

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Ризванова Альберта Анатольевича 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 работы обусловлена увеличением частоты встречаемости болезней пародонта, отмечающимся в последние годы, прежде всего, в странах с высоким уровнем развития экономики. К потенциальным факторам, ответственным за эту негативную тенденцию, можно отнести изменение качества пищи, загрязнение окружающей среды, усиление стрессовых воздействий на человека и расширение объёмов применяемых медикаментозных средств.

Хотя пародонтит затрагивает абсолютное большинство населения Земли в возрасте свыше 50 лет, механизм развития этого заболевания остаётся недостаточно изученным. Не вызывает сомнений ключевая роль в этом процессе микрофлоры пародонта и неадекватная реакция на неё со стороны иммунной системы человека. Практически все работы по пародонтологии оперируют понятием выявленного в 1990 годах комплекса пяти ключевых пародонтопатогенов по Сокранскому: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) и *Treponema denticola* (Ximenez-Fyvie L.A. et al, 2000). При этом практически не рассматриваются природные антагонисты патогенных бактерий, способные выступать в роли пародонтопротекторов. Функциональные взаимосвязи между патогенными бактериями в норме и при развитии болезней пародонта исследовались в ряде работ, но также нуждаются в дополнительном исследовании (Torrunguang K. et al, 2015, Jünemann S. et al, 2012).

Важным аспектом, способным пролить свет на механизм развития болезней пародонта, является давно отмечаемая клиницистами гормональная зависимость этого процесса. Речь идёт о «пародонтита беременных» и ускорении разрушения пародонта под влиянием оральных контрацептивов (Hajishengallis E. et al, 2014). Тем не менее, до настоящего времени в литературе нет экспериментальных о наличии либо отсутствии гендерно обусловленных различий в составе микробиома пародонта человека.

Внедрение методики количественного определения ключевых пародонтопатогенов и пародонтопротекторов с помощью ПЦР в реальном времени в практику рутинного пародонтологического обследования является насущной необходимостью. Однако, создание эффективных диагностических систем для анализа микробиома пародонта остаётся недостижимым без установления механизмов поддержания стабильности микробиома пародонта и его нарушения при патологии, в том числе, с учётом гендерной специфики пациентов. Представленное на рецензию исследование нацелено на достижение именно этой цели.

Работа посвящена изучению состава микробного консорциума пародонта человека в норме и в условиях развития воспалительных заболеваний пародонта: хронического пародонтита различной степени тяжести или агрессивного пародонтита. Работа выполнялась методами молекулярной биологии: с помощью ПЦР в реальном времени и метагеномного секвенирования. На основании проведенного исследования показана целесообразность использования в качестве материала для исследования микробиома пародонта молекулярными методами мягкого зубного налёта. Проведенный метагеномный анализ позволил выявить роды бактерий характерные для здорового пародонта: *Streptococcus*, *Bergeyella*, *Granulicatella*, *Kingella*, *Corynebacterium* и роды, ассоциированные с диагнозом «агрессивный пародонтит»: *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Synergistes*, *Tannerella*, *Filifactor*, *Ruminococcus*, *Parvimonas* и *Mycoplasma*. Показано, что 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*. Впервые установлено, что содержание в мягком зубном налёте бактерий видов *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 потенциальные пародонтопротекторы. Впервые выявлены существенные различия во взаимозависимостях, определяющих содержание пародонтопатогенов и потенциальных пародонтопротекторов в микробных консорциумах пародонта мужчин и женщин.

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

Полученные результаты впервые экспериментально подтвердили факт существования бактерий, повышенное содержание которых 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* и *T. denticola*. Обоими этими признаками обладают бактерии видов *V. parvula* и *S. sanguinis*, на основании чего предложено присвоить им обозначение «потенциальные пародонтопротекторы». Собрана и охарактеризована коллекция образцов ДНК микробиома пародонта от 153 пациентов с различной степенью сохранности пародонта.

