

«УТВЕРЖАЮ»

Директор федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»,  
д.б.н., академик, профессор В.М. Говорун



«19» октября 2017 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации – федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» - на диссертационную работу Шибаевой Анны Валерьевны «Исследование бактериальных консорциумов в качестве этиологического фактора развития болезней пародонта», представленную к публичной защите в диссертационный совет Д 208.046.01 в Федеральном бюджетном учреждении 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 соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03. – Микробиология

**Актуальность темы исследования.** Рецензируемая диссертационная работа А.В. Шибаевой посвящена актуальной в практическом и теоретическом отношении проблеме: изучению состава микробиоценоза пародонта в норме и патологии (при возникновении агрессивного или хронического генерализованного пародонтита). Хронический генерализованный пародонтит встречается практически у всего населения мира в возрасте после 50 лет. Агрессивный пародонтит (юношеский пародонтит наследственной природы), встречающийся у 3-5% населения, в последние 10 лет, показывает ярко выраженную тенденцию к все более раннему началу. При этом до настоящего времени не существует исчерпывающего описания механизма развития пародонтита, представляющего собой прогрессирующее разрушение зубодесневого прикрепления с последующей резорбцией альвеолярной кости и потере зубов. Не вызывает сомнений существенная роль в развитии пародонтита микробиома пародонта, который насчитывает более 2000 видов. При этом

ключевыми пародонтопатогенами считаются *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* и *Treponema denticola*.

В настоящее время лечение пародонтита сводится к применению антибактериальных средств максимально широкого спектра действия в сочетании с мерами, направленными на улучшение гигиены полости рта (удаление мягкого и твёрдого зубного и поддесневого налёта). При этом ни в одной стране мира, включая Россию, в рутинной диагностике не используется анализ качественного и количественного состава микрофлоры над- и поддесневого налета ни методами классической микробиологии, ни с помощью ПЦР. В обоснование укоренившегося подхода к лечению пародонтита, фактически представляющего собой попытку максимально снизить её общую бактериальную обсемененность, в зарубежной литературе выдвигается тезис о ключевой роли в этиологии пародонтита микробной биоплёнки, в состав которой может входить большинство видов бактерий, обитающих в полости рта. При этом приводятся экспериментальные данные, свидетельствующие о повышении потенциала вирулентности комменсальной микрофлоры при включении ее в состав биоплёнки.

Не отрицая значимости фактора формирования биоплёнки, в случае пародонта представляющей собой твердый зубной налет, диссертант высказывает мнение о наблюдаемой неэффективности борьбы с микрофлорой пародонта в целом при лечении пародонтита, поскольку такие меры дают хотя и заметный, но кратковременный, нестойкий терапевтический эффект, не превышающий по длительности нескольких месяцев. Между тем, известны отдельные примеры пациентов, имеющих высокую сохранность пародонта в пожилом возрасте при хронически низком уровне гигиены полости рта. Показано также, что пародонтопатогены встречаются не только у пациентов с поражениями пародонта, но и у большинства лиц с полностью здоровым пародонтом, хотя доля патогенов в консорциуме у них в среднем ниже, чем у пациентов с пародонтитом. Эти примеры косвенно свидетельствуют о существовании эффективных эндогенных механизмов сдерживания экспансии патогенов, к которым могут быть отнесены антогонистические отношения между компонентами микробиоценоза.

С учётом изложенного, в качестве цели диссертации было сформулировано изучение роли антагонистических отношений между компонентами микробиоценоза пародонта, направленное на поиск потенциальных пародонтопротекторов. Необходимо отметить, что такая постановка задачи исследования является оригинальной.

Для достижения цели исследования автор выбрал методы молекулярного анализа ДНК: метагеномное секвенирование с последующей проверкой выявленных закономерностей с

помощью ПЦР в реальном времени. Анна Валерьевна аргументирует этот выбор невозможностью культивирования всех компонентов микробиома пародонта или хотя бы наиболее значимой его части в унифицированных условиях по таким параметрам, как состав среды, газовый состав атмосферы, длительность культивирования. Часть представителей микробиома не удаётся культивировать на искусственных средах. Таким образом, микробиологические методы, позволяя выделить и охарактеризовать отдельные виды бактерий, существенно уступают ПЦР по возможности корректно сравнивать представленность различных компонентов микробиома.

**Степень достоверности результатов исследований, положения и заключения** подтверждены 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.

