

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор

Г.Т. Сухих

«  2018 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертационной работы **Кошечкина Станислава Игоревича** «Разработка диагностической панели для изучения видового разнообразия вагинальных лактобактерий и оценки состояния вагинальной микробиоты», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06-биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Лактобациллы - представители нормальной микробиоты влагалища женщин остаются группой мало изученных микроорганизмов, что сдерживает исследования по обоснованию и подтверждению их гипотетической роли в сохранении локального гомеостаза организма-хозяина и возможного участия в патогенезе различных заболеваний репродуктивной системы. В первую очередь это связано с особенностями культивирования и трудностями выделения чистых культур. Бытует мнение о лактобациллах как о сообществе взаимосвязанных видов, которые существуют по принципу облигатного симбиоза (синтропизм), когда один вид без другого существовать не может, и мутуализма (взаимовыгодное существование

нескольких видов). До использования молекулярно-генетических методов изучение биологических свойств влагалищных лактобацилл (в частности, их видовая идентификация) в условиях фенотипических исследований было очень трудоемким, длительным, шло медленно, и результаты были мало информативны. Развитие молекулярно-генетических методов привело к созданию новой таксономии лактобацилл, и появились методические возможности для видовой идентификации. Различные методики ПЦР в реальном времени позволили подойти к изучению прикладных аспектов проблемы, в частности, разработке диагностических тест-систем для видовой идентификации и количественной оценки содержания лактобацилл в отделяемом влагалища женщин.

Тем не менее, высокая генетическая гетерогенность рода лактобацилл, генетический полиморфизм их близкородственных видов не позволяют добиться необходимой специфичности и эффективности компонентов ПЦР - тест-систем. Однако после расшифровки полногеномных последовательностей лактобацилл появились новые возможности для подбора генетических мишеней и разработки на их основе методов детекции и идентификации. Поэтому не вызывает сомнения актуальность темы диссертационной работы Станислава Игоревича Кошечкина, посвященной выбору адекватной мишени после сравнительного анализа геномов и разработке методов детекции, видовой идентификации и количественной оценки вагинальных лактобацилл на основе технологии мультиплексной ПЦР в реальном времени.

Научная новизна исследования

В работе впервые предложен ген *rplK* (кодирующий рибосомальный белок L11) в качестве генетической мишени для видовой идентификации лактобацилл, что обеспечивает большую специфичность для их дифференциации.

Разработана тест-система для количественного определения общего содержания лактобацилл на основе амплификации маркерного участка гена

rplK методом ПЦР в реальном времени. Эта система оказалась более специфичной, чем методы на основе амплификации гена *16 SpPHK*, в результате создана панель «Лактокомплекс».

Разработана диагностическая панель «Лактоспектр», позволяющая в двух реакциях идентифицировать 11 видов вагинальных лактобацилл: 4 вида индивидуально- *Lactobacillus iners*, *L.crispatus*, *L.jenseni* и *L. acidophilus*; два вида парно (без дифференциации) – *L.gasseri* и *L.johnsonii*; и группы лактобацилл из 5 видов также без дифференциации.

Показано, что в вагинальных микробиотах российских женщин в качестве доминирующих видов лактобацилл встречаются только 4 вида: *L. iners*, *L. crispatus*, *L.jensenii* и *L. gasseri*. Другие виды (в качестве основных) встречаются крайне редко, либо являются минорными компонентами.

Практическая значимость

На основе новой генетической мишени разработана диагностическая тест-система, позволяющая проводить исследования по оценки роли отдельных видов лактобацилл в жизнедеятельности вагинального микроценоза у женщин.

На основе разработанной автором системы нормирования и методики математического обсчёта получаемых результатов предложена система комплексной оценки клинического состояния микробиоты влагалища, что крайне важно, как для понимания фундаментальных основ функционирования микробиоты репродуктивного тракта женщин, так и для оценки функционального состояния вагинальной микробиоты у конкретной пациентки.

Необходимо отметить, что разработка и назначение новых эффективных пробиотических препаратов невозможна без проведения подобных исследований.

Структура и основные результаты работы

Диссертация построена по традиционной схеме, изложена на 100 страницах текста компьютерного набора, включает разделы: введение, обзор

литературы, материалы и методы, собственные исследования, обсуждение результатов исследования, выводы, список сокращений и список цитированной литературы, содержащий 158 источников. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 21 рисунком.

Во введении обоснован выбор направления исследований, сформулированы цель и задачи работы, отражены научная новизна и практическая значимость диссертации.