Предложен алгоритм определения порогового уровня обсеменённости мягкого зубного налёта пародонтопатогенами с применением набора «Дентофлор», обеспечивающий возможность интерпретации данных ПЦР-анализа в интересах клинической диагностики.

Теоретическая и практическая значимость

В результате выполнения диссертационной работы показано, что коммерчески доступный набор для количественного анализа пародонтопатогенов «Дентофлор» даёт воспроизводимые результаты при количественном определении основных пародонтопатогенов, за исключением *P. intermedia*, в образцах мягкого зубного налёта, собранных с различных участков пародонта одного пациента. При использовании набора «Дентофлор» для определения в мягком и твердом зубном налёте патогенов *P. intermedia* и *T. forsythensis* наблюдается более существенный разброс результатов между материалом, отобранным с различных зубов, что осложняет прогнозирование состояния пародонта по данным анализа материала, отобранного с одной или нескольких точек пародонта. Однако, значения разброса результатов, полученные для *T. forsythensis* в мягком налёте, несколько ниже, чем в твёрдом. Таким образом, установлено, что достоверная оценка обсеменённости пародонта индивидуального пациента патогенами может быть достигнута при условии отбора серии образцов мягкого зубного налёта с 4-8 и более зубов каждого пациента.

Предложен алгоритм определения порогового уровня обсеменённости мягкого зубного налёта пародонтопатогенами с применением набора «Дентофлор», обеспечивающий возможность интерпретации данных ПЦР-анализа в интересах клинической диагностики.

Создан лабораторный вариант тест-системы для количественного определения в образцах смывов пародонта кандидатных пародонтопротекторов *V. parvula* и *S. sanguinis*, перспективный для использования при оценке эффективности хода лечения пародонтита.

Практическая значимость работы подтверждается наличием у диссертанта 5 заявок на выдачу патентов 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» / Зорина О.А., Аймадинова Н.К., Шибаета А.В., Ребриков Д.В., Трубникова Е.В., Шевелев А.Б., Кудыкина Ю.К., Болдинова Е.О., Петрухина Н.Б., Трофимов Д.Ю. Заявитель и патентообладатель: ЗАО "НПФ ДНК-технология".

• Заявка на патент на изобретение РФ № 2015120411 от 29.05.2015 (Решение о выдаче патента 21.10.2016). «Способ оценки обсемененности пародонта патогенными бактериями с применением полимеразной цепной реакции в реальном времени» / Шибаета А.В., Ребриков Д.В., Трубникова Е.В., Айвазова Р.А., Сунцова А.Ю., Шевелев А.Б., Кудыкина Ю.К., Белоус А.С., Болдинова Е.О., Трофимов Д.Ю. Заявитель и патентообладатель: ЗАО "НПФ ДНК-технология".

• 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» / Зорина О.А., Аймадинова Н.К., Шибаета А.В., Ребриков Д.В., Трубникова Е.В., Шевелев А.Б., Кудыкина Ю.К., Болдинова Е.О., Петрухина Н.Б., Трофимов Д.Ю. Заявитель и патентообладатель: ЗАО "НПФ ДНК-технология".

• Заявка на патент 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*» / Шибаета А.В., Ребриков Д.В., Трубникова Е.В., Айвазова Р.А., Сунцова А.Ю., Шевелев А.Б., Кудыкина Ю.К., Белоус А.С., Болдинова Е.О., Кузнецова Т.В., Трофимов Д.Ю. Заявитель и патентообладатель: ООО "НПФ ДНК-технология".

• Заявка на 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*» / Шibaева А.В., Ребриков Д.В., Трубникова Е.В., Айвазова Р.А., Сунцова А.Ю., Шевелев А.Б., Кудыкина Ю.К., Белоус А.С., Болдинова Е.О., Кузнецова Т.В., Трофимов Д.Ю. Заявитель и патентообладатель: ООО "НПФ ДНК-технология".

