

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Корнеевой Ольги Сергеевны на диссертационную работу **Евдокимовой Светланы Александровны** «Метод конструирования синбиотических композиций направленного действия для подавления роста патогенов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы диссертации.

Диссертационная работа Евдокимовой С.А посвящена разработке метода исследования пребиотиков и конструирования синбиотических композиций, основанного на математической модели ингибирования роста патогена при совместном росте с пробиотиком, и ее проверке на модели кишечника *in vitro*.

К проблеме создания новых функциональных продуктов питания обращено внимание многих специалистов пищевой промышленности, медицины и других сфер деятельности. По данным ФИЦ питания и биотехнологии, в России наблюдается ухудшение состояния здоровья всех категорий населения, что в первую очередь связано со снижением иммунитета и изменением полезной микробиоты желудочно-кишечного тракта человека, а также изменением углеводного и липидного обмена. Для профилактики и лечения дисбиозов многие годы применяются такие компоненты функционального питания, как пробиотики, пребиотики и синбиотики. Причем эффективность синбиотической композиции, как правило, выше, чем суммарная эффективность ее компонентов (пробиотических бактерий и пребиотических субстратов), что обусловлено взаимным усилением друг друга. Положительное воздействие синбиотиков на микробиоту кишечника может проявляться через нормализацию качественного и количественного состава микробиоты, препятствие закреплению на кишечном эпителии и ингибирование роста патогенов, повышение проницаемости кишечника, стимуляция продуцирования кишечными бактериями полезных метаболитов и многое другое. Одним из значимых механизмов действия синбиотиков является их способность к подавлению роста или активности патогенных микроорганизмов, которая может быть описана количественно, с помощью констант ингибирования. В связи с высокой стоимостью, продолжительностью и этическими требованиями на этапе проверки эффективности *in vivo* на людях, представляется необходимой разработка быстрого и надежного метода сравнения синбиотиков *in vitro* на ранних этапах разработки, что является актуальной задачей.

Научная новизна работы выражается в том, что диссертантом предложен новый подход к оценке *in vitro* эффективности синбиотиков, основанный на математической модели ингибирования роста патогенов метаболитами пробиотиков в присутствии пребиотика. Предложен новый количественный критерий определения активности синбиотиков – синбиотический фактор. Евдокимовой С.А. установлены количественные взаимосвязи между начальными численностями пробиотика и тест-штамма и конечной численностью последнего при совместном культивировании в среде с различными пребиотиками с применением методологии активного эксперимента, а также проведена проверка полученных данных в ходе одностадийной непрерывной ферментации. Впервые проведено сравнение влияния микробного контаминанта на биоценоз кишечника на фоне

предварительного введения пробиотика с применением функциональной трехстадийной непрерывной *in vitro* модели толстого кишечника. Установлено, что математическая модель, основанная на константах ингибирования органическими кислотами, продуцируемыми пробиотиком, описывает подавление роста тест-штамма с приемлемой точностью.

Практическая значимость работы заключается в разработке метода оценки эффективности синбиотических композиций, позволяющего выявить комбинацию пробиотика и пребиотика с максимальным воздействием на рост тест-штамма, с возможностью его использования для сравнения большого количества комбинаций. Указанные метод и критерий применены для обоснования оптимального состава при конструировании синбиотической композиции на основе бифидобактерий и фруктанов, выделенных из растительного сырья.

К наиболее значимому из практических результатов следует отнести возможность применения разработанных моделей, в том числе, модели, приближенной к условиям кишечника, конструирования синбиотических композиций на основе других штаммов пробиотиков и пребиотических веществ. Использование математического аппарата для прогнозирования эффективности действия синбиотических композиций позволит сократить время, требующееся на их разработку, оценку и внедрение в практику.

Достоверность представленных результатов и обоснованность выводов, сделанных на их основе, подтверждается большим объемом изученной литературы по теме диссертации, глубоким и тщательным анализом значительного массива экспериментальных данных, включающем их статистическую обработку, использованием современных методов и оборудования при выполнении поставленных задач. Использование математического моделирования представляется перспективным подходом для описания взаимодействия различных микроорганизмов в сложном микробном сообществе кишечника. Коммерческий потенциал работы обоснован представленным актом апробации результатов исследований.

Полученные результаты, разработанный метод и предложенный количественный критерий могут быть применены на ранних этапах *in vitro* разработки важных функциональных продуктов питания, для снижения затрат на наиболее сложном этапе – исследованиях на людях. Кроме того, представленный в диссертации подход может способствовать появлению на рынке синбиотиков направленного действия, для профилактики и лечения заболеваний ЖКТ, вызванных микробными патогенами, что, в конечном итоге, может способствовать снижению потребления антибиотиков среди населения.

