



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@imb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Института
молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской
академии наук доктор биологических
наук



Иванов Александр Владимирович
« 05 » декабря 2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук о научно-практической ценности диссертации Веселовского Владимира Александровича «Влияние цитокинов человека на комменсальные микроорганизмы на примере лактобацилл и бифидобактерий», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. — генетика

Актуальность темы исследования

Между кишечной микрофлорой, эпителием кишечника и местным иммунитетом слизистых оболочек существует сложная система взаимодействий. Совместная коэволюция организма хозяина и бактерий кишечной микробиоты приводит к тому, что бактерии начинают регулировать различные аспекты работы организма-хозяина и, в

частности, поддержание работы защитной иммунной системы, нацеленной против патогенов.

Микробы в составе кишечной микрофлоры постоянно сталкиваются с воздействием со стороны факторов иммунной системы человека, и их выживание требует от них умения быстро реагировать и приспосабливаться к меняющимся внешним условиям. Способность микробных клеток к адаптации заключается в их возможности воспринимать внешние и внутренние сигналы, включая сигнальные молекулы иммунитета, пептидные гормоны и нейромедиаторы, и реагировать на них.

Микробиом играет ключевую роль в формировании и развитии врожденной и приобретенной иммунной систем организма, в то время как иммунитет отвечает за поддержание ключевых особенностей взаимодействия организма с бактериями. Такие бактерии, как бифидобактерии и лактобациллы, обладают ярко выраженными способностями изменять работу иммунной системы и могут вызывать воспалительные процессы при наличии патогенов, способствуя выработке как противовоспалительных, так и провоспалительных цитокинов и иных факторов, влияющих на иммунный ответ.

Воспалительные механизмы иммунной системы хозяина, направленные на элиминирование патогенных микроорганизмов, как правило, нацелены на консервативные молекулярные структуры. Несмотря на это, состав нормальной кишечной микрофлоры может оставаться относительно стабильным в течение многих лет. Это свидетельствует о высокой устойчивости микроорганизмов к воздействию иммунной системы. Тем не менее, механизмы, позволяющие некоторым бактериям, таким как бифидобактерии, лактобациллы и другим, выживать в условиях воспаления, а также постоянство состава нормальной микробиоты кишечника до сих пор не до конца изучены.

В диссертационной работе Владимира Александровича впервые рассматривается влияние цитокинов человека на комменсальную микробиоту. Понимание процессов адаптации кишечных бактерий, *Bifidobacterium longum* или *Lactocaseibacillus rhamnosus*, поможет лучше разобраться во взаимодействии организма с его собственной микрофлорой.

Научная новизна работы и практическая ценность результатов.

В этом исследовании впервые были изучены механизмы адаптации бифидобактерий и лактобацилл, в частности штаммов *Bifidobacterium longum* GT15 и *Lactocaseibacillus rhamnosus* K32, к наличию в среде таких цитокинов, как TNF α , IL-6, IL-8 и IL-10. Впервые

были исследованы транскрипционные профили этих штаммов и описаны особенности их реакции на цитокины. Основываясь на данных филогенетического профилирования и транскриптомного анализа, впервые были предсказаны генные пути штаммов *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32. Были обнаружены 38 оперонных групп у штамма *B. longum* GT15 под воздействием TNF α , большинство из которых относятся к транспорту и метаболизму сахаров. Так же было показано присутствие цитокина IL-10 для *L. rhamnosus* K32 активируются дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) вовлеченные преимущественно в энергетические пути.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Веселовского В.А. написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, а также выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста, включает 6 таблиц, 18 рисунков, 9 приложений. Список цитируемых литературных источников включает 207 наименований.

Во **Введении** диссертационной работы сформулированы цель и задачи исследования, описана актуальность темы, ее новизна и практическая значимость работы.

В разделе, посвященном **обзору литературы**, описываются существующие научные исследования по теме диссертации. Особое внимание уделяется кишечной микрофлоре человека и ее влиянию на иммунную систему. Рассматриваются основные составляющие кишечной иммунной системы и способы адаптации микрофлоры к факторам иммунного ответа. Также обсуждаются результаты методов транскриптомного анализа бифидобактерий и лактобацилл.

В разделе **“Материалы и методы”** автор описывает объекты, используемые в исследовании. В работе использован большой набор разнообразных современных методик. Методы описаны подробно и грамотно. Глава свидетельствует о том, что автором проделана большая работа по подбору и освоению различных методов исследования, и что автор в совершенстве владеет ими.

