

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора  
Олескина Александра Владимировича на диссертационную работу Клименко Натальи  
Сергеевны на тему:

**«Межиндивидуальная вариабельность изменений состава  
кишечной микробиоты при диетических интервенциях»**, представленную на  
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности  
1.5.8. – математическая биология, биоинформатика.

### **Актуальность темы исследования**

В настоящее время разработаны и успешно применяются в медицине в лечебных и профилактических целях различные способы воздействия на микробиоту кишечника с помощью специальных пищевых ингредиентов и добавок. В частности, в их состав могут вводиться живые полезные микробные культуры (пробиотики) и непременяемые организмом хозяина компоненты, утилизируемые микробиотой (пребиотики). Однако, серьезной проблемой является существенная межиндивидуальная разница в степени эффективности подобных лечебных средств. Как определить, в какой мере можно рассчитывать на профилактический или терапевтический эффект, в частности, на улучшение состояния микробиоты кишечника у данного больного? Именно исследованию механизмов индивидуальной эффективности диетических интервенций и посвящается рецензируемая диссертационная работа.

### **Общая характеристика, структура и оформление диссертации**

Диссертация Клименко Н.С. изложена на 138 страницах. Она состоит из «Введения» и четырех глав: «Обзор литературы», «Межиндивидуальная вариабельность состава микробиоты городского населения и ее связь с рационом питания и другими характеристиками», «Влияние кратковременных диетических интервенций на состав микробиоты», «Вариабельность ответа микробного сообщества на диетическое вмешательство». Работа содержит 33 рисунка и 6 таблиц. Приложение содержит 2 таблицы. В списке литературы присутствует 286 источников (все на английском языке). Работа написана достаточно грамотным научным языком, некоторые разделы читаются с интересом даже неспециалистом и могли бы быть рекомендованы в качестве популярных источников для ознакомления с проблематикой кишечной микробиоты, ее изменчивости и диетических интервенций. Результаты исследования были опубликованы в 3 статьях научных журналов, рекомендованных ВАК. Работа полностью соответствует предъявляемым к кандидатским диссертациям.

В разделе «Введение» автор указывает актуальность, новизну, теоретическую и практическую значимость своей работы; формулирует цели и задачи. Выделяет положения, выносимые на защиту, приводит методологию исследования, степень достоверности результатов, их апробацию на конференциях, личный вклад в диссертационную работу.

В достаточно обширном разделе «Обзор литературы» изложены современные данные о микробиоте человеческого организма (включая различные таксономические группы; в порядке небольшого замечания –домен Archaea логичнее было бы рассматривать по окончании обсуждения роли всех отделов домена Bacteria), роль микробиоты в поддержании здоровья хозяина (где рассмотрены различные микробные продукты; удачно упомянуты микробные нейромедиаторы, но хотелось бы более полный их список и цитирование не вторичного источника, а первоисточников, например, работы: Цавкелова Е.А., Ботвинко И.Б., Кудрин В.С., Олескин А.В. Детекция нейромедиаторных аминов у микроорганизмов методом

высокоэффективной жидкостной хроматографии // Докл. Росс. Акад. наук. 2000. Т.372. С.840—842), факторы, влияющие на состав микробиоты (в том числе пробиотики), возможности ее трансплантации (в том числе ауто трансплантации); ставится важный для собственного вклада автора вопрос о вариабельности степени изменения микробиоты в ответ на те или иные вмешательства (интервенции). Рецензенту хотелось бы особо указать, что желательным было бы процитировать также работы отечественной школы, в том числе публикации проф. Б.А. Шендерова.

В главе 2 «**Межиндивидуальная вариабельность состава микробиоты городского населения и ее связь с рационом и другими характеристиками**» автор останавливается на методике забора и анализа биоматериала добровольцев. Здесь важно отметить соблюдение диссертантом норм биоэтики: наличие информированного согласия всех участников, одобрение исследований локальными этическими комитетами. Конкретно состав микробиома оценивался с помощью секвенирования вариабельного участка V4 гена 16 рПНК (праймеры 515 F (5' - GTGBCAGCMGCCGCGTAA - 3') и Pro-mod-805 R (5'-GACTACNVGGGTMTCTAATCC - 3')). Сравнение данных анализа с типовыми образцами позволяло определить таксономическое положение представителей микробиоты. Очень серьезное внимание в диссертационной работе было уделено статистической обработке полученных результатов. В результате анализа этой структуры у двух подборок испытуемых (206 и 170 человек) были найдены кластеры совместно встречающихся групп бактерий, названные кооперативами. Рецензент принадлежит к старшему поколению, и у него подобные термины вызывают социально-политические ассоциации, особенно если диссертант пишет о бактериальных видах как «членах кооператива» (аналогично, политические ассоциации вызывает и, по-видимому, укоренившийся у специалистов термин «интервенция»).