Краткая характеристика основного содержания диссертации. Диссертационная работа Евдокимовой С.А. построена по традиционной схеме и включает следующие разделы: список используемых сокращений, введение, обзор литературы, использованные в работе материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, выводы, список опубликованных работ по теме диссертации, список цитируемой литературы и приложения. Диссертация изложена на 276 страницах, содержит 56 рисунков, 22 таблицы, 10 приложений; список литературы включает 320 источников, что подразумевает большой объем информации, полученной диссертантом при подготовке работы.

Во введении диссертации Евдокимовой С.А. изложено обоснование актуальности темы диссертации и информация о ранее выполненных исследованиях в этой области. сформулированы цель и задачи работы, отражена новизна и практическая значимость, приведены основные положения, выносимые на защиту, обоснованы достоверность результатов и соответствие диссертации паспорту научной специальности ВАК – 1.5.6. Биотехнология, представлены данные об апробации работы.

В литературном обзоре автором представлены общие сведения о микробиоте толстого кишечника человека: состав и факторы, на него влияющие, взаимодействие различных членов микробиоты между собой, роль микробного сообщества в жизнедеятельности макроорганизма хозяина. Особое внимание уделено дисбактериозам и их негативным последствиям для человека, что обосновывает логический переход к способам модуляции микробиоты кишечника: применению пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков. В последнем разделе литературного обзора автор описывает современные подходы к исследованию влияния функциональных продуктов питания на микробное сообщество кишечника. Рассмотрены методы исследования как *in vivo*, так и *in vitro*, в частности, большое внимание уделено функциональным *in vitro* моделям кишечника, как наиболее оптимальному способу исследования. Завершается литературный обзор логическим обоснованием необходимости разработки именно *in vitro* метода оценки эффективности синбиотиков, что ещё раз подтверждает актуальность темы диссертационной работы.

Во второй главе Евдокимовой С.А. описаны материалы и методы, использованные при выполнении диссертационной работы. В первую очередь приведены микробные объекты исследования – пробиотические штаммы бифидобактерий и тест-штаммы, растительное сырье для получения пребиотических субстратов и коммерческие пребиотики. Следует отметить большое количество разнообразных методов: микробиологических, биохимических, физико-химических и математических, в том числе современные и общепризнанные методы ВЭЖХ, капиллярный электрофорез, ПЦР, ЯМР-спектроскопию и другие. Подробно описаны методика выделения и очистки пребиотических фруктанов из растительного сырья, различные способы культивирования микроорганизмов. Множество математических методов анализа обуславливает ответственный и тщательный подход к обработке экспериментальных данных, что подчеркивает достоверность полученных результатов.

Глава «Результаты и обсуждение» разделена на 8 подразделов и отражает постепенное усложнение экспериментов с приближением условий культивирования к реальному кишечнику человека, с разработкой математической модели на каждом из этапов. В первую очередь описаны эксперименты по совместному и раздельному периодическому культивированию бифидобактерий и тест-штаммов в анаэробных условиях в среде с пребиотиком или глюкозой. Представленные исследования показали, что наличие пребиотика в среде незначительно влияет на удельные скорости роста пробиотика, но может повышать продуцирование органических кислот, подавляющих рост тест-штамма. Диссертантом показано, что для различных пребиотиках ингибирование роста тест-штамма и продуцирование ингибирующих метаболитов бифидобактериями сильно различается, что говорит о специфичности каждой синбиотической композиции. В соответствии с полученными экспериментально и

литературными данными были разработаны два варианта математических моделей для описания совместного роста пробиотика и тест-штамма в среде с пребиотиком: Ki- и MIC-модель.

На основании моделей диссертантом предложен критерий оценки эффективности синбиотиков – синбиотический фактор, рассчитываемый по данным совместного периодического 10-ти часового культивирования пробиотика и тест-штамма в среде с пребиотиком. Далее рассмотрено применение предложенного подхода и критерия для исследования и сравнения эффективности синбиотических композиций бифидобактерий с коммерческими пребиотиками и фруктанами, выделенными из растительного сырья, для подавления роста нескольких тест-штаммов. В результате экспериментов, проведенных по методике активного эксперимента, были получены количественные меры воздействия нескольких факторов на эффективность синбиотика: начальных количеств пробиотика и тест-штамма и степени полимеризации пребиотических фруктанов.

