

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д.208.046.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО 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 ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 02 ноября 2017 г. № 5.

О присуждении Шибаевой Анне Валерьевне, гражданке Российской Федерации, учёной степени кандидата биологических наук.

**Диссертация** «Исследование бактериальных консорциумов в качестве этиологического фактора развития болезней пародонта» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 28.08.2017 г. протокол № 5 диссертационным советом Д.208.046.01 на базе Федерального бюджетного 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 (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10). Диссертационный совет утверждён Приказом Министерства образования и науки РФ № 714/нк «О советах по защите докторских и кандидатских диссертаций» от 2 ноября 2012 г., приказ №1577/нк от 16.12.2016 г. част.изм.

**Соискатель** Шибаева Анна Валерьевна, 1988 года рождения. В 2010 году окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Смоленский государственный университет» по специальности «Химия, биология». Шибаева А.В. в 2010 году поступила в заочную аспирантуру при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук. Работает в должности научного сотрудника лаборатории процессов фотосенсибилизации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

**Научный руководитель** – доктор биологических наук (03.01.03) Шевелёв Алексей Борисович, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, лаборатория процессов фотосенсибилизации, ведущий научный сотрудник.

**Официальные оппоненты:** Припутневич Татьяна Валерьевна - доктор медицинских наук (03.02.03 – микробиология), Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии



имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел микробиологии и клинической фармакологии, заведующая отделом; Ризванов Альберт Анатольевич – доктор биологических наук (03.01.04 - биохимия), Казанский (Приволжский) федеральный университет Министерства образования Российской Федерации, член-корреспондент Академии наук Республики Татарстан, САЕ Трансляционная 7П медицина, заместитель руководителя; кафедра генетики Института фундаментальной медицины и биологии, главный научный сотрудник, профессор; отдел поисковых исследований НОЦ фармацевтики, заведующий отделом – дали положительные отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (г. Москва) в своем положительном заключении, подписанном Ильиной Еленой Николаевной, доктором биологических наук, заместителем директора по научной работе, указала, что диссертация является работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи по исследованию роли эубиотической микрофлоры мягкого зубного налёта в поддержании нормального физиологического статуса пародонта.

**Соискатель имеет** 11 опубликованных работ по теме диссертации, из них 8 работ опубликованы в рецензируемых научных изданиях, 1 – в другом издании, 2 – в материалах конференций, общим объёмом 41 страница и авторским вкладом – 32 страницы. Наиболее значимые работы: 1) Шибаева, А.В. Применение метода ПЦР в реальном времени для изучения микробиома пародонта у пациентов с сочетанной патологией гастродуоденальной зоны и хроническим пародонтитом / А.В. Шибаева, Р.А. Айвазова, Д.В. Ребриков, Е.В. Трубникова, Ю.К. Кудыкина, А.В. Белякова, Р.С. Зарипова, А.Б. Шевелев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2016. - №1. - С. 26-30; 2) Зорина, О.А. Идентификация ключевых элементов нормальной и патогенной микрофлоры, определяющей состояние пародонта, методом NGS-секвенирования банков 16S-рДНК бактериальных консорциумов пародонта / О.А. Зорина, Н.Б. Петрухина, А.А. Басова, А.В. Шибаева, Е.В. Трубникова, А.Б. Шевелев // Стоматология. - 2014. - Т. 93. - № 6. - С. 25-31; 3) Zorina, O. Identification of Key Components of The Healthy Periodontium Microbiome That Protect Against Aggressive Periodontitis by Metagenomic Sequencing / O. Zorina, N. Petrukhina, A. Shibaeva, A. Basova, A. Shevelev // PARIPEX - Indian journal of research. - 2015. - V. 4. - № 5. - P. 109-114.

