

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 на диссертационную работу Шеблаевой Анны Сергеевны  
«Экспериментальное обоснование применения аутопробиотика для восстановления  
микробиоценоза полости рта человека в условиях искусственной среды обитания»  
представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по  
специальности: 3.3.7 — Авиационная, космическая и морская медицина

### Актуальность темы исследования

Диссертационная работа соискателя Шеблаевой Анны Сергеевны  
представляет собой экспериментальное научное исследование, направленное на  
изучение и оценку влияния аутопробиотика слюварного стрептококка  
(*Streptococcus salivarius*) на микробиоциноз полости рта в условиях измененной  
среды обитания.

Длительное пребывание человека в условиях космического полета  
происходит в состоянии невесомости и при воздействии различных физических  
факторов и излучений. Это несет определенные риски для здоровья членов  
экипажа. Условия изолированного помещения космического аппарата с постоянно  
кондиционируемым воздухом, перераспределение жидкостных сред организма в  
условиях невесомости и многое другое приводит к функциональным изменениям  
в работе человеческого организма. Одним из важных факторов, участвующих в  
поддержании гомеостаза, стабилизации работы иммунной системы и обеспечения  
колонизационной резистентности макроорганизма является нормальная  
микробиота тела человека, включая микробное сообщество полости рта.  
Известно, что экстремальные условия среды обитания ведут к изменению

ИМБП ВХ. № 08/4754  
01.28 " 12 2024 г.

микробиоценоза в сторону дисбиотического состояния, что на уровне полости рта может спровоцировать развитие таких многофакторных заболеваний как кариес зубов и пародонтит. Кроме того, стрессогенные факторы вызывают снижение эффективности иммунитета к микробным и прочим агрессивным факторам окружающей среды. Это может вести к развитию одонтогенных и неодонтогенных воспалительных процессов в ротовой полости, а также быть причиной пассивной бактериемии.

Известно, что аутоштаммы являются наиболее безопасными для реципиента при восстановлении микробиоценоза, поскольку они являются привычными элементами собственной микробиоты. Предполагается, что использование аутопробиотика на основе протективной микробиоты полости рта будет иметь успех при включении такого препарата в комплекс методов, направленных на поддержание гомеостаза в условиях длительных космических полетов, применительно к задачам профессиональных и микробиологических рисков в экстремальных условиях.

В связи с этим, решение проблемы восстановления микробиоценоза полости рта путем применения орального аутопробиотика, в условиях искусственной среды обитания, моделирующей космические полёты, предложенное в диссертационной работе Шеблаевой А. С., является, безусловно, актуальным.

### **Научная новизна**

В работе Шеблаевой А.С. впервые использовался высокочувствительный метод масс-спектрометрии микробных маркеров (МСММ) для обнаружения и идентификации микроорганизмов, присутствующих в полости рта у испытуемых, находящихся в искусственной среде обитания. Метод МСММ основан на определении микроорганизмов по спектру жирных кислот, альдегидов, стероидов и пр. маркеров. Метод относится к культурально-независимым и не требует использования транспортных и иных питательных сред, при этом, биологические пробы могут храниться продолжительное время, что особенно актуально для длительных космических полётов. Таким образом, метод МСММ особенно

актуален в экстремальных условиях, где имеются трудности для транспортировки исследуемых образцов и их хранения.

Расширенный анализ МСММ показал динамику изменений оральной микробиоты в зависимости от длительности нахождения в герметично замкнутом объекте, воспроизводящим условия изоляции, специфичные для космического корабля, а также рост таких представителей как: *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.* (включая *P. gingivalis*), *Candida spp.*, *Actinomyces spp.*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Corynebacterium spp.*, *Veilonella spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces viscosus*, *Klebsiella spp.* Тем самым, была получена актуальная информация об изменении состава микробиоты полости рта в условиях имитации космического полета, что нашло отражение в сформированной базе данных «Искусственная слюна, содержащая аутопробиотик саливарного стрептококка», зарегистрированной соответствующим образом в Роспатенте.

Кроме того, впервые было проведено сравнение возможности метода МСММ в сравнении со культуральным методом (бактериологический анализ, микологический анализ) и методом ПЦР применительно к исследованию микробиоты полости рта.

Также впервые экспериментально была доказана состоятельность метода коррекции микробиома полости рта с помощью БАД на основе аутологичного саливарного стрептококка в сравнении с коммерческим БАД на основе того же вида бактерий, что может служить основой для создания верифицированной методики и подготовки клинических рекомендаций для применения аутопробиотиков при коррекции микробиома полости рта человека, находящегося длительное время в измененной среде обитания.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна**

Представленная научная работа является грамотно спланированной и корректно реализованной. Название работы соответствует поставленной цели, задачи исследования полностью соответствуют выводам.

Полученные результаты являются достоверными, их статистическая обработка проведена с использованием адекватного пакета инструментов и соответствующих статистических методов. Представляемые к защите научные положения обоснованы. Выводы из диссертационной работы соответствуют поставленным задачам.

