

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, заведующего отделом санитарно-гигиенической безопасности человека в искусственной среде обитания, заведующего лабораторией микробной экологии человека Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем Российской академии наук» Ильина Вячеслава Константиновича на диссертационную работу Боровковой Екатерины Андреевны «Использование аутопробиотикотерапии для коррекции микробиологических нарушений кишечника», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – микробиология (биологические науки)

### Актуальность темы исследования

Новым направлением традиционной пробиотикотерапии является использование в качестве пробиотиков аутоштаммов микроорганизмов протективной микробиоты (аутопробиотиков). Разработка концепции аутопробиотикотерапии, а также создание и применение аутопробиотиков при различных патологиях принадлежит российским учёным, чьи работы не имеют аналогов в мире. К настоящему времени в РФ запатентованы способы получения аутопробиотических препаратов на основе индигенных *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *E.faecium* и анаэробных консорциумов. Изучается возможность и эффективность коррекции дисбиотических нарушений у пациентов с синдромом раздражённого кишечника, сахарным диабетом второго типа, болезнью Паркинсона, а также у лиц опасных профессий. Вместе с тем, до настоящего времени в России не было работ с участием взрослых добровольцев, посвящённых изучению влияния аутоштаммов *Lactobacillus spp.* на восстановление нормофлоры кишечника, нарушенной применением антибактериальных препаратов. Таким образом, актуальность диссертационного исследования Боровковой Екатерины Андреевны определяется в первую очередь тем обстоятельством, что автором проведена оценка использования аутопробиотиков на основе лактобацилл для стабилизации микрофлоры лиц, прошедших

антибиотикотерапию и обладавших дисбиотическими нарушениями различной степени выраженности. Автором обоснованы критерии отбора штаммов представителей протективной микрофлоры для изготовления аутопробиотических препаратов. В результате проведённых диссертантом исследований пополнена доказательная база эффективности технологии аутопробиотикотерапии.

### **Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Научная новизна диссертационного исследования Боровковой Екатерины Андреевны заключается в том, что с помощью микробиологических и молекулярно-генетических методов исследования проведена идентификация и изучены биологические свойства индигенных штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа разных возрастных групп. В результате определения видового разнообразия лактобацилл выявлено, что преобладающими в лактофлоре кишечника являются *L.rhamnosus* (53,5%), *L.plantarum* (33,9%), *L.paracasei* (9,6%), *L.fermentum* (2,4%) и *L.brevis* (0,6%). Продемонстрировано наличие значительного пробиотического потенциала, выразившегося в средней адгезивной активности 76,0% штаммов и высокой антагонистической активности к патогенным и условно-патогенным тест-культурам большинства штаммов *Lactobacillus spp.* (от 59,0% в отношении *S.typhimurium* № 4922 до 100% в отношении *P.aeruginosa* ATCC 27853).

В результате впервые проведённого полногеномного секвенирования диссертантом описана структура генома и выявлены гены антибиотикорезистентности аутоштаммов *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18. Установлено, что в исследованных геномах не содержатся гены *ermB*, *ermC*, *tetW* и *tetM*, ассоциированные с мобильными генетическими элементами, что определяет безопасность использования аутопробиотиков на основе *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и

*L.plantarum* 83–18 с позиции нераспространения детерминант устойчивости к антибактериальным препаратам.

В результате проведённого культурального исследования микробиоценоза кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа в возрасте от 20 до 60 лет до начала антибактериальной терапии показано наличие нормобиоценоза у 31% лиц и относительно невысокой (по сравнению с другими регионами Российской Федерации) частоты распространения дисбиотических нарушений кишечника I степени в 23% случаев и II степени в 46% случаев.

Автором охарактеризован микробный пейзаж кишечника добровольцев Северо-Кавказского федерального округа, изменённый под воздействием антибиотиков, и показано снижение содержания протективной микрофлоры, а именно *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *E.coli* более чем на два порядка, повышение количества *Candida spp.*, а также снижение количества условно-патогенных *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.* вплоть до элиминации *Proteus spp.*, *E.coli lac-*, *E.coli hem+* и *Staphylococcus spp.*

Диссертантом впервые в исследовании с участием добровольцев доказана эффективность аутопробиотикотерапии в коррекции микробиологических нарушений кишечника, вызванных применением антибактериальных препаратов, выраженная в достоверном повышении и стабилизации содержания *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* и типичных *E.coli*.

