

ОТЗЫВ

официального оппонента, Заслуженного деятеля науки Российской Федерации, доктора медицинских наук, профессора Царёва Виктора Николаевича – директора Научно-исследовательского медико-стоматологического института (НИМСИ), заведующего кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова Минздрава Российской Федерации 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

С тех времён, когда грудное молоко считалось стерильным субстратом, проведено немало микробиологических исследований, как традиционными, так и молекулярными методами, и по данным разных авторов идентифицировано почти до тысячи видов бактерий, грибов и вирусов, встречающихся в грудном молоке. В значительной части это, разумеется, транзиторная микробиота, но более половины этого числа составляют представителями нормофлоры, которые и образуют микробиом протоков молочных желез и грудного молока. Согласно полученным фактам и современным представлениям (Ruiz L. et al., 2019; Consales A. et al., 2022), этот термин, использованный в диссертационной работе Колыгановой Татьяны Игоревны, безусловно, оправдан и уже не вызывает сомнений, как это было ещё 10-20 лет назад. Считается, что основу микробиома грудного молока составляют представители родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* и *Propionibacterium* (Ojo-Okunola A. et al., 2018), а по обилию и видовому разнообразию первые два рода значительно превосходят остальные (Hunt K.M. et al., 2011).

С другой стороны надо сказать и о наших весьма недостаточных знаниях иммунной защиты на уровне этого важного биосубстрата организма.

Иммунная система ребенка формируется постепенно и для ранних стадий постнатального развития младенца характерна незрелость целого ряда факторов, таких как становление анатомических, физических и химических барьеров, низкое число врожденных эффекторных клеток, замедленная продукция секреторного иммуноглобулина А, недостаточность противовоспалительных механизмов дыхательного и желудочно-кишечного трактов, колонизация микроорганизмами. Данные факторы определяют повышенный риск для здоровья ребёнка и матери в плане возможного инфицирования, снижения уровня защиты от заражения инфекционными агентами.

В значительной степени этот недостаток компенсируется тем, что человеческое грудное молоко содержит целый спектр необходимых питательных веществ и биологически активных соединений, которые поддерживают рост и развитие иммунитета ребенка на всем протяжении вскармливания. Иммунные компоненты представлены гуморальными, клеточными факторами врождённого и адаптивного иммунитета и микробиомом грудного молока, оказывающими прямое воздействие на противомикробную защиту младенцев.

Изменения состава биологически активных соединений молока в результате воздействия демографических, генетических факторов, образа жизни матери могут иметь как положительное, так и отрицательное влияние на здоровье младенцев. Крайне актуальным и имеющим научно-практический интерес является изучение воздействия физиологических, физических и биологических факторов на антимикробные свойства грудного молока и его микробиом.

До последнего времени не проводились также и комплексного исследования по изучению взаимосвязи между спектрофотометрически определенной антимикробной активностью грудного молока на разных периодах лактации и воздействием факторов иммунной системы на микробиом, что указывает на нерешённость ряда важнейших вопросов в этой

области. Вышеизложенное определяет актуальность и научную новизну диссертационной работы Колыгановой Т.И.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Основываясь на глубоком анализе литературных данных, диссертант правильно определила контингент обследуемых и методики комплексного исследования. Среди гуморальных компонентов грудного молока одними из важнейших являются антимикробные пептиды (АМП), такие как лактоферрин, лизоцим, лактопероксидаза и другие, а также иммуноглобулины, среди которых преобладающим является секреторный иммуноглобулин класса А. Именно в этом направлении проведены основные исследования и получены убедительные результаты.

Диссертант обосновала использование комплекса современных методов микробиологических и молекулярно-биологических исследований, что позволило дать комплексную оценку состава и антимикробной активности факторов врождённого иммунитета, содержащихся в грудном молоке матери.

Основные положения, выводы и рекомендации, изложенные в диссертационной работе Колыгановой Т.И., а также адаптированный к исследованию антимикробной активности молока человека и млекопитающих спектрофотометрический метод обоснованы полученными экспериментальными данными.

Научные выводы диссертационной работы Колыгановой Татьяны Игоревны базируются на достаточном объеме фактических результатов, наличием репрезентативного количества образцов биоматериалов и анализе полученных данных с применением современных методов биоинформационного анализа и статистической обработки.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Научная новизна исследования, а также цели и задачи работы подробно и убедительно обоснованы автором во введении диссертации. Диссертантом подробно описана методологическая основа и теоретическая база исследования.

