

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора, член-корреспондента РАН
Козлова Романа Сергеевича на диссертационную работу Тюрина Юрия
Александровича «Изменения локальной микробиоты при атопическом дерматите
и аллергическом рините: роль иммунных и неиммунных факторов» на соискание
ученой степени доктора медицинских наук по специальностям
3.2.7. Аллергология и иммунология и 1.5.11. Микробиология

Актуальность исследования

Детальное изучение микробиоты человека, связанной с той или иной экологической нишей, началось в конце прошлого века. С каждым годом появляется все больше работ, открывающих новые аспекты этой проблемы. Развитие многих патологических состояний, в том числе аллергических заболеваний, связывают с нарушениями микробиоты и микробиома. Стремительный рост интереса к проблеме связан в первую очередь с развитием микробиологических методов полногеномного секвенирования, биоинформатического и метагеномного анализа.

Традиционные культуральные методы и сейчас остаются основой бактериологических исследований: в клиническом аспекте они достаточно информативны, и дают возможность исследовать чувствительность выявленных микроорганизмов к антибиотикам и бактериофагам *in vitro*. Со временем изменяются представления о нормальном, с точки зрения микробиологии, состоянии кожных покровов, слизистых оболочек дыхательных путей, а также полых органов, которые ранее считались стерильными. Проведенные в последние десятилетия исследования показали, что эти органы заселяют сообщества микробов, состоящие из комменсалов и потенциальных патогенов, при этом патогены присутствуют в количествах, не способных вызвать заболевание. Комменсалы, составляющие микробиоту, могут находиться в симбиозе с организмом хозяина, участвуя в формировании своеобразного барьера, препятствующего вторжению патогенов. Увеличение относительного числа

оппортунистических патогенов, изменение их разнообразия, и нарушение сбалансированности микробиоты приводит к уменьшению представительства ключевых комменсалов, а реакция иммунной системы на эти изменения может способствовать формированию острого или хронического воспаления.

Понимание природы межмикробной конкуренции важно для разработки методов патогенетического лечения, в том числе и аллергических заболеваний, протекающих с вовлечением кожи, а также слизистой полости носа и околонозальных пазух, и связанных, в частности, с персистенцией золотистого стафилококка. Этот оппортунистический патоген транзиторно или перманентно, и часто бессимптомно, колонизирует слизистую оболочку полости носа, однако при избыточном размножении он способен вызывать целый ряд патологических состояний.

Представленная диссертационная работа Ю.А. Тюрина посвящена комплексному изучению локальной микробиоты и роли факторов вирулентности бактерий рода *Staphylococcus spp.* в патогенезе распространенных форм аллергических заболеваний (атопического дерматита и аллергического ринита).

Таким образом, актуальность рассматриваемой диссертационной работы Тюрина Юрия Александровича, посвященной изучению роли иммунных и неиммунных факторов в изменении локальной микробиоты при atopическом дерматите и аллергическом рините, не вызывает сомнения.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Результаты диссертационного исследования Ю. А. Тюрина последовательно изложены и соответствуют основным положениям, выносимым на защиту. Работа выполнена с использованием микробиологических и молекулярно-генетических методов на современном высокотехнологичном оборудовании. Выводы исследования отвечают целям и задачам и базируются на большом количестве клинического материала и экспериментальных данных, которые проанализированы адекватными методами биоинформатического и

статистического анализа с использованием современного программного обеспечения.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Работа имеет несомненное научно-практическое значение, основанное на определении роли иммунных и неиммунных факторов в качественных и количественных изменениях локальной микробиоты кожных покровов и слизистых при атопическом дерматите и аллергическом рините.

Полученные данные и сформулированные практические рекомендации позволят оптимизировать диагностический алгоритм выявления локального дисбиоза слизистых верхних дыхательных путей и кожи у больных атопическим дерматитом и аллергическим ринитом, а также проводить персонализированную терапию у больных с высокими показателями бактериальной обсеменённости локальных участков кожи и слизистых золотистым стафилококком.

Важное научно-практическое значение имеет и предложенные автором способы детекции генов, кодирующих факторы патогенности бактерий *S. aureus*, определения IgA и IgG-протеиназной активности бактериальных ферментов, и выявления сенсibilизации к ферментам золотистого стафилококка у пациентов с респираторной аллергией и атопическим дерматитом.

Результаты представленной работы имеют большое значение для развития аллергологии и иммунологии, клинической микробиологии, и могут использоваться для дальнейшего изучения данной междисциплинарной научной проблемы.

Соответствие диссертации паспорту специальности

По теме диссертационного исследования, методам, основным положениям и выводам, сформулированным автором, диссертация соответствует паспорту научных специальностей 3.2.7. Аллергология и иммунология и 1.5.11. Микробиология (медицинские науки).

