

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Стояновой Лидии Григорьевны на диссертационную работу **Кириленко Марины Александровны «Оценка свойств пробиотических и аутопробиотических штаммов лактобацилл разными методами»** на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Актуальность темы исследования

В связи с ухудшением эпидемиологической обстановки в мире, вызванной коронавирусной инфекцией COVID-19, увеличился спрос на функциональные продукты питания и безопасные препараты, полезные для здоровья людей. Согласно доктрине продовольственной безопасности РФ как приоритной в развитии страны выделено направление – улучшение состояния здоровья всех возрастных групп населения за счет высокого качества и безопасности потребляемых продуктов питания. В связи с этим необходимо осуществить ряд мер по внедрению прогрессивных технологий и увеличению объемов производства продуктов здорового питания на основе натуральных компонентов (Доктрина продовольственной безопасности Российской Федерации), утверждена указом Президента РФ от 30.01.2010 №120). Влияние недietetических факторов питания на кишечную микробиоту индивида долгое время игнорировалось, однако ситуация постепенно улучшается. Микробиота кишечника - естественный модератор здоровья и болезней. Кишечная микробиота сильно влияет на ряд биологических процессов, важных для здоровья и долголетия человека. Состав микробов легко меняется в ответ на внешние факторы, такие как несбалансированное питание, недостаток физической активности, курение, условия проживания (Voigt et al., 2014; Feng et al., 2018).

Наука о микробиоме позволяет на современном уровне знаний изучать биологические процессы, состав метаболитов и функционирование организма как в норме, так и при патологии. Пробиотики - ключевой фактор в поддержании оптимального состава кишечной микробиоты. Термин «пробиотики» отождествляют с биологически активными добавками (БАДами) или фармакологическими препаратами. Необходимым критерием для отбора пробиотической культуры является ее благотворное действие на организм человека, улучшая баланс микроорганизмов в тонком кишечнике и изменяя структуру микробиоты в отделах толстого кишечника (Hill et al., 2014). В процессе отбора микроорганизма важно правильно определить его таксономическую принадлежность, так как правильная идентификация штамма на видовом уровне важна для оценки его безопасности, стабильности генома, условий роста и метаболических характеристик. Это играет важную роль при производстве коммерческих пробиотических препаратов, так как влияет на их потенциальную эффективность, безопасность. Под понятием «безопасность» подразумевают, прежде всего, наличие или отсутствие факторов патогенности у данного штамма, которое можно определить с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа на цитотоксичность. Отсюда появляются критерии отбора микроорганизмов, входящих в состав пробиотических препаратов. Однако с расширением спектра показаний для назначения пробиотиков стала накапливаться информация, что положительный эффект даже при длительном применении нередко носит временный характер или полностью отсутствует. Появились отдельные сообщения о возникновении у лиц, длительно принимающих живые пробиотические микроорганизмы, различных осложнений.

Разработка новых пробиотиков активно продолжается, и исследования в этом направлении являются перспективными для обеспечения человека новыми биологическими препаратами. Исследования микробиома человека показывают, что для разработки следующего поколения пробиотических агентов необходимо выбирать штаммы бактерий, обладающие особыми свойствами, такими как способность клеток

прикрепляться к стенкам кишечника, устойчивость к желчи и кислотам, синтез бактериоцинов, антиоксидантная, антипатогенная активность и выживаемость в кишечнике. Тем не менее, ряд важных вопросов, связанных с пробиотиками, таких как показания к назначению, сравнительная эффективность пробиотиков с монотерапией и с множеством штаммов, способы доставки и срок годности, остаются нерешенными (Trush et al., 2020).

Одной из главных причин неэффективности пробиотиков является чужеродность для человека входящих в их состав микроорганизмов. Клинико-экспериментальные работы по коррекции дисбактериозов показали, что лучший эффект достигается либо при индивидуальном подборе донорских штаммов, либо при использовании собственной микробиоты. В последние годы возрос интерес к аутологичным штаммам микроорганизмам – представителям протективной микробиоты, на основе которых производят аутопробиотики. Микроорганизмы, входящие в состав такого пробиотика, изолированы из конкретного индивидуума и предназначены для коррекции его микробиоты (Ильин и др., 2013). Разработка нового поколения пробиотиков на основе оценки состояния микробиоты человека и использование новых методов идентификации лакто- и бифидобактерий для профилактики инфекционных и неинфекционных заболеваний, связанных с дисбалансом микробиоты, являются актуальной задачей.

