

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук

Петричук Светланы Валентиновны

на диссертационную работу

Носыревой Ксении Константиновны

**«Роль микробного дисбиоза кожи в иммунопатогенезе
атопического дерматита» на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология**

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа К.К. Носыревой посвящена изучению роли микробного дисбиоза кожи в иммунопатогенезе atopического дерматита (АтД). Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, распространённость АтД в детской популяции достигает 20%, среди взрослых составляет 2-10%, при этом за последние десятилетия наблюдается неуклонный рост заболеваемости в индустриально развитых странах, что связывают с урбанизацией, изменением характера питания и воздействием экологических факторов.

АтД представляет собой хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание, которое значительно снижает качество жизни пациентов, а также часто ассоциировано с развитием других atopических заболеваний (аллергический ринит, бронхиальная астма), что формирует так называемый «атопический марш».

В последние годы накоплены убедительные данные о том, что микробиота кожи играет важную роль в поддержании иммунного гомеостаза, а её нарушение – дисбиоз – активно участвует в патогенезе АтД. Показано, что при АтД происходит доминирование *Staphylococcus aureus* на фоне редукции комменсальных микроорганизмов на коже, что сопровождается активацией Th2-иммунного ответа. Существенный вклад в развитие и поддержание воспаления вносят также грибы рода *Malassezia* и *Candida*, обладающие выраженными иммуногенными свойствами.

Однако ключевой проблемой, сдерживающей внедрение этих знаний в клиническую практику, остаётся несовершенство существующих

методов диагностики микробного дисбиоза кожи. Традиционные культуральные методы обладают относительно низкой диагностической чувствительностью, особенно в отношении труднокультивируемых грибов, и не позволяют точно установить количественные взаимосвязи между уровнем колонизации и выраженностью иммунного ответа. Разработка новых высокочувствительных количественных методов диагностики является необходимым условием для понимания иммунологической значимости микробиоциноза при АД.

Таким образом, диссертационная работа К.К. Носыревой, направленная на разработку количественной ПЦР-РВ методики для оценки микробного дисбиоза кожи и установление его связи с иммунопатогенезом атопического дерматита, является своевременной и практически значимой.

Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует специальности «3.2.7. Иммунология» (биологические науки): (направления исследований: №5 Изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний; №6 Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов).

Основные результаты диссертационной работы

В диссертационном исследовании получены результаты, представляющие несомненный научный и практический интерес.

В первую очередь разработана и валидирована оригинальная методика мультиплексной количественной ПЦР-РВ для комплексной оценки микробного дисбиоза кожи. Созданная панель включает все клинически значимые мишени – *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* spp., *Malassezia* spp., дерматомицеты. Автором проведена полная оптимизация условий реакции, что обеспечило высокую эффективность и воспроизводимость

метода. Сравнительный анализ разработанной методики и культурального «золотого стандарта» убедительно продемонстрировал превосходство предложенного метода, особенно в отношении выявления грибкового компонента микробиоты кожи. Так, частота обнаружения *Malassezia* spp. методом ПЦР-РВ составила 90,9%, что значимо выше, чем при культуральном исследовании (2,7%; $p < 0,0001$) и указывает на 33-кратное увеличение диагностической чувствительности. Частота выявления *Candida* spp. методом ПЦР-РВ также была значительно выше (32,7% против 4,5% при культуральном исследовании).

С использованием разработанной методики проведён анализ образцов 110 пациентов с АтД и 86 условно-здоровых лиц. Основным результатом исследования доказывает избирательный характер дисбиоза, ассоциированный с атопическим дерматитом. Установлено, что не общая бактериальная обсеменённость, а именно уровень колонизации *Staphylococcus aureus* является патогенетически значимым: концентрация *Staphylococcus aureus* у пациентов с АтД составила 4,1 lg копий/мл, что в 100 раз выше, чем в группе сравнения ($p < 0,001$). При этом уровни колонизации *Streptococcus* spp. значимо не различались между группами. Выявлены значимые положительные корреляции между уровнем колонизации *Staphylococcus aureus* и индексом SCORAD, концентрацией общего IgE и эозинофилией, что количественно подтверждает роль этого патогена в патогенезе изучаемого заболевания.

