

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Нетрусова Александра Ивановича на диссертационную работу Цапиевой Анны Николаевны на тему «Микробиологический и молекулярно-генетический анализ молочнокислых бактерий как перспективных пробиотиков», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

03.02.03 – микробиология

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Цапиевой Анны Николаевны посвящена характеристике биологических свойств штаммов молочнокислых микроорганизмов, выделенных из различных источников, в качестве потенциальных пробиотиков. Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при применении в адекватных количествах вызывают улучшение здоровья организма-хозяина. К препаратам, претендующим на то, чтобы быть отнесенными к пробиотикам, заложены следующие основные требования: сохранность жизнеспособности микробов в препарате, их достаточное количество, доказанная эффективность и безопасность. Пробиотики должны быть фено- и генотипически классифицируемыми, не должны обладать патогенностью, должны быть кислотоустойчивыми или заключены в кислотоустойчивую капсулу, должны сохраняться живыми, быть способны к колонизации кишечника и должны быть безопасными. Только доказавшие свою клиническую эффективность в плацебо-контролируемых исследованиях штаммы могут быть использованы для производства пробиотиков. В настоящее время доступно огромное количество продуктов с пробиотиками, но далеко не все отвечают требованиям, предъявляемым к пробиотикам. В некоторых отношениях промышленность развивалась быстрее, чем научные исследования, и сейчас ученые и врачи выступают за дополнительные исследования, чтобы определить, какие же пробиотики действительно полезны. В связи с этим, работа Цапиевой А.Н., посвященная изучению биологических свойств штаммов молочнокислых

микроорганизмов, которые могут претендовать на роль пробиотиков, приносящих пользу, является актуальной.

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

В процессе выполнения диссертационного исследования Цапиевой А.Н. последовательно были решены все поставленные задачи, которые позволили автору получить информативные экспериментальные данные и сформулировать выводы, характеризующиеся высокой степенью научной новизны.

В работе были проведены исследования по характеристике различных штаммов молочнокислых микроорганизмов с целью выявления наиболее перспективных для применения в качестве пробиотических. Детально охарактеризованы физиологические и генетические свойства 62 исследуемых штаммов молочнокислых бактерий, из которых 47 штаммов, относящихся к видам *E. faecium*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii subs. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. crispatus*, *L. helveticus* были отмечены в качестве претендентов для использования в качестве пробиотиков и аутопробиотиков.

Автором была продемонстрирована способность исследуемых штаммов молочнокислых бактерий восстанавливать микробный баланс ЖКТ крыс после применения антибиотиков, а также отмечено, что антагонистические свойства молочнокислых бактерий в отношении представителей условно-патогенных микроорганизмов носят индивидуальный характер и не коррелируют с их способностью устранять дисбиотические нарушения, вызванные приемом антибиотиков.

Автором разработан и апробирован новый методический подход по получению аутопробиотиков на основе собственных штаммов микробиоты человека. Новый подход включает генетический анализ безопасности изолированных штаммов и позволяет получить персональный пробиотик на основе штаммов *Enterococcus faecium* и *Lactobacillus spp.*, способный восстанавливать микробный баланс организма. Впервые собственные штаммы микробиоты человека были использованы для лечения пациентов с синдромом раздраженного

кишечника и показана эффективность такой терапии.

Автором был разработан новый алгоритм определения вида лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР. Для этого Цапиевой А.Н. были сконструированы оригинальные видоспецифические ДНК праймеры, гомологичные 12 видам лактобацилл, наиболее распространенных в разных отделах желудочно-кишечного тракта человека.

Впервые проведена расшифровка нуклеотидной последовательности участка генома известного российского штамма *L. plantarum* 8P-A3, отвечающего за синтез плантарицинов EF и NC8, а также феромон-плантарцина А. Установлено, что плантарицины расположены на плантарициновом локусе размером 17588 п.н., который, кроме плантарицинов, кодирует белки устойчивости к плантарицинам EF и NC8; регуляторный оперон *plnABCD*, кодирующий два регулятора ответа (активатор и супрессор), гистидин киназу, транспортный оперон *plnGHSTUV*, кодирующий ABC-транспортер, вспомогательный транспортный белок, а также ряд протеаз СААХ II семейства, функция которых на настоящий момент не определена.

Впервые было осуществлено полногеномное секвенирование генома штамма *L. plantarum* 8P-A3. Полногеномное секвенирование *L. plantarum* 8P-A3 установило хромосомную локализацию плантарицинового локуса. Было установлено, что штамм не несет других генов, кодирующих бактериоцины, кроме расположенных на плантарициновом локусе плантарицинов А, EF и NC8. В геноме штамма обнаружен ген устойчивости к микроцину С7; 13 копий гена, кодирующего алкогольдегидрогеназу; 6 копий гена, кодирующего лактатдегидрогеназу.