Дисбактериоз кишечника - это клинико-лабораторный синдром, возникающий при целом ряде заболеваний и клинических ситуаций, который характеризуется изменением качественного и/или количественного состава нормобиоты определенного биотопа, а также транслокацией различных ее представителей в несвойственные биотопы, метаболическими и иммунными нарушениями, сопровождающимися клиническими симптомами у части пациентов. Это означает, что сбалансированное или несбалансированное питание всегда приводит к структурному или функциональному изменению состава микробиома, имеющего значительные последствия для здоровья человека. Накопленные в области нутрициологии и микробиологии данные также свидетельствуют о штаммоспецифичности благоприятного воздействия пробиотиков на здоровье человека.

За последние десятилетие достигнуты значительные успехи в разработке и применении пробиотических продуктов и препаратов на основе лактобацилл. Длительное использование аутоштаммов лактобацилл позволяет обеспечить максимальный эффект при восстановлении нормальной микробиоты кишечника (Шендеров Б.А., 2014). Наибольшее воздействие на здоровье оказывает весь бактериальный ансамбль кишечника, а не отдельные его виды. Создание общедоступных технологий выделения аутоштаммов лактобацилл для получения пробиотиков индивидуального потребления крайне важно для устранения микрoэкологических нарушений кишечника и требует дальнейшего изучения. Таким образом, изложенное выше определяет актуальность диссертационной работы, посвященной исследованию изучения свойств пробиотических лактобацилл и лактобацилл входящих в аутопробиотический комплекс.

Цель работы: оценить свойства аутопробиотического комплекса лактобацилл с использованием различных методов исследования бактерий.

Для достижения выше указанной цели были поставлены следующие задачи:

Задачи исследования:

1. Определить наиболее информативный физиологический показатель состояния клеток лактобацилл на различных уровнях развития (клеточном, видовом и популяционном).
2. Установить межвидовую биосовместимость лактобацилл и оценить влияние условно-патогенной микробиоты на представителей рода *Lactobacillus*.
3. Оценить действие природных биологически активных веществ на различные штаммы лактобацилл.
4. Изучить влияние иммунных факторов слюны на клетки лактобацилл *in vitro*.

5. Разработать способ выделения аутоштаммов лактобацилл, выбрать методы оценки степени чистоты и сохранения жизнеспособности культур полученного аутопробиотического комплекса для контроля его качества.
6. Сравнить аутопробиотические комплексы кишечника родственников разного возраста для их возможного использования внутри семейной группы

Структура диссертационной работы Кириленко М.А. «Оценка свойств пробиотических и аутопробиотических штаммов лактобацилл разными методами» традиционная.

Диссертация изложена на 182 страницах и состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследования, результатов собственных исследований, их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 80 работ отечественных и 75 работ зарубежных авторов, приложения. Работа иллюстрирована 17 рисунками и 17 таблицами.

Во Введении показана актуальность выбранной темы исследований, ее новизна. представлены цель и задачи исследований..

Обзор литературы включает 4 раздела:

- 1.1. Значение нормальной микрофлоры человека для регуляции его гомеостаза.
- 1.2. Роль лактобацилл в структуре нормального микробиоценоза кишечника.
- 1.3. Формирование биопленки начальных этапов развития бактериальных популяций и возможная роль лактобацилл в образовании биопленки кишечного микробиоценоза.
- 1.4. Использование лактобацилл в составе препаратов для коррекции дисбактериозов кишечника (пробиотики, аутопробиотики).

Автором детально проработана отечественная и зарубежная литература по теме диссертации, которая вошла в обзор литературы, и использована в обсуждении полученных экспериментальных данных. Подбор литературы логичен, обзор написан хорошим литературным языком, отражает цель и задачи исследований и помогает правильно интерпретировать результаты, полученные автором.

