



L. PASTEUR

Федеральное бюджетное учреждение науки
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ
им. ПАСТЕРА»

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека
(ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии
имени Пастера)

Мира ул., д. 14, Санкт-Петербург, 197101
Тел.: (812) 233-20-92. Факс: (812) 232-92-17
E-mail: pasteur@pasteurorg.ru
<http://pasteurorg.ru>

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор института
академик РАН,
д.м.н., профессор

Арег Артемович Тотолян



№ 866-22 от 25.11.2020 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической ценности диссертационной работы 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 избранной темы

Современный образ жизни человека характеризуется наличием целого комплекса факторов, оказывающих негативное воздействие на физическое и психоэмоциональное здоровье населения. Одним из важнейших факторов, опосредующих связь человека с внешней средой и оказывающих решающее влияние на здоровье, работоспособность, устойчивость организма человека к воздействию экологически вредных факторов производства и среды обитания, является питание.

В последние годы отмечается устойчивое снижение в рационе питания ряда продуктов, в частности молочных. В то же время увеличивается потребление рафинированных, высококалорийных, но бедных витаминами и минеральными веществами продуктов питания, продуктов, подвергнутых интенсивной

технологической обработке с использованием различных химических компонентов. В то же время отказ от веками сложившихся в культуре большинства народов традиций использования ферментированных продуктов, в том числе молочнокислых, способствует возникновению нарушений обменных процессов и адаптационных механизмов, что в свою очередь приводит к развитию различных хронических заболеваний (болезни Крона, гастрита, неспецифического язвенного колита, хронического энтерита и других).

Дополнительным фактором, приводящим к нарушению баланса в структуре микробиоты человека, является бесконтрольное использование антибиотиков, результатом которого является снижение устойчивости к кишечным инфекциям, аллергические реакции, а также заболевания нервной, эндокринной и сердечно-сосудистой систем. И только восстановление и поддержание оптимального баланса микробной флоры в просвете кишечника позволяет снизить реактивность местных факторов иммунитета, нормализовать процесс пищеварения и обменные процессы в целом. С этой целью с успехом могут быть использованы пробиотические штаммы микроорганизмов, в частности – лактобактерии.

В связи с вышеизложенным, диссертационная работа А.Н. Цапиевой, посвященная изучению биологических свойств молочнокислых бактерий как перспективных пробиотиков, является актуальной и необходимой.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В результате проведенной диссертационной работы автором разработаны новые подходы для создания индивидуальных пробиотиков на основе молочнокислых микроорганизмов родов *Lactobacillus* и *Enterococcus*, изолированных из кишечника человека (результаты защищены патентами).

Из двух национальных молочнокислых продуктов «Чакка» и «Мацони» автором выделены новые штаммы *E. faecium* L3 и *L. plantarum* 8P-A3, для которых показана антимикробная активность в отношении панели из сорока штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, включая стрептококки, стафилококки, клебсиеллы, псевдомонады.

Показана способность выделенных молочнокислых бактерий восстанавливать микробный баланс в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) крыс после применения антибиотиков.

Автором исследования разработан новый метод быстрой генетической идентификации лактобацилл, наиболее распространенных в разных отделах ЖКТ человека, путем определения видовой принадлежности лактобацилл на основе

мультиплексной ПЦР с использованием оригинальных видоспецифических ДНК праймеров.

Впервые выявлены гены, кодирующие бактериоцины - плантарицины EF и NC8, и феромон-плантарицин А в ДНК штамма *L. plantarum* 8P-A3, применяемого в России с 1973 года для создания фармакологических препаратов-пробиотиков.

Связь работы с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационное исследование осуществлялось в рамках темы плановой научно-исследовательской работы Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» «Изучение молекулярных механизмов инфекционных заболеваний стрептококковой природы; подходы к профилактике и терапии» (номер государственной регистрации 0120.0 803270).

Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов

Автором исследования разработан новый методологический подход изучения пробиотического потенциала и безопасности перспективных штаммов молочнокислых микроорганизмов на основании их биологических свойств. Предложенная технология получения аутопробиотических штаммов молочнокислых бактерий позволяет в срок от 5 до 14 рабочих дней получить персональный пробиотик для коррекции дисбиоза.

Разработанный метод видовой идентификации лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР позволяет идентифицировать штаммы в течение одного рабочего дня и может быть рекомендован для рутинного применения в лабораториях для изучения лактобацилл.

В результате проведенных исследований автором отобраны и предложены наиболее перспективные для практического применения штаммы молочнокислых бактерий *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 (патент РФ на изобретение № 2391395 от 10.06.2010, патент РФ на изобретение № 2391393 от 10.06.2010).

