

В диссертационный совет 24.1.023.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации — Институте медико-биологических проблем Российской академии наук

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата медицинских наук, главного специалиста по медицинской логистике Логистического центра Российской антарктической экспедиции Федерального государственного бюджетного учреждения «Арктический и антарктический научно-исследовательский институт» Федеральной службы по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Росгидромета) Российской Федерации Панина Александра Леонидовича на диссертационную работу Шеблаевой Анны Сергеевны «Экспериментальное обоснование применения аутопробиотика для восстановления микробиоценоза полости рта в условиях искусственной среды обитания», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 3.3.7 – Авиационная, космическая и морская медицина

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Шеблаевой Анны Сергеевны «Экспериментальное обоснование применения аутопробиотика для восстановления микробиоценоза полости рта в условиях искусственной среды обитания», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 3.3.7 – Авиационная, космическая и морская медицина (далее – ДИССЕРТАЦИЯ), посвящена актуальной проблеме для космической, авиационной и морской медицины, а также решает насущные проблемы микробиологии и эпидемиологии для лиц, подвергающихся экстремальным воздействиям.

Актуальность избранной автором ДИССЕРТАЦИИ темы исследования не оставляет сомнений поскольку зубочелюстная система, включающая пародонт, является важнейшей составляющей в комплексной системе организма. Воздействие на человека специфического ряда факторов, присущих отрицательным условиям космического полета и искусственной среды обитания, как его модели, может приводить к изменению показателей функционального состояния полости рта. Данные негативные влияния могут привести к развитию воспалительных изменений слизистой полости рта и десен, астенизации пародонта и нарушению его кровоснабжения вследствие синдрома вегетативной сосудистой дисфункции. Вследствие этих влияний происходит формирование различного вида дисбиозов и вторичных иммунодефицитных состояний, способствующих экзогенной и эндогенной инфекциям с формированием хронических очагов слизистых оболочек полости

рта. Так, общей тенденцией изменения физиологических показателей у обследуемых космонавтов было снижение скорости слюноотделения в 1,5 раза, которое приводило к изменениям состояния микрофлоры и антиинфекционной резистентности слизистых оболочек ротоглотки. Экстремальные условия среды обитания и факторы хронического стресса могут стать провокационными для начала развития воспалительных процессов в ротовой полости и изменения микробиоценоза в сторону дисбиотических процессов, активации условно-патогенных представителей микробиоценоза.

Одним из методов повышения защитных свойств иммунной системы и нормализации микробиоценоза являются пробиотики. Они представляют собой апатогенные для человека бактерии, обладающие антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий, обеспечивающие восстановление нормальной микрофлоры. Показано, что для узких профессиональных групп, которыми являются космонавты, испытатели моделей космических полетов и лиц, находящихся в условиях длительного экстремального воздействия (например – участники круглогодичных полярных экспедиций) целесообразно использовать пробиотики, основанные на аутологичных микроорганизмах, представителях протективной микрофлоры.

В оппонированной работе убедительно показан положительный эффект от использования аутопробиотика на основе слюварного стрептококка (*Streptococcus salivarius*). Он является представителем протективной микрофлоры пародонта и будет иметь успех при включении его в комплекс методов, направленных на поддержание гомеостаза в условиях длительных пилотируемых полетах, применительно к задачам профессиональных и микробиологических рисков в экстремальных условиях. Поэтому исследование, посвященное, экспериментальному обоснованию применения данного аутопробиотика для восстановления микробиоценоза полости рта в условиях искусственной среды обитания, безусловно, весьма актуально.

При этом, степень разработанности темы исследования охарактеризована исчерпывающе, с необходимой степенью периодизации, что дополнительно подчёркивает её актуальность. Таким образом, избранная автором ДИССЕРТАЦИИ тема является актуальным направлением исследования, способствующим более глубокому пониманию проблемы сохранения здоровья космонавтов и лиц, находящихся в экстремальных условиях, сохраняющей высокую значимость для научной медицины и практического здравоохранения.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов

Научная новизна результатов исследования, положенного в основу ДИССЕРТАЦИИ, вполне очевидна: условия измененной среды обитания и космического полета накладывают трудности в отборе проб, их хранении и транспортировке, что вызывает трудности при

использовании классического бактериологического метода и метода ПЦР. Впервые была проведена сравнительная оценка бактериологического метода и метода хроматомасс-спектрометрии (МСММ) при оценке микрофлоры пародонта у лиц, находящихся в искусственно изменённой среде обитания. Впервые методом хроматомасс-спектрометрии при длительной изоляции в гермообъекте изучался качественный и количественный состав условно-патогенной микрофлоры полости рта у испытуемых.