Достоверность и апробация результатов исследования

Достоверность результатов работы с применением метагеномного секвенирования обеспечивалась точным следованием рекомендациям мирового лидера в этой области, производителем использованного оборудования компанией Illumina. 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 идентификации видов *V. parvula* и *S. sanguinis*, в качестве потенциальных пародонтопротекторов, были подтверждены с помощью ПЦР в реальном времени на группах, составлявших в сумме 153 человека. Таким образом, статистическая достоверность сделанных выводов о существовании корреляции между повышенным содержанием *V. parvula* и *S. sanguinis* и сохранностью пародонта не вызывает сомнений.

Материалы диссертации были представлены на 2-ой Всероссийской научно-практической конференции по геномному секвенированию «Геномное секвенирование 2014» (Москва, 2014); «Геномное секвенирование 2015» (Москва, 2015); Форуме Университетской науки – 2015. «Научное медицинское прогнозирование: молекулярно-генетические аспекты, триггеры патогенеза, ятрогенные влияния» (Москва, 2015); Тематическом секционном заседании XXXVII Итоговой Научной конференции ОМУ, (Москва, 2015).

Разработанные и апробированные тест-системы позволяют количественно определять содержание доли потенциальных

патодонтопротекторов *V. parvula* и *S. sanguinis* в микробиоме мягкого зубного налета пациентов.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс на кафедре пародонтологии и используются при подготовке студентов и ординаторов в соответствии с ФГОС по специальности «Стоматология терапевтическая», при проведении практических занятий со студентами и ординаторами в рамках курса «Методы обследования и лечения больных с заболеваниями пародонта», а также в лекционном материале по теме «Функциональная диагностика в пародонтологии» ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. Тест-системы для определения *V. parvula* и *S. sanguinis* в микробиоме мягкого зубного налета пациентов серийно выпускаются ООО «Иннотех-21» (акты внедрения от 27.04.2017, 11.05.2017 и 00.00.2017).

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Работа выполнена с применением современных методов исследования, адекватных поставленным задачам. Представленные результаты являются достоверными, так как был проведен достаточный объем исследований. Научные положения и выводы, сформулированные Шибаевой Анной Валерьевной, логически вытекают из результатов проведенных исследований.

По объему проведенных исследований, их новизне и научно-практической значимости работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03. – микробиология.

Несмотря на высокий научный и методический уровень работы, при ознакомлении с её материалами возникает ряд вопросов, нуждающихся в уточнении:

1. Целесообразно также тестирование генома пациентов исследуемых выборок на наличие известных мононуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с предрасположенностью к агрессивному пародонтиту, в

частности, в промоторе гена матриксной металлопротеиназы MMP9 и в гене фактора некроза опухолей. Не исключено, что наличие таких полиморфизмов существенно сказывается на составе микрофлоры пародонта и ее реакцию на различные внешние воздействия.

2. При формировании групп пациентов для исследования не учитывался фактор воздействия на них различных лечебных процедур. На какой стадии терапевтической процедуры находились пациенты в момент отбора образцов.
3. Для оценки разрешающей способности предлагаемого способа диагностики целесообразно было бы проанализировать динамику изменения микрофлоры у пациентов в ходе лечения.
4. Осталось неясным, согласен ли автор с утвердившемся в литературе представлением о высокой значимости вида *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* в качестве фактора патогенности при хроническом и, особенно, при агрессивном пародонтите?

Высказанные вопросы и предложения носят дискуссионный характер и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы.

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 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 Постановления 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 присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03. – микробиология.

Доктор биологических наук, член-корреспондент Академии наук Республики Татарстан, заместитель руководителя САЕ Трансляционная 7П медицина, главный научный сотрудник, профессор кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии, заведующий отделом поисковых исследований НОЦ фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.


Ризванов Альберт Анатольевич

420008, г. Казань, Кремлевская 18
Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Институт фундаментальной медицины и биологии
Телефон: +7 843 293 4307; e-mail: rizvanov@gmail.com

20 октября 2017

