативной активностью и входят в состав пробиотических препаратов, используемых для лечения дисбактериоза кишечника. Энтерококки являются минорными представителями микробиоты вагинальной полости и могут вносить свой вклад в формирование колонизационной резистентности урогенитального тракта женщин. Поэтому изучение механизмов антикандидозной активности энтерококков представляет большой практический интерес и научную значимость в медицине.

Немаловажную роль в защите слизистых оболочек от потенциального патогена играют мукозальные эпителиоциты. Эпителиальные клетки способны вступать в активные рецепторные взаимодействия с микроорганизмами, а также синтезировать различные биологически активные вещества, обладающие микробоцидными свойствами. Стоит отметить, что механизмы антикандидозной активности представителей нормобиоты могут быть обусловлены, в том числе, и опосредованным действием их на рецепторный аппарат эпителиоцитов.

Актуальность выбранной соискателем темы диссертационной работы не вызывает каких-либо сомнений.

Диссертационная работа Александровой Натальи Александровны, посвященная изучению взаимоотношений энтерококков и кандид в экспериментальных системах, имеет четко сформулированную цель, а именно:

изучить механизмы взаимодействия энтерококков и кандид, а также их влияние на рецептор-зависимую активность буккальных эпителиоцитов.

Исходя из поставленной цели, сформулированы задачи исследований, которые составили структуру диссертационной работы

Новизна исследования и полученных результатов.

Впервые диссертантом исследована антиадгезивная активность энтерококков в отношении кандид в экспериментальной системе с буккальными эпителиоцитами, которые является информативным материалом в диагностике ряда социально значимых заболеваний и метаболических нарушений.

Установлено, что метаболиты энтерококков с молекулярной массой 3-10 кДа, подавляют адгезию *Candida. spp.* к буккальным эпителиоцитам *in vitro*, вызывая структурные изменения в рецепторном аппарате кандид.

Изучено влияние метаболитов разных штаммов энтерококков на экспрессию Toll-подобных рецепторов на буккальных эпителиоцитах и показано, что продукты метаболизма энтерококков способны влиять на экспрессию TLR-2 и TLR-4 на буккальных клетках.

Впервые дана сравнительная оценка изменения экспрессии Toll-подобных рецепторов на буккальных эпителиоцитах при оральном кандидозе и у здоровых доноров. В ходе экспериментов на проточном цитофлуориметре установлено, что при воспалении, вызванном *Candida spp.*, преобладают TLR-2 / TLR-4-негативные клетки, в отличие от проб, полученных от здоровых пациентов.

Впервые была определена ингибиторная активность энтерококков в отношении кандид на уровне вагинального биотопа. Была выявлена обратная корреляционная зависимость между титрами кандид и энтерококков в вагинальной полости у женщин детородного возраста. Было доказано, что продукты метаболизма *Enterococcus faecium* способствуют элиминации кандид из вагинальной полости при экспериментальном вагинальном кандидозе.

Достоверность и апробация материалов исследования

Материалы диссертационного исследования успешно были апробированы на кафедре микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России. В ходе работы было исследовано большое количество экспериментального

материала. Для проведения экспериментов использовались классические бактериологические и современные молекулярные методы исследования, а также исследования на лабораторных животных. Методы статистической обработки полученных результатов являются общепринятыми и позволяют оценить достоверность полученных результатов диссертационного исследования.

Полученные в результате работы данные позволили сформулировать выводы, положения, выносимые на защиту, характеризующиеся высокой научной новизной. Выводы, положения, выносимые на защиту, а также практические рекомендации логично обоснованы. Автором опубликовано 14 печатных работ, из которых 4 в рецензируемых научных изданиях.

Теоретическая и практическая значимость работы

Доказанная антагонистическая активность энтерококков в отношении кандид на уровне вагинально биотопа расширяет представления о влиянии минорных представителей нормальной микробиоты влагалища на поддержание колонизационной резистентности слизистых оболочек урогенитального тракта.

В ходе работы собрана большая коллекция штаммов *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*, а также *Candida* spp., которая может быть использована в дальнейших исследованиях.