Автор впервые в отечественной литературе использовал, сопоставил и провёл анализ трёх способов оценки микрофлоры пародонта. Расширенный высокочувствительный анализ показал динамику изменений количества условно-патогенной микрофлоры в зависимости от длительности нахождения в герметично замкнутом объекте, имитирующем капсулу космического корабля. При этом убедительно был показан рост таких условно-патогенных представителей как: *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Candida* spp., *Actinomyces* spp., *Peptostreptococcus anaerobius*, *Corynebacterium* spp., *Veillonella* spp., *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces viscosus*, *Klebsiella* spp. Полученные качественные и количественные данные являются первыми приобретенными оценками представителей микробиоценоза полости рта у испытуемых в отечественной медицине. Они могут послужить отправной точкой для дальнейших исследований. Весьма жаль, что автором не выделен раздел «Оценка перспектив дальнейшей разработки темы диссертационного исследования».

Впервые была проведена оценка эффективности средства на основе штаммов саливарного стрептококка (*S. salivarius*) М-18. Проведённые его исследования показали большую эффективность в отношении условно-патогенной микробиоты полости рта таких распространённых представителей, как *Staphylococcus aureus*, *Prevotella* spp., *Corynebacterium* spp., *Klebsiella* spp., по сравнению с коммерческими препаратом.

Проведенное исследование микробиоценоза полости рта на основании методов бактериологического, хроматомасс-спектрометрии и ИФА показало улучшение биоценоза пародонта у участников экспериментов в измененной среде обитания, как моделей космического полёта.

Теоретическая и практическая значимость

Диссертационное исследование А.С. Шеблаевой имеет теоретическую и практическую значимость. Полученные результаты развивают современные представления о специфичности воздействий космического полёта и условий его имитирующих, которые часто вызывают нарушения микробиоценоза полости рта. Это наблюдение будет полезным

при выборе воздействий, моделирующих космический полёт, в дальнейших исследованиях изменений микробиоценоза полости рта при таких отрицательных влияниях.

Общеизвестно, что в практике космической медицины использование бактериологического метода затруднительно при отборе проб, их хранении и транспортировке, поэтому показано преимущество метода хроматомасс-спектрометрии для анализа микробиоты полости рта в экстремальной и экспедиционной обстановках. Из данного исследования следует, что количественные показатели нормы для метода хроматомасс-спектрометрии коррелированы с показателями бактериологического и ПЦР-методами. Однако они имеют отличие от показателей базовых уровней, что следует учитывать при интерпретации данных, полученных с помощью этих методов.

Проведенные исследования аутопробиотического средства на основе *S. salivarius* показали его большую эффективность в отношении условно-патогенной микробиоты полости рта. После применения аутопробиотического саливарного стрептококка было убедительно показано улучшение биоценоза пародонта у участников экспериментов в измененной среде обитания. Данный вывод был подтверждён комплексными исследованиями микробиоценоза полости рта на основании бактериологического, хроматомасс-спектрометрии и ИФА-методов.

Оценка объема, структуры и содержания диссертации

ДИССЕРТАЦИЯ объёмом 182 страницы машинописного текста (в том числе, 181 страница собственно текста диссертации и 1 страница одного Приложения, представленная Государственной регистрационной базой данных, охраняемая авторскими правами. Текст работы перегружен массивом таблиц и рисунков, которые, по моему мнению, частично целесообразней было бы разместить в виде Приложений. Так, ДИССЕРТАЦИЯ содержит 23 таблицы и 61 рисунок, расположенных по тексту. При этом, на Рисунке 8, где мелко показан «Наземный экспериментальный комплекс (НЭК) ГНЦ РФ – ИМБП РАН». А именно в этом уникальном сооружении получены основные результаты рассматриваемой ДИССЕРТАЦИИ. Формат Приложения позволяет более подробно описать и показать имитатор космического полёта, а также размещение ёмких таблиц – облегчало бы ознакомительный процесс с рукописью диссертации.