В результате сопоставления состава микробного сообщества с антропометрическими данными, долговременной диетой и характеристиками стула были выявлены ранее не известные ассоциации, а также валидированы некоторые из ранее описанных. Не буду повторять доклад самой диссертантки, но не могу не отметить некоторые важные «изюминки», например:

Идентифицированный Клименко Н.С. «Enterobacteriaceae-кооператив, включающий неклассифицированных бактерий семейства Enterobacteriaceae и Staphylococcus, ассоциированных с воспалительными заболеваниями кишечника» перекликается с клиническими данными о частоте смешанных кишечных инфекций, вызываемых именно указанными семействами патогенов.

Обнаруженная в диссертационной работе положительная корреляция между разнообразием микробиоты и частотой употребления овощей и фруктов, несомненно, оказывается подкреплением позиции вегетарианцев. Было бы интересно провести аналогичные исследования у народов Крайнего Севера, которые питаются почти исключительно мясом и должны иметь обедненную, специфическую микробиоту. В порядке сопоставления: имеются данные о повышенном содержании бифидобактерий в составе микробиоты северян (см. Rinninella E., Raoul P., Cintoni M., Franceschi F., Miggiano G. A. D., Gasbarrini A., & Mele, M. C. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and disease // *Microorganisms* 2019. V.7. P.14).

Глава 3 «**Влияние кратковременных диетических интервенций на состав микробиоты**» разделена на несколько частей, из которых первая часть является методологической. Раздел впечатляет обширностью и тщательностью проведенных многоступенчатых исследований, их очень скрупулезной статистической обработкой. У диссертанта, извините за ненаучную лексику, по-видимому, «золотые руки» в плане успешной работы с таким большим числом микробных систем и экспериментов, проведенных с двумя группами добровольцев, диета которых была соответственно обогащена диетой, богатой волокнами (группа ДБВ) и характеризовалась

ежедневным употреблением кисломолочного продукта с культурой *Bifidobacterium animalis* (группа ОКП). Исследования диссертанта продемонстрировали, что «состав микробиоты участников ДБВ исследования значимо и однонаправленно изменился в результате интервенции... При этом в исследовании ОКП изменения были на границе значимости» (С. 13 автореферата). В целом, особенно в группе ДБВ, полученные диссертантом новые факты (снижение представленности желче-резистентных и ассоциированных с потреблением сахаров таксонов, повышение представленности продуцентов ценной для здоровья масляной кислоты) говорят в пользу ценности данных диетических интервенций в плане улучшения состава микробиоты, что весьма важно с профилактической и терапевтической точек зрения. В то же время, представляет интерес и «шоковый эффект», включая временное прибавление числа потенциальных патогенов, который гипотетически объяснен в работе «быстрым изменением спектра поступающих питательных веществ».

Глава 4 озаглавлена «**Вариабельность ответа микробного сообщества на диетические интервенции**» и посвящена анализу межиндивидуальной вариабельности степени изменения микробиоты. Можно констатировать, что именно эта часть работы представляет наибольший теоретический и практический интерес - диссертант ищет «мерило» индивидуальной эффективности диетических интервенций с точки зрения влияния на кишечную микробиоту. По словам диссертанта (С. 17 автореферата), «была найдена связь» степени изменения микробиоты «с исходными характеристиками микробиома: отрицательная – с альфа-разнообразием и средним взвешенным предсказанным количеством генов на бактерию в сообществе (СКГ), и положительная - с отношением *Bacteroidetes:Firmicutes* (B:F). О кропотливости работы диссертанта свидетельствует то, что (С.18) «для каждой из интервенций были построены регрессионные модели с помощью алгоритма машинного обучения». Введено понятие «потенциала изменения как составляющей степени изменения микробиома образца, которая определяется исключительно его внутренними микробиотными признаками». Для ОКП и ДБВ-групп испытуемых найдены наиболее значимые таксоны в составе исходной микробиоты, выступающие как ценные маркеры для предсказания степени эффективности диетической интервенции, в частности *Prevotella copri*, *Bifidobacterium adolescentis*, а также неклассифицированные виды родов *Streptococcus* и *Ruminococcus*. О последнем напомним, что именно этот род считается в литературе характерным маркером одного из трех бактериотипов (энтеротипов) человеческих индивидов (наряду с характерными для двух других бактериотипов *Prevotella* и *Bacteroides*, см. Clarke G., Stilling R. M., Kennedy P. J., Stanton C., Cryan J. T., Dinan T. G. Gut microbiota: the neglected endocrine organ // *Molecular Endocrinology*. 2014. V.28. P.1221–1238).

Прервем здесь обсуждение результатов работы, так как сказанного вполне достаточно для весьма высокой оценки данной диссертации как с методологической, так и с результативной точки зрения. Можно вполне согласиться с подведенным в работе итогом, что в ней успешно продемонстрировано, что «альфа разнообразие и среднее взвешенное количество генов на бактерию внесли независимый сильный вклад в предсказание потенциала изменения согласно линейной модели. Эффект от каждой из данных величин наблюдался, несмотря на их взаимную отрицательную корреляцию... Данные величины на двух разных уровнях совместно определяют богатство метаболического потенциала сообщества в целом и его функциональную избыточность» (С.102-103 диссертации).

