

Отзыв

официального оппонента – доктора биологических наук, Андропова Евгения Евгеньевича на диссертационную работу Клименко Наталии Сергеевны «Межиндивидуальная вариативность изменений состава кишечной микробиоты при диетических интервенциях», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. – «математическая биология, биоинформатика»

Актуальность

Актуальность темы, выбранной для диссертационного исследования, вполне очевидна: начало 21-го века ознаменовалось с технологической стороны началом широкого использования методов высокопроизводительного секвенирования для анализа природных микробиомов, которое в результате дало возможность недостижимой ранее полноты и глубины анализа микробных сообществ, а со стороны понимания функций микробных сообществ – открытие их теснейшей интеграции с окружающими средами, и, как частный случай, с высшими организмами-хозяевами микробиоты. В полной мере это касается и кишечной микробиоты человека, важность которой в обеспечении самых различных сторон жизнедеятельности человека, в том числе и взаимодействие микробиоты желудочно-кишечного тракта с центральной нервной системой (the gut-brain axis), в последнее время становится все более и более очевидной. Однако целый ряд сложностей сопутствует исследованиям в этой области, начиная от дизайна проектов, стандартизации пробоподготовки и заканчивая анализом данных. Одна и наиболее важная из них – это большой объем данных, характеризующийся не только высоким разнообразием, но и высоким уровнем шумов, чрезвычайно усложняющих поиск биологически значимого сигнала. С другой стороны, то же самое обилие данных дает возможность производства бесконечного количества красивых картинок, лишенных, впрочем, биологического смысла. Поэтому и сейчас, и еще долгое время такие исследования, ставящие перед собой задачу поиска следов важных и реальных биологических феноменов в данных высокопроизводительного секвенирования, не утратят своей актуальности.

Достоверность и новизна

Достоверность исследования обусловлена весьма представительной выборкой добровольцев ($N_1=206$, $N_2=130$). Кроме того, это исследование является первым крупномасштабным интервенционным исследованием изменения микробиома, выполненным на российской популяции, что обуславливает очевидную новизну представленных данных.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Данное исследование носит по большей части фундаментальный характер в соответствии с состоянием исследований в данной области, проходящих в настоящее время одну из начальных фаз своего развития, и ориентировано не столько на поиски конкретных практических рекомендаций, сколько на понимание связи диетических интервенций с динамикой кишечной микробиоты. Обоснованность научных положений обусловлена использованием

современных статистических орудий, среди которых важное место занимают методы, связанные с машинным обучением, как нельзя кстати подходящих для анализа таких сложных массивов информации.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций

Как уже было сказано выше, значимость работы заключается в поиске средств, позволяющих детектировать компоненты динамики микробиоты, связанные с диетическими интервенциями и позволяющие статистически достоверно идентифицировать их на фоне изменений, вызванных нестабильностью микробиоты у отдельных индивидуалов, межиндивидуальными различиями, стохастическими изменениями и пр. Представленные выводы свидетельствуют о том, что Автору это вполне удалось, причем, что особенно важно, речь идет не только об обычных в такого рода исследованиях выявления дифференциально представленных таксонов, но и о закономерностях гораздо более глубоких, таких, например, которые позволяют выявить общие черты в динамике микробиоты при интервенциях различного типа.

Структура и содержание диссертации, ее завершенность

Структура диссертации не вполне обычная (возможно, только для меня, конечно), а именно, материалы и методы вместе с обсуждением излагаются отдельно для каждого из экспериментальных разделов. Во всем остальном структура традиционна – обзор литературы, экспериментальная часть, выводы. Диссертационное исследование с Приложением и списком литературы изложено на 138 страницах текста, список литературы включает 286 источников. Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора и соответствуют задачам исследования.

Подтверждение опубликования основных результатов в научной печати

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах (WoS, Scopus, Q1). Результаты работы были представлены на международной конференции Nutrients (Барселона, 2019) и международном конгрессе “Биотехнология: состояние и перспективы развития” (Москва, 2019).

