

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Сидоренко Сергея Владимировича 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 работы

С появлением новейших технологий высокопроизводительного секвенирования было установлено, что количество клеток микроорганизмов, населяющих организм человека, превышает число собственных клеток организма человека почти в десять раз. Всю совокупность микроорганизмов, обитающих в различных нишах организма человека, называют микробиотой, при этом микробиота рассматривается как его неотъемлемая часть. Микробиота участвует в выполнении функций, которые организм самостоятельно выполнять не может – утилизация ксенобиотиков, неперевариваемых компонентов пищи, участие в биосинтезе некоторых белков, ферментов и витаминов. Важной функцией кишечной микробиоты является регуляция устойчивости организма хозяина к инфекциям, вызываемым патогенными микроорганизмами и вирусами. Внешние неблагоприятные воздействия на микробиоту, такие как нарушение привычного режима питания, стресс, а также прием лекарственных препаратов – антибиотиков, противовоспалительных препаратов, химиотерапия приводят к нарушению природного баланса микробиоты. Эти изменения могут сопровождаться развитием метаболических расстройств, нарушениями функций желудочно-кишечного тракта, а также заболеваниями, связанными с нарушениями работы иммунной системы. Для восстановления микробного баланса применяют пробиотики. Наиболее распространенными являются пробиотики на основе молочнокислых микроорганизмов, так как кроме того, что они являются важной составной частью нормальной микробиоты человека и животных, молочнокислые бактерии колонизируют листья, плоды и семена растений, с их помощью получают сыры и другие молочнокислые продукты,

вино, сыровяленое мясо, кислую капусту и множество других ферментированных продуктов, широко распространенных во всем мире.

Исследования новых штаммов микроорганизмов, обладающих пробиотическими свойствами, в том числе индигенных штаммов человека, а также исследования, направленные на изучение особенностей уже известных пробиотических штаммов, являются актуальными и востребованными, так как их роль в поддержании здоровья человека огромна.

Таким образом, тема диссертационного исследования Цапиевой Анны Николаевны, посвященного изучению биологических свойств отдельных штаммов молочнокислых бактерий как перспективных пробиотиков, является важной и актуальной.

Научная новизна результатов исследования, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций

В ходе выполнения работы был разработан алгоритм создания персонифицированных пробиотических продуктов на основе лактобацилл и энтерококков, изолированных из кишечника человека, включающий микробиологический и генетический анализ перспективных штаммов.

С применением классических методов микробиологии и генетики был проанализирован микробный состав кисломолочных продуктов «Чакка» и «Мацони» и выделены новые штаммы лактобацилл, входящие в состав этих продуктов. Исследования адаптационных показателей исследуемых штаммов показали способность штаммов выживать при среды рН 2,5 и содержании желчи в среде 0,3%. Для всех штаммов молочнокислых микроорганизмов, выделенных из продуктов «Чакка», «Мацони» и пробиотиков, определен спектр антимикробной активности в отношении сорока тест-штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, включая стрептококки, стафилококки, клебсиеллы, псевдомонады.

Были созданы оригинальные ДНК праймеры для определения 12 видов лактобацилл, объединенные в три мультиплексные ПЦР, на основании которых

был разработан новый подход для видовой идентификации наиболее часто встречающихся в желудочно-кишечном тракте человека лактобацилл.

Впервые было проведено полногеномное секвенирование генома штамма *L.plantarum* 8P-A3, широко известного в нашей стране. В геноме штамма были обнаружены гены, кодирующие три антимикробных пептида - плантарицины EF и NC8, A, и определена структура локуса, на котором расположены плантарицины и другие гены, кодирующие белки, участвующие в их биосинтезе.

Практическая значимость исследования

Разработана технология получения персонафицированных пробиотиков - аутопробиотиков на основе собственных штаммов лактобацилл и энтерококков, включающая изучение генетических особенностей перспективных штаммов, которая позволяет в срок до 14 рабочих дней получить персональный пробиотик для коррекции дисбиотических состояний. Разработанный метод создания аутопробиотиков был внедрен в работу Кафедры терапии и клинической фармакологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова на базе Городской больницы №26 г. Санкт-Петербурга, а также был использован для выполнения поисковых научных исследований в рамках Государственного задания «Молекулярно-генетические и клеточные основы патогенеза, диагностики и лечения социально значимых заболеваний инфекционной и неинфекционной природы» (шифр: 0557-2016-0001).

