

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Быкова Анатолия Сергеевича на диссертационную работу ВЕЧЕРКОВСКОЙ МАРИИ ФЕДОРОВНЫ «Оценка микробиоты ротовой полости у детей с онкогематологическими заболеваниями», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы исследования. Микрофлора человека, в том числе и ротовой полости, выполняет жизненно-важные, уникальные функции и, не смотря на это, является малоизученной. Показано, что наличие в микрофлоре условно-патогенных и патогенных бактерий приводит к возникновению различных заболеваний, в частности таких социально значимых заболеваний, как сахарный диабет 2 типа, ожирение, псориаз, бронхиальная астма, атеросклероз и др. С пониманием важности микрофлоры в развитии организма и формировании предрасположенности к широко распространённым патологическим состояниям, возник большой интерес к малоизученной микрофлоре детей. Практически не изученной остается микрофлора детей с онкогематологическими заболеваниями.

Недостаток знаний о составе микрофлоры определяется особенностями её организации, при которой микробы формируют различные смешанные биопленки с зависимостью друг от друга в росте и в их формировании. В лабораторной практике создать такие условия пока не удастся, так как большая часть микрофлоры представлена так называемыми «пока не культивированными» бактериями; их изучение считается одним из самых актуальных направлений современной микробиологии. Изучение подобных бактерий требует работы с большим объемом экспериментальных данных, анализируемых современными компьютерными программами с использованием высокопроизводительных машин. Все это требует определенной систематизации, которую может обеспечить только специализированная база данных. В последние годы появляется все больше примеров выявления некультивируемых бактерий при различных заболеваниях, включая инфекции костей и суставов, преждевременные роды, вызванные инфицированием амниотической жидкости и другие.

Таким образом, тема диссертации Вечерковской М.Ф. по изучению микробиоты ротовой полости у детей с онкогематологическими заболеваниями является важной и актуальной, а выявление в её составе неизвестных ранее бактерий с последующей идентификацией и изучением свойств на основе специально разработанной базы данных представляется приоритетным исследованием.

Степень новизны, обоснованности, достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Поставленные автором цель и задачи исследования успешно выполнены. Результаты проведенных исследований позволили автору сформулировать положения и выводы, характеризующиеся высокой степенью научной новизны.

Так автором установлено, что микробиота детей с онкогематологическими заболеваниями отличается от микробиоты здоровых детей и характеризуется обеднённым разнообразием культивируемых микроорганизмов - отсутствием 3-х грамотрицательных и 2-х грамположительных представителей родов, выявлением дрожжеподобных грибов и повышенной резистентностью к антибиотикам.

Показано, что смешанные бактериальные сообщества, полученные из материала ротовой полости детей, обладают определённой стабильностью, воспроизводятся при пересевах и содержат культивируемые и «пока не культивируемые бактерии», многие из которых не удаётся получить в виде чистых культур на использованных известных питательных средах.

В составе микрофлоры слюны детей с онкогематологическими заболеваниями из смешанных микробных сообществ выделены бактерии, не встречавшиеся в группе здоровых детей, которые по результатам сравнительного анализа последовательностей гена 16S рРНК, полного генома, гибридизации ДНК, данных протеомного, биохимического и морфологического анализа, были идентифицированы как представители нового, ранее неизвестного вида рода *Streptococcus*.

Автором впервые изучен геном нового вида стрептококков, который содержит различные гены патогенности и антибиотикоустойчивости (бета-

лактамаза класса А, устойчивость к гликопептидам) (геном аннотирован в NCBI № CP007628 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP007628.1>) и сиквенс гена, кодирующего 16S рРНК, № KF780584.

Автором также разработана оригинальная электронная база данных результатов проводимых исследований «Microbes», адаптированная для потребностей микробиологических исследований, которая позволяет накапливать и систематизировать данные, получаемые в ходе экспериментов, проводить их анализ с помощью нового биоинформативного алгоритма (получено свидетельство о государственной регистрации №2013620895 от 08 августа 2013 г.