Научная новизна исследования, достоверность полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнения основана на применение новых высокотехнологичных методов микробиологической и молекулярно-генетической диагностики, в том числе, секвенирования, подтвержденной получением 6 патентов РФ на изобретение. Научно обоснована и разработана новая концепция роли *S. aureus* в патогенезе аллергических заболеваний, что позволило раскрыть ранее неизученные вопросы значимости микробного фактора в их развитии. Установлена связь между клинически значимыми мутациями генов, контролирующими формирование защитного барьера кожи и слизистых оболочек, и бактерионосительством *S. aureus* у пациентов с аллергическими заболеваниями. Выявлены генетические особенности штаммов *S. aureus*, колонизирующие кожу и слизистые ВДП у пациентов с аллергическими заболеваниями, отличающие их от штаммов, колонизирующих эти биотопы у бактерионосителей без аллергического заболевания. Отличительной генотипической особенностью штаммов *S. aureus*, колонизирующих биотопы органов-мишеней при развитии аллергического заболевания, является наличие генов, кодирующих разнообразные факторы патогенности. Получены новые данные, которые позволили констатировать, что изменение защитных свойств эпидермального и эпителиального барьеров организма обусловлено как генетическими факторами макроорганизма, способствующими обширной колонизации *S. aureus* пораженной кожи и слизистых дыхательных путей при аллергическом заболевании, так и патогенными свойствами «назальных» и «кожных» штаммов стафилококков. Открыты общие закономерности изменения локальной микробиоты кожи и слизистых дыхательных путей при развитии аллергического заболевания. Впервые выявлено наличие генов эксфолиативных токсинов у штаммов *S. aureus*, выделяемых с локальных биотопов кожи при атопическом дерматите и их отсутствие у штаммов, выделенных при аллергическом рините. Автор установил, что наличие мутаций (SNP) rs5743708, rs4986790 в генах TLR2-, TLR4-рецепторов, их преобладание при атопическом

дерматите, и взаимосвязь с колонизацией кожи золотистым стафилококком. Впервые автором на обширном клиническом материале, показано, что наличие мутаций rs5743708, rs4986790 в генах TLR2-, TLR4-рецепторов сопровождается преобладанием выработки T2 цитокинов. Впервые выявлено, что снижение врожденной иммунной резистентности в синергизме с нарушением состояния барьерных функций кожи и эпителия у больных с аллергическим заболеванием ассоциированы с генетическими мутациями гена SPINK5 и характеризуется высокой степенью бактериальной колонизации локальных биотопов кожи и слизистых верхних дыхательных путей золотистым стафилококком.

Внедрение полученных результатов и рекомендации по их использованию

Результаты диссертационного исследования внедрены в лечебную практику специализированной поликлиники инфекционно-аллергических заболеваний ФБУН КНИИЭМ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и в образовательный процесс кафедры аллергологии и иммунологии КГМА – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

Результаты диссертационного исследования были полноценно представлены на всероссийских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 41 печатная работа, в том числе 9 научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, 9 статей – в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, 8 – иных публикаций по результатам исследования, из них 5 обзорных статей, 6 патентов и 1 база данных, 8 публикаций – в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Оценка содержания и оформления диссертационной работы, ее завершённость

Диссертационная работа Ю.А. Тюрина выполнена в традиционном стиле, изложена на 284 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, шести глав собственных исследований и обсуждений, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, списка сокращений и семи приложений к работе. Текстовая часть сопровождается 44 таблицами, 41 рисунками. Указатель литературы включает 383 источника, 272 из которых иностранные.

Во «**Введении**» обосновывается актуальность исследования; формулируется цель и основные задачи; обосновывается научная новизна работы, теоретическая и практическая значимость.

В главе «Обзор литературы» описаны основные вопросы, касающиеся современных аспектов распространенности атопического дерматита и аллергического ринита и их патогенеза, а также состояния локальной микробиоты кожи и слизистых верхних дыхательных путей при аллергических заболеваниях. Дана микробиологическая характеристика *S. aureus* как триггерного фактора при атопическом дерматите, и его участия в развитии осложнённого течения дерматоза.

В главе «Материалы и методы исследования» автор описывает методологию работы и статистическую обработку результатов.

В третьей главе диссертации представлен анализ и изложены результаты исследования изменений локальной микробиоты кожи и слизистых верхних дыхательных путей у больных с атопическим дерматитом и респираторными аллергическими заболеваниями. Автором установлено, что состояние локальной микробиоты слизистой носа соответствуют формированию микробного сообщества с доминированием *S. aureus* при развитии аллергического ринита, в то время как у здоровых лиц формируются микробные сообщества с преобладанием *S. epidermidis*, *Corynebacterium spp.* соответственно.