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

Достоверность полученных результатов основана на большом объёме материала и проведённых тестов в соответствии с грамотно разработанным планом исследования по изучению эффективности аутопробиотикотерапии в коррекции дисбиотических нарушений кишечника. Для отбора штаммов кандидатов в аутопробиотики были изучены биологические свойства 159 штаммов *Lactobacillus spp.* Курс аутопробиотикотерапии был назначен 78

добровольцам, каждому из которых было проведено четырёхкратное культуральное исследование фекалий (до и после антибиотикотерапии, до и после аутопробиотикотерапии) для сравнительной микробиологической оценки динамики качественных и количественных показателей микробиоценоза кишечника, включавших бактерии родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* и др.

В диссертационной работе Боровковой Екатерины Андреевны применялись современные микробиологические, высокочувствительные и специфичные молекулярно-генетические методы, проводился биоинформационный и статистический анализ полученных данных, что позволило автору сформулировать научно обоснованные выводы и рекомендации.

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

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в том, что характеристика биологических свойств и выявление высокого пробиотического потенциала индигенных штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечника жителей Северо-Кавказского федерального округа, позволяет применить полученные результаты для создания новых и эффективных региональных пробиотиков. Кроме того, проведённая в динамике оценка состояния микробиоценоза кишечника до и после антибактериальной терапии, а также после аутопробиотикотерапии в комплексе с созданием индивидуального аутопробиотического препарата на основе индигенных *Lactobacillus spp.* определяет новый методологический подход к коррекции дисбиотических нарушений в контексте персонафицированной медицины.

Практическая значимость полученных результатов состоит в том, что в ходе проведения исследования получены и депонированы в базу данных GenBank NCBI полногеномные нуклеотидные последовательности штаммов *L.paracasei* 347–16, *L.plantarum* 123–17 и *L.plantarum* 83–18.

Предложенный автором алгоритм микробиологического мониторинга состава микрофлоры кишечника и коррекции микрoэкологических нарушений с помощью аутопробиотиков на основе *Lactobacillus spp.* позволяет выявлять возможную степень дисбиотических нарушений кишечника, устанавливать качественные и количественные изменения микрофлоры кишечника под воздействием различных факторов, выделять, отбирать и сохранять перспективные аутоштаммы *Lactobacillus spp.* для создания на их основе индивидуальных аутопробиотиков.

Доказанная автором эффективность аутопробиотикотерапии в коррекции микробиоценоза кишечника, нарушенного применением антибиотиков, расширяет область применения данной методики, которая также может быть использована для профилактики и устранения побочных эффектов использования нестероидных противовоспалительных препаратов, гормонотерапии и др. Результаты диссертационного исследования внедрены в лечебно-диагностическую работу Пятигорской городской поликлиники № 1 города Пятигорска, а также используется в работе бактериологической лаборатории Кисловодской городской специализированной инфекционной больницы города Кисловодска.

#### **Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях**

Материалы диссертационной работы представлены на 6 научно-практических всероссийских конференциях, в том числе с международным участием, и отражены в 10 печатных работах, в том числе 3 статьи в рецензируемых изданиях, 1 публикация в другом издании, 5 тезисов в рецензируемых изданиях, 1 – в материалах конференций.

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

Материалы диссертации изложены на 156 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 19 таблицами и 16 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей

разработки темы, списка сокращений, списка литературы, включающего 207 источников, из которых 71 – отечественных, 136 – зарубежных авторов, приложения. Структура и содержание диссертации, научные положения, полученные результаты, выводы и рекомендации в необходимом объёме представлены в автореферате и полностью соответствуют тексту диссертации. Оформление диссертации и автореферата полностью отвечает существующим требованиям.

Во **введении** изложена актуальность темы исследования и степень её разработанности, сформулированы цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, подробно описаны методология и методы исследования, представлены личное участие автора в получении результатов и положения, выносимые на защиту, а также степень достоверности и апробация результатов.

Глава **«Обзор литературы»** включает четыре подраздела, в которых приведены современные данные о составе и функциях микробиоты кишечника человека, дана краткая характеристика бактерий рода *Lactobacillus*, описано влияние антибиотиков на микробиоту кишечника. Обзор завершается описанием существующих сведений об аутопробиотикотерапии. На основании анализа литературных источников автором сделано заключение о перспективности аутопробиотикотерапии с использованием индигенных штаммов *Lactobacillus spp.* в коррекции микрoэкологических нарушений кишечника, вызванных применением антибиотиков.

