

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук (14.03.09), профессора Ненашевой Натальи Михайловны на диссертационную работу Зольниковой Оксаны Юрьевны «Микробиота кишечника и дыхательных путей как патогенетическое звено бронхиальной астмы», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.04 – внутренние болезни.

Актуальность темы выполненной работы

Бронхиальная астма представляет собой одно из самых распространенных хронических заболеваний человека, встречающееся во всех возрастных группах. Бронхиальная астма (БА) является фактором риска тяжелых обострений, частых госпитализаций пациентов, а так же существенно снижает качество жизни больных. В основе развития заболевания лежит хронический воспалительный процесс, приводящий к формированию гиперреактивности бронхов и бронхиальной обструкции. В процессе участвуют разнообразные клеточные элементы, включая тучные клетки, эозинофилы и Т-лимфоциты, а так же различные противовоспалительные медиаторы. Благодаря многочисленным клиническим и экспериментальным исследованиям, многие факторы, способствующие развитию и поддерживающие воспаление в нижних дыхательных путях при БА, стали понятны. Вместе с тем многие остаются не до конца изученными. В частности, в настоящее время большое число научных исследований направлены на изучение роли микробиоты в возникновении и прогрессировании аллергических заболеваний и бронхиальной астмы. В ряде эпидемиологических исследованиями выявлена корреляция между изменениями в составе кишечных бактериальных сообществ и частотой развития аллергических заболеваний, как во взрослой, так и в детской популяции. Известно, что высокое биологическое разнообразие микроорганизмов кишечника защищает от

развития аллергических заболеваний, в том числе посредством адекватного производства короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), индуцирует иммунные регуляторные пути и способствует противовоспалительному ответу. Напротив, низкое биологическое разнообразие кишечного биотопа связано с уменьшением производства КЦЖК, что приводит к сдвигу в сторону Т-хелперов 2-го типа и формированию противовоспалительного иммунного ответа. Отдельного внимания заслуживают данные о наличии легочной микробиоты и ее роли в развитии заболеваний респираторного тракта. Эта совершенно новая область исследований и работ, имеющих в отечественной и зарубежной литературе по данной проблеме, немного. Кроме того, не все они однозначны по оценке диагностической и прогностической значимости полученных результатов. Результаты научных исследований, в целом свидетельствуют в пользу того, что у лиц страдающих бронхо-легочными заболеваниями и бронхиальной астмой в частности, состав микробиоты респираторного тракта существенно отличается от таковой у здоровых добровольцев. Таким образом, изучение состава микробиоты как кишечника, так и респираторного тракта, возможных ее нарушений, а также терапевтической коррекции при БА является перспективной и актуальной научной проблемой.

В связи с вышеизложенным, тема диссертационного исследования Зольниковой О.Ю. по изучению микробиоты кишечника и респираторной системы у больных с бронхиальной астмой, а так же возможности ее коррекции, представляется весьма актуальной и имеющей несомненное практическое значение.

**Степень обоснованности и достоверность научных положений,
выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационная работа Зольниковой О.Ю. выполнена с использованием современных высокотехнологичных методических

подходов и статистического анализа, включает в себя достаточный объем материала для подтверждения достоверности научных положений и выводов, изложенных в диссертации. Основные положения, описанные данные и рекомендации, сформулированные в работе, базируются на исследовании 197 взрослых больных с БА.

Дизайн исследования включал: сбор и анализ анамнестических данных, физикальное и инструментальное обследование пациентов с БА, оценку функции внешнего дыхания и уровня контроля БА, лабораторные исследования, включая определение общего IgE, проводилось секвенирование 16S РНК бактерий в образцах кала и орофарингеальных мазках, газожидкостной хроматографический анализ бактериальных метаболитов, а так же водородный дыхательный тест с лактулозой. Для оценки контроля симптомов БА в работе использован валидный опросник оценки уровня контроля БА АСТ и оценка симптомов по GINA.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием лицензионной программы Statistica 10 (StatSoft Inc., США), разработанной для статистической обработки медицинской информации и включающей в себя все необходимые методы статистического анализа, что позволяет считать результаты работы обоснованными и достоверными.

Выводы соответствуют поставленным задачам, сформулированы четко.

Практические рекомендации основаны на полученных данных и включают: 1) проведение скринингового обследования пациентов с БА, с целью диагностики изменений микробиоты, в том числе проведение водородного дыхательного теста для выявления избыточного бактериального роста в тонкой кишке, определение уровня и спектра короткоцепочечных жирных кислот, секвенирование бактериальной 16S рРНК. 2) Принимая во внимание наличие взаимосвязи основных

патогенетических механизмов бронхиальной астмы, с изменением состава микробиоты, пациентам рекомендовано назначение мультиштаммового пробиотического препарата курсом не менее 1 месяца. 3) В случае выявления СИБР, вне зависимости от его клинических проявлений (или отсутствия таковых), целесообразно проведение селективной деконтаминации кишки препаратом рифаксимин в дозе 600 мг в сутки сроком на 7 дней и последующим назначением мультиштаммового пробиотического препарата, содержащего Лакто- и Бифидобактерии.