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертационной работы.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы

Прежде чем приводить замечания и вопросы к диссертации, я хотел бы оценить ее в целом как исследование, которое я прочитал с большим интересом: прекрасный обзор литературы, который и мне лично был весьма полезен, так как за редкими исключениями микробиомы, которые мы исследуем, довольно далеки от кишечных микробиомов человека. Но

с особым интересом я познакомился с экспериментальной частью, так как Автор поставила в своем исследовании цели по выявлению крупных, можно сказать, интегральных закономерностей в динамике кишечного микробиома и пойти гораздо дальше традиционных способов описания динамики, заключающихся в бесконечном описании отдельных таксонов, численность которых увеличивается или уменьшается в разного рода процессах. Мне часто как ревьюеру и просто как читателю приходится пробираться через такие описания и постоянно терять нить скучного повествования. При чтении данного исследования мне скучать не пришлось, так как Автор сконцентрировала свое внимание на нескольких интересных феноменах, имеющих не частный, а общий характер, и показала, что 1) параметры динамики микробиома зависят от его исходных параметров, которые могут быть конкретизированы; 2) одним из важных маркеров, характеризующих «мобильность» микробиома, служат не доли определенных таксонов в его составе, а их «балансы» (*Bacteroidetes:Firmicutes*), что является весьма важным элементом современной композиционной статистики; 3) другим важным параметром является средневзвешенное количество генов в геномах кишечного сообщества микроорганизмов; 4) наконец, немаловажными параметрами, определяющим «мобильность», являются особенности метрик альфа- и бета-разнообразия. Автору удалось также продемонстрировать, что существуют параметры микробиомов, определяющих его динамику вне зависимости от типа интервенции, что также весьма интересно. Особо следует отметить широкое использование Автором методов машинного обучения, которые, как мне кажется, не просто украсили эту работу, но были здесь в высшей степени уместны.

В общем, можно видеть, что Автор сосредоточилась не на формальных, простых для описания, но при этом скучных и малополезных для понимания феноменах, но выбрала более рискованный и уязвимый для критики путь анализа. Я могу это только одобрить и поддержать, а заодно и поблагодарить Автора, давшего возможность оппоненту вступить в дискуссию. Хочу сразу заметить, что мои критические замечания имеют характер доброжелательной дискуссии и не умаляют достоинств работы, а скорее являются размышлениями, которые Автор, надеюсь, учтет в будущих работах.

Первое замечание носит общий характер и касается терминологического языка работы. Проблемы, о которых пойдет речь довольно общие, так как в русском языке еще не сложилось терминологическое поле для обсуждения вопросов, связанных с анализом микробиомов, но, тем не менее: 1) названия высших таксономических рангов («уровней», как выражается Автор), такие как «отделы», лучше, именовать так, как делает большинство отечественных исследователей, включая научного руководителя этого исследования, – «фили»; 2) могу подсказать Автору, использующему термины «респондер» и «нереспондер», альтернативный термин, пришедший из сельскохозяйственной микробиологии и много десятилетий назад утвердившийся при описании действия микробных препаратов на растения – «отзывчивость»; 3) вместо терминов «корреляционная структура» или даже «корреляционный анализ структуры родового состава» лучше использовать терминологию, устоявшуюся в работах по изучению сетевой организации сообществ: «сети», «хабы», «ноды» и пр., хотя термин «кооператив» мне тоже нравится; 4) «последовательности после обрезания» и «обрезание по баллу качества» лучше заменить иностранным термином «тримминг»; 5) вместо «нормализации вектора признаков к сумме 1 путем деления на суммарное значение ридов на образец» лучше использовать простые термины «частота» или «представленность» таксона без длинных описаний; 6) «среднее бета-разнообразие» звучит крайне сомнительно, лучше говорить о конкретных метриках; 7) «расстояние Эйтчитсона»

правильно будет «Эйтчисона» (Aitchison distance)... Это не все, конечно, но Автору стоит внимательно поработать над языком изложения данных анализа микробиомов.

