

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу **Веселовского Владимира Александровича**
**«Влияние цитокинов человека на комменсальные микроорганизмы на
примере лактобацилл и бифидобактерий»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.7. — генетика

Актуальность темы исследования

Микробиом играет решающую роль в обучении и развитии основных компонентов врожденной и адаптивной иммунной системы хозяина. В то же время, эта иммунная система управляет ключевыми особенностями взаимодействия хозяина и его микрофлоры. Представители нормальной микрофлоры кишечника, бифидобактерии и лактобациллы, обладают ярко выраженными иммуномодулирующими свойствами и способны инициировать воспалительный процесс в ответ на присутствие патогенов, стимулируя выработку как противовоспалительных, так и провоспалительных цитокинов, а также других факторов иммунного ответа в клетках организма-хозяина.

Воспалительные механизмы иммунной системы хозяина, направленные на борьбу с патогенными микроорганизмами, нацелены, как правило, на мишени, присутствующие как у патогенных микроорганизмов, так и у полезных кишечных бактерий. Удивительно, что при этом состав нормальной кишечной микрофлоры может оставаться стабильным в течение многих лет, что демонстрирует высокую устойчивость этих микроорганизмов к факторам иммунной системы. Изучение и понимание механизмов, обеспечивающих выживание и адаптацию комменсальных микроорганизмов в условиях воспалительного процесса, а также основ постоянства состава микробиоты кишечника, позволит лучше понять механизмы взаимодействия организма хозяина и микробиоты. В перспективе это позволит отбирать наиболее подходящие штаммы для применения в клинической практике, осуществлять рациональное моделирование их свойств. Поэтому целью исследований данной диссертационной работы было изучение механизмов адаптации бифидобактерий и лактобацилл к воздействию цитокинов как факторов иммунного ответа на примере *Bifidobacterium longum* и *Lactobacillus rhamnosus*.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Веселовского В. А. изложена на **156** страницах машинописного текста и включает разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», «Приложения» и «Благодарности». Диссертация содержит **6** таблиц, **18** рисунков, **9** приложений. Список цитируемых литературных источников включает **207** наименований.

Во введении диссертант обосновывает актуальность проведенного исследования, определяет цели и задачи, научную новизну и практическое значение работы.

В обзоре литературы представлены современные научные данные по теме диссертации. Он содержит информацию о микробиоте кишечника человека и ее влиянии на иммунную систему хозяина; об основных компонентах кишечной иммунной системы; об адаптации кишечной микробиоты к факторам иммунного ответа; о методах транскриптомных исследований и их результатах, полученных для бифидобактерий и лактобацилл.

В разделе «Материалы и методы» описаны используемые в исследовании объекты, а также примененные в экспериментальной работе методы.

Разделы диссертационной работы «Результаты» и «Обсуждение» содержат, соответственно, результаты проведенных экспериментов и их анализ.

В этих разделах представлены данные по изучению влияния провоспалительных (TNF α , IL-6, IL-8) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов человека на рост культур бифидобактерии *Bifidobacterium longum subsp. longum* GT15 (далее *B. longum* GT15) и лактобациллы *Lactobacillus rhamnosus* K32, а также на транскрипционный профиль клеток этих представителей комменсальных бактерий. В результате исследования выявлен целый ряд дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), представлена их функциональная аннотация, изучена транскрипционная организация и выявлены эволюционно-стабильные группы генов.

Обнаружено, что у штамма *B. longum* GT15 профиль экспрессии генов меняется в зависимости от фазы роста культуры. Так, в экспоненциальной фазе роста активируются гены, отвечающие за синтез аминокислот, энергетический метаболизм, а также гены, участвующие в трансляции, а в стационарной фазе – гены, связанные с защитными функциями.

Исследование влияния цитокинов IL-6 и IL-8 на рост штамма *B. longum* GT15 и IL-10, TNF α , IL-6 и IL-8, на рост штамма *L. rhamnosus* K32 не выявило статистически достоверного изменения роста культур во всех случаях, кроме роста штамма *B. longum* GT15 в присутствии 0,1 нг/мл IL-6.

В работе представлены данные, указывающие на влияние провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF α на экспрессионный профиль штамма *B. longum* GT15, а также влияние цитокинов TNF α , IL-8 и IL-10 на экспрессионный профиль штамма *L. rhamnosus* K32. Для штамма *L. rhamnosus* K32 было также показано, что влияние цитокинов на уровень экспрессии отдельных генов группы ДЭГ не является дозозависимым.

Транскриптомный анализ и филогенетическое профилирование выявили, что в присутствии цитокинов IL-10 и TNF α в клетках штаммов *L. rhamnosus* K32 и *B. longum* GT15, соответственно, увеличивается экспрессия генов, вовлеченных в углеводный обмен и транспорт сахаров в клетку. Путем идентификации точек старта транскрипции в штамме *B. longum* GT15 было выявлено 38 оперонов,

экспрессия которых возрастает под воздействием TNF α , и функция большинства из них связана с транспортом и метаболизмом сахаров.

В «Заключении» кратко подведены итоги проведенных исследований.

В разделе «Выводы» сформулировано пять выводов, отражающих основные результаты работы, ее значимость и новизну.

