



федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России)

443099, РФ, г. Самара,
ул. Чапаевская, 89
тел.: +7 (846) 374-10-01
тел./факс: +7 (846) 374-10-03

e-mail: info@samsmu.ru
сайт: samsmu.ru
ОГРН 1026301426348
ИНН 6317002858

12.01.2023

№ 1230/40-23-67

На № _____

от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Самарский государственный
медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор

И.Л. Давыдкин



ОТЗЫВ

ведущей организации - федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертацию Тюрина Юрия Александровича на тему «Изменения локальной микробиоты при атопическом дерматите и аллергическом рините: роль иммунных и неиммунных факторов», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 3.2.7. Аллергология и иммунология и 1.5.11. Микробиология

Актуальность темы выполненной работы

Эпидемиологические исследования, продемонстрировали высокую распространённость аллергических заболеваний в Российской Федерации и в мире, что отражает неуклонный рост количества больных с аллергической патологией, в том числе и среди детей различного возраста. Наряду с высокой распространённостью аллергических заболеваний, отмечается тенденция к более тяжелому течению аллергических заболеваний, в том числе атопического дерматита и аллергического ринита, и их коморбидности с другой соматической патологией.

Существенное влияние на развитие аллергического заболевания оказывает микробиота, определенные представители которой могут влиять на течение и патогенез аллергической патологии. Значимость бактерий рода *Staphylococcus spp.* в развитии аллергических заболеваний человека подтверждена многочисленными исследованиями, в которых показано, что у больных с

аллергическим ринитом и атопическим дерматитом, прежде всего в детском возрасте, формируется устойчивое бактерионосительство представителей этого вида. Имеются данные о наличии различий представителей микрофлоры, колонизирующих кожные покровы и слизистые дыхательных путей, между страдающими аллергической патологией и здоровыми индивидуумами.

Необходимость определения биологических особенностей штаммов *S. aureus*, колонизирующих локальные биотопы кожи и слизистые верхних дыхательных путей, изучение протеома, состояния механизмов местного иммунитета представляет несомненный интерес для понимания феномена бактерионосительства *S. aureus*, актуального при развитии и реализации атопического фенотипа. При развитии аллергического заболевания часто происходит расширение спектра аллергенов, вызывающих сенсибилизацию, что вызывает необходимость определения возможной роли при этом процессе определенных продуктов *S. aureus*.

В данном контексте, диссертационное исследование по изучению количественного состава локальной микробиоты, продуктов метаболизма её отдельных представителей, раскрытие молекулярно-генетических механизмов снижения резистентности барьерных функций кожи и слизистых у больных с аллергическими заболеваниями, выполненное Тюриным Юрием Александровичем, представляется весьма актуальным и значимым для клинической практики и отвечает требованиям современной науки и практической медицины.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа Тюрина Юрия Александровича «Изменения локальной микробиоты при атопическом дерматите и аллергическом рините: роль иммунных и неиммунных факторов» выполнена в полном соответствии с планом научно-исследовательских работ Федерального бюджетного учреждения науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора.

Новизна исследования и полученных результатов

Впервые автором на большом клиническом материале выявлены количественные изменения локальной микрофлоры кожи при атопическом дерматите и слизистых верхних дыхательных путей при аллергических ринитах, проявившиеся в увеличении встречаемости условно-патогенных видов бактерий – *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Enterobacter spp.*, *Moraxella catarrhalis*, и снижении комменсальных видов бактерий, колонизирующих локальные биотопы (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus sp.*).

Впервые показано различие локальной микробиоты слизистых оболочек верхних дыхательных путей при аллергических ринитах в зависимости от проводимой терапии.

Впервые продемонстрировано увеличение продукции протеиназ и энтеротоксинов у изолятов *S. aureus*, выделяемых с локальных биотопов кожи и

слизистых верхних дыхательных путей у больных с аллергическими заболеваниями по сравнению со здоровыми бактерионосителями золотистого стафилококка.

Впервые выявлено наличие генов эксфолиативных токсинов у штаммов *S. aureus*, выделяемых с локальных биотопов кожи при атопическом дерматите, и их отсутствие на слизистой носа при аллергических ринитах. Впервые показано, что наличие мутаций (SNP) rs5743708, rs4986790 в генах TLR2-, TLR4-рецепторов при атопическом дерматите и взаимосвязано с колонизацией кожи *S. aureus*. Впервые показано, что наличие мутаций rs5743708, rs4986790 в генах TLR2-, TLR4-рецепторов сопровождается преимущественной выработкой T2 цитокинов. Впервые выявлено наличие специфических IgE к SplA-протеиназе *S. aureus* у больных АР.

Впервые была определена гомология первичной последовательности между аллергокомпонентами клещей домашней пыли и протеиназами (*spl*- и *ssp*-оперонов) *S. aureus*. Выявлено, что снижение врожденной иммунной резистентности в синергизме с нарушением состояния барьерных функций кожи и эпителия слизистых ВДП у больных с АЗ ассоциированы с генетическими мутациями гена SPINK5 и характеризуется высокой степенью бактериальной колонизации локальных биотопов кожи и слизистых ВДП *S. aureus*.

