

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 07 апреля 2016 г. № 2.

О присуждении Чаплину Андрею Викторовичу, гражданину РФ, ученой степени кандидата медицинских наук.

Диссертация «Сравнительная геномика штаммов *Bifidobacterium longum*, выделенных из кишечника здоровых людей» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 01 февраля 2016 г. протокол № 1 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 утвержден Приказом Министерства образования и науки РФ № 105/нк «О советах по защите докторских и кандидатских диссертаций» от 11 апреля 2012 г. к приказу № 219 от 05.03.15 г. част. изм.

Соискатель Чаплин Андрей Викторович 1990 г. рождения. В 2012 г. закончил медико-биологический факультет Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, по окончании присвоена квалификация врача-биохимика по специальности «медицинская биохимия». С 2012 по 2015 г. проходил обучение в аспирантуре по специальности «микробиология» в ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Работает в должности ассистента кафедры микробиологии и вирусологии в ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Диссертация выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель – доктор медицинских наук (03.02.03 – микробиология), профессор Ефимов Борис Алексеевич, ГБОУ ВПО «Российский национальный

исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии профессор.

Официальные оппоненты: Припутневич Татьяна Валерьевна – доктор медицинских наук (03.02.03 – микробиология), ФБУН «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел микробиологии и клинической фармакологии заведующая; Николаева Елена Николаевна – доктор медицинских наук (03.00.07 – микробиология, 14.00.36 – аллергология и иммунология), профессор, ГБОУ ВПС «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии, профессор – дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном Быковым Анатолием Сергеевичем, доктором медицинских наук, профессором, кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, профессор кафедры, указала, что диссертационная работа содержит новое решение актуальной научной задачи – изучение характеристик внутривидовой генетической изменчивости и способности к долговременной персистенции штаммов *Bifidobacterium longum*.

Соискатель имеет 10 опубликованных работ, в том числе, по теме диссертации – 4 работ, из них 3 работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, 2 – в материалах научно-практических конференций. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации: 1) Чаплин, А. В. Изучение видового разнообразия бактерий рода *Bifidobacterium* кишечной микрофлоры с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии / А.В. Чаплин, А.Г. Бржозовский, Т.В. Парфёнова, Л.И. Кафарская, Н.Н. Володин, А.Н. Шкопоров, Е.Н. Ильина, Б.А. Ефимов // Вестник РАМН. – 2015. – Т. 70. – № 4. – С. 435-440. doi:10.15690/vramn.v70.i4.1409 2) Shkoporov, A. N. Draft Genome Sequences of Two Pairs of Human Intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Strains 44B and 1-6B and 35B and 2-2B, Consecutively Isolated from Two Children after a 5-Year Time Period / A. N. Shkoporov, B. A. Efimov, E. V. Khokhlova, A. V. Chaplin, L. I. Kafarskaya, A. S. Durkin, J. McCarrison, M. Torralba, M. Gillis, G. Sutton, D. B. Weibel, K. E. Nelson, V. V. Smeianov // Genome Announc. – 2013. – Т. 1 – № 3. PMID: 23682142. doi: 10.1128/genomeA.00234-13 3) Chaplin, A. V. Intraspecies Genomic Diversity and Long-Term Persistence of *Bifidobacterium longum*. / A. V. Chaplin, B. A. Efimov, V. V. Smeianov, L. I. Kafarskaia, A. P. Pikina, A. N. Shkoporov // PLoS One. – 2015. – Т. 10 – № 8. PMID: 26275230. doi: 10.1371/journal.pone.0135658.

На диссертацию и автореферат поступило 4 положительных отзыва без критических замечаний: 1) д.б.н., доцента Стояновой Л. Г., ведущего научного

сотрудника лаборатории физиологии и биохимии микробов кафедры микробиологии биологического факультета ФГБУ ВО "МГУ имени М.В.Ломоносова"; 2) д.б.н. профессора Гельфанда М. С., заместителя директора по научным вопросам ИППИ РАН 3) к.м.н., доцента, Мельникова В. Г., ведущего научного сотрудника ФБУН ЦНИИС Роспотребнадзора; 4) к.м.н., Воложанцева Н. В., заведующего лабораторией молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН ГНЦ ПМИ Роспотребнадзора. В отзывах отмечены большой объем научно-исследовательской работы, разнообразие и современность примененных методов, глубокий анализ экспериментальных данных и аккуратность при использовании статистических методов. В отзыве д.б.н., доцента Стояновой Л.Г. рекомендовано использование более правильных терминов «микробиота» и «микробиом» вместо термина «микрофлора». В отзыве д.б.н., профессора Гельфанда М. С. отмечается низкое разрешение модели степенного закона для оценки роста пан-генома и предлагается использование таких методов, как нижняя граница Чао или биномиальная смесь.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тематикой их научных исследований, компетентностью в вопросах, рассмотренных в диссертации, большим опытом работы в области микробиологии и молекулярно-генетических исследований.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработан подход к оценке внутривидовой генетической изменчивости бактерий на основании финализированных и собранных до уровня контигов полных геномных последовательностей и применен для изучения внутривидового разнообразия представителей вида *Bifidobacterium longum*. Предложены филогенетические деревья анализ генов гликозил-гидролаз, общего набора генов и средней нуклеотидной идентичности, которые обосновывают разделение *B. longum* на монофилетичные клады. Доказаны высокая активность горизонтального переноса генов на уровне последовательностей консервативных генов и общего набора групп ортологов *B. longum* а также открытая структура пан-генома подвида *B. longum* subsp. *longum*, что в сумме формирует концепцию о низком вкладе клональной структуры популяции в генетическую изменчивость. Определены нуклеотидные последовательности геномов 12 штаммов *B. longum*, собранные до уровня контигов, а также последовательности плазмид, представленных в данных штаммах (идентификаторы доступа GenBank JNWC00000000, JNVX00000000, JNVZ00000000, JNWA00000000, JNVY00000000, JNWC00000000, JNWD00000000, JRWN00000000, KP691640, KP691636, KP691641, KP691639, KP691635, KP691633, KP691637, KP691638). Введены новые понятия о долговременно персистирующих внутривидовых группах *B. longum* в микрофлоре кишечника человека, что раскрывает подробности внутривидовой динамики бифидобактерий в периоде взросления.