В главе № 2 **Материал и методы исследования** представлено описание штаммов, отобранных для исследований, описаны методы собственных исследований. Для решения поставленных задач диссертантом были привлечены бактериологические методы (культивирование, микрокультивирование, тестирование на антагонизм), инструментальные методы исследования (нефелометрия, MALDI TOF). Методы статистической обработки, использованные диссертантом в работе, позволили сделать обоснованные выводы.

Глава "РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ" содержит 4 раздела, где представлены полученные экспериментальные данные и их обсуждение.

В **Приложениях** дана схема сборки стационарной камеры диффузного типа для культивирования микроорганизмов (СКДТ), коэффициенты пропускания развивающейся культуры лактобацилл при добавлении слюны генетически близких родственников; микробный пейзаж последовательных серийных разведений микробиоценоза кишечника, качественный и количественный (lg n) состав микрофлоры кишечника людей разных возрастных групп.

На начальных этапах работы после изучения научной литературы автором Кириленко М.А были сформулированы цель и задачи исследования. В обзоре широко представлено применение препаратов пробиотиков, содержащих живые лактобациллы, для коррекции микрофлоры кишечника. Однако, показано, что пробиотики бывают несовместимы с микробиомом конкретного человека и могут стать транзитными. Поэтому наиболее лучший эффект достигается при индивидуальном подборе донорских

штаммов, либо при использовании аутобиоты. Несмотря на широкое и успешное использование лактобацилл для коррекции дисбактериоза кишечника, морфофункциональные особенности взаимодействия их со средой обитания, особенно на ранних стадиях образования колоний, изучены слабо. Однако изучение начальных стадий образования колоний (до этапа формирования устойчивой биопленки) чрезвычайно важно, поскольку здесь может быть получен новый материал для понимания процессов закрепления, функционирования и устойчивости лактобацилл в составе микробиоценоза кишечника. Вместе с тем исследования клеточного и клеточно-популяционного уровней протекания биологических процессов несомненно даст основу для понимания популяционных взаимодействий лактобацилл и другой микробиоты в сложной структуре микробиоценоза кишечника при культивировании в различных условиях.

Разделы результатов собственных исследований представлены в соответствии с целью и задачами диссертационной работы и являются непосредственным следствием проведенных автором исследований. В каждом из этих разделов дается достаточно подробное описание экспериментального материала, документированное таблицами, графиками и микрофотографиями. Проведен огромный объем исследований.

В экспериментах *in vitro* описаны результаты культивирования пробиотических культур в оптимальных и измененных условиях методом микрокультивирования и чашечным методом. Диссертант оценивал свойства пробиотических и аутопробиотических штаммов лактобацилл разными методами. При изучении развития микроорганизмов на клеточном уровне методом микрокультивирования с использованием светового микроскопа в различных режимах наблюдениях (фазовоконтрастном, темного или светлого поля, поляризованного освещения) выявлено наличие высокой антагонистической активности штамма *L. rhamnosus* LGG, в которых время генерации второго поколения *L. acidophilus* существенно увеличилось (с 123 ± 3 минут в контроле, до 212 ± 3 минут в опыте).

Обнаружено различное антагонистическое действие штаммов *L. acidophilus* NK1 (123 ± 3 - контроль, 161 ± 4 минут - опыт), *L. rhamnosus* и *L. casei* (123 ± 3 - контроль, 143 ± 2 минут - опыт), а штамм *L. casei* DN-114001 *defensis* (123 ± 3 - контроль, 129 ± 2 минут - опыт) не оказывал влияние на размножение клеток тестируемого штамма *L. acidophilus*.

Установлен физиологический показатель, позволяющий охарактеризовать состояние популяции лактобацилл на клеточном уровне, - время генерации для первого и второго поколений клеток. Наиболее информативным показателем оказалось время размножения клеток лактобацилл второго поколения, в котором зафиксирован жизненный цикл отдельной клетки.