**На диссертацию и автореферат поступило** 3 положительных отзыва без замечаний от: 1) д.м.н., Алёхина А.И., заместителя главного врача по научной работе ФГБУЗ Центральной клинической больницы Российской академии наук; 2) к.б.н. Брускина С.А., заместителя директора по научной работе, заведующего лабораторией функциональной геномики ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук; 3) д.б.н., доцента Медведевой О.А., Учёного секретаря ученого совета и профессора кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России. В отзывах отмечено, что полученные автором результаты исследования существенно расширили и дополнили



научные знания о составе и механизмах поддержания устойчивости микробиоценоза пародонта в норме и при патологии. Показана важная роль видов *Vellonella parvula* и *Streptococcus sanguinis* в качестве элементов зубиотической микрофлоры пародонта. На основе результатов метагеномного секвенирования банков 16S-рДНК микробных консорциумов мягкого зубного налёта автором разработаны оригинальные тест-системы ПЦР в реальном времени формата Taqman для практического применения в клинической диагностике состояния пародонта.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тематикой научных исследований, компетентностью в вопросах, рассмотренных в диссертации, большим опытом работы в области микробиологической клинической диагностики и методов использования метагеномного анализа в биомедицинских исследованиях.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований научно обоснованы и разработаны предложения по совершенствованию методов исследования микробиоценоза мягкого зубного налёта пациента, а именно, впервые апробированы тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для определения доли в мягком зубном налёте пяти ключевых пародонтопатогенов по Сокранскому: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) и *Treponema denticola*. Разработаны оригинальные тест-системы на основе ПЦР в реальном времени формата Taqman для количественного анализа *V. parvula* и *S. sanguinis*, подтверждена их специфичность в отношении целевых видов бактерий при анализе мягкого зубного налёта. Обосновано и предложено понятие пороговой обсемененности мягкого зубного налёта пародонтопатогенами, позволяющее с высокой достоверностью идентифицировать пациентов с опасным для состояния пародонта уровнем содержания патогенов. Доказано, что хотя пародонтопатогены *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) и *T. denticola* встречаются в составе консорциума мягкого зубного налёта у большинства пациентов как контрольной, так и основной групп, средняя величина доли этих патогенов в консорциуме существенно отличается. Введено понятие кандидатного пародонтопротектора.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что на основании анализа результатов работы доказано существование зубиотического компонента микрофлоры пародонта, повышенное содержание которого в мягком зубном налёте характерно для пациентов с высокой сохранностью пародонта или коррелирует с пониженным содержанием в мягком зубном налёте пародонтопатогенов *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* (*B. forsythus*) и *T. denticola*.

Применительно к проблематике диссертации, результативно использованы возможности количественной ПЦР в реальном времени и комплекс биоинформационных методов исследования, позволивших обнаружить существование устойчивых комплексов пародонтопатогенов, прежде всего комплекса *T. forsythensis* - *T. denticola*. Изложены



представления о существовании гендерных различий в составе микробиоценоза мягкого зубного налета и характере изменений состава бактериального консорциума пародонта у мужчин и женщин, вызванных развитием патологических процессов. Раскрыты значения критических величин обсемененности основными пародонтопатогенами, характерные для нормального пародонта и пародонта в состоянии воспалительного поражения. Изучены корреляционные связи между наличием в микробиоме мягкого зубного налёта сверхкритических долей различных пародонтопатогенов и кандидатных пародонтопротекторов. Проведена модернизация алгоритма вычисления доли пародонтопатогенов и кандидатных пародонтопротекторов с помощью ПЦР в реальном времени формата Taqman путем определения параметра «относительный Ct».