Раздел **«Результаты собственных исследований»** включает три главы, отражающий весь объём проведённой работы. В первой главе автором изучены биологические свойства 159 индигенных штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечника добровольцев, проживающих на территории Северо-Кавказского федерального округа. На основе полифазной таксономии проведена идентификация бактерий рода *Lactobacillus*, определены адгезивная, антагонистическая активность, а также фенотипическая

антибиотикорезистентность. Полученные автором данные показывают потенциальную возможность использования индигенных лактобацилл кишечника в качестве индивидуальных аутопробиотиков.

Во второй главе представлена характеристика генома, выявленные гены антибиотикорезистентности, а также данные по соотношению фенотипической и генотипической устойчивости к антибиотикам аутоштаммов *L.paracasei* 347-16, *L.plantarum* 123-17 и *L.plantarum* 83-18.

В третьей главе Боровкова Екатерина Андреевна описывает динамику микрофлоры кишечника 78 добровольцев под воздействием антибиотиков и аутопробиотикотерапии. В начале главы приведена разработанная автором схема посева фекалий для культурального исследования микробиоценоза кишечника и алгоритм микробиологического мониторинга состояния микробиоценоза кишечника. Диссертант подробно анализирует качественный и количественный состав микрофлоры кишечника добровольцев до и после антибактериальной терапии, до и после применения аутопробиотиков, а также проводит сравнение эффективности аутопробиотикотерапии в трёх группах наблюдения.

В «**Заключении**» автор систематизирует и обсуждает полученные результаты, сопоставляя их с литературными данными, и ещё раз подчёркивает эффективность использования аутопробиотикотерапии для коррекции микроэкологических нарушений кишечника при дисбиозах, вызванных применением антибактериальных препаратов, а также целесообразность использования индигенных *Lactobacillus spp.* в качестве аутопробиотиков за счёт доказанной биологической безопасности и пробиотического потенциала исследованных штаммов. Заключение написано обстоятельно, критично и читается с интересом.

Завершают диссертацию **выводы**, которые соответствуют поставленным задачам, суммируют главные результаты исследования и свидетельствуют о достижении цели работы.

## Соответствие специальности

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 1.5.11. – микробиология (биологические науки).

Принципиальных замечаний по представленной диссертационной работе нет. Возникшие вопросы носят уточняющий характер и вызваны актуальностью выбранной темы.

Замечания и вопросы по диссертационной работе:

1. Объясните необходимость анализировать геномы аутопробиотиков на предмет их потенциальной опасности, связанной с наличием генов антибиотикорезистентности, для своих же собственных хозяев.
2. В тексте диссертации таблицы 15, 17-19 неудачно скомпонованы, что затрудняет оценку изменений микрофлоры кишечника в группах наблюдения до и после антибиотиков, после аутопробиотикотерапии.
3. Для более рельефной иллюстрации преимуществ аутопробиотикотерапии следовало бы использовать в качестве сравнения группы, принимающие аллогенные бактериальные препараты.

## Заключение

Диссертационная работа Боровковой Екатерины Андреевны на тему: «Использование аутопробиотикотерапии для коррекции микробиологических нарушений кишечника», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – микробиология (биологические науки), выполненная под руководством доктора медицинских наук, доцента Алиевой Елены Васильевны, является завершённой научно-квалификационной работой и содержит решение актуальной научной задачи – оценка эффективности аутопробиотикотерапии в коррекции дисбиотических нарушений кишечника, вызванных применением антибактериальных препаратов, и изучение биологических свойств индигенных штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечника



жителей Северо-Кавказского федерального округа. По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Боровковой Екатерины Андреевны отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., № 426 от 20.03.2021, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ № 751 от 26.05.2020 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а её автор, Боровкова Екатерина Андреевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.11. – микробиология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Заведующий отделом санитарно-гигиенической безопасности человека в искусственной среде обитания, заведующий лабораторией микробной экологии человека Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем Российской академии наук» (123007, Москва, Хорошевское шоссе 76 А, +7 (499) 195-2363, e-mail: doc@imbp.ru) доктор медицинских наук,

профессор  
«20» октября 2021 г.

Ильин Вячеслав Константинович

Подпись В.К. Ильина заверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем Российской академии наук» (123007, Москва, Хорошевское шоссе 76 А, +7 (499) 195-2363, e-mail: doc@imbp.ru),

доктор биологических наук



Левинских Маргарита Александровна