Результаты исследования отражены в 25 публикациях, включая публикации в рецензируемых журналах из списка, рекомендованного Высшей аттестационной комиссией и цитируемых в базах Scopus и Web of Science.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Научная новизна исследования заключается в том, что впервые исследован состав микробиоты кишечника и орофарингеальной зоны у больных с бронхиальной астмой. Установлено статистически значимое увеличение в составе кишечного биотопа бактерий типа Протеобактерии, а также снижение содержания бактериальных таксонов, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты. В составе орофарингеального биотопа также выявлено значимое снижение доли бактерий, продуцирующих КЦЖК. Выявлены корреляционные зависимости, указывающие на взаимосвязь изменений в бактериальном спектре и клинико-лабораторных проявлений бронхиальной астмы (длительность анамнеза, ОФВ1, активность аллергического ответа). Проанализированы и сопоставлены результаты измененного бактериального спектра кишечной микрофлоры с наличием у пациентов синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке.

Впервые проведен анализ метаболической активности бактерий у пациентов с бронхиальной астмой. Определено достоверное уменьшение общего содержания КЦЖК, содержания ацетата, пропионата и бутирата. Выявлено изменение их спектра, что подтверждает изменение в составе и активности бактерий (в 84% случаев анаэробный спектр и 16% - аэробный) и соответствующих значений анаэробного индекса. Установлена взаимосвязь изменений метаболической активности с некоторыми патогенетическими механизмами развития бронхиальной астмы (активность аллергического ответа, изменение со стороны функции внешнего дыхания, длительность заболевания).

В исследовании проведена сравнительная оценка эффективности применения в комплексной терапии бронхиальной астмы антибактериального и пробиотических препаратов, их влияния на восстановление метаболической активности бактерий, а так же на клинические симптомы и дальнейшее течение заболевания. Показано снижение частоты обострений бронхиальной астмы в последующий год наблюдения (с 2-3 раз ежегодно до 1-2 раз) в случае лечения СИБР антибактериальным препаратом и последующим приемом пробиотика. На фоне терапии, направленной на коррекцию состава микробиоты кишечника, так же отмечено улучшение метаболической бактериальной активности (нормализация спектра КЦЖК, анаэробного индекса, изокислот, отмечен эффект пробиотика в увеличении количества КЦЖК).

На основании проведенного исследования и полученных результатов сформулированы практические рекомендации по диагностике нарушений микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой и проведения терапии направленной на их коррекцию.

Материалы диссертационного исследования используются в учебно-методической работе со студентами и курсантами факультета последипломного образования на кафедре пропедевтики внутренних

болезней Института клинической медицины имени Н.В.Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), при обследовании и лечении пациентов с бронхиальной астмой.

**Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом,
замечания по оформлению диссертации**

Диссертация изложена на 209 страницах машинописного текста. Работа построена по классической схеме и включает: введение, восемь глав (обзор литературы, характеристика больных и методы исследования, результаты собственных исследований, заключения) а также выводов, практических рекомендаций, приложений. Работа хорошо иллюстрирована таблицами и схемами. Список литературы содержит 259 источников (39 отечественных и 229 зарубежных, опубликованных в период 2003-2019г).

Оформление диссертации соответствует ГОСТ 7.0.11-2011. Замечаний к оформлению диссертации нет.

Введение диссертационной работы включает в себя полностью обоснованную актуальность темы исследования, четка сформулированные цель и задачи, в полной мере освещенные научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, положения выносимые на защиту, степень достоверности и апробацию результатов исследования.

Обзор литературы отражает современное состояние существующей проблемы. Отмечено, что в настоящее время большое внимание уделяется изучению микробиома человека и его возможной роли в развитии многих заболеваний. Вместе с тем типы и соотношения бактерий, которые защищают от иммуноопосредованных заболеваний, до конца не выяснены. В одном из исследований было показано, что снижение у детей доли *Fecalibacterium*, *Lachospiria*, *Rothia*, *Veillonalla* связано с риском развития бронхиальной астмы. Отмечается у пациентов БА увеличение численности *Proteobacteria* и снижение бактериального разнообразия кишечного

биотопа. В обзоре представлены результаты исследований по изучению микробиоты респираторного тракта. А также обсуждается взаимосвязь функциональной активности двух систем посредством функционирования так называемой оси «кишка-легкие». Анализируется возможность применения пробиотиков у пациентов с БА.

Автором детально представлены все методы исследования и охарактеризованы пациенты, включенные в исследование на основании четких критериев включения и исключения.

