

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 350.002.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 26.10.2018 г. № 14

О присуждении Кошечкину Станиславу Игоревичу, гражданину РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка диагностической панели для изучения видового разнообразия вагинальных лактобактерий и оценки состояния вагинальной микробиоты» по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 24.08.2018 г., протокол № 9 диссертационным советом Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, Оболенск, приказ о создании №714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Кошечкин Станислав Игоревич 1989 г. рождения, в 2011 г. окончил «Иркутский государственный университет» по специальности «Биология», с 2012 г. работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт молекулярной генетики» Российской академии наук, лаборатория молекулярной диагностики (в 2018 г. реструктуризирована в Центр коллективного пользования «Центр клеточных и генных технологий»), инженер. Кошечкин Станислав Игоревич в 2011 г. поступил в аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт

молекулярной генетики» Российской академии наук, окончил аспирантуру в 2015 г.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярной диагностики (в 2018 г. реструктуризирована в Центр коллективного пользования «Центр клеточных и генных технологий») Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной генетики» Российской академии наук.

Научный руководитель – кандидат медицинских наук Демкин Владимир Витальевич, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной генетики» Российской академии наук, заведующий Центром коллективного пользования «Центр клеточных и генных технологий».

Официальные оппоненты:

Лахтин Владимир Михайлович, доктор биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов, главный научный сотрудник,

Мавзютов Айрат Радикович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, заведующий,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном Припутневич Татьяной Валерьевной, доктором медицинских наук, отдел микробиологии, клинической

фармакологии и эпидемиологии, заведующей, указала, что диссертационная работа Кошечкина С.И. является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной проблемы видоспецифической детекции вагинальных лактобацилл. Использование однокопийного гена *rplK*, кодирующего рибосомальный белок L11, в качестве мишени позволило создать идентификационные тест-системы, которые обладают высокой специфичностью и эффективностью. Это открывает большие перспективы в изучении фундаментальных и прикладных аспектов роли лактобацилл в составе микробиоты репродуктивного тракта женщин. Появляются новые возможности в создании биопрепаратов на основе видов лактобацилл, формирующих нормоценозы. Использование современных методов исследования, их адекватность поставленным задачам, большая теоретическая и практическая значимость полученных результатов дают основание считать, что диссертационная работа С.И. Кошечкина по актуальности темы, научной новизне и практической значимости полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ (Постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., в редакции Постановления Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Кошечкин Станислав Игоревич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Соискатель имеет 7 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 7 работ, в том числе опубликованных в зарубежных рецензируемых научных изданиях - 2 статьи и 5 работ, опубликованных в материалах научных конференций и симпозиумов. Авторский вклад в опубликованных работах составляет 75 %, объем работ – 1,4 п.л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Demkin, V.V., Characterization of vaginal *Lactobacillus* species by *rplK* - based multiplex qPCR in Russian women / V.V. Demkin, **S.I. Koshechkin** // **Anaerobe**. – 2017. – Vol. 47 – P. 1 – 7. **Impact Factor 2,80**

2. Demkin, V.V. A novel real-time PCR assay for highly specific detection and quantification of vaginal lactobacilli / V.V. Demkin, **S.I. Koshechkin**, A. Slesarev // **Mol. Cell. Probes.** – 2017. – Vol. 32. – P. 33 – 39. **Impact Factor 1,61**

3. **Кошечкин, С.И.** Анализ видового состава лактобактерий в микробиотах влагалища у женщин репродуктивного возраста методом ПЦР в реальном времени / **С.И. Кошечкин**, В.П. Карлина, Р.А. Кузьмичева, В.В. Демкин // Молекулярная диагностика. Сб. трудов колл. авт. под ред. В.И. Покровского. – Т. 1. – М.: ООО "Издательство МБА", 2014 – С. 181 – 182. **ISBN 978-5-906325-79-2 ISBN 978-5-906325-81-5**

