

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, заведующей лабораторией микробиологии Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лазаревой Анны Валерьевны на диссертационную работу Колыгановой Татьяны Игоревны на тему: «Антимикробная активность и микробиом грудного молока на разных сроках лактации», представленную в диссертационный совет ДСУ 208.001.25 на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 Микробиология.

Актуальность выбранной темы

Очевидная польза грудного вскармливания обусловлена не только макронутриентным составом грудного молока, но и наличием в нём иммунных компонентов, обладающих противoinфекционной активностью и играющих важную роль в формировании иммунитета. Современные данные по противомикробным гуморальным компонентам грудного молока значительно расширили представление об этой биологической жидкости. Неотъемлемой частью грудного молока человека является уникальный микробиом, включающий комменсальные и потенциально пробиотические микробы, выделяющие метаболиты и колонизирующие кишечник младенцев, обеспечивая их иммунную защиту. До сих пор, однако, не проводились исследования, касающиеся оценки взаимосвязи между антимикробными свойствами грудного молока и населяющим его микробиомом. Такие исследования представляют как научный, так и сугубо практический интерес.

В научной литературе представлены различные способы оценки антимикробной активности грудного молока и его микробного разнообразия, однако, в настоящее время на первый план выходят современные методы, такие как хроматомасс-спектрометрия и спектрофотометрия.

В связи с этим, тема диссертационной работы Колыгановой Т.И. весьма актуальна, так как посвящена исследованию свойств грудного молока, его антимикробным компонентам и микробиому с использованием современных методов.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Колыгановой Татьяны Игоревной выполнена на высоком теоретическом и методологическом уровне и представляет собой комплексное научное исследование. Выбранные цели, задачи и дизайн исследования базируются на анализе достаточно большого объема литературных данных и современных тенденций в научных исследованиях. Выводы диссертационной работы соответствуют поставленным целям и задачам исследования, включают достаточную выборку участников исследования и являются научно обоснованными.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Научная новизна исследования заключается в проведении комплексной оценки антимикробной активности грудного молока человека ранее не применявшимся к этой биологической жидкости спектрофотометрическим методом и сопоставлении полученных данных с периодом лактации, возрастом матери, микробиомом и концентрацией отдельных антимикробных пептидов грудного молока (АМП).

Автором впервые показан прямой микробицидный эффект секреторного иммуноглобулина класса А (sIgA) на клетки *C. albicans*.

Впервые установлено антимикробное действие очищенного препарата лактопероксидазы на клетки микроорганизмов *per se*, т.е. вне связи с лактопероксидазной системой.

Автором изучено действие фракций сыворотки грудного молока с молекулярным весом 3 кДа, 30 кДа, 100 кДа по отношению к клеткам *C. albicans*. Хромато-масс-спектрометрический анализ фракции сыворотки с молекулярной массой ниже 3 кДа показал отсутствие пептидов человеческого происхождения.

Достоверность полученных данных подтверждена современными методами статистики.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Данные, полученные в ходе исследования, показали, что микробиом грудного молока, представленный наиболее часто встречающимися стафилококками - *S. epidermidis* и *S. aureus*, и стрептококками - *S. mitis* и *S. oralis*, является его неотъемлемой частью и находится в тесной взаимосвязи с антимикробной активностью этой биологической жидкости. Общая обсемененность имеет высокую обратную корреляцию с периодом лактации и высокую прямую корреляцию с антимикробной активностью сыворотки. Снижение общей обсемененности грудного молока условно-патогенными бактериями по мере увеличения срока лактации первично по отношению к снижению антимикробной активности сыворотки.

Снижение концентраций основных антимикробных пептидов - sIgA, лактоферрина, лизоцима и сывороточного альбумина - по мере увеличения периода лактации влияет на антимикробную активность, однако, проведенный расчет показал, что к 12 месяцам вскармливания младенец получает не меньше антимикробных компонентов, чем при кормлении молозивом, а в несколько раз больше ввиду увеличения объема потребляемого молока.

В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболensk) депонирован полученный автором штамм бактерии *Paenibacillus amylolyticus* 22069 – кандидатный штамм-продуцент антимикробных и биологически активных веществ.

Соответствие диссертации паспорту специальности

По теме, методологии исследования, основным положениям и выводам диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.11 Микробиология (медицинские науки).

Полнота освещения результатов диссертации в печати

По результатам исследования автором опубликовано 15 работ, в том числе 6 научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и в изданиях, индексируемых в международных базах (Web of Science, Scopus, PubMed), 9 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежной конференции).

Содержание и оформление диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 132 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, экспериментальной части, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы из 248 источников (230 из которых – зарубежные). Диссертация иллюстрирована 15 рисунками и включает 10 таблиц.

Во введении отражены актуальность, научная и практическая значимость и новизна исследования, освещены степень разработанности вопроса в современной литературе, обозначены цели и задачи диссертационной работы, а также методология и основные положения, выносимые на защиту. Задачи научной работы направлены на комплексное изучение антимикробной активности грудного молока во взаимосвязи с его микробиомом.

В разделе «Обзор литературы», состоящим из шести глав, включая заключение по обзору, представлены современные данные по антимикробной активности грудного молока и его отдельных компонентов, микробиому, влиянию физиологических, физических и видовых факторов на противомикробную защиту молока. При описании используемых методов диагностики антимикробной активности грудного молока наиболее

пристальное внимание уделено методам посевов и микроскопии, что позволило автору определить и аргументировать направление собственных исследований и выбрать дальнейший вектор работы. Особое место в обзоре литературы занимает качественный и количественный анализ АМП, которые могут быть обнаружены не только в молоке человека, но также и в молоке других млекопитающих – коровы, козы, верблюда, лошади и даже мыши, что безусловно является важным в изучении противомикробной активности этой биологической жидкости.