Для статистического анализа результатов использовалась программа Statistica 10 (StatSoft Inc, США). С ее помощью проводили мультивариантный анализ полученных в процессе работы показателей. Использовались непараметрические статистические методы и рассчитывались коэффициенты корреляции. Качественные признаки анализировались при помощи абсолютных и относительных (%) величин, количественные при помощи медианы (Me) и 95% доверительного интервала (ДИ) (Me [-ДИ_{95%}; +ДИ_{95%}]). При сравнении количественных показателей двух независимых групп использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. При сравнении более двух независимых групп - критерий Краскела-Уоллиса. При сравнении категориальных переменных использовался двусторонний точный тест Фишера и тест χ^2 Пирсона.

В результате проведенного исследования удалось установить, что у больных бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми добровольцами преобладали бактерии типа *Proteobacteria* ($p < 0,01$). Выявлены существенные различия внутри бактериальных типов *Firmicutes* ($p < 0,05$) и *Bacteroidetes* ($p < 0,05$), связанные со снижением представленности бактерий, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты. Выявлено, что изменение содержания отдельных бактерий кишечного биотопа у пациентов с бронхиальной астмой ассоциировано с длительностью заболевания, и выраженностью аллергического ответа.

Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке, встречался значительно чаще при atopической астме (67% vs 33%; $p < 0,05$) и имел различия в бактериальном спектре в зависимости от фенотипа заболевания.

В целом клинические проявления нарушений микробиоты кишечника у больных с астмой не специфичны и не связаны с фенотипом заболевания ($p > 0,05$). Вместе с тем, у больных бронхиальной астмой их наличие ассоциировано с основными патогенетическими механизмами заболевания: при atopической астме выявлены более высокие титры IgE ($p < 0,01$), большее количество эозинофилов мокроте ($p < 0,001$) и более выраженное снижение объема форсированного выдоха за 1 сек. ($p < 0,01$); при нетопической астме - связано только с изменением функции внешнего дыхания (снижение $ОФВ_1$ ($p < 0,01$)).

Снижение метаболической активности бактерий кишечного биотопа у пациентов бронхиальной астмой, так же сопровождается более выраженным иммунным ответом и снижением $ОФВ_1$.

Результаты по изучению орофарингеального биотопа у пациентов с бронхиальной астмой продемонстрировали выраженные нарушения в бактериальном спектре на различных таксономических уровнях и подтвердили корреляционную зависимость с основными клинико-лабораторными характеристиками заболевания.

Сформулированные выводы полностью соответствуют поставленным целям и задачам диссертационного исследования.

Представленные автором рекомендации имеют безусловную практическую значимость.

Перспективы дальнейшей разработке темы исследования обусловлены актуальностью выбранной темы и полученными многообещающими результатами.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям, изложенным в диссертационной работе, оформлен в соответствии с требованиями ВАК РФ.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет.

Возникли следующие вопросы к диссертанту:

1. Чем Вы можете объяснить разницу в выявленных нарушениях микробиоты, частоте СИБР у пациентов с атопической и неатопической БА? Разный тип воспаления в нижних дыхательных путях приводит к разному паттерну нарушений микробиоты или наоборот?
2. Исследовалось ли влияние фармакотерапии, в том числе системной (системные ГКС), ИМТ на состояние микробиоты кишечника и орофарингеальных биотопов?

Заключение

Диссертационная работа Зольниковой Оксаны Юрьевны «Микробиота кишечника и дыхательных путей как патогенетическое звено бронхиальной астмы», представленная к защите на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.04 – внутренние болезни, является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований сформулированы теоретические положения, которые могут быть квалифицированы как крупное научное достижение в области внутренних болезней, а именно показано, что изменения состава микробиоты кишечника и орофарингеальных биотопов, метаболической активности микробиоты служит одним из звеньев патогенеза бронхиальной астмы.

По своей актуальности, структуре, научной новизне, методическому уровню, теоретической и практической значимости диссертация

Зольниковой Оксаны Юрьевны «Микробиота кишечника и дыхательных путей как патогенетическое звено бронхиальной астмы» полностью соответствует требованиям п.15 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденным приказом Сеченовского университета от 31.01.2020г. №0094/Р, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора медицинских наук.

Официальный оппонент, доктор медицинских наук, профессор,
заведующая кафедрой аллергологии и иммунологии
ФГБОУ ДПО «Российская Медицинская Академия
Непрерывного Профессионального Образования» Минздрава России

Н.М. Ненашева



123995 г. Москва, ул. Баррикадная, 2/1
+7 (499) 252-21-04; email: rmapo@rmapo.ru

Согласна на обработку моих персональных данных.

Подпись профессора Ненашевой Н.М. заверяю:
Ученый секретарь ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава России


21.09.2020

Савченко Л.М.