Теоретическая и практическая значимость работы

При выполнении диссертационного исследования Цапиева Анна Николаевна получила ряд приоритетных результатов, имеющих существенное научное и практическое значение.

Исследования адаптационных, физиологических и генетических свойств выделенных штаммов молочнокислых бактерий позволили автору отобрать в качестве претендентов для использования в качестве пробиотиков и

аутопробиотиков 47 штаммов бактерий, относящихся к видам *E. faecium*, *L. delbrueckii subs. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. crispatus*, *L. reuteri*. Новые штаммыполнили коллекцию микроорганизмов отдела молекулярной микробиологии Федерального Государственного Бюджетного Научного Учреждения «Институт экспериментальной медицины».

Разработана технология получения аутопробиотиков на основе собственных штаммов молочнокислых бактерий, включающая изучение генетических особенностей перспективных штаммов, которая позволяет в срок от 5 до 14 рабочих дней получить персональный пробиотик для коррекции дисбиоза.

Разработан новый метод видовой идентификации лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР, который является эффективным и достоверным для определения вида лактобацилл и позволяет идентифицировать штаммы в течение одного рабочего дня. Метод может быть рекомендован для рутинного применения в лабораториях, объектом изучения которых являются лактобациллы, выделенные от людей, животных, из пищевых продуктов и растений.

Полногеномный сиквенс генома штамма *L. plantarum* 8P-A3 размещен в открытую базу данных GenBank NCBI под номером CP046726.

Короткие нуклеотидные последовательности, соответствующие участкам ДНК, кодирующим 16S рРНК исследуемых бактерий, полученные в результате выполнения работы, депонированы в банк данных GenBank NCBI: GU299484 - *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LM1; GU299485 - *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LM2; EU346727 - *L. delbrueckii* TS1-06; EU346728 - *L. fermentum* TS3-06.

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

О достоверности полученных результатов свидетельствует достаточный объем выборки исследованных штаммов молочнокислых микроорганизмов, большой объем проведенных исследований. Изучено более 60 штаммов молочнокислых микроорганизмов, выделенных из толстой кишки человека и других источников. Работа выполнена на современном методическом уровне, характеризуется

разнообразием методических подходов, совокупность которых адекватна цели и задачам работы.

Диссертация логично и последовательно изложена, обсуждение результатов работы основано на большом объеме библиографических данных.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации и оформлен в соответствии с существующими требованиями.

По теме диссертации опубликованы 33 печатные работы, в том числе 6 публикаций в рецензируемых изданиях, 2 публикации в других изданиях, 5 патентов РФ на изобретения, 20 публикаций в материалах конференций.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности и оформления

Материалы диссертации изложены на 108 страницах машинописного текста и иллюстрированы 21 таблицей, 20 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 207 источников, из которых 40 – отечественных, 167 – зарубежных авторов.

Во введении четко сформулированы актуальность и степень разработанности темы исследования, цели и задачи работы, а также ее теоретическая и практическая значимость. Основные результаты исследований были представлены на всероссийских и международных конференциях и симпозиумах.

Аналитический обзор литературы изложен на 17 страницах и содержит сведения об основных биологических свойствах пробиотиков на основе молочнокислых микроорганизмов, критериях оценки их безопасности, о современных микробиологических и молекулярно-генетических методах изучения и идентификации молочнокислых микроорганизмов. В целом, обзор литературы демонстрирует хорошее знание работ отечественных и зарубежных исследователей в этом направлении.

В главе «Микробиологические исследования пробиотических свойств выделенных штаммов молочнокислых микроорганизмов» приведены результаты исследования адаптационных показателей микроорганизмов, их антагонистической

активности по отношению к *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*. В результате проведенного исследования были определены минимальные ингибирующие концентрации исследуемых молочнокислых микроорганизмов в отношении 40 индикаторных штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Анализ результатов, полученных в ходе исследования, выявил определенные тенденции в показателях минимальных ингибирующих концентраций для каждого из исследуемых молочнокислых микроорганизмов.

В главе «Генетическая характеристика исследуемых штаммов молочнокислых микроорганизмов» подробно описана разработка праймеров для поиска генов, кодирующих бактериоцины лактобацилл. Было проведено исследование геномов исследуемых лактобацилл на наличие генов, кодирующих бактериоцины с использованием разработанных праймеров, в результате которого в геноме *L. plantarum* 8P-A3 были обнаружены гены, кодирующие феромон-плантарицин А и двухпептидный бактериоцин EF. Эта находка привела к изучению строения локуса, на котором были обнаружены вышеперечисленные гены, с использованием оригинальных праймеров, сконструированных автором для этой цели.