В базу данных GenBank NCBI автором задепонированы следующие нуклеотидные последовательности: CP046726 - полногемный сиквенс *L. plantarum* 8P-A3; HQ651181 - плантарициновый локус *L. plantarum* 8P-A3; EU346727 - участок кодирующий 16S рРНК *L. delbrueckii* TS1-06; EU346728 - участок кодирующий 16S рРНК *L. fermentum* TS3-06; GU299484 - участок кодирующий 16S рРНК *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LM1 - GenBank; GU299485 - участок кодирующий 16S рРНК *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Благодаря проведенной работе рабочая коллекция микроорганизмов отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ» пополнена 46 штаммами молочнокислых бактерий: *L. delbrueckii* TS1-06, *L. fermentum* TS3-06, *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* LM1, *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* LM2, три штамма *L. fermentum* (ПСРК-7, ПСРК-10, ПСРК-23), четыре штамма *L. delbrueckii* (ПСРК-13, ПСРК-16, ПСРК-17, ПСРК-19), пять штаммов *L. plantarum* (8P-A3, ПСРК-11, ПСРК-25 - ПСРК-27), два штамма *L. crispatus* (ПСРК-22, ПСРК-32), *L. reuteri* ПСРК-31, два штамма *L. helveticus* (ПСРК-4, ПСРК-8), двадцать пять штаммов *E. faecium* (ПСРК-50, ПСРК-51, ПСРК-53, ПСРК-57, ПСРК-58, ПСРК-60, ПСРК-61, ПСРК-65 - ПСРК-70, ПСРК-72 - ПСРК-74, ПСРК-76 - ПСРК-80, ПСРК-82 - ПСРК-85).

Разработанный автором метод создания аутопробиотиков применяется для проведения исследований сотрудниками Кафедры терапии и клинической фармакологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова на базе Городской больницы №26 г. Санкт-Петербурга (акт внедрения от 14.03.2019), а также 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) (акт внедрения от 15.02.2019).

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

Достоверность полученных результатов исследования и обоснованность сделанных автором выводов подтверждается большим количеством исследованных штаммов молочнокислых микроорганизмов (более 60 штаммов), большим объемом проведенных исследований с применением новейших методов микробиологии, в том числе молекулярной генетики. Полученные результаты обработаны с использованием баз данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и НИ Human Microbiome Project (<http://www.hmpdacc.org/>) и адекватных методов статистической обработки данных.

Полученные автором результаты исследований опубликованы в 33-х печатных работах: 6 публикаций в рецензируемых изданиях, 2 публикации в других изданиях, 5 патентов РФ на изобретения, 20 публикаций в материалах конференций.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Автором исследования отобраны в качестве наиболее перспективных для получения пробиотиков и аутопробиотиков 47 штаммов бактерий, относящихся к видам *E. faecium*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii subs. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. crispatus*, *L. helveticus*.

Разработан метод получения аутопробиотических молочнокислых заквасок на основе безопасных штаммов собственной кишечной микробиоты (родов *Enterococcus* и *Lactobacillus*).

Полученная двухкомпонентная закваска на основе *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 сертифицирована ООО «Авена» для использования в пищевых продуктах.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению

Диссертационная работы изложена на 108 страницах машинописного текста и иллюстрирована 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, состоящего из 207 источников, из которых 40 – отечественных, 167 – зарубежных авторов.

Недостатки в содержании и оформлении диссертации не выявлены.

Все поставленные автором задачи выполнены в полном объеме.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации.

Замечания к работе

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Работа заслуживает положительной оценки.

Заключение:

Диссертационная работа Цапиевой Анны Николаевны «Микробиологический и молекулярно-генетический анализ молочнокислых бактерий как перспективных пробиотиков» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, члена-корреспондента РАН, заведующего отделом молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») профессора Суворова Александра Николаевича, содержащей решение

актуальной научной задачи по совершенствованию методологических подходов при исследовании лактобактерий, их лабораторной диагностике и конструированию пробиотических препаратов, представленной к защите 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 присуждении 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 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «микробиология», а ее автор Цапиева Анна Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «микробиология».

Отзыв на диссертационную работу Цапиевой Анны Николаевны обсужден и одобрен на заседании проблемной комиссии отдела микробиологии Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 12 от 24.11.2020 года).

Заведующая лабораторией медицинской бактериологии Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197101, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14,
Тел. +7 (812) 233-20-92, факс +7 (812) 233-08-56
Сайт: <http://www.pasteurorg.ru/>, e.mail: pasteur@pasteurorg.ru

доктор медицинских наук

Краева Людмила Александровна

Подпись д.м.н. Красовой Л.А. заверяю:

Ученый секретарь ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

кандидат медицинских наук



Трифонова Галина Федоровна