В кратком разделе «**Обсуждение**», которое только что было процитировано нами, автор обобщает полученные результаты исследования и обозначает перспективы их использования. Из пожеланий рецензента: было бы целесообразно расширить раздел «Обсуждение», с тем чтобы достойно обобщить содержание кропотливой экспериментальной работы в сопоставлении с ранее изложенным в главе 1 литературным материалом.

## Степень достоверности результатов исследований положений и заключения

Достоверность полученных в работе результатов обусловлена использованием современных методов исследования, включая подробный и точный статистический анализ массива полученных данных. Результаты многих исследований были опубликованы в рецензируемых рейтинговых российских и международных журналах. В целом достоверность результатов не вызывает сомнений.

## Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования

Несомненную новизну представляют данные о составе микробиоты больших выборок добровольцев в связи с их рационом и другими факторами, в результате чего выявлены новые микробные ассоциации («кооперативы»), в том числе имеющие потенциально патогенный характер. Эти исследования опирались на инновационные методы, включая анализ 16S рРНК. Показано, что под влиянием диетических интервенций (богатая волокнами диета; молочнокислая продукция с бифидобактериями) происходят в целом позитивные сдвиги в количественном и качественном составе микробиоты. Впервые детально охарактеризована зависимость степени изменений микробиоты под влиянием интервенций от исходного состава микробиоты, что дало возможность построить новаторскую концепцию «потенциала изменения как составляющей степени изменения микробиома образца, которая определяется исключительно его внутренними микробиотными признаками». Для обеих групп испытуемых найдены наиболее значимые таксоны в составе исходной микробиоты, в частности, *Prevotella copri*, *Bifidobacterium adolescentis*, а также неклассифицированные виды родов *Streptococcus* и *Ruminococcus*. Впервые установлены корреляции потенциала изменений микробиоты со средневзвешенным количеством генов на геном и с соотношением *Bacteroidetes:Firmicutes* (B:F). Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы Клименко Н.С. связана с ее концепцией потенциала изменения микробиоты при интервенциях, которая зависит от исходных характеристик индивидуальной микробиоты и может быть оценена по характерным таксонам в профилактических и терапевтических целях. Обширный и современный обзор литературы представляет самостоятельную ценность и может быть рекомендован к опубликованию в качестве важной монографии и/или учебного пособия.

## Замечания

- 1) Вновь подчеркну, что в литературном обзоре следовало бы уделить больше внимания вкладу отечественных микробиологов в проблематику диссертации, включая, в особенности, работы проф. Б.А. Шендерова.
- 2) При в целом внимательном отношении диссертанта к современной таксономии микроорганизмов выскажу пожелание об устранении имеющихся спорных моментов; например, таксон Archaea имеет ранг домена, а не царства и логично было бы все остальные микроорганизмы рассмотреть под рубрикой домена Bacteria; рецензент осознает всю сложность и дискуссионность современной систематики, где спорным является даже число таксонов высшего уровня (доменов).
- 3) Затронутая в литературном обзоре тема роли микробных нейромедиаторов имеет ныне такой первостепенный интерес, что рецензент рекомендует (при публикации монографии) расширить данный раздел и цитировать первоисточники, а не только вторичную обзорную литературу.
- 4) При общей высокой научной и литературной грамотности диссертанта, отмечим некоторую дискуссионность исходно англоязычных терминов («интервенция», «кооператив» и др.), которые имеют свои ненаучные ассоциации в русском языке.

5) Диссертация и соответствующий ей по содержанию автореферат имеют минимальное число опечаток и стилистических погрешностей.

Все сделанные частные замечания и высказанные пожелания никак не умаляют высоких достоинств рецензируемой диссертационной работы.

Диссертационная работа Клименко Натальи Сергеевны соответствует критериям (в том числе пп. 9-14), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. – математическая биология, биоинформатика.

Профессор кафедры общей экологии  
и гидробиологии ФГБОУВО МГУ им. М.В.  
Ломоносова, Биологический факультет  
Доктор биологических наук (07.00.10)  
23 мая 2023 г.

Олескин Александр Владимирович

Адрес: Россия, 119234, Москва,  
Ленинские горы д. 1, стр. 12,  
Тел.: +74959393872  
e-mail: [oleskiny@yandex.ru](mailto:oleskiny@yandex.ru)

Подпись официального оппонента  
Олескина А.В. заверяю  
Декан биологического факультета МГУ  
профессор  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»,  
Биологический факультет Россия, 119234,  
Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 12,  
Тел. +7(495)939-2776; email [info@mail.bio.msu.ru](mailto:info@mail.bio.msu.ru)

Рубцов Александр Михайлович