В рамках диссертационного исследования в NCBI GenBank аннотирована информация о реконструированных геномах штаммов *S. aureus* KZ188 (JAGGIM000000000.1), выделенный с кожи при осложненном атопическом дерматите, *S. aureus* KZ187 (JAIUGC000000000.1) со слизистой носа от пациента с аллергическим ринитом, *S. epidermidis* KZ_197 (JAIUGO000000000.1), с кожи ребенка больного атопическим дерматитом, а также информация восьми нуклеотидных последовательностей (MK268208, MW345525, MW345526, MW345527, MW345528, MW345529, MW345530, MW345531) генов токсинов (*ent A*, *set11* или *ssl7*), протеиназ (*sspA*, *splA*, *splB*), адгезинов, в реконструированных геномах изолятов *S. aureus*, выделенных с участков воспаленной кожи и слизистых верхних дыхательных путей и характеризующихся фенотипической протеиназной активностью и токсинообразованием, и устойчивых к антимикробным препаратам. Данные функциональные последовательности прокариотического генома штаммов *S. aureus*, описанные и реконструированные автором при секвенировании, могут быть использованы для разработки генно-инженерных подходов для получения рекомбинантных бактериальных аллергенов *S. aureus* для *in vitro* аллергодиагностики.

Значимость для науки и практической деятельности полученных автором результатов

Полученные результаты имеют большое научное и практическое значение и направлены на совершенствование ведения больных с аллергическими заболеваниями – атопическим дерматитом и аллергическим ринитом.

Автором разработан алгоритм клинико-иммунологического исследования пациента при аллергическом заболевании, включающий способы молекулярно-

генетических исследований изолятов, выделяемых от больных с atopической патологией, были внедрены в лечебную практику работы специализированной поликлиники инфекционно-аллергических заболеваний ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Разработанные автором рекомендации по современным методам идентификации стафилококков, тестирования протеолитических свойств у патогенных штаммов, выделяемых с локальных биотопов кожи и слизистых верхних дыхательных путей, а также молекулярно-генетические методы (ПЦР) детекции генов протеиназ *spl*-и *ssp*-оперона в геноме *S. aureus*, выделяемых у пациентов с аллергическими заболеваниями включены в региональные методические рекомендации, утвержденные Министерством здравоохранения Республики Татарстан (РТ) в 2020 г. и внедрены в работу системы здравоохранения Республики Татарстан.

Полученные результаты отражены в информационно-методических письмах «Особенности микробиоты кожи человека при аллергической патологии» и «Особенности микробного консорциума слизистых оболочек верхних дыхательных путей человека при аллергической патологии» для использования в профессиональной деятельности врачей аллергологов, педиатров, дерматовенерологов и отоларингологов (утверждены Министерством здравоохранения РТ, 2020 г.).

При выполнении работы автором были выделены, изучены и депонированы в ФБУН ГНЦ ПМБ в отдел «Государственная коллекция патогенных микроорганизмов-Оболенск» 13 штаммов *St. aureus* (от бактерионосителей с аллергодерматозами и респираторной аллергией, отличающиеся выраженной Ig-протеиназной активностью и устойчивостью к применяемым антимикробным препаратам.

При выполнении диссертационного исследования автором совместно с соавторами были разработаны новые способы оценки протеолитической активности (патент РФ № 2373538, патент РФ № 2426126, патент РФ № 2510026), в том числе, высокочувствительный способ определения Ig-протеиназной активности с использованием полимерных матриц (патент РФ № 2519071), предложен способ идентификации генов стафилококковых экзотоксинов с высокой структурной гомологией с суперантигенами методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления (патент РФ № 2532225), оригинальный метод определения хитиназо-подобного белка YKL-40 в экскретах человека (выделения носовой полости), как один из биомаркёров аллергического воспаления при аллергическом рините и atopической бронхиальной астме (патент РФ №2423707), создана и предложена к применению «База данных клинико-лабораторных характеристик пациентов с atopическим дерматитом бактерионосителей *Staphylococcus aureus*» (№ 2021623211. дата гос. Регистрации в Реестре баз данных 27.12.2021).

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в работе, в выборе направления исследования, проведения анализа отечественных и зарубежных источников литературы по теме диссертации, оценке и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, автором лично разработана концепция исследования, проведены статистический анализ полученных данных, обоснование и обобщение полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментально-теоретической и лабораторной реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и их внедрение в практику.

Высокий уровень проведения научно-исследовательской работы, репрезентативная выборка, четко определенные и сформулированные задачи, современные методы исследования, дали возможность получить обоснованные результаты и сделать содержательные выводы и практические рекомендации. Положения, выносимы на защиту, вытекают из полученных результатов и отражают наиболее значимые результаты исследования.

