

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Припутневич Татьяны Валерьевны на диссертационную работу Шибаевой Анны Валерьевны «Исследование бактериальных консорциумов в качестве этиологического фактора развития болезней пародонта», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03. – Микробиология

Актуальность темы

Актуальность темы исследования обусловлена тем, что в настоящее время анализ состава микробиоценоза пародонта не используется в клинической практике. Между тем, несмотря на очевидный прогресс в создании новых антибактериальных средств и способов поддержания гигиены полости рта, встречаемость как хронического, так и, в особенности, агрессивного пародонтита неуклонно растёт. За последние десять лет частота встречаемости агрессивного пародонтита у пациентов моложе 25 лет выросла в 8 раз. При этом доля пациентов, страдающих хроническим пародонтитом, в возрасте старше 50 лет приближается к 100%.

Начиная с 1990 года в литературе сформировалось понятие о ключевых пародонтопатогенах «по Сокранскому»: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* и *Treponema denticola*. Однако, вопрос о существовании естественных антагонистов патогенных бактерий, способных выступать в роли пародонтопротекторов, в литературе не рассматривался. Исследование функциональных взаимосвязей между патогенными бактериями в норме и при развитии болезней пародонта способно существенным образом повлиять на подходы к лечению пародонтита. Взамен воздействия на микробиом пародонта в целом с целью снижения его общей бактериальной обсемененности предлагается изыскивать средства направленного воздействия на пародонтопатогены при минимизации воздействия на протекторы. С использованием этого подхода может быть достигнут наиболее длительный и устойчивый лечебный эффект. Современные высокопроизводительные методы молекулярного анализа: метагеномное секвенирование и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени, находят широкое применение в биомедицинских исследованиях. Применение этого нового средства, несомненно, способно резко интенсифицировать накопление новых данных, принципиально углубляющих и расширяющих наши представления о микробных сообществах в целом и в механизме развития пародонтита в частности.

Внедрение методики количественного определения ключевых пародонтопатогенов и пародонтопротекторов с помощью ПЦР в режиме реального времени в практику рутинного пародонтологического обследования является насущной необходимостью, так существующие методы лечения пародонтита не способны обеспечить стойкого эффекта и

дают больному только кратковременное улучшение в виде снятия боли и приостановки разрушения пародонта. Однако, создание эффективных диагностических систем для анализа микробиома пародонта остаётся недостижимым без установления механизмов поддержания стабильности микробиома пародонта и его нарушения при патологии. Данное исследование было нацелено на достижение именно этой цели.

Необходимо отметить, что к началу выполнения диссертационной работы уже были в наличии некоторые технические возможности анализа пародонтопатогенной микрофлоры. Так в 2012 году отечественной компанией ООО "НПФ ДНК-технология" была разработана тест-система «Дентофлор», позволяющая проводить качественное и количественное определение основных пародонтопатогенов *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola* в биологических материалах с помощью ПЦР в режиме реального времени. По качеству изготовления и подходу к выбору праймеров и зондов для обеспечения должной специфичности реакции эта разработка до настоящего времени остается уникальной на мировом уровне. Однако, использование тест-системы «Дентофлор» в интересах клинической диагностики ограничено в виду отсутствия валидированной методики отбора биологического материала, обеспечивающего достоверность анализа, а также алгоритма интерпретации данных анализа в терминах «норма-патология» или «степень тяжести инфекционного процесса». В рамках работы А.В. Шибяевой «Дентофлор» широко использовалась как средство оценки качественных и количественных характеристик препаратов суммарной ДНК, выделяемых из образцов мягкого и твёрдого зубного налёта различными методами. С другой стороны, при проведении работы исследователем ставилась задача охарактеризовать чувствительность и специфичность тест-системы «Дентофлор». В итоге была выработана методика отбора, обработки и исследования проб, способная обеспечить адекватную оценку состояния микробиома пародонта больного, минимально зависящую от неэквивалентности микробиома в различных точках его пародонта. За счёт этого появляется возможность прогнозирования течения заболеваний пародонта. Статистические методы использовались автором для выявления тенденций, характеризующих взаимодействие пародонтопатогенной микрофлоры и человека не только на индивидуальном, но и на популяционном уровне. Это направление анализа данных не преследовало непосредственной цели улучшения рутинной диагностики, а было направлено на выявление новых фундаментальных закономерностей возникновения и течения пародонтита.

