

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения
высшего образования «Курский
государственный медицинский
университет» Министерства
здравоохранения Российской
Федерации

д.м.н., профессор, Заслуженный врач
Российской Федерации
Виктор Анатольевич Лазаренко



«31» августа 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России) о научно-практической ценности диссертационной работы Рубальского Евгения Олеговича на тему: «Исследование влияния пробиотических композиций на физиологические показатели пула гистамина и гуморального иммунитета», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность избранной темы исследования

Диссертационная работа Е.О. Рубальского посвящена теме, которая представляет интерес с точки зрения как фундаментальных, так и прикладных разделов современной микробиологии.

Изучение физиологических механизмов взаимодействия организма человека и его микробиоты, в том числе возможностей физиологической коррекции тех факторов, которые связаны с развитием аллергических реакций,

необходимы для дальнейшего формирования представлений о влиянии ингредиентов пищевых продуктов на это взаимодействие, а также для разработки пробиотических композиций как основы продуктов функционального питания при профилактике заболеваний.

Выбор автором диссертации изменений уровня гистамина, уровня и соотношения классов и подклассов иммуноглобулинов в качестве показателей эффективного противоаллергического действия пробиотических композиций на основе штаммов лактобацилл является обоснованным с учётом того, что эти показатели, во-первых, определяют состояние важных гуморальных факторов аллергических реакций и, во-вторых, могут изменяться в зависимости от свойств экзогенно поступающих в организм штаммов лактобацилл.

В связи с тем, что для разработки пробиотических композиций как продуктов функционального питания, корригирующих в физиологических условиях уровень гистамина, а также тонкие физиологические изменения уровней и соотношения классов и подклассов иммуноглобулинов, требовалась модель *in vivo*, наиболее информативно отражающая физиологическое взаимодействие организма человека и микробиоты, в диссертационном исследовании были использованы обезьяны вида *Macaca mulatta*, которые близки к человеку по показателям физиологии пищеварительного тракта, по восприимчивости к большинству свойственных человеку кишечных инфекций и часто страдают клинически выраженными формами дисбактериозов.

В соответствии с вышеизложенным целью исследования – разработка пробиотических композиций, физиологически снижающих пул гистамина и регулирующих иммуноглобулиновое звено гуморального иммунитета при коррекции микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, – представляется несомненно актуальной и важной. Задачи исследования сформулированы чётко, полностью отражают структуру диссертационного исследования и достаточны для достижения поставленной цели.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

В представленной диссертационной работе впервые описаны композиции на основе штаммов лактобацилл для коррекции уровня гистамина в организме *Macaca mulatta* – физиологической модели организма человека.

Автором впервые биоинформатическим анализом Fc фрагментов IgG1, IgA и IgM проведена оценка диагностических возможностей различных тест-систем для измерений концентрации сывороточных иммуноглобулинов макак резусов.

Впервые в рамках данной диссертационной работы, установлены физиологические показатели пула гистамина в фекалиях и в периферической крови; уточнены физиологические концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови интактных низших обезьян (*Macaca mulatta*).

Диссертант впервые доказал, что физиологическое снижение уровня гистамина в содержимом кишечника *Macaca mulatta*, связанное с коррекцией микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, не приводит к изменению уровня гистамина в периферической крови этих приматов, что свидетельствует о поддержании гомеостаза в организме на примере физиологической регуляции уровня гистамина ферментами микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта во взаимодействии с ферментными системами организма.

В результате проведенной работы выявлено, что в крови *Macaca mulatta* повышается уровень IgG за счет IgG1 на фоне отсутствия достоверных изменений содержания IgA и IgM в результате перорального введения пробиотических композиций, содержащих вместе с лактобациллами среду их культивирования.

В целом полученные результаты диссертационного исследования по регуляции пула гистамина позволяют разрабатывать пробиотические композиции для снижения аллергической настроенности организма.

При этом новым результатом, полученным в рамках настоящей диссертационной работы, является экспериментальное обоснование использования низших обезьян на примере *Macaca mulatta* в качестве модели для доклинических исследований физиологического действия пробиотических композиций, направленных на коррекцию показателей пула уровня гистамина и гуморального иммунитета человека.