Материалы диссертационной работы опубликованы в 3 рецензируемых журналах из перечня журналов ВАК РФ, соответствующих специальности 3.3.7 – Авиационная, космическая и морская медицина, а также в 8 других печатных работах и тезисах докладов, представлены на 5 научных конференциях.

Автореферат в полной мере отражает ключевые разделы диссертации.

### **Структура диссертации**

Структура диссертационной работы упорядочена и направлена на достижение поставленных целей и задач исследования.

Диссертация построена по стандартному образцу и состоит из введения, 3-х глав («обзор литературы», «материалы и методы», «результаты исследований и обсуждения»), заключения с общей оценкой результатов, выводов и списка литературы, включающего 252 источника. Текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования, библиографические ссылки оформлены в соответствии с требованиями ГОСТ.

Раздел «Материалы и методы» содержит исчерпывающее описание приемов и методов исследования. В работе используется широкий спектр микробиологических, биохимических, генетических, морфологических, иммунологических методов, а также методов клеточной и молекулярной биологии, статистической обработки результатов и обработки изображений.

Раздел «Результаты исследований и обсуждения» развернуто демонстрирует полученные данные. Все результаты подробно изложены и хорошо проиллюстрированы.

В главе 3.1 описываются результаты 14-суточного эксперимента («Эскиз») с участниками, находящимися в герметично замкнутом помещении, имитирующем капсулу космического корабля. Методом масс - спектрометрии микробных

маркеров были идентифицированы: *S. mutans*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Fusobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Actinomyces spp.* Одновременно, с помощью бактериологического метода были изолированы и идентифицированы: *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *A. viscosus*, *C. glabrata*, *Streptococcus sangius*, *F. nucleatum*, *P. anaerobius*, *Corynebacterium spp.*, *K. pneumoniae*, *S. intermedius*, *A. naeslundii*, а также протективная микробиота: *Lactobacillus spp.* и *S. salivarius*. При сравнении был сделан вывод, что оба метода показали схожие значения накопления условно-патогенной микробиоты с пиковыми значениями на выходе из эксперимента, либо к 7 суткам по окончании эксперимента. В то же время, было отмечено, что метод масс-спектрометрии микробных маркеров в ряде случаев (для определенных патогенов) является более чувствительным по сравнению с бактериологическим методом.

Микроорганизмы были разделены на те, которые достигли регистрируемых величин в течение эксперимента и те, которые регистрировались с начала эксперимента и число которых оставалось стабильным или снизилось в течение эксперимента. Замечено так же, что значения одних и тех же микроорганизмов были достаточно вариабельны у разных участников, что может быть связано с индивидуальной микробиотой каждого участника и характеризуется индивидуальным накоплением условно-патогенной микробиоты.

Были определены уровни ряда цитокинов (IL-4, IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) а также иммуноглобулинов (sIgA, IgA, IgM) на выходе из эксперимента по сравнению с фоновыми значениями.

Также в процессе эксперимента наблюдалось снижение кровенаполнения артериолярного и капиллярного звеньев микроциркуляторного русла (Qs/Qam) у участников во время эксперимента с постепенным увеличением кровенаполнения в микроциркуляторном русле (Qs/Qam).

В главе 3.2 проводится сравнение классического бактериологического метода и метода масс-спектрометрии микробных маркеров у участников 7 суточной иммерсии. Отмечалось, что оба метода показали схожие значения накопления условно-патогенной микробиоты с пиковыми значениями на выходе из

эксперимента. Были выделены две группы микроорганизмов, К первой группе отнесли тех, кто подверглись росту в течение эксперимента: *Fusobacterium spp.*, *Actinomycetemcomitans*, *Corynebacterium spp.*, *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.* . Ко второй группе , не показавшей рост, отнесли *P. anaerobius*, *A. viscosus*.

**В главе 3.3** оценивается применение аутопробиотического препарата саливарного стрептококка в условиях измененной среды обитания (эксперимент «Sirius 2021–22»). Исследовали испытуемых–добровольцев, которые в течение восьми месяцев находились в замкнутом герметичном пространстве, имитирующем капсулу космического корабля. Оценивали влияние аутопробиотического препарата на основе штамма *S.salivarius*, который давали в течении 14 дней, начиная с 150 суток эксперимента на микробиологические и иммунологические показатели полости рта. Сделано наблюдение, что микробиота в слюне меняет свои значения значительнее, нежели чем в области зева, после приема аутопробиотического препарата.

**В главе 3.4** проводится сравнение методов ПЦР и метода масс-спектрометрии микробных маркеров (эксперимент «эквивалентность»). Метод масс-спектрометрии микробных маркеров оказался более чувствительным по сравнению с методом ПЦР и выявил большее наличие следующих условных патогенов: *Prevotella spp.*, *P. gingivalis*, *Veilonella spp.* Сделан вывод, что МСММ не уступает методу ПЦР и может в дальнейшем использоваться в условиях измененной среды обитания.

**В главе 3.5** сравнивается эффект от применения аутопробиотического препарата саливарного стрептококка и коммерческого препарата (БАД) «дентоБЛИС», содержащего тот же вид бактерий, с участием добровольцев в условиях изменённой среды обитания в эксперименте «Гипобария». Оценивались микробиологические и иммунные показатели. Показано, что наилучший результат наблюдался у группы, принимающей аутопробиотический препарат *S.salivarius* по сравнению с другими группами. Замечен положительный пролонгирующий эффект роста протективной группы бактерий, после окончания приема аутопробиотика.