Второе замечание касается использованных Автором метрик альфа- и бета-разнообразия. Традиционно авторы исследований микробиоты используют несколько индексов разнообразия, не особенно углубляясь в смысл коэффициентов. Хочу обратить внимание, что в индексах альфа-разнообразия принято выделять два важных тренда – evenness (ровность распределения) и richness (таксономическое богатство). Чтобы адекватно интерпретировать смысл изменений индексов разнообразия, необходимо принимать во внимание вклад параметров evenness и richness в используемые коэффициенты. Могу посоветовать познакомиться с весьма древней, но прекрасной статьей на эту тему (DeJong, 1975), в которой автор проанализировал вклады evenness и richness в несколько коэффициентов разнообразия, включая используемый Автором коэффициент Шеннона (забавно, сейчас, пересматривая эту статью я заметил, что в качестве экспериментального материалы для этой статьи были использованы данные Уиттакера – автора концепции уровней экосистемного разнообразия: альфа-, бета-, гамма-). Общий смысл сказанного заключается в том, что использование тех или иных коэффициентов разнообразия должно быть обосновано, исходя из их свойств и конкретных задач и гипотез проекта. Поэтому в данном исследовании мне не хватает анализа коэффициентов, ориентированных на анализ ровности распределения в большей степени, чем Шеннон, например, индекса Симпсона, что позволило бы рассмотреть закономерности динамики с нескольких сторон. И здесь это было бы не просто статистическим упражнением, так как авторы другой прекрасной работы Wittebolle et al., 2009 показали, например, что микробные сообщества, характеризующиеся большей ровностью распределения таксонов, быстрее и эффективнее справляются с внешними стрессовыми воздействиями. Я думаю, что учет этих аспектов разнообразия был бы полезен и для этого диссертационного исследования. Здесь уместно, кстати, похвалить Автора за исследование «математической составляющей» зависимости потенциала изменчивости от альфа-разнообразия, с которым я познакомился с большим интересом, и которое напомнило мне работу DeJong, процитированную выше.

То же самое касается бета-разнообразия, у которого тоже есть два тренда (если можно так выразиться) – взвешенность (индексы, построенные с учетом представленности таксонов) и невзвешенность (без учета представленности). Автор использовал два индекса – взвешенный UniFrac и индекс Брея-Кёртиса (о характере которого в смысле взвешенности можно порассуждать). Частый вопрос в работах такого рода – какой именно индекс использовать. Один из вариантов – использование обобщенного индекса UniFrac, однако я бы посоветовал использовать обе версии этого индекса одновременно и именно при анализе данных, представленных Автором. В самом деле, если речь идет о пробиотических интервенциях, в которых титр пробиотика чрезвычайно мал по сравнению с численностью кишечной микрофлоры, то использование взвешенного UniFrac оставит исследователя в неведении об изменениях, вызванных динамикой представленности минорных таксонов, в то время как невзвешенная версия UniFrac могла бы детектировать их влияние. Например, в данных, представленных на рис. 19, демонстрирующем изменения микробиоты, вызванные пробиотической интервенцией, использование невзвешенной версии UniFrac могло бы быть более информативным (даже в том случае, если изменения будут также невелики, как и в взвешенной версии).

Следующая часть дискуссии посвящена весьма интересному наблюдению, связанному с влиянием фактора, представляющего собой баланс Bacteroidetes:Firmicutes. Очевидно, что в этой части Автор приблизилась к инструментарию композиционной статистики (Gloor et al., 2017), неизбежность и важность которой широкое сообщество исследователей микробиоты начинает осознать (расстояния Эйтчисона, кстати, тоже являются важным инструментарием этой статистики). При чтении этого раздела возник вопрос о том, как именно, из множества балансов фил Автор выбрала именно этот? На чем основывался этот выбор и проверяла ли Автор валидность других балансов в качестве предикторов?

