

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора Ворошилиной Екатерины Сергеевны на диссертационную работу **Мячиной Юлии Леонидовны «Влияние метаболитов вагинальной микробиоты на функциональное состояние клеток хозяина»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Мячиной Ю.Л. посвящена одной из фундаментальных проблем современной микробиологии и биомедицины — изучению механизмов взаимодействия между комменсальной микробиотой и клетками организма-хозяина. Вагинальный микробиоценоз представляет собой уникальную экосистему, нарушения которой ассоциированы не только с локальными инфекционными процессами, но и с онкогенезом, особенно в контексте персистенции вируса папилломы человека и развития рака шейки матки.

Особую значимость исследованию придает тот факт, что, несмотря на обязательную роль ВПЧ в развитии цервикальной карциномы, одной вирусной инфекции недостаточно для малигнизации — необходим «благоприятный» фон, создаваемый дисбиотической микробиотой. Работа чрезвычайно актуальна, поскольку бактериальный вагиноз и ВПЧ-инфекция являются глобальными проблемами здравоохранения. При этом связь между дисбиозом и персистенцией ВПЧ, а также прогрессированием цервикальной неоплазии, прослеживается в эпидемиологических работах, однако молекулярные механизмы этой взаимосвязи остаются недостаточно раскрытыми. Диссертация восполняет этот пробел, показывая, что ключевым звеном являются бактериальные метаболиты, модулирующие метаболизм и выживаемость клеток-мишеней, причем направленность этих эффектов принципиально различается для здоровых, ВПЧ-инфицированных и трансформированных клеток.

Автор справедливо концентрирует внимание на метаболитах как главных «посредниках» в межклеточном диалоге в системе «микробиота — клетки хозяина». В литературе имеется множество описаний связи состава микробиоты с заболеваемостью, но работ, системно изучающих влияние конкретных бактериальных продуктов на функциональное состояние клеток разных типов (эпителиальных, иммунных, опухолевых), крайне мало. Именно этим определяется высокая актуальность исследования, выполненного в русле приоритетных направлений по разработке постбиотических препаратов и персонализированных подходов к терапии гинекологических заболеваний.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором выстроен четкий иерархический экспериментальный дизайн: от наблюдений на клиническом материале (первичные эпителиоциты, полученные от 111 женщин с различным типом микробиоценоза и ВПЧ-статусом) к контролируемым экспериментам на изолированных нейтрофилах периферической крови и стандартизированной клеточной линии HeLa. Такой подход позволил последовательно перейти от феноменологических наблюдений к выявлению причинно-следственных связей и расшифровке молекулярных механизмов.

Цель и задачи диссертационного исследования полностью согласованы. Каждая задача решена с применением адекватных моделей и методов (МТТ-тест, оценка митохондриального потенциала с использованием LumiTrackerMito Red CMXRos, определение типов клеточной гибели с помощью Аннексин V-AF488, оценка киллинговой активности нейтрофилов), а полученные результаты послужили базой для формулировки трех защищаемых положений. Эти положения логически вытекают из экспериментальных данных и не являются декларативными. Научные выводы доказательны, обоснованы и полностью соответствуют поставленным задачам.

Достоверность и новизна исследования и полученных результатов

Достоверность результатов обеспечена репрезентативным объемом выборки (111 женщин, 130 штаммов лактобацилл, 10 штаммов *Gardnerella vaginalis*), использованием стандартизированных клеточных линий, применением современных микробиологических, цитохимических и биохимических методов. Многократная повторяемость опытов (в трех повторностях и трехкратном воспроизведении) и корректный статистический анализ, включающий критерий Колмогорова-Смирнова, t-критерий Стьюдента, точный критерий Фишера, критерий Манна-Уитни и двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA), гарантируют надежность выводов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Новизна диссертационного исследования не вызывает сомнений и включает следующие принципиально новые результаты:

Впервые показано, что регуляция метаболической активности и устойчивости к окислительному стрессу вагинальных эпителиоцитов

определяется не только численностью лактобацилл, но и их функциональной способностью продуцировать пероксид водорода, причем направленность эффекта на ВПЧ-инфицированные клетки диаметрально противоположна по сравнению со здоровыми клетками.