На диссертацию и автореферат поступили положительные отзывы без замечаний от: (1) д-ра мед. наук **Рахматулиной Маргариты Рафиковны**, профессора кафедры дерматовенерологии и косметологии с курсом клинической и лабораторной диагностики Государственного научного центра «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России, г. Москва; (2) канд. мед. наук **Большенко Натальи Викторовны**, и.о. заведующей отделением дерматовенерологии областного кожно-венерологического диспансера, дерматовенеролога Научно-консультативного клиничко-диагностического центра ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва; (3) д-ра биол. наук, профессора **Хмель Инессы Александровны**, зав. лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов ФБУН «Институт молекулярной генетики» РАН, г. Москва.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов Лахтин Владимир Михайлович является компетентным специалистом в сфере микробиологии и биотехнологии, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Кошечкина С.И. (**Иммунол.** – **2015.** – Т. 36. – № 3. – С. 176-183; **Леч. Профилакт.** – **2015.** – № 2(14). – С. 28-33; **Иммунол.** –**2015.** – Т. 36. – № 5. – С. 290-295; **Бюлл. Вост.-Сиб. науч.**

центр. Сиб. отд. Росс. акад. мед. наук. – 2015. – № 5. – С. 113-122, С. 88-93; **Мед. Иммунол.** – 2015. – Т. 17. – С. 116; **Эффект. Фармакотер.** – 2013. – № 27. – С. 6-11); доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки Республики Башкортостан, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии Мавзютов Айрат Радикович является признанным специалистом в области молекулярной микробиологии и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Кошечкина С.И. (**Биохим.** - 2014. - Т. 79. - № 2. - С. 178-186; **Биорг. Хим.** - 2014. - Т. 40. - № 2. - С. 186; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** - 2014. - № 5. - С. 99-110; **FEBS Lett.** - 2015. - Vol. 589. – No. 15. - P. 1819-1824; **Биорг. Хим.** - 2014. - Т. 40. - № 3. - С. 297; **Мед. Вестн. Башкорт.** - 2016. - Т. 11. - № 3 (63). - С. 20-22; **Пробл. Мед. Микол.** - 2016. - Т. 18. - № 2. - С. 129; **Мол. Генет. Микробиол. Вирусол.** - 2017. - Т. 35. - № 3. - С. 103-108.).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области разработки новых средств, технологий и способов диагностики, лечения и профилактики инфекционных и неинфекционных заболеваний репродуктивного тракта женщин, а также наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Кошечкина С.И. (**Bull. Exp. Biol. Med.** –2016. –Т. 160. – № 6. – С. 783-786; **Хим.-Фарм. Журн.** – 2016. – Т. 50. – № 9. – С. 7-9; **Междунар. Журн. Прикл. Фунд. Иссл.** – 2016. – № 8-2. – С. 198-202; **Bull. Exp. Biol. Med.** – 2015. –Т. 158. – № 1. – С. 112-114; **Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер.** - 2015. - Т. 17. - № 4. - С. 318-327; **Акушерство Гинекол.** - 2016. - № 11. - С. 71-78; **Гинекология.** - 2017. - Т. 19. - № 6. - С. 11-15.)

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана не имеющая аналогов в мире панель тест-систем для видовой идентификации вагинальных лактобактерий и оценки состояния вагинальной микробиоты на основе технологии количественной ПЦР в реальном времени,

которая позволяет одновременно оценить долю лактобактерий в общей бактериальной массе и идентифицировать не менее 11 видов лактобактерий;

предложена новая генетическая мишень для детекции и идентификации вагинальных лактобактерий – ген *rplK*, кодирующий синтез рибосомального белка L11;

доказано, что использование гена *rplK* в качестве мишени для идентификации видов лактобактерий, повышает специфичность идентификации и расширяет спектр идентифицируемых видов, что продемонстрировано на примере сравнения при использовании в качестве мишени с гена *tuf*;

введены новые уточняющие сведения об интерпретации результатов ПЦР-реакции с помощью одной пары праймеров в случае присутствия в реакции более одной ДНК-мишеней: количественная оценка присутствия каждой из ДНК-мишеней может быть произведена достоверно только в случае, если их концентрации отличаются не более чем в 5 раз; одновременная детекция нескольких видов бактерий возможна только, если их численность различается не более чем в 10 раз.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что в Европейской части России распространенность доминирующих видов вагинальных лактобактерий совпадает с общемировыми данными: вне зависимости от города проживания и возраста пациенток, у них наиболее часто встречаются виды *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. gasseri*, при этом подтверждена ассоциация *L. crispatus* с нормоценозом, а *L. iners* - с дисбиозом;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования, в том числе методы поиска консенсусных мотивов в геномах микроорганизмов на основе оригинального программного обеспечения, разработанного в лаборатории диссертанта; биоинформатические методы, в том числе методы анализа динамических характеристик разрабатываемых олигонуклеотидов;