Раздел **“Результаты”** содержит экспериментальные данные, полученные в ходе диссертационной работы.

Автором были выполнены эксперименты по анализу профилей экспрессии генов на разных стадиях роста штамма *B. longum* GT15. В результате была выбрана

экспоненциальная фаза роста для анализа влияния цитокинов на штаммы в которой самая высокая экспрессия генов. Было изучено влияние провоспалительных цитокинов на рост штамма *B. longum* GT15. Обнаружено статистически значимое отличие в значениях оптической плотности культуры *B. longum* GT15 при добавлении цитокинов IL-6 в концентрации 0,1 нг/мл. Образцы с цитокинами IL-6 в концентрации 0,1 нг/мл и TNF α в концентрации 10 нг/мл использовали для транскриптомного анализа. Изучались эволюционно стабильные группы генов и их оперонная организация. Особое внимание хочется уделить использованием Владимиром Александровичем в своей работе подхода по созданию библиотек точек старта транскрипции. Тем самым оперонная организация эволюционно стабильных групп генов бы доказана не только *in silico*, но и экспериментальным путем. Следующим шагом было изучение влияния TNF α , IL-6, IL-8 и IL-10 на штамм *L. rhamnosus* K32. TNF α , IL-6, IL-8 и IL-10 не влияют на рост штамма, но оказывают влияния на транскрипционный профиль при этом влияние цитокинов на штамм не является дозозависимым. В последнем разделе автором было проведено сравнение влияния TNF α на штаммы *B. longum* GT15 и *L. rhamnosus* K32.

Разделе диссертации “Обсуждение” интерпретируются полученные экспериментальные данные.

Анализ метаболических путей штамма *B. longum* GT15 выявил влияние TNF α на метаболизм глутатиона, азота, пропионата. Веселовским В.А. показано, что ответ *B. longum* GT15 на провоспалительные цитокины представляет собой адаптивную реакцию на стресс, направленную на обеспечение нормального функционирования бактериальных клеток. Также эта реакция способствует подавлению воспаления в организме-хозяине, особенно в кишечном тракте. При этом бифидобактерии способны выделять медиаторы, такие как короткоцепочечные жирные кислоты, антиоксиданты и прочие молекулы, которые могут регулировать уровень провоспалительных цитокинов.

Диссертантом показано, что штамм *L. rhamnosus* K32 изменяет свой экспрессионный профиль только в ответ на добавление в среду IL-10, который активирует гены фосфотрансферазной системы. При этом показано снижение экспрессии генов биосинтеза D-аланин-липотейхоевой кислоты что влияет на синтез клеточной стенки.

Транскриптомный анализ и филогенетическое профилирование, проведённые в рамках данной диссертационной работы, показали, что влияния цитокинов IL-10 на штамм

L. rhamnosus K32 и TNF α на штамм *B. longum* GT15 наблюдается увеличение экспрессии генов, участвующих в процессах углеводного обмена и транспорта сахаров внутрь клетки.

Выводы, сделанные автором, хорошо аргументированы и соответствуют поставленным задачам в диссертационной работе.

Содержание работы полностью отражено в 3 печатных работах по теме диссертационной работы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки.

Диссертационная работа Веселовского В.А. выполнена на хорошем уровне. Но есть и недостатки такие как, опечатки и отсутствие знаков препинания в некоторых местах.

Так же есть вопрос к автору по экспериментальному поиску точек старта транскрипции. На сколько достоверен использованный вами метод для их поиска?

Диссертационная работа “Влияние цитокинов человека на комменсальные микроорганизмы на примере лактобацилл и бифидобактерий” соответствует всем требованиям “Положения о присуждении ученых степеней”, предъявляемым к диссертациям на получение ученой степени кандидата биологических наук. Автор работы, Веселовский Владимир Александрович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности 1.5.7 — генетика.

Отзыв на диссертацию Веселовского В.А. заслушан, обсужден и утвержден на лабораторном коллоквиуме Лаборатории постгеномных исследований ИМБ РАН 30.11.2023 г.

Младший научный сотрудник
Института молекулярной
биологии им. В. А. Энгельгардта РАН
к.б.н.

Зульфия Гаделевна Гуватова

ул. Вавилова, д. 32, Москва, 119991, Россия
тел.: 8(499)135-11-60
электронный адрес: guvatova.zulfiya@mail.ru



Подпись З.Г. Гуватовой заверяю
Ученый секретарь
Института молекулярной
биологии им. В. А. Энгельгардта РАН
к.в.н.

Александр Анатольевич Бочаров