

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора, заслуженного деятеля науки Афанасьева Станислава Степановича, главного научного сотрудника Федерального бюджетного образовательного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на диссертационную работу Безродного Святослава Леонидовича на тему «Разработка метода микробиом-ассоциированной экспосомики для интегральной оценки нарушений липидного и углеводного обмена у лиц пожилого возраста» по специальности 1.5.11 — Микробиология.

Актуальность проблемы

Исследование микробиома человека методами персонифицированной медицины является перспективным направлением медицинской и биологической науки. Исследование реакции единой системы макроорганизма и микробиоты с помощью ОМИК-технологий при сахарном диабете и дислипидемии, является актуальной задачей.

Известно, что при сахарном диабете возникают «идеальные» условия для формирования окислительного стресса: увеличивается содержание субстратов окисления (глюкоза и липиды) и уменьшается образование и снижается активность естественных антиоксидантных систем — таких, как глутатион, супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионовая пероксидаза. Окислительный стресс является «универсальной основой» развития всех осложнений при сахарном диабете, обусловленных, в частности, нарушением эндотелиальной функции. По результатам биопсических и морфологических исследований при сахарном диабете установлено, что слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки имеет характерный воспалительный профиль. Слизистая оболочка обильно инфильтрована макрофагами и имеет все признаки иммунной активации.

Таким образом, определяемые в крови компоненты клеточной стенки и мембран микроорганизмов, являются результатом разрушения микроорганизмов свободными радикалами.

Концентрации жирных кислот микробного происхождения несут в себе информацию об активности оксидативного стресса, составе микробиоты, о работе

иммунной системы и многих других процессах. Результат сложно интерпретировать из-за высокой дисперсии значений, поэтому в работе использован аппарат математического моделирования и многомерной статистики, который позволяет получать информацию из сильно зашумленных данных с высокой диагностической точностью.

Тема работы предполагает разработку метода исследования сахарного диабета и дислипидемий у пожилых людей, что является важной задачей для увеличения продолжительности жизни людей. Сама технология может быть использована гораздо шире, так как оксидативный стресс сопровождает не только сахарный диабет, но и атеросклероз, гипертензию, болезнь Альцгеймера и многие другие.

Новизна исследований, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В результате проделанной работы получены важные показатели, имеющие несомненную научную новизну и ценность. С помощью ROC-анализа определены концентрации химических соединений, характеризующие уровень бактериального эндотоксина при оксидативном стрессе, связанном с сахарным диабетом 2 типа у пожилых людей. Определено такое же пороговое значение концентрации для маркера бактериального плазмодогена. Концентрации жирных кислот в крови были сгруппированы в зависимости от фило типа микроорганизма и на этом основании был рассчитан критерий соотношения *Bacteroides* к *Firmicutes* (*B/F*). Для этого критерия также с помощью ROC-анализа была рассчитана пороговая концентрация.

Построенные математические модели линейного дискриминантного анализа позволяют с высокой прогностической точностью определить сахарный диабет 2 типа, дислипидемию и дифференцировать проявления дислипидемий.

Для предиктивной диагностики использованы концентрации компонентов клеточной стенки и мембран микроорганизмов в крови. По сути предлагается новая ОМИК-технология - микробиом-ассоциированная экспосомика, которая ранее нигде в отечественной и зарубежной литературе не встречалась, и вполне могла бы быть вписана в раздел новизна в тексте диссертации.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность полученных данных не вызывает сомнения, так как была проведена объемная работа – 163 образца крови исследованы на содержание жирнокислотного состава газовой хроматографией масс-спектрометрией, проведены биохимические анализы крови. Использована многомерная статистика и математическое моделирование. Написаны программы для ЭВМ. Результаты обсуждались на 8 научных конференциях, опубликованы статьи в рецензируемых журналах, учебное пособие, в автореферате отмечены акты о внедрении.

В диссертации имеются 214 ссылок на литературные источники. Текст диссертации построен в соответствии с ГОСТом объем 150 страниц, 31 таблица, 16 рисунков.

Автореферат отражает основные положения диссертации и написан в соответствии с ГОСТ. В тексте диссертации встречаются опечатки и неточности, некоторые предложения имеют неоправданно сложную структуру, что затрудняет восприятие материала. Тем не менее могу утверждать, что диссертационная работа Безродного Святослава Леонидовича на тему «Разработка метода микробиом-ассоциированной экспосомики для интегральной оценки нарушений липидного и углеводного обмена у лиц пожилого возраста», соответствует специальности: 1.5.11 — микробиология и соответствует требованиям ВАК.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

При описании теоретической значимости диссертационной работы хочется отметить новое направление персонифицированной медицины - микробиом-ассоциированная экспосомика. Микробиом-ассоциированная экспосомика имеет большой информационный потенциал, так как химические соединения микробного происхождения прошли путь от клеточной стенки микроорганизма до кровотока и на их концентрацию повлияли такие факторы как фагоцитоз, оксидативный стресс, проницаемости слизистой оболочки кишечника и многие другие процессы. Оценивается не только состояние микробиома, но и взаимодействие микробиома с макроорганизмом.

