

## УТВЕРЖДАЮ

проректор по научной  
и исследовательской работе  
ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский  
федеральный университет»,  
кандидат физико-математических наук,



А.А. Алиханов

2024 г.

## ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет» (СКФУ) на диссертационную работу Евдокимовой Светланы Александровны на тему «Метод конструирования синбиотических композиций направленного действия для подавления роста патогенов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология в диссертационный совет 99.0.027.03 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

**Актуальность работы.** Для поддержания микробиоценоза человека в эффективном состоянии широко используются такие приемы, как использование пробиотиков, и пребиотиков. Клиническая эффективность пробиотиков и пребиотиков определяется их совокупным действием как на механизмы формирования иммунологической толерантности, так и на процессы воспаления в кишечнике и проницаемость кишечной стенки. Синбиотики, комбинация пробиотиков и пребиотиков, обычно используются в составе препаратов (БАД) или продуктов.

Несмотря на большой интерес научного сообщества к про- и пребиотикам, методы оценки эффективности их действия *in vitro* в настоящее время далеки от совершенства, что приводит к необходимости проведения длительных и дорогостоящих клинических исследований. Также остается

нерешенной проблема индивидуального подбора препаратов, связанная с тем, что кишечный микробиом у каждого человека индивидуален, а современные методы оценки состава кишечной микробиоты не применяются широко. Это обуславливает необходимость стандартизации подхода к оценке эффективности синбиотиков на этапе *in vitro*, для сокращения экономических и временных затрат на последних, наиболее сложных, этапах проверки *in vivo*.

Учитывая вышеизложенное, диссертационная работа Евдокимовой С.А., направленная на разработку метода оценки эффективности синбиотиков *in vitro*, является актуальной и своевременной.

**Достоверность, полнота опубликования и апробирования основных положений и результатов диссертации, полученных автором,** подтверждается значительным объемом выполненных экспериментальных исследований с использованием современных методов анализа, математической и статистической обработкой данных с применением компьютерных программ.

Основные научные результаты и положения диссертационной работы опубликованы в 22 печатных работах, в т.ч. 1 статья в журнале, рекомендуемом ВАК РФ, и 10 в изданиях, индексируемых Web of Science и Scopus. Основные результаты работы представлены на международных и всероссийских конференциях: на XVI и XVII Всероссийских конференциях молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием "ПИЩЕВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ" (Казань, 2019, 2021); на II Школе молодых ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний» (Москва, 2019), на XXXIII Международной конференции молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2019» (Москва, 2019), на 18th, 19th, 20th и 21th International Multidisciplinary Scientific GeoConference (Албена, Болгария, 2018, 2019, 2020 и 2021), 33rd European Federation of Food Science and Technology (EFFoST) International Conference (Роттердам, Нидерланды, 2019).

**Новизна, теоретическая и практическая значимость исследований.**

Предложен подход и создана математическая модель, описывающая ингибирование роста тест-штамма метаболитами пробиотика, из которой был выведен количественный критерий эффективности синбиотиков. Установленные закономерности являются теоретической основой для конструирования синбиотических композиций. Исследовано влияние и 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. Разработана математическая модель, позволяющая установить количественные параметры воздействия на тест-штамм через константы ингибирования при совместном культивировании с пробиотиком по схеме одностадийной непрерывной ферментации. Впервые проведено сравнение влияния микробного контаминанта на биоценоз кишечника на фоне предварительного введения пробиотика с применением трехстадийной непрерывной *in vitro* модели толстого кишечника. Установлено, что математическая модель, основанная на константах ингибирования органическими кислотами, описывает подавление роста тест-штамма с приемлемой точностью.

На основании комплексного решения проблем на всех этапах исследования Евдокимовой С.А. удалось разработать, по сути, новый принцип комбинирования синбиотиков направленного действия для борьбы с контаминантами кишечника и получить новый продукт высокой эффективности по качественным показателям соответствующий требованиям современной фармакопеи (Патент РФ № 2782196).

Полученные результаты были использованы для создания Программно-алгоритмического обеспечения для нейросетевого моделирования микробиологических процессов, что отражено в авторском свидетельстве программ для ЭВМ № 2021668003. Данные модели могут быть применены для исследования процессов колонизации микробного сообщества микроорганизмами–симбионтами, а также его контаминации патогенами.