Чашечным методом установлено, что *L. acidophilus* в большинстве случаев проявляет слабый антагонизм к использованным в работе тест-штаммам *Staphylococcus* sp., *Shigella flexneri*, *Serratia marcescens*, *Candida* sp. В тоже время штаммы *S. aureus* N-3, *Salmonella* sp., *E. coli* M-17 биосовместимы. Исключение составили *Staphylococcus* sp. 2, рост которого на чашке отсутствовал. Кроме того, обнаружено ингибирующее действие *Klebsiella* sp. на штамм *L. acidophilus*.

Показано, что пробиотические штаммы лактобацилл обладали различным спектром антагонистической активности как в отношении друг друга, так и в отношении штаммов условно-патогенной микробиоты кишечника человека. Информация о биосовместимости культур необходима при конструировании новых биопрепаратов для коррекции дисбиотических нарушений кишечной микробиоты.

Выявлено воздействие антимикробных факторов врожденного иммунитета на отдельные виды микроорганизмов микробиоты человека. Нефелометрическим методом анализа изучено влияние на лактобациллы слюны между чужими и родственными людьми. Обнаружено, что в популяции лактобацилл после обработки слюной происходила активная элиминация части бактериальных клеток. На основании этого

можно говорить о возможности быстрого индивидуального подбора пробиотических штаммов лактобацилл при использовании слюны конкретного индивидуума. На основании данных диссертации автор утверждает, что антимикробные факторы слюны близких родственников оказывают одинаковое физиологическое действие на лактобациллы, а лактобациллы, обладавшие антагонистической активностью, идентичны у генетически близких родственников.

В пятой главе описано получение аутопробиотика, содержащего комплекс живых лактобацилл. Данные этих экспериментов показали возможность быстрого, надежного и экономически выгодного процесса накопления и хранения необходимой биомассы при получении готового продукта, а также стимуляции роста и развития лактобацилл биологически активными веществами (соком и порошком гриба Шиитаке). Дана характеристика гриба. Впервые установлено, что биологически активные вещества сока и порошка гриба Шиитаке на 40 - 75% стимулируют рост лактобацилл.

На основании полученных данных при изучении свойств лактобацилл разными методами разработан новый аутопробиотический комплекс (АПК). Доказано, что лактобациллы аутопробиотического комплекса при минус 20 °С в условиях длительного хранения (24 месяца) не снижали жизнеспособность.

В заключении автором подробно анализируются полученные данные и сопоставляются с результатами других авторов.

Диссертация **Кириленко Марины Александровны «Оценка свойств пробиотических и аутопробиотических штаммов лактобацилл разными методами»** производит хорошее впечатление манерой изложения материала, четкостью постановки экспериментов, логикой обсуждения полученных результатов. Она написана правильным литературным языком, её структура подчинена строгой логике выбранного автором направления исследований.

Выводы корректны и вытекают из логики выполнения экспериментальной работы и поставленных задач.

Автореферат составлен в классической форме и отражает содержание, основные результаты исследований, изложенные в диссертации

Приоритетность полученных данных подтверждена патентами РФ «Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобациллы» 2014 г. и «Способ получения препарата эубиотика Лактобактерин с добавлением сока или порошка гриба Шиитаке» 2018 г.

Теоретическая и практическая значимость

Автором получены данные о межвидовых взаимоотношениях лактобацилл на клеточном и популяционном уровнях, расширяющие представления об их симбиотических взаимодействиях с условно-патогенными микроорганизмами и нормальной микробиотой кишечника человека, что явились основой разработки аутопробиотического комплекса.

Установлена длительность хранения лактобацилл без потери их жизнеспособности и активности на протяжении не менее двух лет в условиях низкой температуры (минус 20 °С). Это в перспективе может стать основой для создания криобанка аутоштаммов при получении продуктов индивидуального потребления.