Рекомендации по использованию результатов работы и выводов диссертации

Выводы и основные положения диссертационной работы Тюрина Ю.А. могут быть широко использованы в практической работе не только врачей аллергологов-иммунологов, но и врачей смежных специальностей (педиатров, дерматовенерологов, отоларингологов, врачей-бактериологов). Основные результаты диссертационного исследования внедрены и используются в практической работе научно-исследовательских лабораторий и специализированной поликлиники инфекционно-аллергических заболеваний ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Публикации по теме диссертации

По результатам диссертационной работы автором опубликовано 41 работа, в том числе 9 научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук; 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 (из них 5 зарубежных конференций).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 284 страницах компьютерного текста и состоит из введения и 8 глав, включающих обзор литературы (глава 1), методы исследования (глава 2), и основную часть работы, которая состоит из 6 глав описания результатов собственных исследований, а также заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. В текст диссертации включены 41 рисунок, 44 таблицы, 7 приложений. Список литературы содержит 383 источника, в том числе 111 публикаций отечественных и 272 – зарубежных авторов.

Во введении автором изложена актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, определены научная новизна, практическая значимость, указаны методы и методология исследования, обоснована степень достоверности и апробация полученных результатов.

В первой главе автором описываются результаты анализа публикаций отечественных и зарубежных исследователей о распространённости в популяции atopического дерматита и аллергического ринита у человека и патогенеза этих заболеваний, а также состояния локальной микробиоты кожи и слизистых оболочек верхних дыхательных путей при этих АЗ. Показана роль *S. aureus*, как триггерного микробного фактора при atopическом дерматите, вызывающего развитие инфицирования и связанных с ним осложнений. Проведены данные касающиеся роли белков - факторов патогенности *S. aureus* в патогенезе atopического заболевания и воздействия на барьеры кожи и эпителия. Отдельно представлены данные касающиеся группы сериновых протеиназ *S. aureus*, как потенциальных факторов аллергенности и их роли в сенсибилизации пациентов с atopическим дерматитом и респираторной аллергией

Во второй главе полностью раскрываются методы и методология исследования, а также характеристика клинического материала. Дается точное описание иммунологических, молекулярно-генетических, биохимических, протеомных, бактериологических, микологических, статистических и биоинформатических методов исследования.

В третьей главе представлены результаты проведённого исследования локальной микробиоты кожи и слизистых оболочек ВДП у больных с atopическим дерматитом и респираторной аллергией

В четвёртой главе отражены результаты исследования, которые демонстрируют связь между количественными изменениями микробиоты кожи, слизистых оболочек ВДП у больных с АтД и респираторной аллергией и усилением патогенного потенциала *S. aureus*, включая повышение протеолитической активности, а также продукцию широкого спектра экзотоксинов и протеиназ.

В пятой главе представлены результаты исследования генетического профиля штаммов *S. aureus*, которые лежат в основе высокого патогенного потенциала этих штаммов у больных с atopическим дерматитом и аллергическим ринитом.

В шестой главе представлены результаты исследования по выявлению мутаций (SNP) генов TLR2-, TLR4-рецепторов и гена SPINK5, у больных с atopическим дерматитом и аллергическим ринитом (респираторной аллергией).

В седьмой главе отражены результаты исследования аллергенных свойств продуктов жизнедеятельности штаммов *S. aureus*, колонизирующих верхние дыхательные пути и кожу, которые вызывают IgE-опосредованную сенсibilизацию у больных с респираторными атопическими заболеваниями. В качестве таких продуктов, автором исследован один из стафилококковых белков – фермент сериновая протеиназа группы *Spl*-протеиназ золотистого стафилококка, для которых показаны потенциальные аллергенные свойства.

В восьмой главе представлены результаты биоинформатического исследования по изучению первичной структуры аллергенов *S. aureus* (*SplA*) и аллергенов клещей домашней пыли. Результаты, отражённые автором в данной главе, впервые показали высокую степень гомологии между бактериальной *SplA* протеиназой *S. aureus* и алергокомпонентами (*Der p 4* или α -амилаза) из клещей домашней пыли *D. pteronyssinus* и *Der f 6* (химотрипсин) *D. farinae*.

Представленные выводы полностью соответствуют поставленным задачам и полностью их раскрывают. Практические рекомендации, указанные автором в конце диссертационной работы, дают рациональное и всеобъемлющее решение по ведению пациентов с аллергическими заболеваниями – атопическим дерматитом и аллергическим ринитом.

Построение списка сокращений и условных обозначений, а также списка литературы полностью соответствует всем требованиям ГОСТ, предъявляемым к диссертационным работам.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

В диссертационной работе наблюдаются редкие технические и стилистические недостатки, которые не снижают научную и практическую ценность работы.

Рекомендации по использованию материалов диссертации в учебных целях

Материалы диссертационной работы Тюрина Ю.А. могут быть использованы в учебном процессе клинических и теоретических кафедр. Результаты диссертации следует использовать как материал для обучения студентов, врачей-ординаторов, аспирантов, проходящих обучение по клиническим и медико-биологическим специальностям, и врачей, повышающих свою квалификацию.

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры аллергологии и иммунологии Казанской государственной медицинской академии – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации (КГМА-филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России) при изучении дисциплин оториноларингология, внутренние болезни, педиатрия, инфекционные болезни, дерматовенерология; гастроэнтерология и диетология, читаемых слушателям (ординаторам) по