Данные исследований могут быть применены при разработке новых синбиотиков, а предложенные в работе методы и подходы – в биосинтетических процессах производства других высоковольтных препаратов. Предложенный количественный критерий эффективности синбиотиков может стать основой для нового способа классификации данных функциональных продуктов и стать дополнительным фактором для назначения конкретных синбиотиков при дисбактериозах, вызванных пищевыми контаминантами и кишечными патогенами. Синбиотики направленного действия могут способствовать снижению применения антибиотиков, что является общемировой глобальной проблемой.

Диссертационная работа выполнена в рамках реализации проекта, поддержанного РФФИ (грант № 17-79-20365).

#### **Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом.**

Диссертационная работа Евдокимовой С.А. изложена на 276 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы исследования, результатов и их обсуждения, выводов, списка сокращений, списка цитированной литературы, который включает 320 источников (из них 275 иностранных), списка работ, опубликованных по теме работы и приложений. Диссертация содержит 22 таблицы, 56 рисунков, 10 приложений.

**Во введении** обоснована актуальность темы исследования и степень ее разработанности, приведены цель и задачи, научная новизна работы и ее практическая значимость, приведены основные положения, выносимые на защиту, достоверность результатов, апробация работы и соответствие паспорту научной специальности ВАК.

**Обзор литературы** включает 3 раздела, в которых приведены основные сведения о микробиоте кишечника человека, способах ее модуляции и методах исследования воздействия функциональных продуктов на микробиоту.

**Во второй главе** описаны материалы и методы, использованные в работе. Следует отметить большое количество и разнообразие методик.

Описаны современные микробиологические, молекулярно-биологические, аналитические, физико-химические, биотехнологические и математические методы, в том числе ВЭЖХ, ПЦР, ЯМР, различные способы культивирования, математическое моделирование и статистическая обработка.

**В третьей главе** приводятся результаты проведенных исследований и их обсуждение. Глава разделена на 8 подразделов, в которых описаны эксперименты с последовательным приближением условий проведения к реальному кишечному микробиоценозу. В первую очередь приведены результаты по совместному и индивидуальному культивированию пробиотиков и тест-штаммов, описаны выявленные закономерности, на основании которых далее разработаны две модели для описания совместного роста пробиотика и тест-штамма в присутствии пребиотика при ингибировании роста тест-штамма метаболитами пробиотика – молочной и уксусной кислотами. Основными константами моделей являются константы ингибирования или минимальные ингибирующие концентрации (МИК). На основании полученных моделей был предложен количественный критерий оценки эффективности синбиотика – синбиотический фактор. Последующие исследования были посвящены применению разработанных моделей и фактора для оценки эффективности нескольких комбинаций пробиотика, тест-штамма и пребиотика (как коммерческих субстратов, так и выделенных из растительного сырья). Обнаружены комбинации с наибольшим антагонизмом в отношении тест-штамма, сделан вывод о специфичности каждой синбиотической композиции и влиянии на эффективность таких факторов, как начальные численности пробиотика и тест-штамма. Для установления количественных взаимосвязей между указанными факторами и эффективностью синбиотических композиций были проведены эксперименты по схеме ротatableльного центрального композиционного плана (РЦКП). Результаты показали, в основном, что наибольший антагонизм в отношении тест-штаммов проявляют композиции при наибольшем количестве бифидобактерий, наибольшей средней степени полимеризации фруктанов

растительного сырья, наименьшей начальной численности тест-штамма. Следующая группа экспериментов была проведена в условиях упрощенной функциональной модели, при непрерывном культивировании совместно или по-отдельности *Bifidobacterium adolescentis* и *Bacillus cereus* в условиях, моделирующих нисходящий отдел толстого кишечника человека, с пребиотиком (олигофруктозой) или глюкозой. Показано, что концентрация пребиотика влияла на ключевые параметры роста тест-штамма: время наступления динамического равновесия, скорость роста и длительность лаг-фазы за счет стимулирования синтеза кислот-ингибиторов пребиотиком. На основании полученных данных математическая модель была модифицирована для описания роста тест-штамма при непрерывном со-культивировании. Средние значения относительных ошибок между экспериментальными и рассчитанными значениями численностей бактерий колеблются от 0,74 до 2,78 %, что подразумевает высокую прогностическую ценность модели. Были спрогнозированы как длительность фазы задержки роста, так и скорость на стадии активного роста. Далее было исследовано воздействие *Bac. cereus* на фекальную микробиоту в непрерывной трехстадийной функциональной модели кишечника в присутствии синбиотика или пребиотика, а также на фоне предварительного внесения в систему *Bif. adolescentis*, влияния на микробное сообщество контаминанта *Bac. cereus*. В последних разделах главы «Результаты и обсуждение» представлен материал по математическому моделированию роста *Bacillus cereus* при непрерывном культивировании в системе TSC на фоне и без предварительного внесения пребиотика и эффективности применения разработанного метода в лабораторных условиях.