Целью работы автор выбрал углубленное изучение состава микробиома пародонта на статистически репрезентативных выборках пациентов пародонтологического профиля с применением комбинации новых методов молекулярного анализа: метагеномного секвенирования и ПЦР в режиме реального времени. В результате такого изучения должны были быть выявлены кандидатные бактерии-пародонтопротекторы и изучен характер их отношений с пародонтопатогенами, а также исследованы закономерности

взаимодействия пародонтопатогенов друг с другом и их патогенетический потенциал.

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

Степень новизны и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации подтверждена большим количеством экспериментальных данных, использованием современного научного оборудования, статистической обработкой материала.

Основные результаты исследований апробированы и представлены на конференциях, а также опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Научная новизна полученных результатов

Научная новизна исследования заключается в доказательстве того, что использование в качестве образца для диагностики мягкого зубного налета пациента более эффективно, чем использование твердого зубного налета. При работе с мягким зубным налетом наблюдается большая сходимость результатов количественного анализа для различных участков пародонта одного больного, чем в случае твердого зубного налета.

С применением метода метагеномного секвенирования банков 16S рДНК проведено комплексное исследование состава микробиома мягкого зубного налета человека. Для сравнительного анализа представленности бактерий на пародонте впервые использованы таксономические группировки низкого ранга: род и вид.

С помощью метагеномного секвенирования банков 16S рДНК микробиома мягкого зубного налета впервые *Veillonella parvula* и *Streptococcus sanguinis* определены как бактерии, ассоциированные со здоровым пародонтом.

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 налета.

С применением разработанных ПЦР тест-систем для количественного анализа *V. parvula* и *S. sanguinis* выявлено, что повышенная доля этих бактерий в мягком зубном налете характерна для пациентов из контрольной группы. Снижение доли кандидатных пародонтопротекторов в составе микробиома пародонта коррелирует с увеличением доли признанных пародонтопатогенов: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola*.

Впервые показаны статистически достоверные гендерные различия содержания пародонтопатогенных бактерий и потенциальных пародонтопротекторов в мягком зубном налете в норме и при патологии.

Tannerella forsythensis, *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra*, *Mycobacterium* Впервые *Veillonella parvula* и *Streptococcus sanguinis* определены как бактерии

Теоретическая и практическая значимость

Данные количественного анализа *V. parvula* и *S. sanguinis* показывают, что повышенная доля этих бактерий в мягком зубном налёте характерна для пациентов из контрольной группы. Данные о том, что снижение доли кандидатных пародонтопротекторов в составе микробиома пародонта коррелирует с увеличением доли признанных пародонтопатогенов: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola*, являются новыми, достоверными и имеют важное значение для решения практических и теоретических задач работы.

Данные, полученные А.В. Шибасовой в рамках диссертационной работы, имеют безусловную практическую ценность для разработки альтернативных подходов к диагностике и лечению различных типов пародонтита путем целенаправленного воздействия на соотношение пародонтопатогенов и кандидатных пародонтпротекторов взамен попыток снижения общей бактериальной обсемененности пародонта.

Результаты диссертационного исследования могут быть включены в учебные, учебно-методические и методические пособия по медицинской микробиологии и пародонтологии.

Достоверность и апробация результатов исследования

Достоверность результатов работы с применением метагеномного секвенирования обеспечивалась точным следованием рекомендациям мирового лидера в этой области, производителем использованного оборудования биотехнологической компанией Illumina Inc (ILMN). Достоверность анализа состава микробиома у пациентов выборки №1 при небольшом числе проанализированных образцов гарантируется высокой плотностью покрытия, составившей более 100 млн. прочтений для каждого образца. Первичные данные метагеномного анализа, приведшие к определению бактерий *V. parvula* и *S. sanguinis* как потенциальных пародонтопротекторов, подтверждены с помощью ПЦР в режиме реального времени на материалах выборки №2, включавшей 153 пациента. Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовались стандартизованные методики, оборудование проходило регулярную поверку. Выполнялась статистическая обработка при помощи лицензионного программного обеспечения с применением метода анализа по Манну-Уитни, Краскаллу-Уоллису и Спирману.