Далее хотелось бы остановиться на весьма интересной части работы, которая связывает потенциал изменения микробиоты со средневзвешенным количеством генов на геном в сообществе. Я хотел бы обратить внимание Автора на исследования, в которых экологические стратегии микроорганизмов связываются с числом рРНК-оперонов на геном (что, возможно, также связано и с числом генов в геноме), и демонстрируют ясную связь между жизненными стратегиями микроорганизмов (копиотрофия/олиготрофия), способности к утилизации спектра субстратов и числом рРНК-опернов. В частности, думаю, что Автору было бы интересно познакомиться с публикацией Wang et al., 2022, с которой я хорошо знаком, так как выступал здесь в качестве ревьюера.

Наконец, хотелось бы коснуться одного из последних выводов о том, что степень изменения микробиома можно предварительно оценить до интервенции по его составу, путем оценки расстояния до множества других образцов крупной выборки, содержащей по одному образцу микробиоты на индивида. Поправьте меня, если я ошибаюсь, но в переводе на русский язык, эта гипотеза, по всей видимости, могла бы быть сформулирована следующим образом: «типичные микробиомы менее отзывчивы на интервенции, чем маргинальные»? Я не критикую эту гипотезу, она реально интересная и при этом обладающая высоким эвристическим потенциалом. Но если это так, значит ли это, что микробиота большинства пациентов (относящихся к самому большому кластеру нормы) будет малоотзывчива на интервенции различных типов?

Остальные вопросы придется оставить без внимания, по причине их меньшей важности и для того, чтобы не безмерно удлинять отзыв. Повторю лишь, что диссертация мне очень понравилась, мои замечания являются лишь приглашением к дискуссии, они не уменьшают значимость полученных результатов и носят рекомендательный характер, а рецензируемая диссертационная работа Клименко Наталии Сергеевны представляется весьма перспективной для развития этого направления исследований.

Заключение о соответствии диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 в последней редакции

Диссертационная работа Клименко Наталии Сергеевны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная задача в области исследования динамики кишечной микробиоты человека в ответ на диетические интервенции. Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства

РФ от 24.09.2013 № 842 в последней редакции, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. – «математическая биология, биоинформатика».

Цитированная литература

DeJong, T. M. 1975. A Comparison of Three Diversity Indices Based on Their Components of Richness and Evenness. *Oikos*, vol. 26, no. 2, pp. 222–27. JSTOR, <https://doi.org/10.2307/3543712>.

Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., De Vos, P., Verstraete, W., & Boon, N. 2009. Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature*, 458(7238), 623–626. <https://doi.org/10.1038/nature07840>

Gloor GB, Macklaim JM, Pawlowsky-Glahn V, Egozcue JJ. 2017. Microbiome datasets are compositional: and this is not optional. *Frontiers in Microbiology* 8:2224 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02224>

Wang Y., Wilhelm R.C., Swenson T.L., Silver A., Andeer P.F., Golini A., Kosina S.M., Bowen B.P., Buckley D.H. and Northen T.R. 2022. Substrate Utilization and Competitive Interactions Among Soil Bacteria Vary With Life-History Strategies. *Front. Microbiol.* 13:914472. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.914472>

2 июня 2023 года

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (г. Санкт-Петербург), доктор биологических наук, специальность 03.00.07– «Микробиология». 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3, эл.почта eeandr@gmail.com тел. +7-911-213-93-01

Андронов Евгений Евгеньевич

Подпись руки Андропова Евгения Евгеньевича, главного научного сотрудника лаборатории микробиологического мониторинга и биоремедиации почв ФГБНУ ВНИИСХМ, доктора биологических наук, заверяю:

начальник отдела кадров ФГБНУ ВНИИСХМ Ковалевская М.А.

2 июня 2023 года.