Завершается диссертационное исследование выводами, которые полностью отражают полученные Евдокимовой С.А. результаты и соответствуют целям и задачам диссертационной работы. Эксперименты проводили в трех-пятикратной повторности, и их достоверность не вызывает сомнения.

Автореферат изложен на 19 страницах и полностью соответствует содержанию самой диссертации. Выводы в автореферате и диссертации идентичны. По содержанию, объему и структуре соответствует установленным требованиям. Личный вклад автора подробно описан в автореферате.

**Замечания и рекомендации.** Наряду с отмеченными выше положительными сторонами диссертационной работы, научной и практической значимостью, в порядке дискуссии необходимо отметить следующие замечания и пожелания:

1. В заключительной части главы 1 целесообразно было сформулировать общие выводы по результатам анализа литературы.

2. В разделе 3.1 диссертации требует пояснения выбор продолжительности совместного культивирования *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 и тест-штаммов *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

3. При изучении закономерностей совместного культивирования бифидобактерий, являющихся умеренными ацидофилами, и тест-штаммов (рисунки 18, 19 диссертации) необходимо было обосновать выбор начальных значений pH среды на уровне 7,0,

4. В таблицах 10, 11, 12, 13 диссертации вызывает сомнение корректность использования терминов «начальная численность пробиотика», «начальная численность бацилл», «конечная численность бацилл», «начальная численность сальмонелл», «конечная численность сальмонелл» применительно к параметрам, имеющим размерность концентрации – lg(КОЕ/мл).

5. Графические зависимости, описывающие кинетику накопления молочной и уксусной кислот при одностадийном непрерывном культивировании *Bifidobacterium adolescentis* (рисунки 36, 37) целесообразно было дополнить уравнениями регрессии с указанием достоверности аппроксимации.

Высказанные замечания не являются принципиальными, носят рекомендательный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации и не снижают общую положительную оценку работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Евдокимовой Светланы Александровны «Метод конструирования синбиотических композиций направленного действия для подавления роста патогенов» является законченной научно-квалификационной работой, в которой изложены новые научно-обоснованные принципы конструирования синбиотиков для борьбы с микробными контаминантами пищи и кишечными патогенами, что вносит значительный вклад в исследование, разработку и оценку эффективности функциональных продуктов питания. Это логичное, системно взаимосвязанное, целостное исследование, выполненное на высоком научном уровне с применением современных методов исследования. Научные положения и выводы, сформулированные автором, теоретически и экспериментально обоснованы, оригинальны, достоверны, обладают научной новизной и практической значимостью.

Диссертационная работа Евдокимовой Светланы Александровны «Метод конструирования синбиотических композиций направленного действия для подавления роста патогенов» соответствует требованиям п.п. 9-11, 13 и 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в текущей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Автор, Евдокимова Светлана Александровна, заслуживает присуждения ей степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Отзыв подготовлен Евдокимовым Иваном Алексеевичем, заведующим базовой кафедрой технологии молока и молочных продуктов, доктором технических наук, профессором, членом-корреспондентом РАН.



Отзыв рассмотрен и утвержден на расширенном заседании кафедры прикладной биотехнологии факультета пищевой инженерии и биотехнологий, протокол № 8 от 05.02.2024 года.

Присутствовало на заседании 16 чел. В обсуждении приняло участие 3 чел. Результаты голосования: «за» – 16 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет.

Заведующий кафедрой прикладной биотехнологии факультета пищевой инженерии и биотехнологий доктор технических наук, доцент



Горбачев Алексей Дмитриевич

Контактные данные:

ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»

355017, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1

[www.ncfu.ru](http://www.ncfu.ru) тел.: 8(8652)95-68-08