Значение, полученных соискателем результатов исследования для практики, подтверждается тем, что разработанные автором в рамках диссертационной работы тест-системы, на основе ПЦР в реальном времени для определения *V. parvula* и *S. sanguinis* в микробиоме мягкого зубного налета пациентов, серийно выпускаются ООО «Иннотех-21» с ноября 2015г. и используются в работе Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова. Выполненное в рамках диссертационной работы статистическое сравнение контрольной и основной (с агрессивным пародонтитом) групп по представленности в микробиоме мягкого зубного налёта каждой таксономической группировки (OTU) позволило определить пять OTU ранга рода, характерных для здорового пародонта: *Streptococcus*, *Bergeyella*, *Granulicatella*, *Kingella* и *Corynebacterium*. Было также обнаружено 9 OTU ранга рода, ассоциированных с диагнозом «агрессивный пародонтит»: *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Synergistes*, *Tannerella*, *Filifactor*, *Ruminococcus*, *Parvimonas* и *Mycoplasma*. На основании анализа данных метагеномного секвенирования показано, что преобладание родов *Treponema*, *Synergistes* и *Filifactor* сильнее всего ассоциируется с заболеванием, в то время как роды, к которым принадлежат общеизвестные пародонтальные патогены: *Porphyromonas* и *Tannerella*, показывают лишь слабую тенденцию к такой связи. На основании выполненного анализа помимо хорошо известных пародонтопатогенов могут быть предложены и новые виды, определение которых могло бы помочь развитию методов диагностики пародонтита. Создана технологическая документация на производство тест-систем на основе ПЦР в реальном времени для определения *V. parvula* и *S. sanguinis* в микробиоме мягкого зубного налёта пациентов. Результаты исследования были представлены на конференциях и семинарах, посвященных изучению болезней пародонта.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что выводы основаны на большом объёме материала и проведено на высоком научно-методическом уровне с применением молекулярных методов в микробиологии, современных стандартов и подходов к обработке биоинформационных данных, а также сертифицированного




оборудования. Методами ПЦР в реальном времени в ходе экспериментальных работ были исследованы образцы смывов мягкого зубного налета от 153 индивидуальных пациентов, включенных в базу данных исследования. Теория и планирование схемы исследования построены на известном из широкой клинической практики феномене влияния гормонального статуса женщин на состояние их пародонта, хотя исследования гендерного фактора на состав микробиома пародонта ранее не публиковались. Идея базируется на отечественных и мировых научно-исследовательских данных, описывающих такие явления, как «пародонтит беременных» и негативное влияние оральных контрацептивов на сохранность пародонта у женщин детородного возраста. Использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по проблеме количественного исследования состава микробиома пародонта различными методами. Установлено, что большинство результатов исследования согласуется с результатами других авторов, представленными в независимых источниках, хотя зарубежные авторы, за исключением одной работы, акцентировались на анализе твёрдого, а не мягкого зубного налета, а предшествующие диссертационной работе отечественные публикации не содержали сведений об использовании количественной ПЦР, позволяющей достоверно определять долю той или иной бактерии в консорциуме. Используются сертифицированные методы исследования и описательной статистики, компьютерные программы и международные общедоступные базы данных.

Личное участие соискателя заключалось в выполнении молекулярно-биологического анализа образцов клинического материала (выделение ДНК, изготовление банков ДНК для метагеномного анализа, их анализ методом ПЦР в реальном времени), получении результатов, изложенных в диссертации, и их интерпретации. Биологические материалы предоставлены д.м.н. О.А. Зориной (ЦНИИСиЧЛХ Минздрава России), к.м.н. Р.А. Айвазовой (ФГБОУ ВО МГМСУ имени А.И. Евдокимова Минздрава России). Первичная статистическая обработка материалов метагеномного анализа 16S рДНК выполнена совместно с к.б.н. Е.С.Шубиной («ООО «НПО ДНК-Технология», Россия»). Статистическая обработка данных ПЦР проводилась совместно с д.б.н. Е.В. Трубниковой (ФГБОУ ВО КГУ Минздрава России).

На заседании 02 ноября 2017 г. диссертационный совет принял решение присудить Шибаевой Анне Валерьевне учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 12 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология, участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 17, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета,  
доктор биологических наук

 Комбарова Светлана Юрьевна

Учёный секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук – доцент

 Борисова Ольга Юрьевна

02.11.2017 г.