Диссертация завершается обобщающим заключением.

Выводы логично и четко вытекают из содержания научного исследования.

### Соответствие специальности

Дизайн диссертации, включающий обширную серию экспериментов по моделированию нахождения человека в условиях космического полёта, а также комплекс современных методов исследования, сформулированная цель и поставленные задачи полностью соответствуют шифру научной специальности 3.3.7 — Авиационная, космическая и морская медицина.

В процессе ознакомления с диссертационной работой возник ряд вопросов и замечаний:

1. Как показали эксперименты с длительным нахождением испытуемых в измененной среде обитания и использованием пробиотиков («Sirius 2021–22»), динамика изменений микробиоты в слюне и нв слизистой зева у участников эксперимента может отличаться. На какие биологические пробы ( слюна, смывы со слизистой) лучше ориентироваться и почему?

2. Стоит ли проводить предварительную проверку антагонистических свойств аутоэкологичного штамма стрептококка в отношении представителей микробиоты полости рта в тестах *in vitro*?

3. С какой целью для оценки местного иммунитета, наряду с секреторным иммуноглобулином, исследовали IgM?

4. В эксперимннтах серии «Эскиз» исследлвали широкий набор цитокинов, при этом наибольшие различия были продемонстрирована в уровне TNF $\alpha$ . В то же время, в эксперименте «Гипобария» был исследован другой набор (IL-6, IL-10). С чем связан такой выбор цитокинов?

5. Обращает на себя внимание довольно большой разброс фоновых значений концентраций облигатных представителей оральной микробиоты у испыталелей-добровольцев в различных сериях экспериментов (как с пробиотиками, так и без них). Кроме того, концентрации этих микроорганизмов (фон) у здоровых людей нередко существенно отличалась от условной нормы. При этом, речь не идет о факультативной микробиоте, такой как грибы рода *Candida*, чье резкое увеличение концентрации выше определенной величины сопровождается клинически

выраженным воспалением (кандидозом). В связи с вышеуказанным, возникает несколько вопросов:

- 5.1. Какие данные послужили основой для установления количественной нормы облигатных представителей биоценоза полости рта?
  - 5.2. Насколько подобная норма соответствует нормальному состоянию биотопов людей с разными пищевыми привычками, проживающими в разных климатических условиях, учитывая тот факт, что в космических полётах участвуют люди из разных стран?
  - 5.3. Что может быть более информативно как показатель дисбиоза полости рта: количественные изменения на уровне определенных видов или изменение спектра родовых таксонов облигатных представителей орального биоценоза?
6. В различных вариантах экспериментов по имитации космических полётов (с пробиотиками и без них) наблюдалось повышение количества микромицетов в полости рта. Есть ли необходимость дополнительно проводить антикандидозные мероприятия для испытуемых, находящихся длительное время в измененной среде обитания?

Следует также отметить, что

- в работе имеются речевые ошибки, в частности, неточности в согласовании падежей в сложносочиненных предложениях;
- присутствуют опечатки. Из наиболее заметных – ошибки в подписях к круговым диаграммам (рис. 61.а) и обозначении столбцов в таблице (табл.4, 5);
- при выборе *S. salivarius* в качестве объекта для получения пробиотического препарата одной из причин была названа апатогенность вида, что не является корректным. Все оральные (зеленящие) стрептококки - условно-патогенные бактерии, способные пассивно (при повреждении слизистой) попадать в кровоток и, в силу особенностей своего адгезивного аппарата, вызывать эндокардит.

### **Заключение**

Вместе с тем, указанные замечания не снижают общей высокой оценки научной и практической ценности рецензируемой работы и роли научного




руководителя. Диссертационная работа Шеблаевой Анны Сергеевны «Экспериментальное обоснование применения аутопробиотика для восстановления микробиоценоза полости рта в условиях искусственной среды обитания» является законченным научным трудом. Тема диссертации актуальна, результаты имеют новизну, выводы достоверны.

Таким образом, диссертационная работа А.С. Шеблаевой 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 ее автор заслуживает присвоения ему ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.7 — Авиационная, космическая и морская медицина.

#### **Официальный оппонент:**

профессор кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России);  
603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1;  
тел. +7(920) 012-56-67, e-mail: maya.zaslav@gmail.com

доктор биологических наук, доцент  Заславская Майя Исааковна  
«26» декабря 2024 г.

Подпись Заславской Майи Исааковны заверяю:

Ученый секретарь Университета  
(ФГБОУ ВО «ПИМУ» Нижний Новгород,  
пл. Минина и Пожарского, 10 /1;  
тел: +7-831-439-09-43; факс: +7-831-439-0184;  
e-сайт: <https://pimunn.ru> или [pimu.rf](https://pimu.rf);  
email: [rector@pimunn.net](mailto:rector@pimunn.net)

кандидат биологических наук, доцент

  
Сорокина Юлия Андреевна

*26.12.2024*