В соответствии с вышеизложенным научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, является несомненной.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Практическая ценность работы значительна и, прежде всего, определяется тем, что внедрение в практику полученных результатов исследования, в том числе подходов к конструированию пробиотических композиций и оценке в эксперименте их физиологического действия, будет способствовать более эффективному применению пробиотиков для снижения аллергической реактивности организма. В результате проведенных исследований доказана перспективность включения в рацион *Macaca mulatta* пищевых добавок в виде пробиотических композиций, физиологически снижающих уровень гистамина в кишечнике и повышающих уровень IgG и IgG1 в крови животных, а также разработаны и запатентованы наиболее эффективные варианты таких пробиотических композиций (патент на изобретение № 2393214). Кроме того, разработано информативное сочетание экспериментальных моделей *in vitro* (патент на изобретение № 2441066) и *in vivo*, использование которого перспективно для создания и предварительной оценки свойств пробиотических композиций, предназначенных для физиологической коррекции метаболизма гистамина в желудочно-кишечном тракте *Macaca mulatta*, позволяющих эффективно корригировать микробиоценоз кишечника этих животных при их подготовке к планируемым

экспериментам. Важное научно-практическое значение имеют установленные физиологические показатели пула гистамина в фекалиях, в периферической крови и уточненные физиологические концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови интактных *Macaca mulatta* популяции ФГБНУ «НИИ МП», которые необходимы для повышения информативности доклинических исследований лекарственных средств, пробиотических композиций, при разработке новых кормов и кормовых добавок для *Macaca mulatta*. В результате выполнения диссертационного исследования продемонстрирована высокая информативность анализа биоинформатических данных аминокислотных последовательностей иммуноглобулинов человека и обезьян в сочетании с феноменологическим подходом при подборе иммунохимических тест-систем для определения физиологического содержания иммуноглобулинов *Macaca mulatta*. Разработанные автором способы мультиплексного ПЦР-анализа (патенты на изобретения № 2470997, № 2496883) можно использовать как для идентификации бактериальных компонентов микробиоценозов и пробиотических композиций, так и при профилактическом обследовании животных и диагностике инфекционных заболеваний.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций диссертационной работы

Полученные данные базируются на достаточном объеме данных литературы, достаточном количестве приматов и большом объеме экспериментальных данных. При выполнении работы использованы микробиологические, биотехнологические, биологические, иммунологические, биохимические и гистологические экспериментальные методы исследования. На современном уровне проведены биоинформатические исследования. Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием методов вариационной и описательной статистики. Для оценки достоверности различий между показателями использовали *t*-критерий Стьюдента, достоверность полученных данных также определяли по критерию Фишера,

проводилось определение показателя силы влияния фактора (перорального введения пробиотических композиций) на формируемые признаки: уровень гистамина в фекалиях и цельной периферической крови, концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови. Математическая и статистическая обработка результатов проводилась в программной среде Microsoft Excel. Таким образом достоверность полученных результатов, достоверность и обоснованность научных положений, выносимых на защиту, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в планировании и реализации исследования. Диссертант проанализировал отечественные и зарубежные источники литературы по теме работы, им получены и оценены результаты исследований. Автором самостоятельно проведены: разработка дизайна исследования, подбор и модификация методов исследования, выполнение лабораторных и биоинформатических исследований, математическая и статистическая обработка данных, подготовка статей по теме диссертации.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Подходы к конструированию пробиотических композиций, предназначенных для снижения аллергической реактивности организма и оценке в эксперименте их физиологического действия, позволят создавать и внедрять в производство новые варианты эффективной пробиотической продукции. Разработанные пробиотические композиции могут быть введены в пищевой рацион обезьян для коррекции микробиоценоза кишечника этих животных при их подготовке к планируемым экспериментам. При проведении доклинических исследований лекарственных средств, пробиотических композиций, при разработке и оценке свойств новых кормов и кормовых добавок для *Macaca mulatta* можно рекомендовать установленные

физиологические показатели пула гистамина в фекалиях, в периферической крови и уточненные физиологические концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови интактных *Mascas mulatta*. Способы мультиплексного ПЦР-анализа можно использовать для идентификации бактериальных компонентов микробиоценозов и пробиотических композиций, а также при профилактическом обследовании животных и диагностике инфекционных заболеваний.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация изложена на 147 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка использованных литературных источников и списка работ, опубликованных по теме диссертации. Работа иллюстрирована 36 таблицами и 9 рисунками. Библиографический указатель содержит 206 источников, в том числе 79 отечественных публикаций и 127 зарубежных публикаций.

Во «Введении» автор раскрывает актуальность проблемы, четко формулирует цель и задачи, отражает научную новизну работы, формулирует основные положения, выносимые на защиту, определяет научную и практическую значимость полученных результатов.

В описании методологии и методов исследования дана подробная информация об объектах исследования, достаточно раскрыты использованные материалы, оригинальные, модифицированные методы исследования, приведены сведения о нормативно-технических, нормативно-методических и других документах (государственных стандартах, методических указаниях, руководствах), согласно которым проводились исследования, данные об использованных наборах реагентов, программного обеспечения. Приведена информация о методах математической и статистической обработки результатов.

