

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Романова Виталия Александровича на диссертацию 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. Проблемы становления, формирования и функционирования нормальной микробиоты человека, а также возможности ее восстановления после нарушений различной степени тяжести являются значимыми в микробиологических исследованиях. Эта микробиота важна для сохранения гомеостаза организма и повышения устойчивости во внешней среде. Особую роль в поддержании гомеостаза организма играет нормальная микробиота кишечника.

Одной из наиболее значимых групп микроорганизмов кишечника являются лактобациллы. Значимость лактобацилл, а также их использование, особенно для коррекции дисбактериозов кишечника человека, являются одной из наиболее обсуждаемых проблем при оценке значимости микробиоты макроорганизмов. Таким образом, изучение свойств пробиотических лактобацилл и лактобацилл входящих в аутопробиотический комплекс, что является актуальным и значимым направлением современной микробиологии.

Степень обоснованности научных положений и выводов

В диссертационной работе использован большой экспериментальный материал. В ходе работы методом микрокультивирования было установлено, что наиболее оптимальным показателем для оценки физиологического состояния клеток бактериальных популяций является время генерации, рассчитываемое для первых двух поколений клеток. В результате

многочисленных экспериментов процессе совместного микрокультивирования клеток пробиотического штамма *L.acidophilus* с грибами рода *Candida sp.* и *S.aureus N-3* обнаружено различное адаптивное поведение изучаемого штамма. Полученные автором данные позволяют говорить о наличии высокой антагонистической активности пробиотического штамма *L.rhamnosus LGG* на штамм *L.acidophilus*, т.к. время генерации (τ) второго поколения существенно увеличилось (с 123 ± 3 минут в контроле до 212 ± 3 минут). Также обнаружено, что антагонистическое воздействие штамма *L.acidophilus NK1*, в среднем, увеличило время генерации второго поколения клеток штамм *L.acidophilus* (до 161 ± 4 минуты) по сравнению с контролем (123 ± 3 минуты). Антагонистическое воздействие штаммов *L.rhamnosus* и *L.casei DN-113001* на клетки штамма *L.acidophilus* в ходе совместного микрокультивирования можно расценить как низкое т.к. τ увеличились всего до 143 ± 2 минуты.

В опытах с использованием биологически активного вещества (сок), полученного из гриба Шиитакэ, установлено, что под действием сока время генерации второго поколения бактериальных клеток пробиотических штаммов сократилось на 10% относительно контроля.

В ходе работы был разработан способ получения аутопробиотика, содержащего комплекс живых лактобацилл (Кузнецов О.Ю. и др., Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобациллы №2505304, 27.01.2014). Полученный аутопробиотический комплекс (АПК) может применяться для восстановления, нарушенного микробиоценоза кишечника. Продемонстрировано аналогичное воздействие сока гриба Шиитакэ на лактобациллы, входящие в пробиотики и в АПК. Данные экспериментов показали увеличение оптической плотности в опыте относительно контроля в 2,5 раза ($p < 0,05$, контроль $D = 0,62 \pm 0,02$, опыт $D = 1,52 \pm 0,04$), что указывает на увеличение биомассы лактобацилл АПК при культивировании в селективной питательной среде. Это подтверждается

увеличением числа клеток лактобацилл АПК (контроль – $2,4 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, опыт – $4,24 \cdot 10^7$ КОЕ/мл), свидетельствуя о стимуляции развития микробной популяции лактобацилл в результате влияния АПК.

В работе использовались классические и современные микробиологические, физико-химические методы. Методы статистической обработки, использованные диссертантом в работе, позволили сделать обоснованные выводы.

Все выводы и положения корректны и вытекают из логики выполнения экспериментальной работы.

Научная новизна диссертационной работы

Научная новизна диссертационной работы заключается в изучении свойств пробиотических и аутопробиотических лактобацилл.

Автором установлен физиологический показатель, позволяющий охарактеризовать состояние популяции лактобацилл на клеточном уровне - время генерации для первого и второго поколений клеток.

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.

Впервые установлено, что биологически активные вещества сока и порошка гриба Шиитаке на 40 - 75% стимулируют рост лактобацилл.

Разработанный способ выделения, накопления и хранения комплекса аутоштаммов лактобацилл позволяет получить аутопробиотик индивидуального потребления, восстанавливающий микробиоценоз человека на основе собственных штаммов микробиоты.

Практическое значение исследования

Показана перспективность использования натуральных биологически активных компонентов гриба Шиитаке для стимуляции роста лактобацилл в пробиотических препаратах и аутопробиотических комплексах.

По результатам проведенных исследований получены патенты 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.

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.

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа построена по общепринятому плану и включает в себя введение, обзор литературы, 3 главы собственных исследований, заключение, выводы, список литературы и приложение. Работа изложена на 182 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, четырёх глав собственных исследований, содержащих описание объектов и методов исследования, заключения, выводов, списка сокращений и библиографического указателя, включающего 80 работ отечественных и 75 работ зарубежных источников. Работа иллюстрирована 17 рисунками и 17 таблицами.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, кратко охарактеризована степень научной разработанности проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, определены его объекты, приведены наиболее существенные результаты работы, выносимые на защиту и обладающие научной новизной.