Дальнейшие эксперименты по непрерывному со- или моно-культивированию пробиотика и тест-штамма в упрощенной (одностадийной) функциональной модели кишечника в среде с пребиотиком или глюкозой в различных концентрациях позволили диссертанту сделать вывод о влиянии концентрации пребиотика за счет стимулирования синтеза кислот-ингибиторов пробиотиком на ключевые параметры роста тест-штамма: время наступления динамического равновесия, скорость роста и длительность лаг-фазы. Была предложена система уравнений для математического описания динамики численности тест-штамма с учетом предложенной ранее Ki-модели. Данная модель показала высокую точность прогноза численности тест-штамма в ферментере, имитирующем нисходящий отдел толстого кишечника (10 и 11 %).

Наконец, последние подразделы посвящены культивированию пробиотика и тест-штамма в трехстадийной функциональной модели кишечника, которая представляла собой систему из трех последовательно соединенных реакторов, различающихся рН и кратностью замены среды, что соответствует восходящему, поперечному и нисходящему отделам толстого кишечника. В данном случае совместный рост тест-штамма с введением пробиотика или без последнего исследовали на фоне фекальной культуры человека, моделирующей реальную микробиоту, с ежедневным введением суточной дозы пребиотика. Полученные результаты полезны для понимания механизмов взаимодействия популяций и установления количественных критериев этих взаимодействий.

Выводы, представленные в работе, полностью соответствуют поставленным задачам и отражают основные закономерности, выявленные в результате эксперимента. Полученные результаты и сделанные на их основе выводы имеют большое значения для развития технологий функционального питания и борьбы с кишечными патогенами.

В целом, работа Евдокимовой С.А. оставляет положительное впечатление. Диссертантом представлен существенный массив экспериментальных данных, полученный в ходе тщательно спланированных, логически связанных экспериментов, должным образом обработанный с применением современных методов математического анализа и статистической обработки.

По диссертационной работе Евдокимовой С.А. возникли следующие вопросы и замечания.

1. Образование агломератов бифидобактериями, которое, как указано в диссертации, вызывало расхождения между фактической и полученной при культивировании микроорганизмов численностью бактерий, было рассмотрено при одностадийном непрерывном культивировании, однако, при периодическом культивировании данные об агломерации отсутствуют.
2. При проверке математических моделей в периодических условиях показано, что для некоторых комбинаций пробиотика, пребиотика и тест-штамма точность прогноза Ki-модели была выше, чем у MIC-модели, а для некоторых – наоборот. Хотелось бы услышать объяснение этому и понять, что является критерием выбора той или иной модели?
3. Не понятно, относятся ли использованные в работе тест-штаммы к патогенам и какие условия поддерживали при работе с ними.

Указанные замечания, однако, не снижают высокой ценности диссертационной работы и носят дискуссионный характер.

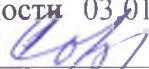
По материалам диссертации опубликовано 22 работы, в том числе 10 публикаций в журналах, индексируемых международной системой SCOPUS и Web of Science, 1 публикация в журнале, рекомендованном к изданию ВАК, и получен 1 патент и 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ. Результаты работы широко представлены на отечественных и международных конференциях. Опубликованные диссертантом материалы и автореферат отражают содержание работы.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности ВАК 1.5.6 - Биотехнология по п. 3 (в части: создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения), п. 8 (в части: разработка научно-методических основ для применения стандартных биосистем на молекулярном, клеточном, тканевом и организменных уровнях в научных исследованиях, контроле качества и оценки безопасности использования пищевых биопрепаратов).

Диссертационная работа Евдокимовой С.А «Метод конструирования синбиотических композиций направленного действия для подавления роста патогенов» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных диссертантом исследований в области биотехнологии содержится решение научных и практических задач по получению новых, эффективных продуктов функционального питания на основе комбинаций пробиотика и пребиотика, а также по сравнению эффективности уже существующих синбиотиков. Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию процессов модуляции микробиоты кишечника, контаминации кишечными патогенами, а математическое моделирование может снизить количество трудоемких, продолжительных и, зачастую, дорогостоящих исследований, что свидетельствует о практической значимости работы.

Диссертационная работа по актуальности, научной новизне и практической значимости соответствует требованиям ВАК РФ п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, № 1168 от 01.10.2018), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Евдокимова Светлана Александровна заслуживает

присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент – врио проректора по научной и инновационной деятельности, заведующий кафедрой биохимии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий», доктор биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия, профессор по кафедре микробиологии и биохимии  **Корнеева Ольга Сергеевна**

Тел.: 8 (473)255-37-16

e-mail: korneeva-olgas@yandex.ru

394036, Россия, г. Воронеж,

проспект Революции, д. 19

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