Исследование проведено на достаточной выборке (100 образцов грудного молока, полученных от здоровых матерей в возрасте от 23 до 45 лет на разных сроках лактации), то есть имел место мониторинг запланированных данных при многократных повторных исследованиях.

Научная новизна диссертационного исследования Колыгановой Т.И. заключается в том, что автором:

- применен к исследованию грудного молока человека и молока млекопитающих спектрофотометрический метод, причём впервые продемонстрирована антимикробная активность не только цельной сыворотки, полученной из грудного молока, но и её и фракции ниже 100 кДа, содержащей комплекс АМП;
- впервые спектрофотометрически установлен дозозависимый эффект цельной сыворотки и фракции ниже 100 кДа, содержащей комплекс АМП;
- в результате комплексного исследования установлена взаимосвязь между антимикробной активностью грудного молока, периодом лактации и микробиомом;
- в отношении микромицетов *C. albicans in vitro* обнаружена противомикробная активность физиологических концентраций очищенных препаратов sIgA и лактопероксидазы вне лактопероксидазной системы;
- с использованием комплекса современных методов микробиологических и молекулярно-биологических исследований впервые дана комплексная оценка состава и антимикробной активности факторов врождённого иммунитета, содержащихся в грудном молоке матери.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Результаты диссертационной работы Колыгановой Т.И., несомненно, представляют значительный научный и практический интерес. Применение бактериологического метода, получение чистых культур микроорганизмов и последующая идентификация методом хромато-массспектрометрии дали возможность автору из образцов грудного молока человека выделить 270 бактериальных культур и идентифицировать 36 видов, принадлежащих к 13 родам, а также определить частоту их встречаемости.

Проведенное диссертантом всестороннее изучение особенностей формирования антимикробной защиты грудного молока в контексте его взаимосвязи с микробными, физиологическими и видовыми факторами позволяет оценить иммунологическую состоятельность и полноценность данной биосубстанции. Широкий спектр использованных микробиологических и молекулярно-биологических методов позволили диссертанту получить комплексную картину антимикробной активности молозива, грудного молока, их значимых с точки зрения микробиологии фракций, провести биоинформационный анализ полученных данных и установить или подтвердить многофакторные взаимосвязи.

Примененный автором спектрофотометрический метод оценки антимикробной активности грудного молока и его отдельных компонентов может быть использован в дальнейших научно-исследовательских и практических изысканиях. Сравнение метода спектрофотометрии с традиционным методом посевов и микроскопии для оценки противомикробной активности сыворотки грудного молока показало, что методы микроскопии и спектрофотометрии дают не только сравнимые результаты, но и позволяют более быстро, просто и достаточно точно определить антимикробную активность сыворотки.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 1.5.11 Микробиология, области науки: медицинские науки.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

По материалам 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. Представленные статьи также индексируются в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed. В сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций опубликовано 9 публикаций (1 из них на зарубежной конференции).

Структура и оценка содержания работы

Диссертационная работа построена по общепринятой схеме: 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). Значительная часть представленных литературных ссылок проведена за последние 5 лет. Диссертация содержит 132 страницы машинописного текста, включает 15 рисунков и 10 таблиц.

Во введении отражена актуальность темы исследования, степень её разработанности, цель, задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, личный вклад автора, внедрении полученных результатов в практическую деятельность, а также учебный процесс, сформулированы положения, выносимые на защиту, показана степень достоверности и представлены данные об апробации.

Автор демонстрирует хорошее знание современной научной литературы по изучаемой проблеме. В обзоре литературы подробно и с позиций критического анализа представлены данные по характеристике основных пептидов грудного молока человека и млекопитающих, обладающих противомикробной активностью; микробиому грудного молока и влиянию видовых и физических факторов на антимикробную активность

грудного молока. Проводится оценка современной методологии построения научных исследований и применяемых лабораторных анализов при изучении антимикробных свойств молока.

В главе «Материалы и методы» автор описывает используемые в диссертационной работе практические исследования. Обращает на себя внимание обширный спектр методик и тот факт, что автором были освоены и применены как микробиологические и молекулярно-биологические методы, так и иммунологические методы с последующей статистической обработкой. Диссертация методологически построена таким образом, что содержит две взаимосвязанные части – экспериментальную и собственно клиническую.

Глава 3 посвящена собственным экспериментальным исследованиям.