В главе «Материалы и методы исследования» автором подробно описаны все микробиологические, иммунологические и статистические методы, использованные в работе.

Раздел «Экспериментальная часть» включает в себя 6 глав.

В главе 3.1 «Экспериментальной части» автор сравнил применение спектрофотометрического метода определения антимикробной активности грудного молока с традиционными методами посевов и микроскопии. Для подбора адекватного модельного организма для последующих исследований автор оценил влияние сыворотки грудного молока на культуры *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans*. В дальнейшем автор остановил свой выбор на культуре *C. albicans* ввиду сопоставимых полученных результатов и удобстве визуализации действия сыворотки грудного молока и его компонентов.

Глава 3.2 посвящена изучению взаимосвязи антимикробной активности сыворотки грудного молока с его основными противомикробными компонентами. Автор определил концентрации мажорных АМП грудного молока, таких как лактоферрин, sIgA, сывороточный альбумин, и рассчитал их вклад в общую активность сыворотки грудного молока. На основе данных, полученных для разных периодов лактации, среднего объема секретируемого молока и среднего веса младенца автор доказал, что к поздним срокам лактации ребенок получает не меньше иммунных факторов, а значительно больше.

В главе 3.3 автор приводит данные по исследованию микробиома грудного молока. Автор выделил 270 изолятов из 100 образцов грудного молока на протяжении периода лактации от молозива до зрелого грудного молока, установил взаимосвязь между микробиомом грудного молока, антимикробной активностью образцов и возрастом матери и ребенка. Автором показано, что общая обсемененность грудного молока снижается с увеличением периода лактации. Однако с убыванием общей обсеменённости грудного молока также убывает антимикробная активность сыворотки. При этом снижение общей обсемененности грудного молока условно-патогенными бактериями по мере увеличения срока лактации первично по отношению к снижению антимикробной активности сыворотки.

Глава 3.4. включает серию исследований по определению активности фракций сыворотки, содержащих полипептиды молекулярной массой ниже 3, 10, 30 и 100 кДа. Сравнивая активность цельной нефилтрованной сыворотки грудного молока с фракцией 100 кДа автор делает заключение, что основная активность сосредоточена в высокомолекулярной фракции сыворотки, в то время как на фракцию 100 кДа и ниже приходится меньше половины всей активности. При этом отсутствие разницы между фракциями 3 и 30 кДа приводит автора к изучению состава фракции 3 кДа методом хромато-масс-спектрометрии: в этой фракции пептидов человека не обнаружено.

Главы 3.5 и 3.6 посвящены влиянию физических и биологических факторов на антимикробную активность сыворотки молока. Автором проведены эксперименты с физическими воздействиями, такими как пастеризация, лиофилизация и замораживание на молоко человека и взятого в качестве контроля молока коровы. По полученным результатам автор сделал заключение, что пастеризация меньше всего влияет на противомикробные свойства молока человека и может быть рекомендована к методам обработки грудного молока для продления сроков его хранения.

Влияние видовых факторов на антимикробную активность сыворотки было оценено спектрофотометрическим методом на образцах молока коровы,

kozy, лошади, верблюда и мыши. Антимикробная активность значительно варьировала и возрастала в ряду коза-лошадь-верблюд-корова-человек-мышь.

В разделе «Заключение» автором обобщены сведения, изложенные в предыдущих разделах диссертационной работы и проведен глубокий анализ собственных результатов в сопоставлении с данными литературы.

Все 7 выводов диссертационной работы в полной мере отражают её содержание, конкретны и соответствуют поставленным автором задачам.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Содержание автореферата полностью отражает основные положения и выводы диссертации.

Замечания по содержанию и оформлению диссертации

Принципиальных замечаний по диссертации Колыгановой Т.И. у меня нет. Вместе с тем, при ознакомлении с диссертацией у меня возник вопрос к автору, который не влияет на положительную оценку диссертационной работы:

1. Проводилась ли антибактериальная терапия кормящих женщин, чье молоко вошло в исследование?

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Колыгановой Татьяны Игоревны на тему: «Антимикробная активность и микробиом грудного молока на разных сроках лактации», выполненная под руководством д.б.н., профессора, заведующей лабораторией физиологии грибов и бактерий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Арзуманян Веры Георгиевны и представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 Микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей выводы о противомикробной активности грудного молока

человека во взаимосвязи с микробиомом и влиянии физиологических, физических и биологических факторов, а также имеющей важное теоретическое и прикладное значение. Данная диссертационная работа соответствует требованиям п.16 «Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)», утвержденным приказом ректора от 06.06.2022 г. № 0692/Р, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Колыганова Татьяна Игоревна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 Микробиология.

Официальный оппонент:

Лазарева Анна Валерьевна,
доктор медицинских наук
(специальность 03.02.03 – Микробиология (1.5.11),
заведующая лабораторией микробиологии
Федерального государственного автономного учреждения
«Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
г. Москва

Подпись А.В. Лазаревой заверяю:
Ученый секретарь ученого совета
ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»
Минздрава России,
доктор медицинских наук,
профессор РАН



Ирина Валериевна Винярская

ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России,
119991, Москва, Ломоносовский проспект, д.2, стр.1
Телефон: 8 499 134-30-83, e-mail: info@nczd.ru, www.nczd.ru

Согласен на обработку персональных данных
«22» 12 2023 года