Обзор литературы представляет собой развёрнутый, квалифицированный, достаточно полный анализ публикаций и современных данных литературы, дающих полное представление о взаимосвязи физиологического пула гистамина с микрофлорой желудочно-кишечного тракта, об основных биологических свойствах лактобацилл, реализуемых при физиологических и патологических состояниях организма, о макаках резусах как модели физиологического функционирования желудочно-кишечного тракта человека при взаимодействии с микрофлорой и о физиологических особенностях их иммуноглобулинового профиля.

В главе «Разработка композиций на основе лактобацилл» описаны результаты исследований содержания гистамина в питательных средах, зависимости свойств моноштаммовых композиций на основе лактобацилл от используемой закваски, свойств композиции от соотношения штаммов лактобацилл в консорциуме, результаты исследований в процессе культивирования лактобацилл динамики показателей уровня гистамина в среде культивирования, роста лактобацилл, активной и титруемой кислотности композиций, а также результаты исследований влияния катионов меди (II) на свойства композиции.

Глава «Исследование физиологических показателей уровня гистамина в кишечнике у мышей» посвящена гистологическим исследованиям образцов печени, тонкого и толстого кишечника, исследованию содержания гистамина в тонком и толстом кишечнике при проведении экспериментов на этих животных.

В главе «Исследование физиологических показателей уровня гистамина в кишечнике и периферической крови у интактных *Macaca mulatta* и при коррекции пробиотическими композициями метаболизма гистамина микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта» анализируются соответствующие показатели у интактных животных и в результате введения обезьянам пробиотических композиций.

Глава «Исследование физиологических показателей иммуноглобулинового звена гуморального иммунитета у интактных *Macaca mulatta* и при коррекции пробиотическими композициями метаболизма гистамина микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта» посвящена результатам исследований данных показателей как у интактных животных, так и при получении ими пробиотических композиций. Также в этой главе диссертации сопоставлена информативность определения у *Macaca mulatta* уровней сывороточных иммуноглобулинов по данным радиальной иммунодиффузии и иммуноферментного анализа, проведен филогенетический анализ аминокислотных последовательностей Fc фрагментов IgG1, IgA и IgM человека и макак резусов.

Интерпретация полученных результатов не вызывает возражений.

В главе «Заключение» подведен итог значительной по объёму проделанной работы. Корректно обобщены и детально проанализированы полученные данные.

Выводы, представленные автором, отражают результаты собственного исследования и соответствуют поставленным перед исследованием задачам.

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 03.02.03 – микробиология.

Автореферат оформлен в соответствии с ГОСТ Р 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 5 – в рецензируемых изданиях (в том числе 3 – в периодических изданиях из перечня научных изданий, утвержденного ВАК при Министерстве образования и науки России), 6 патентов Российской Федерации на изобретения, 1 учебное пособие, 2 монографии. Материалы диссертации неоднократно обсуждались на международных инновационных салонах, региональных инновационных мероприятиях.

Таким образом, диссертационная работа отличается высоким уровнем научных исследований и практической значимостью полученных результатов.

Она выполнена на большом объёме экспериментальных данных с использованием широкого перечня современных методов исследования. Достаточно высокий уровень математического и статистического анализа полученных результатов соответствует поставленным задачам, поэтому достоверность полученных результатов является несомненной.

Работа не вызывает принципиальных замечаний, рекомендации носят преимущественно редакционный характер и не снижают теоретической и практической ценности диссертационной работы.

Заключение

Диссертация Рубальского Евгения Олеговича на тему: «Исследование влияния пробиотических композиций на физиологические показатели пула гистамина и гуморального иммунитета», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи современной микробиологии – разработки пробиотических композиций, физиологически снижающих пул гистамина и регулирующих иммуноглобулиновое звено гуморального иммунитета при коррекции микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта.

По актуальности, методическому уровню, научной новизне полученных результатов, их практической значимости диссертация Рубальского Е.О. соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013, с изменениями, утверждёнными постановлением Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв обсуждён на заседании кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №1 от 31 августа 2016 года).

Заведующий кафедрой микробиологии,
вирусологии, иммунологии
федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования
«Курский государственный
медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
доктор медицинских наук,
профессор

Калуцкий Павел Вячеславович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Курский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
305041, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3.
Телефон: (4712) 58-81-32, 58-81-52; факс: (4712) 56-73-99, 58-81-37; e-mail:
kurskmed@mail.ru

Подпись д.м.н., профессора Калуцкого П.В. заверяю
Учёный секретарь учёного совета
ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский
университет» Минздрава России
доктор биологических наук
доцент



Медведева Ольга Анатольевна