С применением метода метагеномного секвенирования банков 16S рДНК проведено комплексное исследование состава микробиома мягкого зубного налёта человека. Выявлены роды бактерий характерные для здорового пародонта: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Bergeyella*, *Granulicatella*, *Kingella*, *Corynebacterium* и бактерии, ассоциированные с диагнозом «агрессивный пародонтит»: *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Synergistes*, *Tannerella*, *Filifactor*, *Ruminococcus*, *Parvimonas* и *Mycoplasma*. Впервые *Veillonella parvula* и *Streptococcus sanguinis*, определены как бактерии,

ассоциированные со здоровым пародонтом. Результаты метагеномного анализа депонированы в базе данных NCBI BioProject Submissions system под номером доступа ID SUB588191; BioProject ID PRJNA256234

Разработаны оригинальные тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени формата Taqman для качественного и количественного определения *V. parvula* и *S. sanguinis*, обладающие высокой специфичностью в отношении целевых видов бактерий при анализе мягкого зубного налёта в результате получены патенты на изобретение РФ № 2015147190 от 03.11.2015 (решение о выдаче патента 24.01.2017) «Тест-система на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени для количественного определения бактерии-пародонтопротектора *Veillonella parvula*» и патент на изобретение РФ № 2015147189 от 03.11.2015 (решение о выдаче патента 24.01.2017) «Тест-система на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени для количественного определения бактерии-пародонтопротектора *Streptococcus sanguinis*».

С применением разработанных ПЦР тест-систем для качественного и количественного анализа *V. parvula* и *S. sanguinis* выявлено, что повышенная доля этих бактерий в мягком зубном налёте характерна для пациентов из контрольной группы. Снижение доли кандидатных пародонтопротекторов в составе микробиома пародонта коррелирует с увеличением доли признанных пародонтопатогенов: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola*.

Собрана и охарактеризована коллекция образцов ДНК микробиома пародонта от 153 пациентов с различной степенью сохранности пародонта.

Впервые показаны статистически достоверные гендерные различия содержания пародонтопатогенных бактерий и потенциальных пародонтопротекторов в мягком зубном налёте в норме и при патологии.

Необходимо отметить, что в настоящее время в литературе полностью отсутствуют данные, касающиеся гендерных различий в чувствительности пародонта к каким-либо бактериальным патогенам.

На основании полученных данных, диссертантом впервые предложено присвоить бактериям *V. parvula* и *S. sanguinis* статус «потенциальных пародонтопротекторов».

Предложен алгоритм определения порогового уровня обсеменённости мягкого зубного налёта пародонтопатогенами с применением тест-системы «Дентофлор», обеспечивающий возможность интерпретации данных ПЦР-анализа в интересах клинической диагностики (Заявка на патент на изобретение РФ № 2015120411 от 29.05.2015 (решение о выдаче патента 21.10.2016) «Способ оценки обсеменённости пародонта патогенными бактериями с применением полимеразной цепной реакции в реальном времени».

Кроме того, в рамках исследования поданы еще две заявки на патент РФ: заявка на патент на изобретение РФ № 2015120410 от 29.05.2015 (решение о выдаче патента 16.02.2017) «Способ оценки защитной эффективности работы неспецифического иммунитета на поверхности пародонта на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени» и

заявка на патент на изобретение РФ № 2015120412 от 29.05.2015 (решение о выдаче патента 26.09.2016) «Способ определения степени гноетечения на пародонте по уровню мРНК гена интерлейкина-8 (IL-8) человека».

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация изложена на 178 страниц и содержит следующие разделы: введение, материалы и методы, обзор литературы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы и список сокращений. Работа включает 16 рисунков, 40 таблиц. В списке литературы содержится 260 источников, в том числе 30 отечественных и 230 зарубежных авторов.

