

## 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 пробиотиков 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 (однотадийной) 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-olga@yandex.ru

394036, Россия, г. Воронеж,

проспект Революции, д. 19

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