На основании полученных данных издано и используется в курсе лекций учебное пособие для студентов «Дисбактериоз кишечника. Причины, симптомы, современная диагностика и эффективное лечение», 2016 г., в ФГБОУ ВО «Ивановской медицинской академии» Минздрава России.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности Отрасль наук: биологические науки. 03.02.03 – «Микробиология» по следующим пунктам областей исследований формулы специальности: п. 2 – выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов; п. 4 – исследование микроорганизмов на

популяционном уровне; п. 10 – использование микроорганизмов в народном хозяйстве, ветеринарии и медицине.

Вместе с тем представленная диссертация не лишена отдельных недостатков, касающихся, главным образом, оформления работы.

К диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. В главах РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ очень подробно описаны методические приемы, которым место в главе 2. Материал и методы исследования.
2. В представленных рисунках (рис.11,14, 15) желательно привести доверительный интервал, который можно указать в сносках к названию ($p \leq 0.05$), несмотря на то, что в главе № 2, разделе "Статистические методы исследования" подробно описана методика статистической обработки результатов исследований, и доверительный интервал указан в таблицах.
3. В тексте встречается термин **микрофлора**, которое следует заменить на термин **микробиота**, поскольку в новой систематике все микроорганизмы исключены из царства растений (флоры).
4. Есть неудачные выражения - активность отмечена по отношению к **грамнегативным Shigella sonnei...**, принято **грамотрицательным Shigell**
5. Курсивом пишут только названия культур микроорганизмов, например: *L.acidophilus* NK1, а не *L.acidophilus* NK1: *L.rhamnosus* LGG, а не *L.rhamnosus* LGG
6. изменения оптической плотности - пишут **ОП**, а не D (стр. 16 по тексту автореферата и табл.5)
7. Оформить список литературы в соответствии с требованиями.

Имеется вопрос: Как объяснить выбор для исследования концентрации сока гриба Шиитаке 2.5%?

В тексте диссертации встречаются отдельные опечатки.

Следует отметить, что указанные замечания легко устранимы, не носят принципиального характера, не снижают значимость полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

Соискателем проделана интересная и своевременная работа, актуальность, новизна, научная и практическая значимость которой неоспорима. Результаты подвергнуты тщательной обработке методами математической статистики, что и позволило автору выявить закономерности и корреляционные зависимости. Достоверность полученных данных не вызывает сомнений. Проведенные диссертантом анализ и обобщение результатов комплексных научных исследований позволили полностью обосновать основные положения, выносимые на защиту

Диссертация производит хорошее впечатление манерой изложения материала, четкостью постановки экспериментов, логикой обсуждения полученных результатов. Она написана правильным литературным языком, её структура подчинена строгой логике выбранного автором направления исследований. В конце главы эксперимента дан подробный анализ результатов в виде заключения, демонстрирующий высокую эрудицию автора, его способность делать правильные научные выводы.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликована 31 научная работа, из них 7 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, 2 патента РФ, а также 1 учебно-методическое пособие для студентов.

Публикации дают полное представление о выполненной работе. Основные результаты исследований неоднократно обсуждались на многочисленных Всероссийских и Международных научных конференциях.

Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

Заключение

Диссертация представляет собой обстоятельный и законченную научно-квалификационную работу. По актуальности, используемым способам решения поставленных задач и значимости полученных результатов рассматриваемая диссертационная работа представляет собой новое приоритетное исследование. Проведенные диссертантом анализ и обобщение результатов комплексных научных исследований позволили полностью обосновать основные положения, выносимые на защиту. Полученные диссертантом результаты имеют фундаментальную, общебиологическую и несомненную практическую ценность.

В целом, диссертационная работа **Кириленко Марины Александровны «Оценка свойств пробиотических и аутопробиотических штаммов лактобацилл разными методами»** полностью отвечает требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями в редакции Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017 г., №1027 от 28.08.2017 г., №1168 от 01.10.2018 г.), предъявляемым кандидатским диссертация, а ее автор заслуживает степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник кафедры
микробиологии ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова»

Доктор биологических наук, доцент
119991, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12;
Биологический факультет
тел. +7(495)939-45-45
e-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Л.Г.Стоянова

Подпись. Стояновой Лидии Григорьевны заверяю:
Декан биологического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»
академик



28 апреля 2022 г.