Установлено, что в присутствии *Gardnerella vaginalis* (ключевого представителя бактериального вагиноза) ВПЧ-инфицированные эпителиоциты приобретают повышенную метаболическую активность и резистентность к окислительному стрессу, что может служить одним из механизмов длительной персистенции вируса и формирования онкогенного потенциала.

Впервые продемонстрирована штамм-специфическая модуляция киллинговой функции нейтрофилов комплексом метаболитов лактобацилл, что расширяет представления о роли микробиоты в локальном иммунитете и поддержании колонизационной резистентности вагинального биотопа.

Установлено, что комплекс нативных внеклеточных метаболитов лактобацилл, в отличие от чистых лактата и пероксида водорода, переключает гибель клеток карциномы шейки матки (HeLa) в условиях окислительного стресса с некроза на апоптоз, что указывает на наличие синергических эффектов компонентов метаболома лактобацилл и открывает новые перспективы для разработки постбиотических препаратов с противоопухолевым потенциалом.

Теоретическая ценность диссертационного исследования Мячиной Ю.Л. заключается в создании целостной концепции, согласно которой вагинальная микробиота выступает не просто пассивным колонизатором, а активным регулятором клеточного гомеостаза, митохондриальной функции и типа клеточной гибели. Предложенная модель «микробные метаболиты — метаболизм клеток хозяина» существенно расширяет представления о роли комменсальной микрофлоры и имеет важное значение для понимания фундаментальных основ симбиоза.

Соискателю успешно удалось решить поставленную задачу — охарактеризовать роль микробных метаболитов в регуляции жизнедеятельности клеток хозяина. Реальная новизна заключается в том, что впервые показана дифференцированная чувствительность здоровых, ВПЧ-инфицированных и опухолевых клеток к одним и тем же метаболитам, а также выявлено, что комплекс метаболитов лактобацилл обладает свойствами, не сводимыми к сумме эффектов отдельных компонентов.

Практическая значимость подтверждена патентом РФ на изобретение № 2856925 «Способ отбора лактобацилл для создания пробиотиков, способных снижать количество жизнеспособных клеток карциномы шейки матки». Обоснована возможность использования уровня биогенных аминов (в частности, путресцина) в качестве дополнительного диагностического маркера риска персистенции ВПЧ и прогрессирования цервикальной

интраэпителиальной неоплазии. Результаты могут быть использованы при разработке персонализированных схем терапии бактериального вагиноза и ВПЧ-ассоциированных заболеваний, что созвучно задачам национального проекта «Здоровье» по улучшению женского репродуктивного здоровья.

Структура и содержание диссертации, ее завершенность, качество оформления

Диссертация представляет собой логически завершенное исследование. Структура построена по проблемно-целевому принципу: обзор литературы не является самоцелью, а подводит к формулировке нерешенных вопросов. Главы собственных данных (главы 3-5) выстроены по единой схеме: описание влияния на конкретный тип клеток с четким разделением на компоненты микробных метаболитов, анализ митохондриального потенциала и устойчивости к окислительному стрессу.

Первая глава (обзор литературы) демонстрирует глубокое погружение автора в проблему. В ней систематизированы современные представления о структуре вагинального микробиоценоза, его роли в поддержании гомеостаза, связи с ВПЧ-инфекцией и канцерогенезом. Обзор написан хорошим научным языком, критически осмыслен и органично подводит к формулировке цели и задач исследования. Список литературы включает 139 источников, преимущественно за последние годы, что подтверждает актуальность и глубину проработки темы.

Вторая глава («Материалы и методы») детально и грамотно описывает дизайн исследования, критерии включения пациентов, использованные микробиологические, цитологические, биохимические методы и методы статистической обработки данных. Объем выполненных экспериментов (130 штаммов лактобацилл, 10 штаммов *G. vaginalis*, выделенных от 111 женщин, работа с культурами клеток HeLa и первичными эпителиоцитами) свидетельствует о репрезентативности полученных данных и высокой квалификации автора.