На основе мультиплексной ПЦР разработан метод определения 12 видов лактобацилл с использованием ДНК праймеров, разработанных диссертантом. Новый метод представляет возможность в течение суток определить вид лактобацилл, выделенных из различных источников.

В результате проведенных исследований биологической активности штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из кисломолочных продуктов, были отобраны и запатентованы наиболее перспективные для практического применения штаммы - *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06.

В базу данных нуклеотидных последовательностей GenBank NCBI под номером CP046726 был внесен полногеномный сиквенс генома штамма *L. plantarum* 8P-A3.

В рабочую коллекцию микроорганизмов отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ» были депонированы 46 новых штаммов молочнокислых бактерий, выделенных в процессе выполнения работы.

Структура, оформление и содержание диссертации

Диссертация Цапиевой А.Н. построена традиционным образом, изложена на 108 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, 5 глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Диссертация иллюстрирована 21 таблицей и 20 рисунками. Список литературы включает 207 источников, в том числе 40 отечественных и 167 зарубежных авторов, что говорит о недостаточной степени освещенности проблемы в отечественной периодической литературе.

В разделе «Введение» автор кратко описывает актуальность и степень разработанности проблемы исследования пробиотических штаммов и создания новых пробиотиков. Также приводится цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, основные положения, выносимые на защиту, формулировки которых не вызывают замечаний.

Раздел «Методология и методы исследования» посвящен описанию материалов, методов и объектов исследования. В работе проведены исследования более 60 штаммов молочнокислых микроорганизмов, выделенных из кишечника человека и национальных заквасок; использованы 39 штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов из рабочей коллекции отдела молекулярной микробиологии Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Институт экспериментальной медицины». Работа с лабораторными животными проведена согласно разрешению Локального этического комитета согласно ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и

уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур». Микробиологические методы исследования тщательно описаны, имеются ссылки на научную литературу, все модификации известных методов имеют подробные разъяснения. В работе использованы современные молекулярно-генетические методы исследования, имеются ссылки на ведущие научные исследования и актуальные базы данных.

В первой главе работы приведен содержательный аналитический обзор мировой научной литературы, включающий ряд подразделов, отражающих современные представления о молочнокислых бактериях, применяемых в качестве пробиотиков, о современных методах их идентификации, описаны основные способы исследования биологической активности пробиотических бактерий и критерии изучения их безопасности. Тщательно выполненный аналитический обзор логично подводит к дальнейшим разделам собственных исследований и свидетельствует о высоком уровне знаний автора в этой области.

В главах 2-4, посвященных результатам собственных исследований, прослеживается последовательное решение поставленных задач, позволяющее углубиться в исследования биологических свойств изучаемых молочнокислых бактерий с использованием современных научных подходов.

Микробиологические исследования в первую очередь были направлены на анализ антимикробной активности исследуемых штаммов молочнокислых микроорганизмов относительно представителей условно-патогенной микробиоты, включая стрептококки, стафилококки, кишечную палочку и клебсиеллы, в результате которых были получены интересные данные об отдельных штаммах молочнокислых бактерий, способных подавлять рост представленных тест-культур условно-патогенных микроорганизмов. Так, был обнаружен штамм *L. fermentum* TS3-06, способный подавлять рост некоторых штаммов *S. pyogenes*, но ни одной из других представленных в работе тест-культур. Кроме того, были проведены исследования, направленные на анализ устойчивости исследуемых молочнокислых микроорганизмов к содержанию в питательной среде желчи и к способности штаммов выдерживать повышенную

кислотность среды, в результате которых была продемонстрирована способность всех исследуемых штаммов молочнокислых микроорганизмов, изолированных из молочнокислых продуктов, выживать при pH 2,5 и содержании желчи в среде до 0,6%. Такие показатели говорят о том, что все штаммы успешно адаптируются в условиях ЖКТ человека, где pH составляет 2,5-3, а содержание желчи составляет около 0,3%.