Достоверность и новизна результатов исследования. Исследование, выполненное М.Ф. Вечерковской, носит фундаментально-прикладной характер. Автор использовала адекватные поставленным задачам традиционные микробиологические, биохимические и современные молекулярно-генетические и биоинформативные методы исследования микроорганизмов.

Достоверность результатов исследования не вызывает сомнения, поскольку основана на достаточном объёме материала и современных методах сбора и обработки информации. Статистическая обработка данных проведена с использованием интерактивного языка высокого уровня Octave, содержащая набор инструментов для проведения сложных вычислений и построения графиков. Сиквенс полного генома прошёл оценку специалистами NCBI. Оригинальность разработанной базы данных подтверждена сертификатом Федеральной службы по интеллектуальной собственности.

Полученные данные обработаны и систематизированы с помощью пакетов компьютерных программ и информационных баз данных и представлены в виде таблиц и графических изображений. Основные положения и выводы диссертации отражены в 6 печатных работах, опубликованных в рецензируемых изданиях, патенте на базу данных «Microbes» и в материалах конференций.

Диссертация апробирована на совместном заседании проблемной комиссии «Микробиология и иммунология» и кафедры микробиологии, вирусологии и

иммунологии ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, протокол № 14-12.2 от 22 декабря 2014 года.

Теоретическая и практическая значимость работы подчеркивается новыми данными о микробиоте детского возраста, которые дополняют понимание об изменениях микрофлоры в процессе лечения с применением протоколов, включающих использование цитостатиков и противомикробных препаратов. Разработанная электронная база данных результатов проводимых исследований «Microbes» позволяет оперативно суммировать, сохранять и анализировать информацию, связанную с культивированием смешанных микробных популяций с разделением отдельных их компонентов и идентификацией на основе бактериологических, бактериоскопических, биохимических и молекулярно-генетических методов.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации. Диссертационная работа изложена на 160 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, приложений и списка использованных данных литературы, который содержит 519 источников, в том числе 32 отечественных и 487 зарубежных авторов. Она иллюстрирована 16 таблицами и 30 рисунками.

В введении автор обосновывает актуальность, анализирует степень разработанности темы исследования, формулирует цель и задачи. Им сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, а также изложены методология и методы, используемые в работе.

В главе 1 представлен аналитический обзор данных литературы, в котором описаны нормальная микрофлора ротовой полости детей, свойства биоплёнок, роль внеклеточной ДНК и некодирующих РНК в формировании биоплёнки. Рассмотрены механизмы коммуникации микроорганизмов в биоплёнках, включая кворум сенсинг и основные бактериальные молекулы, участвующие в межклеточной коммуникации. Большое внимание уделено новой области исследования в микробиологии - некультивируемым бактериям. Рассмотрены

основные причины «некультивируемости» и подходы к изолированию «пока некультивируемых» микроорганизмов. Специальные разделы посвящены освещению влияния полихимиотерапии на микробиоту детей с онкогематологическими заболеваниями и проблемам систематизации информации в биологии, в том числе базам данных.

В главе 2 приведена оценка состава микрофлоры полости рта здоровых детей и детей с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии. Результаты сравнительного изучения микробиоты микроскопическими и культуральными методами показали, что около 70% микроорганизмов, выявленных при микроскопии, можно отнести к «пока не культивируемым», что соответствует современным результатам, получаемым при аналогичных исследованиях другими авторами. У детей с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии, удалось выделить и идентифицировать меньшее количество родов микроорганизмов хотя на момент исследования дети не получали противомикробную терапию в течение 3 и более месяцев. Установлено, что имеются различия в распространении антибиотикоустойчивости в микрофлоре здоровых и больных детей. Автор приходит к заключению, что это может быть связано с длительным применением в период лечения противомикробных препаратов различных групп у детей с онкогематологическими заболеваниями и что такое распространение генов антибиотикоустойчивости среди представителей нормальной микрофлоры представляет потенциальную опасность, поскольку в ее состав входят и условно-патогенные микроорганизмы.