Главы 3-5, содержащие результаты собственных исследований, выстроены по единому принципу и представляют собой три законченных этапа работы, объединенных общей концепцией. В главе 3 изучено влияние микробных метаболитов на метаболизм и устойчивость к окислительному стрессу первичных вагинальных эпителиоцитов (в том числе ВПЧ-инфицированных). В главе 4 охарактеризовано влияние тех же метаболитов на функциональную

активность нейтрофилов. Глава 5 посвящена оценке их действия на клетки карциномы шейки матки (линия HeLa). Выводы, представленные в конце работы, логично вытекают из полученных результатов, полностью соответствуют поставленным задачам и носят доказательный характер. Все 8 выводов четко сформулированы и отражают ключевые результаты работы.

Объем (127 стр.) и иллюстративный материал (22 рисунка, 3 таблицы) адекватны содержанию диссертации. Стил ь изложения научный, четкий, что свидетельствует о хорошем владении материалом. Работа обладает внутренним единством, цель и задачи гармонично коррелируют с содержанием. Автореферат полностью соответствует диссертации и отражает ее основные положения.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты опубликованы в 4 работах, из которых 2 статьи — в журналах, индексируемых WoS и Scopus (включая Q1 — International Journal of Molecular Sciences, 2025), 1 статья в издании РИНЦ и 1 патент РФ на изобретение. Публикации отражают все аспекты работы. Результаты диссертационного исследования апробированы на трех всероссийских и международных конференциях, включая X Российскую научную конференцию с международным участием «Персистенция и симбиоз микроорганизмов» (Оренбург, 2023), VIII Международный молодежный научно-практический форум «Медицина будущего: от разработки до внедрения» (Оренбург, 2024) и Пятую всероссийскую молодежную научную школу-конференцию с международным участием «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» (Оренбург, 2025).

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат подготовлен по стандартному шаблону, содержит все необходимые разделы, его текст точно передает содержание диссертации. В нем корректно сформулированы новизна, практическая значимость, выносимые положения. Замечаний к автореферату не имеется.

Соответствие специальности

Диссертация полностью соответствует паспорту специальности 1.5.11. Микробиология, так как в ней изучаются физиолого-биохимические свойства

микроорганизмов (продукция метаболитов лактобациллами и *G. vaginalis*), их взаимоотношения с макроорганизмом на молекулярном и клеточном уровнях, а также механизмы регуляции клеточного гомеостаза хозяина микробными метаболитами

Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы

При общей высокой оценке работы хотелось бы задать диссертанту несколько уточняющих вопросов:

1. В исследовании использован большой набор штаммов лактобацилл, однако в автореферате не указано, проводилась ли видовая идентификация всех изолятов. Учитывая, что вами показана штамм-специфичность эффектов, не могли бы вы предположить, какие именно виды (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* и др.) вносят наибольший вклад в наблюдаемые эффекты на клетки HeLa и нейтрофилы? Планируется ли в дальнейшем дополнительное типирование для выявления наиболее эффективных таксонов для создания постбиотических препаратов?

2. В эксперименте с внеклеточными метаболитами вы проводили стандартизацию только по молочной кислоте. Однако, как вы сами отмечаете, эффекты разных штаммов при одинаковой концентрации лактата значительно различались. Какие ещё компоненты культуральной жидкости, по вашему мнению, могут отвечать за эти различия (например, бактериоцины, другие органические кислоты, пептиды, экзополисахариды) и как их можно идентифицировать в дальнейших исследованиях?

3. В работе показано, что комплекс нативных метаболитов лактобацилл индуцирует апоптоз клеток HeLa в условиях окислительного стресса, в отличие от чистых лактата и пероксида водорода, вызывающих некроз. Как вы можете объяснить этот феномен с точки зрения синергического действия компонентов метаболома? Какие из компонентов (помимо лактата и пероксида водорода) могли бы играть ключевую роль в переключении типа клеточной гибели на апоптоз?

Высказанные замечания и вопросы носят дискуссионный характер и не снижают общей высокой оценки диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Мячиной Юлии Леонидовны на тему «Влияние метаболитов вагинальной микробиоты на функциональное состояние клеток хозяина» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи —

Таким образом, диссертационная работа Мячиной Юлии Леонидовны полностью соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Мячина Юлия Леонидовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Shp

620028, Российская Федерация Свердловская область, г. Екатеринбург, ул.
Репина, д.3; тел. 8(902)409-42-84; e-mail: voroshilina@gmail.com

Начальник отдела по работе с персоналом ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Зангирова Наталья Анатольевна

1. 09

дата