Автор начинает свою экспериментальную работу с адаптации спектрофотометрического метода к изучению антимикробных свойств грудного молока. Колыганова Т.И. конструирует дальнейший дизайн исследования, подбирая необходимый модельный организм - *C.albicans* ввиду его морфологических преимуществ перед *S.aureus* и *E.coli*.

Для изучения взаимосвязи физиологических (возраст матери и период лактации) и иммунологических показателей сыворотки (содержание пептидов с противомикробной активностью) с антимикробной активностью сыворотки молока автор ранжировал выборку из 66 образцов на 5 групп по периодам лактации и измерил в образцах концентрации sIgA, лактоферрина, сывороточного альбумина, антимикробную активность как в цельной сыворотке молока, так и в её фракции ниже 100 кДа.

Клинико-микробиологическая часть диссертационной работы посвящена исследованию обсеменённости грудного молока условно-патогенной микробиотой. Автором получена исчерпывающая картина микробиома грудного молока человека по данным микробиологических и массспектрометрических методов исследования (выделено 270 бактериальных культур, которые представлены 36 видами, принадлежащими к 13 родам), а также определена частота их встречаемости.

Результаты исследования на всех этапах хорошо иллюстрированы таблицами и рисунками (фотографиями). Особый интерес в работе представляет Таблица 6, являющаяся ключевой для исследования. В ней автор систематизирует взаимосвязь между периодом лактации, антимикробной активностью сыворотки и наличием микроорганизмов в грудном молоке.

Последующие три раздела работы посвящены детальному изучению влияния межвидовых различий и физических факторов на антимикробную активность сыворотки молока. Автор определил, в какой фракции грудного молока (3 кДа, 30 кДа, 100 кДа и цельной) сосредоточена основная антимикробная активность, и как видовые (тип млекопитающего) и физические факторы (пастеризация, замораживание сроком на 3 месяца и лиофилизация) оказывают влияние на эту активность.

В заключении автор обобщает полученные данные и расставляет акценты на наиболее значимых результатах. Материал работы изложен последовательно, обработан статистически и аналитически.

Достоверность результатов диссертационной работы Колыгановой Т.И. обусловлена большим объемом проведенных исследований, а также использованием современных методов исследований и статистической обработки данных.

Результаты, полученные автором, свидетельствуют о решении поставленных задач и согласуются с литературными данными. Положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации научно обоснованы и отражают проведенные исследования.

Диссертация завершается выводами и практическими рекомендациями, содержание которых вытекает из поставленных задач. Выводы логически вытекают из материалов исследования, полностью соответствуют поставленным задачам и отражают основные результаты работы.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание и выводы текста диссертационной работы Колыгановой Т.И. Иллюстрирован 3 таблицами и 2 рисунками.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Принципиальных замечаний по представленной диссертационной работе нет. В ней имеются отдельные стилистические погрешности, не носящие принципиальный характер, которые не умоляют достоинств диссертационного исследования и не снижают научной и практической ценности работы.

В порядке дискуссии хотелось бы уточнить несколько вопросов:

- 1) Антимикробные пептиды (АМП) – дефензины, кателицидин, лактоферрин, лактопероксидаза и другие – обнаруживаются в грудном молоке в нанограммовых концентрациях, каким образом они вносят свой вклад в общую антимикробную активность?
- 2) Учитывая, что механизмы их действия на микробные клетки при всем их разнообразии, сводятся к повреждению клеточных мембран, каковы возможные перспективы применения, например, препаратов лактоферрина?

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Колыгановой Татьяны Игоревны на тему: «Антимикробная активность и микробиом грудного молока на разных сроках лактации» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержатся данные по оценке взаимосвязи между антимикробной активностью сыворотки грудного молока человека и микробиологическими / иммунологическими показателями молока на разных сроках лактации.

Диссертационная работа «Антимикробная активность и микробиом грудного молока на разных сроках лактации» 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 (Сеченовский Университет)» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 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:

Заслуженный деятель науки Российской Федерации,
доктор медицинских наук (03.00.07 (1.5.11) – Микробиология),
профессор Царёв Виктор Николаевич – директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института (НИМСИ), заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова Минздрава Российской Федерации

Согласен на обработку персональных данных
«5» декабря 2023 года



Царёв В.Н.

Подпись доктора медицинских наук, профессора В.Н. Царева заверяю:

Ученый секретарь ученого совета МГМСУ им. АИ. Евдокимова
Заслуженный работник высшей школы Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор

Васюк Юрий Александрович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ) 103475, г. Москва, ул. Долгоруковская, д.4
Тел.(495) 609-67-00 сайт:www.msmsu.ru