ДИССЕРТАЦИЯ оформлена, в основном, по традиционному плану, включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, а также список цитированной литературы (с. 153 – 181), включающий 252 литературный источник в период с 1905 по 2024 гг. Из которых, 136 опубликованы в отечественной печати в основном с 2000 по 2024 гг. Обидно за Рэма Викторовича Петрова, великого учёного и пуполизатора

иммунологии, которого поставили последним в алфавитном списке цитированной литературы (№136 Основы иммунитета и иммунная биотехнология // Вестник РАМН. – 2000. – № 11. – С. 18–21). Иностраных 116 источников и среди них только 2 ссылки после 2020 г.

Вместе с тем, обзор литературы достаточно объемный (с. 11-46) и раскрывает состояние изучаемой проблемы. Он включает четыре раздела:

1. Факторы, определяющие нормальную микрофлору и функциональность полости рта здорового человека;
2. Формированию пародонтопатогенной микрофлоры и влияние на слизистые оболочки полости рта условий герметично замкнутого пространства, моделирующего космический полёт;
3. Средства коррекции дисбиоза зубочелюстной системы;
4. Применение аутопробиотика саливарного стрептококка (*S. salivarius*) для поддержания гомеостаза ротовой полости.

Во втором разделе Обзора (с. 25-31) – «Формирование пародонтопатогенной микрофлоры, её состав и влияние на слизистые оболочки полости рта в условиях герметично замкнутого пространства» убедительно показано, что в условиях космических полетов микроорганизмы, являющиеся условно-патогенными, могут повысить свои болезнетворные свойства. Это наблюдается вследствие снижения защитных сил организма с последующим нарушением колонизационной резистентности.

Данные процессы связаны с нарушением трёх основных барьеров:

- первый из которых представлен протективной микрофлорой;
- второй состоит из эпителия покровных тканей и слизистых;
- третий представлен факторами клеточного и гуморального иммунитета.

В третьем разделе обзора (с. 31-35) – «Средства коррекции дисбиоза зубочелюстной системы: пробиотики» весьма детально показана периодизация открытия, внедрения в практическую медицину и повседневный быт пробиотиков. Убедительно показаны пионерские работы лауреата Нобелевской премии, популяризатора науки Илья Ильича Мечникова и других учёных, показавших практическую пользу от конкурентных взаимоотношений в микромире.

В главе «Материалы и методы исследования» (с. 46-78) автор подробно описывает использованные лабораторные методы исследования и моделирование искусственной среды обитания в условиях наземной имитации космического полёта. Так, в исследовании участвовало 62 человека, из них 42 испытуемых находились непосредственно в условиях измененной среды обитания (герметично замкнутом помещении, иммерсионная ванная и условия высокогорья с уровнем подъёма свыше 5 тысяч над уровнем моря).

Достаточно ли такое количество участников экспериментов!? В современных условиях недофинансирования науки я считаю, что это большая заслуга администрации Института медико-биологических проблем, которая смогла организовать участие такого количества добровольцев. Ежегодно ААНИИ с большим трудом набирает на зимовку около 100 человек на пять круглогодичных объектов РАЭ. Однако, положительная динамика появилась в связи с вводом в строй нового научного и жилого комплекса станции «Восток». Пока там зимуют до 15 человек, а это готовые и более суровые условия высокогорья с уровнем подъёма свыше 5 тысяч над уровнем моря, где необходимо продолжить реализовывать тематику рассматриваемой ДИССЕРТАЦИИ.

В данных исследованиях использовались следующие 5-ть методов:

1. Классический бактериологический метод;
2. Метод масс-спектрометрии микробных маркеров;
3. Метод доплерографии;
4. Метод иммуноферментного анализа;
5. Метод ПЦР.