В результате выполненных экспериментальных работ диссертантом показана целесообразность использования в качестве материала для исследования микробиома пародонта молекулярными методами мягкого зубного налёта. Метагеномный анализ выявил роды бактерий характерные для здорового пародонта: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Bergeyella*, *Granulicatella*, *Kingella*, *Corynebacterium* и роды, ассоциированные с диагнозом «агрессивный пародонтит»: *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Synergistes*, *Tannerella*, *Filifactor*, *Ruminococcus*, *Parvimonas* и *Mycoplasma*. При развитии хронического пародонтита наблюдается тенденция к формированию комплекса, состоящего из патогенов *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola* в мягком зубном налёте. Наиболее устойчивая положительная корреляция наблюдается для видов *T. forsythensis* и *T. denticola*. Содержание в мягком зубном налете *V. parvula* и *S. sanguinis* проявляет статистически достоверную положительную корреляцию со степенью сохранности пародонта и отрицательную – с содержанием в мягком зубном налёте патогенов *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola*, что позволяет рассматривать *V. parvula* и *S. sanguinis*, как потенциальных пародонтопротекторов.

Впервые выявлены существенные различия во взаимозависимостях, определяющих содержание пародонтопатогенов и потенциальных пародонтопротекторов в микробных консорциумах пародонта мужчин и женщин.

В качестве замечаний к работе хотелось бы указать на следующее:

1. Представленные в работе сведения о половозрастной характеристике выборки, участвовавшей в исследовании, свидетельствуют о наличии существенных различий между контрольной и основной группами. Так, средний возраст контрольной группы составлял в среднем $27,7 \pm 10$ лет, а основной - $42,6 \pm 11,3$ лет. Хотелось бы увидеть насколько достоверными могут считаться данные, полученные на столь слабо стандартизованных группах.
2. Для проведения исследования состава консорциумов методом метагеномного секвенирования была сформирована выборка пациентов с агрессивным пародонтитом, в результате чего выявлены потенциальные пародонтопротекторы *V. parvula* и *S. sanguinis*. В дальнейшем проверка

значимости выявленной корреляции между высоким содержанием *V. parvula* и *S. sanguinis* в мягком зубном налёте и высокой сохранностью пародонта проверялась на группах пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом различной степени тяжести. С учетом этого, хотелось бы чтобы автор в обсуждении результатов уделил большее внимание сопоставлению данных метагеномного секвенирования и ПЦР с целью выявления статистических закономерностей, характеризующих представленность «потенциальных пародонтопротекторов *V. parvula* и *S. sanguinis*» в мягком зубном налёте пациентов с агрессивным и хроническим генерализованным пародонтитом различной степени тяжести.

3. В выводе №2 перечислен целый ряд родов бактерий, которые характерны для здорового пародонта для пародонта пациентов с диагнозом «агрессивный пародонтит». Однако, большинство этих родов не исследовались в работе в качестве потенциальных пародонтопатогенов и пародонтопротекторов.

Также по материалам, представленным в работе, возникает вопрос:

Почему при выполнении работы не были использованы методы классической микробиологии? Их применение существенно увеличило бы достоверность выводов значимости *V. parvula* и *S. sanguinis* в качестве потенциальных пародонтопротекторов и позволило бы подтвердить достоверность выводов, полученных с применением молекулярных методов.

Высказанные вопросы и замечания не носят принципиального характера и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы, которая выполнена на высоком научно-методическом уровне и содержит новые важные результаты.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Шибяевой Анны Валерьевны «Исследование бактериальных консорциумов в качестве этиологического фактора развития болезней пародонта» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук Шевелева Алексей Борисовича, имеет существенное значение для микробиологии.

Диссертационная работа Шибяевой Анны Валерьевны «Исследование бактериальных консорциумов в качестве этиологического фактора развития болезней пародонта», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03. – микробиология, по актуальности, научной новизне и практической значимости полученных результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями Постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21 апреля 2016 года, №748 от 02 августа 2016 года, № 650

от 29 мая 2017 года, № 1024 от 28 августа 2017 года «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Шibaева Анна Валерьевна заслуживает присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Доктор медицинских наук, заведующая отделом микробиологии и клинической фармакологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Припутневич Татьяна Валерьевна

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Тел: +7 (495) 4382510

E-mail: t_priputnevich@oparina4.ru

Подпись Припутневич Татьяны Валерьевны заверяю:

Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова»
Минздрава России
кандидат медицинских наук



С.В. Павлович

20 октября 2017