Полученные референсные значения маркёров бактериальных эндотоксина и плазмологена указывают на проявления оксидативного стресса, который развивается в результате сахарного диабета 2 типа у пожилых людей. Относительно этих референсных значений можно определить интенсивность оксидативного стресса и оценить динамику лечения.

Экспосомный отпечаток сахарного диабета 2 типа, выраженный в виде классификационных уравнений позволяет дополнить диагностику и расширить возможности диагностики, особенно в случаях со стертой симптоматикой и в сложных случаях, когда пациент болен несколькими заболеваниями одновременно.

Для простоты использования классификационными уравнениями диссертант предлагает удобную и простую компьютерную программу, что называется, с одной кнопкой.

Все вышеизложенное определенно относится к научной и практической значимости работы.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Структура изложения диссертации соответствует ГОСТ: Введение, материалы и методы, обзор литературы, 2 главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и литературы.

Введение посвящено описанию актуальности персонифицированной медицины и ОМИК-технологии в изучении микробиома при сахарном диабете 2 типа и дислипидемии у пожилых людей. Излагается степень разработанности темы - микробиом-ассоциированной экспосомики, как ветви метаболомики человека в развитии направления ОМИК-технологий. Цель исследования состоит в исследовании взаимодействия микробиома и макроорганизма по концентрациям жирных кислот микробного происхождения в крови и изучения этих концентраций с помощью математического моделирования в целевой группе. Задачи описывают пошаговое достижение поставленной цели, начиная с изучения особенностей структуры микробиома у пожилых людей с сахарным диабетом и дислипидемией, построения математических моделей, применения моделей в изучении системы макроорганизм-микробиота и заканчивая написанием программы для ЭВМ.

Сформулирована новизна, теоретическая и практическая значимость работы, описаны методы исследований, положения, выносимые на защиту, личный вклад в выполнение исследования. В разделе материалы и методы большое внимание уделено тонкостям хроматомасс-спектрометрии, а также соотношению микробных маркеров и микроорганизмов, что было бы более уместно описать, на мой взгляд, в литературном обзоре.

Обзор литературы начинается с описания химического состава микробных маркеров и соотношении их с видами микроорганизмов. Убедительно доказывается специфичность и микробное происхождение химических соединений, отобранных для исследований в рамках микробиом-ассоциированной экспосомики.

В следующем разделе обзора литературы Святослав Леонидович подробно останавливается на описании дисбактериоза и современном представлении об этом клинико-лабораторном синдроме. Описывается роль отдельных видов микроорганизмов в дисбиотических изменениях при различных заболеваниях.

Следующие 3 раздела литературного обзора посвящены описанию биохимических особенностей развития дислипидемии, как состояния, предшествующего сахарному диабету 2 типа. Описывается связь нарушений липидного обмена и дисбактериоза кишечника, особенности дислипидемии при сахарном диабете 2 типа.

Заключительный раздел литературного обзора описывает особенности использования математического моделирования в биологии и медицине, с особым акцентом применения линейного дискриминантного анализа.

Резюмирует литературный обзор короткое заключение о важности использования биоинформационных методов при интегральном подходе к изучению здоровья человека.

Результаты собственных описывают подбор критериев интегральной оценки взаимодействия микробиома и макроорганизма по концентрациям микробных маркеров и их производных, а также построение моделей дискриминантного анализа. Во втором разделе собственных исследований, полученные критерии, используются для оценки изменений, происходящих в системе макроорганизм - микробиота при дислипидемии, сахарном диабете 2 типа и при их сочетании.

В качестве интегральных критериев предложены концентрации октадеценового альдегида – микробного маркера бактериального плазмологена, и сумма отдельных гидроксикислот, характеризующих уровень бактериального эндотоксина и отношение концентраций химических соединений, относящихся к *Bacteroides* и *Firmicutes*. Глава собственных исследований начинается с того, что уровень плазмологена и эндотоксина имеют статистически значимые отличия и их можно использовать для оценки эндотоксимии при сахарном диабете. Полученная, в результате ROC-анализа, прогностическая точность на уровне 65-69% и площадь под ROC-кривой 0,74-0,8 характеризуют не высокий уровень классификатора.

Далее автор использует линейный дискриминантный анализ для выявления экспозомного отпечатка сахарного диабета 2 типа и сочетанной дислипидемии. С помощью дискриминантного анализа исследуется влияние разных типов дислипидемий на экспозом человека. Высокие прогностические характеристики, полученных моделей, указывают на тесную взаимосвязь нарушений углеводного обмена со специфическим составом микробиома и процессов, сопровождающих оксидативный стресс. Следует отметить, что методы и результаты дискриминантного анализа описаны очень подробно и несколько избыточно, так как некоторые детали не связаны с обсуждением результатов и выводами и вполне могут быть опущены.