На золотом стандарте бактериологии следовало бы остановиться более подробно. Отрадно отметить значительный набор современных 4-х сред:

1. Стафилококковый агар №110 (M521);
2. Основа колумбийского кровяного агара (M144) с 5 % (об/об) дефибринированной крови и селективной добавкой для выделения *неспоровых анаэробов, важных и трудно изолируемых представителей слизистых*;
3. Mitis Salivarius Agar (M259) – селективная питательная среда для стрептококков;
4. Хромогенный агар для грибов *Candida*.

Весьма подробно описана методика отбора исследуемого материала на транспортную систему Де Ингли.

Научная новизна ДИССЕРТАЦИИ заключается в использовании некультурального подхода к идентификации микроорганизмов методом масс-спектрометрии микробных маркеров. Жаль, что автор не уделил больше внимания описанию сути данного метода. Итак, что известно о идентификации микроорганизмов с применением газовой хромато-масс-спектрометрии. Применение данного метода используется для определения в биологических пробах человека компонентов клеточных стенок микроорганизмов, так называемых микробных маркеров из числа высших жирных кислот. У каждого микроорганизма есть "свой", то есть характерные только ему маркеры. При их обнаружении делаются заключения о присутствии тех, или иных микробов с их количественной оценкой. Это используется для

определения инфекционных агентов воспалений и оценки дисбиозов различных локализаций. Особенно этот метод полезен для выделения и идентификации неспоровых анаэробов, которые доминируют пародонтопатогенной микрофлоре.

Таким образом, метод масс-спектрометрии микробных маркеров позволяет контролировать и проводить периодический мониторинг условно-патогенной микробиоты полости рта в условиях измененной среды обитания, а также связанных с трудностью отбора материала, его хранения и транспортировки. Показано, что этот метод применительно к исследованию пародонта и слюны адекватен по количественной и видовой составляющей бактериологическим и ПЦР-методам исследования.

Хочу отметить широкий спектр использованных автором современных методических подходов к статистической обработке полученных экспериментальных данных, описанных в соответствующем разделе главы «Материалы и методы» и адекватных решению каждой из поставленных задач.

Результаты исследования и их обсуждение описывает ответы на поставленные автором задачи. Исследование характеризуется внутренней логикой, где каждый следующий этап работы базируется на результатах предыдущего и развивает его. Разделы с результатами по каждой задаче сопровождаются обсуждением полученных данных.

Степень обоснованности и достоверность полученных результатов, научных положений и выводов

Обоснованность и достоверность результатов, полученных экспериментальных данных, не вызывает сомнения. Исследование выполнено с использованием адекватно подобранных для работы с человеком в условиях изоляции неинвазивных классических и современных методов, таких как бактериологический, масс-спектрометрии микробных маркеров, иммуоферментного анализа, полимеразной цепной реакции, ультразвуковой доплеровской флуометрии.

Основным методом статистической обработки данных употреблен дисперсионный анализ. Используемые в экспериментах выборки достаточны, особенно при учете фактора доступности экспериментальных данных, только для ограниченных в силу естественных причин, групп испытуемых. Результаты, полученные с использованием различных методических подходов, удачно дополняют друг друга и обеспечивают формирование целостной картины изменений, происходящих в микробиоценозе полости рта человека в условиях искусственной среды обитания, имитирующих космический полёт.

По результатам исследований удачно сформулированы выводы, которые полностью отражают суть работы. Выносимые на защиту положения также целиком обоснованы.

Диссертационная работа оформлена надлежащим образом, за исключением высказанных замечаний.

Личное участие автора в выполнении диссертационной работы заключалось в сборе, анализе научной литературы, планировании экспериментальной части диссертационной работы, выполнении бактериологических и молекулярно-генетических исследований, написании статей и подготовке докладов, оформлении ДИССЕРТАЦИИ. Личный вклад автора ДИССЕРТАЦИИ в выполнение диссертационной работы может быть расценен как достаточный.

Основные результаты ДИССЕРТАЦИИ опубликованы в 10-ти научных работах (в том числе, 3-х статьях – в научных рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК, имеется одно свидетельство о регистрации базы данных, охраняемое авторскими правами).

Материалы и основные положения ДИССЕРТАЦИИ доложены и обсуждены на 15-ти Российских (в том числе, с международным участием) и 4-х международных научно-практических конференциях.