В четвертой главе автор описывает связь между количественными изменениями локальной микробиоты кожи, слизистых верхних дыхательных путей

у больных с атопическим дерматитом и респираторной аллергией и усилением патогенного потенциала *S. aureus*, включая повышение протеолитической активности, а также продукцию широкого спектра экзотоксинов и протеиназ. Изменение защитных свойств эпидермального кожного барьера обусловлено как генетическими факторами *S. aureus*, способствующими экспансии, так и способностью к продукции у штаммов, колонизирующих кожу и слизистые оболочки верхних дыхательных путей, протеолитических ферментов. В данной главе представлены результаты определения Ig-расщепляющей активности супернатантов культуральной жидкости штаммов бактерий *Staphylococcus spp* по разработанной автором методике. Оценены изменения экспрессии белков протеомного профиля секрета штаммов *S. aureus*, выделенных с кожи и слизистых верхних дыхательных путей. Установлены статистически значимые различия в уровне экспрессии гидролитических ферментов, токсинов, гемолизинов, некоторых цитозольных ферментов и адгезинов между штаммами, выделенными от пациентов с аллергическим заболеванием, и от бактерионосителей без аллергической патологии. Различия в экспрессии этих белков может отражать различный патогенный потенциал штаммов *S. aureus*, колонизирующих и адаптированных к локальным биотопам кожи и слизистых верхних дыхательных путей респираторной системы бактерионосителей и больных аллергическим заболеванием.

В пятой главе представлены результаты исследования генетического профиля штаммов *S. aureus*, которые лежат в основе высокого патогенного потенциала у больных с атопическим дерматитом и аллергическим ринитом. Полученные данные продемонстрировали, что встречаемость штаммов, содержащих гены эксфолиативных токсинов, зависела от тяжести атопического дерматита. Автором установлено, что гены протеолитических ферментов (*aur*, *sspA*, *scpA* и *sspB*) встречаются у большей части выделенных культур штаммов *S. aureus*, заселяющих кожу и слизистые верхних дыхательных путей. Выявлены характерные генотипы штаммов *S. aureus*, встречающиеся у пациентов с аллергическим заболеванием, как правило, редко выделяемые от

бактерионосителей без аллергического заболевания. Проведено изучение характерного генома штамма *S. aureus*, выделенного с локального биотопа кожи ребенка при atopическом дерматите, реконструированного в результате полногеномного секвенирования и определён его профиль факторов патогенности и устойчивости к антимикробным препаратам.

В шестой главе на основе результатов молекулярно-генетического тестирования пациентов с аллергическим заболеванием получены результаты по распространённости клинически значимых мутаций (SNP) генов TLR2-, TLR4-рецепторов и гена SPINK5 у больных с atopическим дерматитом и аллергическим ринитом; обсуждены основные результаты исследования и сопоставлены с литературными данными.

В седьмой главе представлены результаты, отражающие исследования аллергенных свойств продуктов жизнедеятельности штаммов *S. aureus*, колонизирующих верхние дыхательные пути и кожу, которые вызывают IgE-опосредованную сенсibilизацию у больных с респираторными аллергическими заболеваниями. Данные белки образуются штаммами *S. aureus* в процессе своей жизнедеятельности и адаптации к локальным биотопам.

В восьмой главе отражены данные исследований по изучению первичной структуры аллергенов *S. aureus* с аллергенами клещей ДП. Результаты, полученные автором, показали высокую степень гомологии между бактериальной *SplA* протеиназой *S. aureus* и алергокомпонентами (Der p 4 или альфа-амилаза) из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* и Der f 6 (химотрипсин) *Dermatophagoides farinae*, что может обуславливать формирование перекрестных реакций между ними.

В «Заключении» отражены основные результаты проведенного диссертационного исследования.

Выводы, сделанные автором, обоснованы и полностью соответствуют поставленной цели и задачам диссертации. Они основаны на достоверных данных, вытекают из результатов исследования. Практические рекомендации

сформулированы четко, логично и адресно, и могут быть использованы в практической работе.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат хорошо структурирован, отображает содержание работы, оформлен в соответствии с требованиями.

Замечания по содержанию и оформлению диссертации

Все вышеуказанное позволяет сделать вывод о высоком методическом уровне работы и завершенности диссертационного исследования в целом. Принципиальных замечаний, влияющих на оценку качества выполнения диссертационной работы, нет. Однако при рецензировании работы возникли три вопроса:

1. Какое значение может иметь выявленный Вами у бактерионосителей *S. aureus* с респираторным аллергическим заболеванием факт более высокой экспрессии таких белков, как ClpB (шаперон) и MgrA ?

2. Проводилось ли серотипирование штаммов *S. pneumoniae*, выделяемых со слизистой носоглотки у больных детей и подростков с аллергическим ринитом? Какие серотипы преобладали и как изменялся серотиповый состав штаммов *S. pneumoniae* у детей и подростков после терапии АСИТ?

3. Какова роль таких представителей *Proteobacteria*, как *Enterobacter spp.*, *Moraxella spp.* в течении аллергического ринита и сенсибилизации?

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Тюрина Юрия Александровича на тему: «Изменения локальной микробиоты при атопическом дерматите и аллергическом рините: роль иммунных и неиммунных факторов» на соискание ученой степени доктора медицинских наук является законченной научно-