молекулярно-генетические методы, в том числе выделение ДНК из различных материалов, электрофорез в агарозном геле, мультиплексная ПЦР в реальном времени, определение концентрации и секвенирование ДНК; статистические методы, в том числе методы линейной и логарифмической регрессии, для калибровки и валидации количественных ПЦР тест-систем;

изложены закономерности распространения доминирующих видов лактобактерий в Европейской части России: в 77 % образцов доминировал только один вид лактобактерий, в 21 % присутствовали два вида, и только в 1,6 % проб встречались три доминирующих вида лактобактерий; наиболее часто встречались виды *L. iners* и *L. crispatus*, реже - *L. jensenii* и *L. gasseri*;

раскрыты противоречия между данными о распространенности доминантных видов лактобактерий, полученными биохимическими и молекулярно-генетическими методами: по данным биохимической идентификации в вагинальной микробиоте могут встречаться до 20 видов лактобактерий, а по данным ПЦР доминантными компонентами вагинальной микробиоты являются 4 вида, остальные либо встречаются крайне редко, либо являются минорными;

изучена распространенность вагинальных микробиот, в которых лактобактерии не являются доминирующим компонентом (по данным зарубежных авторов, до 20 % от общего числа женщин обладают микробиотой такого типа), автор диссертационного исследования показал, что среди женщин, проживающих в Европейской части России, вагинальная микробиота без лактобактерий характерна лишь для 3 % популяции;

проведена модернизация биотехнологических процедур и математических алгоритмов обчета общего содержания лактобактерий относительно общей бактериальной массы, что позволило получить более точные данные в сравнении с используемыми на данный момент тест-системами; предложена новая генетическая мишень для амплификации ДНК лактобактерий, что позволило создать не имеющую аналогов тест-систему для одновременной идентификации не менее 11 видов лактобактерий.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены в производственный процесс ООО «Нанодиагностика» тест-системы «Лактокомплекс» и «Лактоспектр_gpIK» (Акт о внедрении результатов научных исследований от 11.09.2017 г.) – Учрежденческий уровень внедрения;

определены перспективы для разработки пробиотиков на основе резидентных штаммов вагинальных лактобактерий по принципам персонафицированной медицины;

создана аналитическая панель для одновременной идентификации доминирующего вида вагинальных лактобактерий и оценки состояния вагинальной микробиоты в категориях дисбиоз/нормоценоз;

представлены Методические рекомендации для специалистов лабораторий, изучающих динамику вариабельности видового состава микробиоты влагалища, влияние патогенных микроорганизмов на микробиоценоз влагалища, взаимосвязь микробиоты и человеческого организма (Утверждены на совместном семинаре Центра клеточных и генных технологий и Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики ФГБУН ИМГ РАН, протокол № 1 от 18.05.2018 г.).

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты получены на сертифицированном оборудовании, калибровки разработанных тест-систем соответствуют Европейским стандартам (The MIQE Guidelines - Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), воспроизводимость результатов проверена в различных условиях с необходимым количеством повторов;

теория согласуется с опубликованными в зарубежных рецензируемых научных изданиях экспериментальными данными по теме диссертации, статистические методы анализа применены адекватно.

идея диссертационного исследования базируется на анализе имеющихся в литературе данных об актуальности исследований, направленных на изучение

фундаментальных основ функционирования вагинальной микробиоты, и необходимости разработки рационального подхода для проведения масштабных скринингов с учетом клинических данных;

установлено частичное совпадение полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными зарубежных авторов - в части анализа распространенности доминантных видов лактобактерий;

использованы современные методы получения и обработки информации.

Личный вклад соискателя состоит в:

проведении автором лично следующих этапов работы - анализ научной литературы, планирование и выполнение экспериментальной части, разработка алгоритма математического обсчета и интерпретации результатов ПЦР, выполнение скрининговых исследований, анализ и статистический обсчет полученных результатов, поиск организаций для ведения совместной научной деятельности и заключение с ними договоров о научно-техническом сотрудничестве.

На заседании 26.10.2018 г. диссертационный совет принял решение присудить Кошечкину С.И. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 15 человек, из них 7 докторов наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), участвовавших в заседании, из 21 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 15 против нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель
диссертационного совета _____ (Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета _____ (Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 26.10.2018 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.