Разработанный метод оценки экспрессии Toll-подобных рецепторов на буккальных эпителиоцитах может быть использован для отбора безопасных штаммов, обладающих пробиотической активностью.

Полученные данные о влиянии бактериальных метаболитов на экспрессию Toll-подобных рецепторов дают новое представление о вкладе нормобиоты в поддержание колонизационной резистентности эпителиальных клеток опосредованно через рецепторный аппарат.

Экспериментальная тест-система «кандиды– буккальные эпителиоциты» может применяться для исследования антиадгезивной активности потенциальных пробиотических штаммов.

Материалы, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, могут быть использованы при составлении учебных программ для студентов разных факультетов Федерального государственного бюджетного образовательного

учреждения высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 15.06.17). Разработанные методы и алгоритмы исследования внедрены в работу Федерального государственного бюджетного учреждения «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России (г. Нижний Новгород) (акт внедрения от 28.08.17).

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, методологии исследований, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и литературы. Список литературы включает в себя 110 отечественных и 122 зарубежных источников. Работа хорошо иллюстрирована, в ней присутствуют 14 таблиц и 19 рисунков.

Во введении диссертант обосновывает актуальность научного исследования, а также указывает разработанность выбранной темы. Автор формулирует цели и задачи научной работы, теоретическую и практическую значимость, новизну исследования, положения, выносимые на защиту.

Автором детально проработана отечественная и зарубежная литература по теме диссертации, которая вошла в обзор литературы, изложенный на 21 странице. В обзоре литературы представлены данные о микромицетах рода *Candida* и факторах их патогенности, дана характеристика бактериям рода *Enterococcus*, в том числе их биохимической активности. В главе подробно охарактеризованы ферменты и известные бактериоцины энтерококков, способные выступать в качестве факторов патогенности, а также проявлять антагонистические свойства в отношении ряда микроорганизмов. Дано представление о роли мукозальных эпителиоцитов в поддержании колонизационной резистентности слизистых оболочек, более подробно описаны Toll-подобные рецепторы, опосредованно влияющие на синтез различных цитокинов. Подбор литературы логичен, обзор написан хорошим литературным языком, отражает задачи исследований и помогает правильно интерпретировать результаты, полученные автором.

Основными объектами исследования являлись микромицеты рода *Candida*, бактерии рода *Enterococcus* и буккальные эпителиоциты человека. Буккальный эпителий (БЭ) является легкодоступным объектом для молекулярной диагностики различных заболеваний, а его получение возможно неинвазивным путем. Для решения поставленных задач диссертантом были привлечены новые современные микробиологические, молекулярные методы работы в свете последних научных исследований. В работе использовалось современное оборудование для проведения проточной цитофлуориметрии и протеомного анализа. Эксперименты проводились в системах *in vitro* и *in vivo* (на лабораторных белых беспородных крысах-самках). Исследовано свыше 950 проб буккальных эпителиоцитов человека, проведено бактериологическое исследование вагинального содержимого 552 женщин. Для моделирования вагинального кандидоза использовали 30 белых беспородных крыс. Проведено 93 серии экспериментов по искусственной колонизацией эпителиоцитов кандидами, свыше 1350 бактериологических исследований., включающих 7 серий экспериментов по изучению антагонистической активности энтерококков и кандид *in vitro* и 3 серии *in vivo*. Выполнено 4 серии экспериментов с использованием проточного цитофлуориметра.

Статистическая обработка результатов исследований проведена с привлечением современных методов математической обработки результатов.

Результаты собственных исследований представлены в пяти главах.

В главе 2 исследована способность энтерококков оказывать влияние на адгезивный потенциал кандид в отношении буккального эпителия. Исследования проводились в системе *in vitro*. В главе подробно изучаются возможные механизмы антиадгезивной активности продуктов метаболизма энтерококков. Доказано, что способность *Enterococcus* spp. подавлять адгезию кандид носит штаммоспецифичный характер и связана с модификацией рецепторов адгезии микромицетов.