Модель дифференциальной диагностики дислипидемии убедительно показывает какие именно типы дислипидемий имеют статистически значимое влияние на состояние экспозома, а какие не имеют. Так гиперхолестеринемия, как следует из трехмерной диаграммы, не оказывает на экспозом статистически значимого влияния. Исследование дифференциальной диагностики на мой взгляд более логично перенести в главу 3.3, так как эта модель не относится к критериям оценки, а характеризует изменения при различных типах дислипидемий.

В главе 3 с помощью, полученных, критериев характеризуется состояние системы микробиом - макроорганизм при активном использовании частотного, корреляционного, факторного анализа. Полученные результаты свидетельствуют о многократном повышении концентрации малых молекул микробного происхождения в крови, за счет *Fungi* и *Actinobacteria*, при этом количество малых молекул, которые принадлежат *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Proteobacteria* снижается. Нарушения углеводного обмена приводят снижению коэффициента прямой корреляции уровня

глюкозы с представленностью *Firmicutes*. По результатам исследования экспосома математическим моделированием отмечается разнонаправленное влияние дислипидемии и сахарного диабета на систему взаимодействия макроорганизм – микробиота. Дислипидемия мешает развитию нарушений углеводного обмена. При сочетании дислипидемии и сахарного диабета в меньшей степени чем при сахарном диабете без дислипидемии снижается представленность *Firmicutes* и *Fungi*. Повышается количество эндотоксина. Корреляция коэффициента уникальности модели сахарного диабета при сахарном диабете имеет положительный знак – прямая корреляция, а при дислипидемии корреляция обратная. Уверен, что результаты 3 главы будут интересны специалистам в области эндокринологии, так как интерпретация большинства результатов требует анализа специалиста медицинского профиля.

Последний раздел собственных результатов представляет программу Диабет-скрин, выполненную в программе Microsoft Excel. В тексте приведены скриншоты основных окон программы, но отсутствует блок-схема, описывающая алгоритм, что является более важной информацией. Из автореферата следует, что были написаны 2 программы «Диабет-скрин» и «Дислипидемия-скрин», на которые получены авторские свидетельства. Интерфейсы этих программ несколько проще при такой же функциональности. На мой взгляд эти результаты также могли бы быть представлены в тексте диссертации.

По мере изучения текста диссертации возникло несколько вопросов:

1. Вопрос относительно единиц измерения. Уровень бактериального плазмодогена указан в мг/г, а уровень бактериального эндотоксина в наномоль/г. Почему для представления плазмодогена используется массовая концентрация, а для эндотоксина - молярная?

2. Также есть вопросы к методике хроматографии, где указано, что кровь отбирается в количестве 40 мкл, а результат представлен в наномоль/г, хотя пробу не взвешивали.

3. Есть вопрос к аргументации выбора интегральных критериев. В третьей главе показано, что другие параметры, например, общий уровень микробных маркеров, также имеют статистически значимые отличия, значит его тоже можно

использовать, как и другие показатели. На чем основано решение взять именно эти критерии? На чем основано решение взять именно эти критерии? Полученная, в результате ROC-анализа, прогностическая точность на уровне 65-69% и площадь под ROC-кривой 0,74-0,8 характеризуют не высокий уровень классификатора.

Настоящие вопросы носят уточняющий характер и не ставят под сомнение мою положительную оценку настоящей работы.

Заключение диссертации резюмирует полученные данные, которые сравниваются с данным представленными в литературе.

Выводы, сделанные по итогам проведенной работы, соответствуют поставленным задачам. Пункты выводов содержат конкретные ответы, они аргументированы и подтверждены достоверными данными.

Диссертация и автореферат оформлены согласно требованиям ГОСТ. Текст автореферата отражает содержание диссертации в необходимом объеме, в достаточной степени иллюстрирован рисунками и содержит достаточное количество таблиц.

Соответствие специальности

Диссертация Безродного Святослава Леонидовича полностью соответствует специальности 1.5.11 Микробиология (биологические науки).

Заключение

Диссертационная работа «Разработка метода микробиом-ассоциированной экспосомики для интегральной оценки нарушений липидного и углеводного обмена у лиц пожилого возраста», представленная на соискание степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.11 — микробиология является научно-квалифицированным трудом. В результате проведения диссертационного исследования решена актуальная народно-хозяйственная задача – разработки методики микробиом-ассоциированной экспосомики, как инструмента исследования системы взаимодействия макроорганизм – микробиота при дислипидемии и сахарном диабете у пожилых людей.

По своей актуальности, новизне и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке

присуждения ученых степеней» № 842, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Безродный Святослав Леонидович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.11 -микробиология.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник Федерального бюджетного учреждения науки Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки
профессор, доктор медицинских наук 03.02.03 – «микробиология»

Афанасьев Станислав Степанович

Контактные данные:

РФ 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10 Федеральное бюджетное учреждение науки Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора

Тел.: +7 (495) 452-18-16

e-mail: info@gabrigh.ru

Подпись Станислава Степановича Афанасьева удостоверяю

Начальник отдела кадров ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора



Т.М. Лазунина