Организацию и выполнение диссертационного исследования, а также все эксперименты были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ФГБУН ГНЦ РФ — Института медико-биологических проблем РАН (Протоколы № 573 от 01.04.2021г., №594 от 06.09.2021). Если исследования проводились на базе Медицинского института РУДН, то имеется заключение Комитета по этике РУДНа (Протокол № 5 от 17.03.2021г.). Все участники экспериментов дали информированное согласие на участие в экспериментах.

Отмеченные по тексту отзыва недостатки не носят принципиального характера, не умаляют научной и практической значимости ДИССЕРТАЦИИ и не являются основанием для отказа от общей положительной оценки последней.

Текст ДИССЕРТАЦИЯ отвечает необходимым лексическим и стилистическим требованиям, не содержит профессиональных вульгаризмов, но имеет опечатки.

Автореферат ДИССЕРТАЦИИ позволяет составить исчерпывающее представление о её содержании. ДИССЕРТАЦИЯ и автореферат оформлены надлежащим образом, с соблюдением требований ГОСТ Р 7.0.11-2011 “Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления”.

Основные положения ДИССЕРТАЦИИ, выносимые на защиту, в концентрированной форме отражают наиболее важные в смысловом отношении, проблемные аспекты ДИССЕРТАЦИИ. Исходя из вышеизложенного, следует отметить, что ДИССЕРТАЦИЯ является завершённым исследованием, представляющим несомненный интерес для научной медицины и практического здравоохранения, что свидетельствует о высоком уровне научной и профессиональной подготовке её автора.

Замечания и вопросы

Принципиальных замечаний к диссертационной работе Шеблаевой А.С. у меня нет. Однако, как официальный оппонент хотел бы задать автору несколько вопросов, носящих дискуссионный характер:

1. Какая перспектива дальнейшей разработки темы?
2. Какие эталонные штаммы бактерий использованы в качестве контрольных?
3. Какие дополнительные питательные среды (кроме перечисленных) и режимы культивирования были использованы в рамках бактериологического исследования?
4. Сможет ли метод масс-спектрометрии микробных маркеров заменить бактериологический метод в ближайшей перспективе?
5. «ДентоБЛИС» – это коммерческая биологическая добавка (БАД) к пище, и он не относится к официальным препаратам. Почему Вы называете БАД – официальным препаратом, т.е. лекарственным средством?
6. В ссылка авторов публикаций не указаны их имя и отчество. Хотя это требование не регламентировано, но является знаком уважения к научным коллегам.
7. В тексте ДИССЕРТАЦИИ нет сведений, что эксперименты были одобрены Комиссией по биомедицинской этике. И хотя такие данные имеются в публикациях автора – целесообразно эту информацию указывать и больше внимания ей уделять.

Заключение

Диссертационная работа Анны Сергеевны Шеблаевой «Экспериментальное обоснование применения аутопробиотика для восстановления микробиоценоза полости рта человека в условиях искусственной среды обитания» выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента РАН Ильина Вячеслава Константиновича является научно-квалификационной работой, в которой решены актуальные научные задачи: проведена оценка эффективности аутопробиотиков в процессе восстановления микробиоценоза полости рта у участников экспериментов, находящихся в условиях измененной среды обитания; проведена оценка роста и накопления условно-патогенной микробиоты методом масс-спектрометрии микробных маркеров в условиях измененной среды обитания и изучены возможности и состоятельность работы методом масс-спектрометрии микробных маркеров в ротовой полости у участников экспериментов, находящихся в условиях измененной среды обитания.

Итак, диссертация А.С. Шеблаевой, представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.7 – Авиационная, космическая и морская медицина, является завершённой научно-квалификационной работой, по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов, она соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук (пп. № 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.), а её автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.7 – Авиационная, космическая и морская медицина.

Официальный оппонент – главный специалист по медицинской логистике Логистического центра Российской антарктической экспедиции Федерального государственного бюджетного учреждения «Арктический и антарктический научно-исследовательский институт» Росгидромета Российской Федерации, кандидат медицинских наук

05.12.2024 г.



Панин А.Л.

Подпись заверяю
Учёный секретарь ФГБУ «АНИИ»



Гусакова М.А.