Глава 3 посвящена изучению реактивности буккальных эпителиоцитов в ответ на действие продуктов метаболизма энтерококков. В ходе исследования показано, что метаболиты разных штаммов энтерококков не оказывают влияния

на рецепторы адгезии эпителиоцитов, но способны изменять экспрессию Toll-подобных рецепторов TLR-2 и TLR-4 на эпителиальных клетках. Было показано, что направление этих изменений связано с биохимическими свойствами штаммов.

В четвертой главе приведены данные, полученные в экспериментах по изучению фунгицидных свойств энтерококковых метаболитов. В ходе исследования было выявлено, что для всех штаммов энтерококков характерен фунгистатический эффект в отношении кандид. Фунгицидным действием обладали лишь некоторые штаммы.

В пятой главе представлены результаты исследования экспрессии TLR-2 и TLR-4 у больных оральным кандидозом. Было показано, что при хроническом оральном кандидозе количество TLR-2 и TLR-4 - негативных буккальных клеток значительно увеличивалось, что было нехарактерно для эпителиоцитов, полученных от здоровых доноров.

Шестая глава посвящена изучению взаимоотношений кандид и энтерококков в системах *in vivo*. Было проведено бактериологическое исследование содержимого влагалища женщин детородного возраста с последующим корреляционным анализом данных. Была выявлена обратная корреляционная зависимость между количеством энтерококков и титром кандид, колонизирующих влагалище пациенток. Полученные данные были подтверждены автором при проведении экспериментов на лабораторных животных. Было показано, что введение продуктов метаболизма энтерококков во влагалище крыс способствовало элиминации микромицетов. Результаты исследований наглядно иллюстрированы таблицами и рисунками, подтверждающими глубокий анализ экспериментальных данных.

Выводы конкретны, обобщают полученные результаты и соответствуют цели и задачам исследования. В заключении автором даются практические рекомендации, описываются перспективы дальнейшей разработки темы.

Список литературы содержит достаточное количество современных отечественных и иностранных источников.

Основные результаты исследований неоднократно обсуждались на Всероссийских и Международных научных конференциях. Публикации по теме диссертации дают полное представление о выполненной работе.

Автореферат составлен в классической форме и отражает содержание, основные результаты исследований, изложенные в диссертации.

Автором проведено объемное исследование и решены поставленные задачи. Работа представляет собой законченное научное исследование и соответствует специальности 03.02.03 – микробиология.

Несмотря на высокий уровень проведенной научно-исследовательской работы в ходе изучения диссертации **возникает ряд вопросов**, требующих уточнения.

1. При исследовании вагинального содержимого женщин были обследованы пациентки детородного возраста, стоило отметить, имелись ли среди них беременные женщины, и как это могло повлиять на результаты исследования?

2. В работе исследовано изменение экспрессии Toll-подобных рецепторов при кандидозе полости рта, хотелось бы уточнить каковы изменения экспрессии TLR-2 и TLR-4 при вагинальном кандидозе?

Высказанные вопросы носят дискуссионный характер и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы. Очевидна практическая значимость данной работы для здоровья человека и непосредственный выход в медицину.

Заключение

Диссертационная работа Александровой Н.А. «Взаимодействие энтерококков, кандид и мукозальных эпителиоцитов в экспериментальных системах», выполненная под руководством доктора биологических наук, доцента Заславской Майи Исааковны и представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является законченным научно-квалификационным трудом и содержит новое решение актуальной задачи: исследование взаимодействия энтерококков и кандид, а также влияние их на мукозальные эпителиоциты.

По актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований диссертационная работа **«Взаимодействие энтерококков, кандид и мукозальных эпителиоцитов в экспериментальных системах»** 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.

Ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии микробов кафедры микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, тел. +7 (495) 939-27-76, e-mail: stoyanovamsu@mail.ru)
доктор биологических наук, доцент



Л.Г. Стоянова

Подпись Стояновой Лидии Григорьевны заверяю:
Декан биологического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
академик



М.П.Кирпичников

25 января 2018 года