Обзор литературы отражает ориентированность автора в проблеме и дает представление о современном состоянии и актуальности темы исследования. Автор сумел лаконично и четко изложить мировой опыт по затронутой проблеме, критически проанализировать представленные работы и обосновать необходимость дальнейших исследований.

Методическая часть работы представлена достаточно подробно, так как от выбранной методологии зависели успех в выборе новых мишеней для генетического анализа сложных микробных комплексов, каким является вагинальная микробиота, а также и конечный результат работы – создание панели тест-систем для оценки общего содержания лактобацилл в биологическом образце и их видовой спектр. В работе адекватно использованы молекулярно-генетические, биологические, биоинформатические и статистические методы исследования.

Собственные исследования автора изложены четко, конкретно и последовательно. Начальный раздел посвящен анализу геномов с целью подбора перспективных диагностических мишеней. Анализ полногеномных последовательностей, которые представлены в базах данных для ряда вагинальных лактобацилл, позволил автору найти генетические области, которые были им выбраны как мишени для целевой амплификации и идентификации тех видов лактобацилл, которые по данным метагеномных исследований наиболее характерны для вагинального микроценоза. В конечном итоге, внимание было остановлено на гене *rplK*, отвечающим за синтез рибосомального белка L11.

Поиск последовательностей, гомологичных выбранному гену *L.iners* позволил определить целевой участок, обеспечивающий возможность групповой детекции всех видов именно вагинальных лактобацилл. Найденная мишень имела протяженность около 400 пар оснований и включала 3 консервативных участка, характерных только для вагинальных лактобацилл.

Проверку специфичности праймеров и зонда *in vitro* проводили в реакциях амплификации с ДНК из 14 штаммов вагинальных лактобацилл, а также других бактерий филогенетически близких к лактобациллам и препаратах ДНК, выделенной из человеческой крови в качестве отрицательного контроля. Сигнал от зонда наблюдали только в реакциях с ДНК, имевшей по данным секвенирования 100% гомологии с зондом. На основе этих олеγονуклеотидов автор создал тест-систему «Лактокомплекс» для определения общего содержания лактобацилл в содержимом влагалища. Линейный диапазон работы системы находился в пределах от 40 до $40 \cdot 10^9$ копий мишени в реакции. Автором рассчитано уравнение работы тест-системы для оценки количественного содержания лактобацилл в клинических образцах.

Автором на основе гена *rplR* разработана видо-специфическая тест-система для вагинальных лактобацилл. Разработан набор зондов с дифференцирующими свойствами. Однако сравнительно высокий уровень гомологии у ряда вагинальных лактобацилл позволил только для 4 видов предложить моно-зонды: *L.iners*, *L.crispatus*, *L.jensenii* и *L.acidophilus*. Последовательности гена *rplK* у видов *L.gasseri* и *L.johnsonii* имели очень высокий уровень гомологии, что не позволило создать зонды для выявления каждого из этих видов в отдельности, но был сконструирован зонд для детекции обоих видов. Кроме того, обнаружен участок гомологичный ещё для 5 видов лактобацилл и пригодный для разработки зонда на эту группу лактобацилл. В результате сформирована диагностическая панель, состоящая из двух наборов олигонуклеотидов, содержащих одну пару универсальных

праймеров и зонды, меченные разными флуорофорами (диагностическая панель «Лактоспектр *rplK*»). Предложенная тест-система позволяет проводить в двух реакциях амплификации с детекцией по трём каналам флуоресценции идентификацию 4 индивидуальных видов лактобацилл (*L.iners*, *L.crispatus*, *L.jensenii* и *L.acidophilus*), одной пары видов лактобацилл (*L.gasseri* и *L.johnsonii*) и одного комплекса лактобацилл, состоящего из 5 видов (*L.helveticus*, *L.amylovorus*, *L.gallinarum*, *L.acetotolerans* и *L.kefiranofaciens*).

Одной из задач диссертационной работы была оценка предложенной зарубежными авторами тест-системы, в которой в качестве мишени использован ген *tuf* для детекции и типирования в одной реакции 4 основных видов вагинальных лактобацилл: *L.crispatus*, *L.iners*, *L.jensenii* и *L.gasseri*. Сконструированная диссертантом тест-система «Лактоспектр *tuf*» на коллекции ДНК из 14 видов лактобацилл при проверке не соответствовала в полной мере поставленным задачам, так как не обеспечивала индивидуальную идентификацию *L.crispatus* и специфическую детекцию *L.iners*. Оказалось также, что данная мишень из-за высокой степени полиморфизма не позволила подобрать родоспецифический зонд для оценки общего количества лактобацилл в пробе.