#### **Научная значимость, теоретическая и практическая ценность исследования.**

В результате выполнения работы впервые доказано, что использование для диагностики состава микробиома пародонта мягкого зубного налёта пациента более эффективно, чем использование твёрдого зубного налёта. При работе с мягким зубным налётом наблюдается большая сходимость результатов количественного анализа для различных участков пародонта одного больного, чем в случае твёрдого зубного налёта.

С применением метода глубокого секвенирования банков 16S рРНК проведено комплексное исследование состава микробиома мягкого зубного налёта человека, выявлены 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*. Впервые идентифицированы виды бактерий, ассоциированные со здоровым пародонтом: *Veillonella parvula* и *Streptococcus sanguinis* Для сравнительного анализа представленности бактерий на пародонте впервые использованы таксономические группировки низкого ранга: род и вид.

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 (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*» и 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*».

С применением разработанных ПЦР тест-систем для 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*.

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

Данные, полученные А.В. Шибяевой в рамках диссертационной работы, имеют безусловную практическую ценность для разработки новых методов диагностики пародонтита с применением ПЦР в реальном времени, а в перспективе и для выработки новых подходов к терапии пародонтита. Результаты диссертационного исследования могут быть использованы в учебном процессе путем включения в учебные, учебно-методические и методические пособия по микробиологии и стоматологии.

**Общая характеристика, структура и оформление диссертации.** Диссертационная работа изложена на 178 страницах машинописного текста и состоит из введения, описания материалов и методик, обзора литературы, 4 глав описания результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы. Библиографический указатель включает 260 источников литературы, из них 30 работ отечественных и 230 работ зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 16 рисунками и 40 таблицами. Работа построена по традиционному плану, содержит введение с формулировкой целей и задач, материалы и методы, обзор литературы, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Автореферат оформлен в соответствии с существующими требованиями и полностью отражает содержание диссертации.

**Пожелания, замечания, вопросы.** Несмотря на высокий уровень результатов работы, наличие в ней большого количества оригинальных результатов, достоверность которых не вызывает сомнений, удачную формулировку целей и задач работы и последовательное описание их решения, на наш взгляд, диссертанту могут быть даны следующие рекомендации:

1) Обзор литературы не в полной мере отражает тематику исследования и является сложным для восприятия неспециалистом в представленной области. В данном разделе не хватает информации об истории развития исследований по данной тематике и актуальности данной проблемы для России.

2) Не совсем ясна роль главы о формировании бактериальных пленок (более 25 страниц). Приводимые в главе данные практически не обсуждаются автором в результатах.

3) Крайне коротко описан метод глубокого секвенирования. По результатам исследования не совсем ясна глубина чувствительности и специфичности выбранного метода метагеномного анализа с использованием небольшого региона 16S рРНК.

4) Результаты исследования метагеномных данных приводятся на уровне идентификации рода. В свою очередь в обзоре литературы говорится о видах. С учетом того, что виды представлены в обзоре однобуквенным родовым названием с точкой, а в дальнейшем видовым названием, то соотносить результаты с обзором литературы представляется сложной задачей.

Завершая сказанное, необходимо подчеркнуть, что сделанные замечания носят рабочий характер и не затрагивают общей оценки работы, как исключительно важного и своевременного исследования, включающего большой массив новых данных в области изучения механизмов патогенеза при пародонтите, связанных с изменениями микробного консорциума пародонта.

**Заключение.** Таким образом, диссертация Шибасовой Анны Валерьевны «Исследование бактериальных консорциумов в качестве этиологического фактора развития болезней пародонта» является законченной научно-квалификационной работой, имеющей существенное значение для микробиологии. Диссертационная работа посвящена актуальной теме, а автор является высококвалифицированным специалистом.

Диссертация Шибасовой Анны Валерьевны на тему «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 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 присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03. – микробиология.

Отзыв на диссертационную работу Шibaевой А.В. подготовлен доктором биологических наук, профессором РАН, заместителем директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России) Ильиной Еленой Николаевной. Отзыв заслушан и одобрен на заседании научного коллоквиума лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов.

Зам. директора по научной работе  
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России  
д.б.н., профессор РАН



Ильина Е.Н.

Подпись Ильиной Е.Н. заверяю  
Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России,  
к.б.н.

Васильева Л.Л.

119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а  
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»  
Тел.: +7 (499) 245-04-71  
E-mail: [ilinaen@gmail.com](mailto:ilinaen@gmail.com)