Необходимо отметить оригинальное решение по разработке метода идентификации кишечных лактобацилл на основании метода мультиплексной ПЦР с использованием праймеров, разработанных автором диссертации на основании данных научной литературы и современных баз данных нуклеотидных последовательностей бактериальных ДНК.

Осуществлено полногеномное секвенирование *L. plantarum* 8P-A3 которое подтвердило, что плантарициновый локус, просеквенированный автором ранее, располагается на хромосоме. Штамм не несет других генов, кодирующих бактериоцины, кроме расположенных на плантарициновом локусе плантарицинов А, EF и NC8.

В главе «Анализ способности исследуемых микроорганизмов восстанавливать микробный баланс после индуцированного дисбиоза на модели лабораторных

животных» проведено исследование влияния молочнокислых микроорганизмов на макроорганизм и его микрофлору при развитии дисбиотических состояний на модели индуцированного дисбиоза. В результате эксперимента было установлено, что аппетит и вес начинали расти в тех группах животных, которым после антибиотиков дополнительно к стандартному рациону вводили молочнокислые закваски. Наискорейшее восстановление микробного баланса после индуцированного дисбиоза наблюдалось после воздействия штаммов *L. delbrueckii* TS1-06, *L. fermentum* TS3-06, *E. faecium* L3.

В главе «Разработка метода и получение аутопробиотика на основе собственных штаммов микробиоты человека» подробно описаны исследования, направленные на разработку новой технологии получения персональных пробиотиков – аутопробиотиков на основе собственных штаммов молочнокислых микроорганизмов, представителей нормальной микробиоты ЖКТ человека. Обоснована последовательность исследований, их необходимость и достаточность. В результате предложена инновационная технология получения персонифицированного пробиотика и изложены перспективы развития данной разработки.

В главе «Исследование влияния пробиотиков и аутопробиотиков на самочувствие пациентов с синдромом раздраженного кишечника» описаны результаты исследования влияния приема пробиотиков и аутопробиотиков пациентами с синдромом раздраженного кишечника, проведенные автором совместно с сотрудниками Кафедры терапии и клинической фармакологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова на базе Городской больницы №26 г. Санкт-Петербурга. Показано, что во всех группах обследуемых пациентов, получавших молочнокислые закваски на основе собственных и пробиотических штаммов молочнокислых микроорганизмов, достоверно уменьшилась выраженность болевого синдрома, выраженность метеоризма, отмечено достоверное изменение формы стула. Наблюдалось достоверное улучшение общего самочувствия пациентов.

В пяти главах собственных исследований полученные данные изложены последовательно, проиллюстрированы достаточным количеством рисунков и таблиц. Все представленные автором результаты являются оригинальными. На основании полученных результатов сделаны 6 выводов, полностью соответствующих поставленным задачам.

Соответствие специальности

Кандидатская диссертация Цапиевой А.Н. полностью соответствует специальности 03.02.03 – микробиология.

В процессе рецензирования диссертационной работы возникло несколько вопросов:

1. В чем состоит преимущество разработанного метода идентификации лактобацилл на основе метода мультиплексной ПЦР по сравнению с уже существующими?
2. Были ли обнаружены другие микроорганизмы кроме штаммов лактобацилл в составе исследуемых кисломолочных продуктов «Чакка» и «Мацони»?

В оппонируемой диссертации имеются немногочисленные опечатки и грамматические ошибки, которые не снижают общей высокой оценки научной и практической ценности работы.

Таким образом, диссертационная работа Цапиевой Анны Николаевны на тему: «Микробиологический и молекулярно-генетический анализ молочнокислых бактерий как перспективных пробиотиков» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента РАН Суворова Александра Николаевича, содержащей новое решение актуальной научной задачи – разработка подхода для поиска и анализа новых перспективных пробиотических штаммов, имеющей существенное значение для микробиологии.

Диссертационная работа Цапиевой Анны Николаевны на тему «Микробиологический и молекулярно-генетический анализ молочнокислых бактерий как перспективных пробиотиков», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 –

микробиология, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335, от 02 августа 2016 года № 748, от 29 мая 2017 года № 650, от 28 августа 2017 года № 1024, от 01 октября 2018 года № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Цапиева Анна Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры микробиологии биологического
факультета Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова» (г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12)

тел.: +7-495-939-54-83

e-mail: anetrusov@mail.ru

25.11.2020г.

А.И.Нетрусов

Подпись Нетрусова Александра Ивановича заверяю:

Декан биологического факультета

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени

М.В. Ломоносова», академик



М.П.Кирпичников