Интересные результаты получены диссертантом при количественной оценке лактобацилл в образцах, содержащих ДНК двух видов одновременно. Смешанные образцы представляли собой разные соотношения предварительно откалиброванных препаратов ДНК *L.iners* и *L.gasseri*. Проведенные исследования показали, что присутствие ДНК дополнительного вида не влияет на детекцию и количественное определение доминирующего вида.

Наличие в образце ДНК двух видов лактобацилл приблизительно в равной концентрации не отражается не только на детекции этих видов, но и на их количественной оценке. Различие в концентрации ДНК двух видов более чем в 5 раз делает некорректной количественную оценку, а при

больших различиях в концентрациях и невозможной детекцию и идентификацию минорных компонентов. Полученные выводы особенно важны при интерпретации результатов исследования клинических образцов.

Большой и наиболее интересный с точки зрения практической значимости раздел работы посвящен изучению видового разнообразия лактобацилл в вагинальных микроценозах женщин нескольких российских регионов. С помощью тест-систем «Лактокомплекс» и «Лактоспектр gplK» исследовано 602 образца вагинального отделяемого, взятых у женщин в возрасте от 14 до 66 лет. Выборка включала как женщин практически здоровых и не предъявлявших жалоб, так и женщин с различными патологическими процессами репродуктивной системы. В подавляющем большинстве проб (77%) доминирующим был один вид лактобацилл, в 21% доминировали 2 вида и только у 1,6% женщин встречались три доминирующих вида лактобацилл. Наиболее часто встречались виды *L.iners* и *L.crispatus* (50 и 44,5% проб соответственно). *L.jensenii* встречался в 15% проб, при этом в 70% проб он занимал минорную позицию в сочетании с *L.iners*. Реже остальных обнаруживали *L.gasseri* (6%), но если он присутствовал, то всегда был доминирующим видом. Помимо 4 основных видов *L.iners*, *L.crispatus*, *L.jensenii* и *L.gasseri*, в двух образцах обнаружены *L.acidophilus* и *L.vaginalis*. Каких-либо других видов в данной клинической группе женщин не обнаружено.

Анализ ассоциации видового разнообразия лактобацилл с возрастом и городом проживания женщин показал отсутствие такой связи.

К сожалению, автор не анализировал видовой состав лактобацилл и их количество в биоматериале в зависимости от клинического диагноза пациенток, и ограничился классификацией проб по степени процентного отношения содержания лактобацилл к общей бактериальной массе (так называемая степень дисбиоза).

Разработанная и апробированная автором панель тест-систем для видовой идентификации вагинальных лактобацилл будет крайне важным

инструментом для дальнейших прикладных исследований в клинической практике для получения новых знаний о роли лактобацилл в физиологии и патологии репродуктивной системы.

Таким образом, цель поставленная в диссертационной работе, полностью выполнена. Работа представляет собой цельное законченное исследование. Принципиальных замечаний по существу работы нет. Выводы отражают содержание работы и научно обоснованы.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и дает полное представление о работе: По материалам диссертационной работы опубликовано 7 научных работ, в том числе 2 статьи в международных рецензируемых научных журналах и 5 тезисов в материалах международных и всероссийских научных конференций.

Заключение

Диссертационная работа **Кошечкина Станислава Игоревича** «Разработка диагностической панели для изучения видового разнообразия вагинальных лактобактерий и оценки состояния вагинальной микробиоты» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной проблемы видоспецифической детекции вагинальных лактобацилл. Использование однокопийных рибосомальных оперонов в качестве мишеней 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.

Таким образом, использование современных методов исследования, их адекватность поставленным задачам, большая теоретическая и практическая значимость полученных результатов дают основание считать, что диссертационная работа С.И. Кошечкина «Разработка диагностической панели для изучения видового разнообразия вагинальных лактобактерий и

оценки состояния вагинальной микробиоты» 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).

Отзыв о научно-практической значимости диссертации С.И. Кошечкина «Разработка диагностической панели для изучения видового разнообразия вагинальных лактобактерий и оценки состояния вагинальной микробиоты» заслушан, обсужден и одобрен на заседании Ученого совета от «17» сентября 2018 года, протокол № 11

Заведующая отделом
микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии федерального
государственного бюджетного учреждения
ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России,
доктор медицинских наук

Т.В. Припутневич

Подпись Т.В. Припутневич заверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России,

кандидат медицинских наук, доцент

С.В. Павлович



Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.
<http://www.ncagip.ru>
e-mail: secretariat@oparina4.ru
тел. 8 (495) 438-14-77

«18» сентября 2018г.