Теоретическая значимость исследования обусловлена тем, что доказана применимость концепции распределенного генома к бактериям вида *B. longum* выражающаяся в большом объеме пан-генома и существовании большого числа фенотипически значимых неконсервативных элементов генома, а также в выраженности горизонтального переноса генетической информации. Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс микробиологических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов исследования. Изложены подходы внутривидового сравнительно-геномного анализа в применении к собранным до урсви-контигов геномным последовательностям непатогенных бактерий в аспекте оценки вклада горизонтального переноса генов. Раскрыты особенности внутривидовой геномной изменчивости *B. longum* и состава отдельных частей пан-генома *B. longum* subsp. *longum* показана перепредставленность генов синтеза поверхностных структур среди штаммоспецифических генов, что отражает высокую степень варибельности наружных элементов бифидобактериальных клеток. Изучены ранее не описанные семейства систем CRISPR-Cas и плазмид бифидобактерий и осуществлен анализ встречаемости ранее описанных локусов бифидобактерий, кодирующих белки с пробиотическими свойствами, что может в значительной степени объяснять особенности фенотипа штаммов *B. longum*. Проведена модернизация подходов к видовой идентификации бифидобактерий и расширены представления о различиях подвидов *B. longum* основывающихся на тотальном наборе генов, реконструкции филогении и спектре семейств гликозил-гидролаз.

Значение полученных результатов для практики подтверждается тем, что разработаны подходы для сравнительного анализа геномов бифидобактерий и создана компьютерная база данных, характеризующая представленность различных групп ортологов в геномах *B. longum* и позволяющая проводить анализ структуры пан-генома, исследовать распространенность групп ортологов различных функциональных классов и оценивать схожесть штаммов по тотальному набору генов. Результаты исследования внедрены в материалы лекций кафедры микробиологии и вирусологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова для студентов лечебного и педиатрического факультетов, аспирантов, ординаторов хирургического профиля, врачей-специалистов перинатальной медицины и педиатров. Разработанная база данных групп ортологических генов используется для филогенетических исследований бактерий нормальной микрофлоры кишечника человека в научной работе кафедр микробиологии и вирусологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова (акт внедрения от 07.12.15). Биоинформатические подходы применяются для сравнительно-геномного исследования молекулярно-генетических особенностей возбудителей дифтерии и коклюша в Референс-центре по мониторингу за возбудителями дифтерии и коклюша ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора (акт внедрения от 03.12.15). Представлены практические рекомендации для

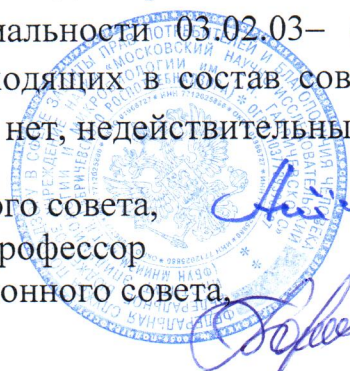
конструирования пробиотических препаратов и генной инженерии бифидобактерий, основанные на описанных в пределах данной работе переменных элементах генома *B. longum*.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что исследование основано на большом объеме материала и проведено на высоком научно-методическом уровне с использованием современных подходов к обработке данных, включающих поиск ортологов, реконструкцию филогении, и разработку реляционной базы данных для эффективного анализа. Теория построена на основе существующих представлений о генетическом разнообразии бактерий и согласуется наблюдаемыми в геномных последовательностях закономерностями. Идея базируется на большом объеме сведений о функциях отдельных генов бифидобактерий и развитых представлениях об их взаимодействиях в микрофлоре кишечника человека. В работе использовано сравнение авторских данных с данными, полученными ранее по выбранной тематике. Установлено совпадение результатов внутривидовой филогенетической реконструкции с существующей таксономией, а также соответствие представлений о сахаролитической активности представителей подвидов *longum* и *infantis* с данными анализа генов гликозил-гидролаз. Используются современные методы анализа биологических последовательностей и статистические критерии с необходимыми проверками применимости и внесенными поправками на множественные сравнения.

Личный вклад соискателя состоит в самостоятельном выполнении всех этапов молекулярно-генетических исследований, биоинформатического анализа полученных данных, статистической обработки и теоретического обобщения полученных результатов. Бактериологическое исследование, а также выделение ДНК проводились совместно с сотрудниками НИЛ микробиологии и биологической безопасности ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова: старшим научным сотрудником к.м.н. Шкопоровым А.Н. и лаборантом Бржозовским А.Г., а также с сотрудниками лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России Парфёновой Т. В. и д. б. н., профессором Ильиной Е. Н.

На заседании 07.04.2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Чаплину Андрею Викторовичу ученую степень кандидата медицинских наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 12 докторов наук по специальности 03.02.03– «микробиология», участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени - 18, против - нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор
Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук
07.04.2016 г.



Алешкин Владимир Андрианович

Борисова Ольга Юрьевна