Анализ грибковой составляющей микробиома кожи показал, что АтД ассоциирован с повышением частоты носительства *Candida* spp. и специфическим увеличением частоты выявления *Debaryomyces hansenii* (*C. famata*) в 2,7 раза. Впервые установлена качественная перестройка видового состава *Malassezia* spp., за счет снижения частоты носительства *Malassezia sympodialis*, что свидетельствует о нарушении колонизационной резистентности. Выявлено, что уровень колонизации *Malassezia* spp. коррелировал с тяжестью заболевания по индексу SCORAD.

На основе ROC-анализа впервые определены диагностически значимые пороговые значения микробной нагрузки, превышение которых

коррелирует с клиническими признаками инфекционного осложнения АтД и может служить объективным лабораторным критерием для обоснованного назначения таргетной антимикробной терапии.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Цель и задачи сформулированы четко. В работе использованы современные молекулярно-биологические, микробиологические и иммунологические методы исследования, выполненные на сертифицированном оборудовании. Выбор методов полностью соответствуют цели и поставленным задачам исследования. Полученные данные обработаны с применением адекватных статистических методов и достоверны.

Научная новизна диссертационной работы

Впервые с помощью метода ПЦР-РВ доказано, что гиперколонизация *Staphylococcus aureus* является самостоятельным триггером иммунного воспаления при atopическом дерматите. Продемонстрирована значимая прямая корреляция уровня колонизации *Staphylococcus aureus* с концентрацией общего IgE, эозинофилией и клинической тяжестью заболевания по индексу SCORAD, что свидетельствует о значимой роли стафилококковой колонизации в патогенезе АтД.

Впервые проведён детальный анализ грибковой составляющей микробиома кожи с использованием метода ПЦР-РВ. Выявлено повышение частоты носительства *Candida* spp. и качественная перестройка видового состава рода *Malassezia*, что указывает на нарушение конкурентных взаимоотношений внутри микробиома.

Впервые установлена прямая корреляционная связь между уровнем колонизации *Malassezia* spp. и тяжестью atopического дерматита, что обосновывает патогенетическую значимость грибкового дисбиоза в поддержании хронического воспалительного процесса.

Впервые сформулирована и экспериментально обоснована концепция «порога колонизации», согласно которой переход от бессимптомного носительства к иммуноопосредованному воспалению определяется превышением определённого количественного уровня колонизации микроорганизма на коже.

Теоретическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в расширении существующих представлений о месте микробного фактора в иммунопатогенезе АтД. Убедительно доказано, что микробный дисбиоз кожи при АтД способен самостоятельно инициировать и поддерживать хроническое воспаление. Полученные данные позволяют пересмотреть упрощённую линейную модель развития заболевания и рассматривать микробиоту как динамический модулятор иммунного гомеостаза.

Особую теоретическую ценность имеет доказательство избирательного характера дисбиотических нарушений. Установлено, что специфичность иммунопатологических механизмов на коже пациентов с АтД реализуется за счет бактерии вида именно *Staphylococcus. Aureus*, в отличие от стафилококков: уровень колонизации *Streptococcus* spp. значимо не различался между сравниваемыми группами.

В работе теоретически обосновано существование «иммунологически безопасного» уровня колонизации, что меняет фундаментальный подход к оценке микробиологических данных: диагностическое значение имеет не сам факт обнаружения микроорганизма, а превышение количественного порога его колонизации, запускающего каскад иммунопатологических реакций.

Практическая значимость диссертационной работы

Практическая значимость работы имеет существенное значение для улучшения диагностики и терапии пациентов с АтД.

