

**ОТЗЫВ официального оппонента
на (о) диссертацию(и) на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Дбар Сарии Джоновны на тему «Создание
полифункциональной пищевой добавки на основе *Lactococcus lactis* subsp.
lactis»
по специальности 1.5.11. Микробиология
1.5.6. Биотехнология**

В настоящее время актуальность исследований пробиотиков связана с успехами в изучении микробиома человека и роли кишечной микробиоты. Микробиом кишечника является неотъемлемой частью нашего здоровья и выполняет важнейшие функции - метаболическую, координирующую, защитную и эпигенетическую, которые тесно взаимосвязаны. Кишечная микробиота оказывает влияние на наше здоровье и благополучие, на иммунную систему и обмен веществ, детоксикацию токсичных веществ, а также воздействует на поведение, сон и когнитивные способности. Микробиоту кишечника рассматривают как фактор, активно влияющий на развитие нервной системы, функциональное состояние мозга и поведение, в том числе через эпигенетические модификации генов – т.е. изменения активности генов под действием внешних факторов (стресс, образ жизни, питание и т.д.), не затрагивающих структуру ДНК. Исследования последних десятилетий выявили влияние кишечной микробиоты на такие заболевания и дисфункции, как депрессия, невротико-тревожные расстройства (разные фобии и тревожность), аутизм, болезнь Альцгеймера.

Важным фактором, обеспечивающим поддержание и нормализацию кишечного микробиоценоза являются пробиотики. Новым направлением является разработка пробиотиков – психобиотиков, или нейробиотиков. Психобиотик – это особый класс пробиотиков, которые оказывают положительное влияние на психическое здоровье человека. Термин психобиотики был введен в 2013 году психиатром Дайнаном и неврологом Крайаном. Психобиотики положительно влияют на церебрально-кишечную ось, называемую вторым мозгом. Суть заключается в нейронных, эндокринных и

иммунологических механизмах связи между пищеварительной системой и центральной нервной системой.

Психобиотик или нейробиотик – это особые живые бактерии, которые при попадании в организм в достаточном количестве, производят полезное воздействие на здоровье пациентов, страдающих различными психическими расстройствами. Считается, что нейробиотик воздействует на мозг с помощью способности продуцировать такие биологически активные соединения, как нейротрансмиттеры. Нейротрансмиттеры передают информацию от одного нейрона другому, управляют главными функциями организма, включая движение, эмоциональные реакции и физическую способность ощущать удовольствие и боль. Наиболее известными нейротрансмиттерами, влияющими на регуляцию настроения, являются серотонин, норадреналин, дофамин, ацетилхолин и гамма аминomásляная кислота (ГАМК). Поэтому особое внимание уделяется штаммам бактерий, способных синтезировать эти соединения.

Выбор темы и значимость данного исследования связаны с недостаточной изученностью возможного применения культуры *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* в качестве БАДа, поскольку в литературе в большей степени представлены исследования по изучению различных свойств представителей рода *Lactobacillus* и *Bifidobacteria*. Тема изучения является актуальной, подчеркивается важная роль, которую штаммы молочнокислых бактерий могут играть в качестве пробиотических, заквасочных или биозащитных культур для улучшения качества и безопасности пищевых продуктов. Кроме того, большое внимание уделено антимикробной активности пробиотических культур и ее роли во взаимодействиях *in vivo*, происходящих в желудочно-кишечном тракте человека, что способствует здоровью кишечника.

Разработке такого штамма-психобиотика с антимикробной активностью и посвящена диссертация Сарии Дбар, а именно, изучение пробиотических свойств 3-х штаммов *Lactococcus lactis*, с целью выбора наиболее эффективного для создания полифункционального препарата БАД. Полифункциональность

препарата должна быть связана с активностью в отношении ЦНС, и с синтезом бактериоцинов. Изучены природный штамм 194, а также два штамма F-116 и F-119, ранее полученные слиянием протопластов двух родственных штаммов руководителем соискателя Стояновой Лидией Григорьевной. Важную часть исследования составляет биотехнологическая часть работы, заключающаяся в создании лабораторного образца пищевой добавки на основе пробиотического штамма *L. lactis subsp. lactis* 194 и проведение поведенческих тестов на животных для оценки эффективности БАДа.

Диссертация построена традиционно и включает 171 страницу и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, рекомендаций, списка литературы, а также приложений, включающих акт апробации опытного БАД и протокол его испытаний. Можно отметить, что работа является образцом классического исследования по микробиологии и биотехнологии, и включает изучение культуральных и физиолого-биохимических свойств продуцентов, выбор наиболее эффективного штамма, а также оценку нетоксичности компонентов, биологической активности опытного препарата, и оптимизацию способа его хранения.