Степень достоверности результатов и обоснованности выводов, сделанных автором, научная новизна и практическая значимость исследования

Исследования данной диссертационной работы выполнены с использованием комбинации современных микробиологических, молекулярно-генетических, биоинформационных методологических подходов *in vivo*, *in vitro* и *in silico*. Проведена стандартная статистическая обработка полученных данных. Представленный в диссертационной работе экспериментальный материал не вызывает сомнений в достоверности. Он представляет научный и практический интерес и может служить основой для проведения дальнейших исследований.

Так, полученный автором большой массив данных по влиянию различных цитокинов человека на профили транскрипции генов у *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32 может служить хорошей базой для дальнейшего изучения взаимодействия комменсальных микроорганизмов и их хозяина. Он позволяет расширить фундаментальные знания о молекулярных механизмах выживания комменсальных бактерий в организме-хозяине даже в неблагоприятных условиях воспалительного процесса. На практике данные результаты могут быть использованы для подбора и рационального конструирования комменсальных бактерий в целях поддержания здоровья человека и лечения различных заболеваний, например, заболеваний кишечника, сопряженных с воспалительным процессом.

Результаты и выводы диссертационной работы Веселовского В.А. полностью отражены в 7-ми научных публикациях, в том числе в 3-х статьях в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований.

Замечания и вопросы

Несмотря на общую положительную оценку работы, необходимо сделать некоторые замечания, которые в большинстве своем носят рекомендательный характер и не снижают значимость и достоверность рассматриваемой работы Веселовского В. А.

Хотя в целом диссертационная работа изложена понятным языком, не обошлось все же без недостатков: неточностей, грамматических ошибок, неопределенности в формулировках и т.д. Так, в первом выводе из работы не уточняется, к какому штамму относится данный вывод; раздел «Методология и методы исследования» автореферата не отвечает содержанию диссертационной работы и отличается от соответствующего раздела полного текста диссертации.

Подпись к рисунку 10 диссертации не соответствует легенде рисунка и отличается от подписи к соответствующему рисунку (рисунок 3) в автореферате. Встречаются также многочисленные несогласования слов, пропуски предлогов, в некоторых случаях нарушены правила написания в тексте названий микроорганизмов и т.д.

Хотелось бы услышать ответы на вопросы, которые остались непонятны из текста диссертации:

1. Автор диссертационной работы предполагает, что добавленные в среду культивирования цитокины действуют, связываясь с «рецептороподобными структурами клеток» бактерий. Даже если предположить, что у лактобацилл и бифидобактерий есть структуры, подобные эукариотическим высокоаффинным мембранным рецепторам цитокинов, то хорошо было бы хотя бы обсудить в работе, что может служить непосредственным сигналом для разнонаправленного изменения экспрессии целого ряда генов и оперонов в бактериальной клетке в ответ на связывание цитокинов с такого рода рецептороподобными структурами. Есть ли у автора работы какие-то мысли на этот счет?

2. Почему для исследований были выбраны концентрации цитокинов 0,1; 1 и 10 нг/мл? Насколько мне известно, их концентрации в организме человека в тысячу раз меньше (порядок пг/мг).

3. Вопрос по влиянию IL-6 на рост *B. longum* GT15 (Рис. 7 диссертации). Почему именно низкая концентрация этого интерлейкина (0,1 нг/мл) приводила к снижению оптической плотности культуры, тогда как его более высокие концентрации эффекта на рост не оказывали?

4. Вопрос по влиянию различных концентраций цитокинов на экспрессию генов *L. rhamnosus* K32 (Таблица 5 диссертации). Как объяснить, почему увеличение концентрации цитокина с 0,1 нг/мл до 1 нг/мл в случае IL-8 и IL-10 приводило к увеличению количества ДЭГ, а в случае TNF α наоборот к снижению? И как это увязать с фактом, что уровень экспрессии генов из группы ДЭГ не изменялся при обработке разными концентрациями цитокина (0,1, 1 и 10 нг/мл)?

Заключение

Исходя из изложенного выше, диссертационная работа Веселовского Владимира Александровича является законченной научно-квалификационной работой, посвященной исследованию влияния цитокинов человека как факторов воспалительного процесса на клетки штаммов комменсальных микроорганизмов, лактобацилл и бифидобактерий. Рассматривая работу, можно заключить, что полученные в диссертационном исследовании данные расширяют представление о молекулярных механизмах взаимодействия организма-хозяина и микробиоты.

Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Диссертационная работа Веселовского Владимира Александровича ««Влияние цитокинов человека на комменсальные микроорганизмы на примере лактобацилл и бифидобактерий»» по своей актуальности, научной новизне, полноте описания и достоверности полученных результатов полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Веселовский Владимир Александрович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности 1.5.7 — генетика.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук, доцент,
заместитель директора по научной работе,
заведующий лабораторией,
АО Научно-исследовательский институт
«Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»)

Закатаева Наталия Павловна

07.11.2023

Подпись Н.П. Закатаевой заверяю,
Генеральный директор АО «АГРИ»

Рыбак Константин Вячеславович



Адрес организации: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1, корп. 1
Тел.: +7 (495) 780-32-66
E-mail: agri-ofc@agri.ru