Молекулярно-генетические исследования включали видовую идентификацию исследуемых молочнокислых бактерий и анализ отдельных участков геномов исследуемых лактобацилл и энтерококков и были выполнены на высоком методическом уровне с использованием ДНК-праймеров, разработанных автором диссертации. Результатом проведенной работы явилось обнаружение генов нескольких антимикробных пептидов в геноме штамма *L. plantarum* 8P-A3, расположенных на впервые обнаруженном и детально проанализированном плантарициновом локусе размером более 17000 пар нуклеотидов, секвенированном автором диссертации методом Сенгера с последующим подтверждением строения локуса в результате полногеномного секвенирования генома штамма *L. plantarum* 8P-A3. Необходимо отметить важную разработку автора – метод идентификации лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР, позволяющей в течение суток определить 12 видов лактобацилл, выделенных из различных источников.

Изучение биологических свойств штаммов на модели лабораторных животных выступает в качестве логического завершения лабораторных исследований штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из пробиотических продуктов – национальной закваски и контрольных пробиотических препаратов. Анализ способности исследуемых микроорганизмов восстанавливать микробный баланс после индуцированного дисбиоза на модели лабораторных животных позволил выделить перспективные для практического применения *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06.

Глава 5 посвящена разработке метода получения аутопробиотиков – пробиотиков на основе собственных бактерий человека, предназначенных к

применению персонально для того человека, от которого ранее был выделен индивидуальный бактериальный штамм. Большое внимание в работе уделено исследованию безопасности штаммов собственной кишечной микробиоты, предлагаемых для использования в качестве аутопробиотиков, что является большим преимуществом описанного метода. Разработанный алгоритм получения аутопробиотиков включает как генетическую идентификацию выделенных индигенных бактерий, так и ПЦР анализ для создания заключения об отсутствии в бактериальном геноме выбранного штамма генов, кодирующих потенциальные факторы патогенности.

Глава 6 включает результаты исследования влияния пробиотиков и аутопробиотиков на самочувствие пациентов с синдромом раздраженного кишечника. Результаты исследования демонстрируют хорошую переносимость аутопробиотиков пациентами, улучшение самочувствия пациентов и отсутствие побочных эффектов.

Разделы «Обсуждение результатов» и «Заключение» содержат краткое описание, критическое осмысление и обобщение основных положений диссертации в контексте мировых научных данных, что позволяет положительно оценить вклад Цапиевой А.Н. в исследования свойств пробиотических микроорганизмов.

Достоверность и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов исследования и обоснованность сделанных автором выводов подтверждается достаточным объемом выборки исследованных штаммов молочнокислых микроорганизмов, а также большим объемом проведенных исследований с применением современных методов микробиологии и молекулярной генетики, которые характеризуются высокой специфичностью и чувствительностью. Изучено более 60 штаммов молочнокислых микроорганизмов, выделенных из различных источников. Применены современные методы обработки результатов с использованием баз данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и NIH Human Microbiome Project (<http://www.hmpdacc.org/>); использованы адекватные методы

статистической обработки данных. Доказательная база диссертации основана на фактических данных, полученных автором диссертации представленных в результатах собственных исследований, анализ которых позволил сформулировать выводы, изложенные в работе.

Полученные автором диссертации результаты широко представлены в открытой печати: по теме работы 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.

Соответствие специальности

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

Принципиальных замечаний по выполненной работе нет. В то же время автору следует объяснить почему для идентификации бактерий по 16S рРНК не использовали общепринятые праймеры, указать какие фрагменты гена были амплифицированы, какие геномы использовали в качестве референтных. Есть также вопросы по оценке клинической эффективности пробиотиков. К трактовке результатов необходимо подходить с осторожностью, поскольку исследование не было плацебо-контролируемым.

Заключение

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, которая содержит новое решение актуальной научной задачи – совершенствование комплексного анализа биологических свойств пробиотических бактерий, 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 медицинских наук, профессор,
заведующий отделом медицинской микробиологии и молекулярной
эпидемиологии Федерального государственного бюджетного
учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных
болезней федерального медико-биологического агентства»
г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.9.

тел.: +7-812-234-60-04

e-mail: sidorserg@yandex.ru



Сергей Владимирович Сидоренко



Подпись руки *С.В. Сидоренко*
Удостоверено *24.11.2020*
Зам. Нач. Отдела *Сидорова И.Е.*