В начале автор подробно рассматривает биологическую роль лактобацилл в биоценозе кишечника человека, а также проблему становления нормальной микробиоты. Далее он проводит анализ литературных данных по использованию лактобацилл в составе пробиотических препаратов для восстановления и сохранения нормальной кишечной микробиоты. В заключение первой главы автор предлагает использование аутокультур

лактобацилл для дальнейшего достижения максимального эффекта при восстановлении нормальной микробиоты кишечника.

Во второй главе автор описывает классические и современные методики исследования. Также автор разрабатывает свои авторские методики на основе классических методов исследования.

В третьей, четвертой и пятой главах (результаты собственных исследований) автор подробно описывает полученные результаты. Третья глава содержит данные о культивировании лактобацилл в различных условиях методом микрокультивирования и чашечным методом. В экспериментах при совместном культивировании лактобацилл, содержащихся в функциональных продуктах питания и совместно с отдельными видами микроорганизмов микробиоты тела человека, были обнаружены различные взаимоотношения между микроорганизмами.

В четвертой главе изучается воздействие антимикробных факторов врожденного иммунитета на отдельные виды микроорганизмов микробиоты тела человека. При изучении популяции лактобацилл использовали нефелометрический метод исследования. Обнаружено, что в популяции представителей лактобацилл из состава пробиотических препаратов после обработки стерильной слюной человека происходит активная элиминация части клеток бактериальной популяции. Установлено, что при определении коэффициента корреляции развивающихся популяций клеток лактобацилл при добавлении слюны родственников превалирует сильная и очень сильная связь между признаками, приближенная к единице, однако встречается и отрицательная корреляция (очень слабая связь, 3 значения из 20). При использовании слюны другого человека (не родственника) на эти же штаммы лактобацилл чаще всего встречается умеренная и значительная связь между признаками и отрицательная (6 значений из 20). Кроме того, в ходе работы разработан способ получения аутопробиотика, содержащего комплекс живых лактобацилл.

В пятой главе представлены результаты по исследованию свойств аутопробиотического комплекса лактобацилл *in vitro*. Автором получены данные, демонстрирующие, о возможности получения консервированной формы препарата в виде замороженного бактериального АПК (препарата). Установлено, что данный препарат содержит живые лактобациллы без потери их жизнеспособности (не менее 2 лет), судя по динамике изменения оптической плотности (D) через 24 и 48 часов культивирования - ($D = 0,26 \pm 0,01$ и $D = 1,11 \pm 0,01$ соответственно) нефелометрическим методом.

В заключении диссертационной работы автор кратко обобщает основные результаты исследования. Работу завершают семь выводов, полностью соответствующих поставленным задачам. Автореферат содержит основные результаты исследований, представленные в диссертации, и полностью отражает ее содержание. Тема диссертации, основные положения, выносимые на защиту, и выводы полностью соответствуют специальности 03.02.03 – «Микробиология».

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея и планирование научной работы, формулировка цели и задач, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с научным руководителем д.б.н. Кузнецовым О.Ю. Лично автором выполнены микробиологические и нефелометрические исследования, а также анализ полученных масс-спектров методом MALDI TOF. Данные, полученные в ходе выполнения работы, статистически обработаны и проанализированы автором.

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.

Принципиальных замечаний нет. Однако в порядке дискуссии хотелось бы задать автору несколько вопросов.

1. Почему в исследованиях методом микрокультивирования были взяты только *S.aureus* и грибы рода *Candida*, а не все микроорганизмы, использовавшиеся ранее при культивировании на чашках?

2. С какой целью определяли биосовместимость или антагонизм между различными штаммами лактобацилл? Ведь можно изначально ожидать различные взаимоотношения между ними.

3. Представление в литературном обзоре некоторых устаревших данных и литературных источников кажется несколько излишним.

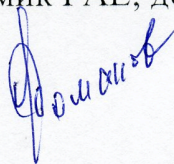
Заключение

Представленная работа является законченным исследованием, выполненным на современном методическом уровне и значительном экспериментальном материале. Полученные результаты о свойствах пробиотических и аутопробиотических лактобацилл могут быть использованы для получения молочнокислых продуктов индивидуального потребления при коррекции дисбактериоза кишечника.

По своей актуальности, решению поставленных задач, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертация Кириленко Марины Александровны 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., ред. от 11.09.2021), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой микробиологии с вирусологией и иммунологией
Федерального государственного бюджетного учреждения высшего
образования «Ярославский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ЯГМУ
Минздрава России), Почетный работник высшего профессионального
образования РФ, Академик РАЕ, доктор медицинских наук, профессор



Романов Виталий Александрович

Шифр специальности - 03.02.03 – микробиология

Место работы:

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет»
МЗ РФ

150000, Ярославская область, г. Ярославль, ул. Революционная, 5
+7(4852)30-56-41; +7(4852)72-91-42, rector@ygm.ru

Подпись Романова Виталия Александровича заверяю:

Проректор по научной работе и развитию регионального здравоохранения
ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор
(П.М.Маслюков)



08.04.2022