Во введении обосновывается актуальность изучаемой проблемы, формулируется цель и задачи исследования, выдвигаются основные положения на защиту, отражается научная новизна полученных результатов и их теоретическое и практическое значение.

Хорошо написан литобзор. Он изложен на 40 страницах, и даёт представление о свойствах лактококков *L. lactis subsp. lactis* и возможном применении их как биоконсерванта, для создания безлактозных продуктов, а также при заболеваниях ЖКТ и профилактики заболеваний, связанных с ЦНС. Большое внимание уделено короткоцепочечным жирным кислотам и аминокислотам в контексте их влияния на нервную систему. Специальная глава посвящена бактериоцинам молочнокислых бактерий. Сарией Дбар показано, что как и лактобациллы, штаммы лактококков *Lactococcus lactis* также способны

к синтезу бактериоцинов, среди которых наиболее известным является низин. Диссертантом отмечено, что из молока бурятских коров выделен штамм лактококков №194, синтезирующий два бактериоцина, и этот штамм явился одним из объектов исследований автора.

В разделе «материалы и методы» подробно описаны методики и протоколы, использованные в работе. Эксперименты выполнялись в лаборатории физиологии и биохимии микробов кафедры микробиологии, на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета, в аналитическом центре химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова», а также в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова" с использованием современного оборудования.

В разделах «результаты» и «обсуждение» изложены результаты проведенной работы и их анализ. Автором исследованы антимикробная активность, синтез нейромедиаторов и короткоцепочечных жирных кислот, адгезионные свойства штаммов. В ходе работы обнаружены фунгицидные свойства у штаммов *L. lactis subsp. Lactis*, что позволяет существенно расширить спектр их применения. Также впервые была обнаружена способность к синтезу биогенных аминов и их предшественников штаммами *L. lactis subsp. lactis*, и оценена возможность использования в качестве психобиотиков. Был отобран штамм 194 для создания БАДа и проведена разработка и оптимизация условий его хранения, а также проведена апробация лабораторного образца в модельных опытах на крысах. Интересная схема лиофилизации лактококков с использованием криопротектора на основе бентонита, что повысило сохранность клеток и уменьшило период их восстановления. Мне кажется, этот важный биотехнологический прием может быть запатентован.

Диссертантом было показано статистически достоверное снижение тревожности и повышение ориентировочно-исследовательской активности у

животных, получавших опытный препарат с выбранным штаммом лактококков. Поэтому данный штамм можно считать новым психобиотиком.

Выводы, полученные в результате проведенных исследований, соответствуют поставленным целям и задачам. Основные положения и результаты были представлены на конференциях, посвященных проблемам микробиологии, биотехнологии в области создания новых пищевых продуктов, полезных для здоровья человека:

В ходе знакомства с представленной диссертационной работой возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Входили ли в биологически активную добавку на основе пробиотического штамма 194 *L. lactis* subsp. *lactis* исследованные аминокислоты?

2. Почему тестирование опытного БАД проводили на крысятах с 10 по 25 день, что, как указано автором, соответствует возрасту человека от 3 до 8 лет? С какой целью диссертантом был использован этот период онтогенеза крысят? Пробиотики животным обычно даются в период активного роста при переходе от молочного вскармливания на смешанное питание для профилактики дисбиозов, а в данном случае что автор хотел получить?

3. В некоторых таблицах не приведены ошибки средних. Например, таблица 6 - Оценка жизнеспособности *Lactococcus. lactis* ssp. *lactis* штамма 194 (это таблица 3 в автореферате), таблица 7 - Характеристика биологически активной добавки на основе пробиотического штамма 194.

4. При тестировании животных в тесте «Открытое поле» Сария визуально оценивала параметры двигательной активности. Почему не использовано видеонаблюдение с компьютерным анализом изображений? Есть специальные программы по анализу поведенческих данных, например, доступна программа BORIS (Behavioral Observation Research Interactive Software).

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям,

установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Дбар Сария Джоновна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
главный научный сотрудник, заведующая лабораторией инновационных технологий ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН)

Ушакова Нина Александровна

Контактные данные:

тел.: 7(903):

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.06, 03.02.03– Микробиология, биотехнология

Адрес места работы:

119071, Москва г. Ленинский проспект, д. 33,

ИПЭЭ РАН

Тел.: 8495633

m

Подпись сотруд
удостоверяю:
Ученый секрета

Н.Ю. Феоктистова

дата