Глава 3 посвящена выявлению и генетической идентификации ранее неизвестной бактерии, обнаруженной в слюне шести детей с онкогематологическими заболеваниями в стадии ремиссии. Получена чистая культура грамположительных бактерий, которая после детального изучения, в том числе, с использованием систем Vitek 2 и Bruker Biotyper, а также анализа изученных последовательностей гена, кодирующего 16S рРНК, не могла быть четко идентифицирована, что потребовало дальнейшего полно-геномного

исследования. Приведены подробные данные о результатах сиквенирования генома и его сборки и аннотации. Полученные результаты указывают, что в геноме бактерий данного штамма содержатся гены (присущие патогенным и условно-патогенным бактериям), обеспечивающие гемолиз, адгезию и антибиотикоустойчивость, причём к широкому спектру препаратов, включая сравнительно редко применяемые пептидные препараты, типа тейкопланина. Эти гены не транслировались в использованных стандартных условиях определения данных свойств. В данном исследовании при использовании стандартных методик, выделенный штамм был чувствителен ко всем испытанным антибиотикам. Полученные данные позволили автору обоснованно предположить, что данный штамм персистирует и распространяется среди больных, скорее всего, находящихся на стационарном лечении.

Для уточнения положения изолированного штамма в систематике автор приводит результаты выполненной им виртуальной ДНК-ДНК гибридизации с геномами сравниваемых организмов. Полученные данные об уровне сходства свидетельствуют, что автору удалось изолировать неизвестный ранее вид стрептококков.

Глава 4 суммирует результаты создания базы данных результатов исследования.

В связи с необходимостью учета и анализа комплекса выполненных исследований (полуавтоматические методы идентификации, световая, электронная и люминесцентная микроскопия, сиквенирование, анализ отдельных генов и полных геномов бактерий), а так же полученных результатов в виде огромного количества информации в разнообразных форматах (текстовые документы, таблицы, рисунки, фотографии, файлы с нуклеотидными последовательностями, отчёты систем идентификации и др.) возникла потребность их быстрой и чёткой систематизации, с возможностью доступа одновременно к результатам различных этапов нескольких опытов. Поэтому, перед началом работы, диссертантом была создана база данных «Microbes». Разработанная и запущенная база данных, предназначена в первую очередь для

исследований, направленных на многопрофильное научное изучение большого числа микроорганизмов. База позволяет не только контролировать и анализировать большие объёмы разнородной информации, но и оперативно сравнивать данные, полученные разными специалистами, работающими в этом проекте.

Раздел «Заключение» содержит обобщение основных положений диссертации. Тема диссертации, основные положения и выводы полностью соответствуют специальности 03.02.03 – «Микробиология», как и автореферат, который также соответствует содержанию диссертации и удовлетворяет современным требованиям ВАК РФ и ГОСТ 7.0.11. – 2011.

Принципиальных замечаний по существу работы нет. Имеются отдельные стилистические неточности и неудачные обороты, не умаляющие достоверности и значимости полученных автором результатов.

Вопрос по теме диссертации: Считаете ли Вы удобным для исследования метод лазерной микродиссекции?

Заключение

Диссертационная работа Вечерковской Марии Фёдоровны «Оценка микробиоты ротовой полости у детей с онкогематологическими заболеваниями», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора В.В. Теца.

Она содержит новое решение актуальной научной проблемы изучения микрофлоры ротовой полости здоровых и больных детей, с выделением бактерий ранее неизвестного вида, и по своей актуальности, новизне и практической значимости отвечает требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор –

Вечерковская Мария Фёдоровна заслуживает присвоения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент – профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (103009, Москва, ул. Моховая, д.11, стр.10, тел. +7 (495) 629-75-79, byukov@mail.ru) доктор медицинских наук, профессор

Подпись Быкова Анатолия Сергеевича
заверяю



А.С. Быков (А.С. Быков)