Разработанная и валидированная методика мультиплексной количественной ПЦР-РВ представляет собой готовый к внедрению диагностический инструмент. Преимущества представленной методики

перед культуральными методами очевидны: высокая чувствительность (особенно к труднокультивируемым грибам), объективная количественная оценка, одновременное выявление бактериальных и грибковых патогенов, а также быстрота получения результата. Это позволяет использовать разработанную методику мультиплексной количественной ПЦР-РВ в клинической практике для экспресс-диагностики дисбиотических нарушений.

Автором впервые установлены диагностически значимые пороговые значения (cut-off) микробной нагрузки, которые могут служить объективными лабораторными критериями для принятия клинических решений. Для *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus* spp. порог составляет 4,0 lg копий/мл, для *Malassezia* spp. - 3,0 lg копий/мл, для общей бактериальной нагрузки - 5,0 lg копий/мл. Превышение этих порогов позволяет дифференцировать инфекционное обострение от неинфекционного и обоснованно назначать целенаправленную антимикробную терапию.

Разработанная методика может использоваться для объективного мониторинга эффективности лечения. Количественная оценка микробной нагрузки в динамике позволяет оценить адекватность подобранной терапии и при необходимости скорректировать её, что повышает контроль над течением заболевания и улучшает прогноз.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа К.К. Носыревой изложена на 127 страницах машинописного текста и оформлена по традиционному плану: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список литературы и приложение. Работа иллюстрирована 13 рисунками и 12 таблицами, что способствует наглядному восприятию материала. Библиографический список включает 144 источника, из которых 18 отечественных и 126 зарубежных, что свидетельствует о глубоком анализе современного состояния проблемы.

Обзор литературы выполнен на высоком уровне, содержит систематический анализ данных об иммунопатогенезе АтД, роли

микробиоты кожи и ограничениях существующих методов диагностики. Глава «Материалы и методы» подробно и грамотно описывает дизайн исследования, клинические группы, молекулярно-биологические, микробиологические, иммунологические и статистические методы. Результаты исследования изложены последовательно и логично, хорошо проиллюстрированы. Глава «Обсуждение» представляет собой глубокий анализ полученных данных с их сопоставлением с современной литературой. Заключение содержит практические рекомендации и перспективы дальнейших исследований. Выводы полностью обоснованы полученными результатами.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 7 печатных работах, в том числе в 5 статьях в рецензируемых научных журналах, которые включены в перечень периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

При рассмотрении диссертации возникли следующие вопросы:

1. Как вы можете объяснить низкую высеваемость грибов рода *Malassezia* и дрожжеподобных грибов классическими микробиологическими методами по сравнению с разработанной вами методикой на основе ПЦР-РВ?
2. В тексте диссертации не упоминается использование внутреннего контроля для оценки эффективности экстракции ДНК и наличия ингибиторов ПЦР в клинических образцах. Применялся ли какой-либо контроль и если нет, то как вы исключали возможное влияние потерь ДНК или ингибирующих компонентов кожных соскобов на количественные результаты?
3. В работе соскобы брали с разных анатомических областей (лицо, волосистая часть головы, плечи, кисти, голени и др.), а в группе

сравнения образцы разделили на «себорейные» и «несеборейные» зоны. Учитывая, что микробиом сильно зависит от локализации, не проводился ли отдельный анализ внутри каждой зоны, и если нет, то не могла ли такая гетерогенность повлиять на результаты сравнения?

4. Вы предложили пороги для разграничения патологической колонизации и носительства. Планировалось ли проверить эти пороги в динамике – например, оценить, как они меняются на фоне успешной терапии, и можно ли их использовать для мониторинга эффективности лечения?

Заключение

Диссертационная работа Носыревой Ксении Константиновны «Роль микробного дисбиоза кожи в иммунопатогенезе атопического дерматита» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных задач, имеющих существенное значение для иммунологии: установлена взаимосвязь между количественными параметрами микробного дисбиоза и иммунопатологическим процессом при атопическом дерматите; разработан и валидирован новый высокочувствительный метод количественной диагностики дисбиоза; доказано, что гиперколонизация *Staphylococcus aureus* и *Malassezia* spp. является активным триггером иммуноопосредованного воспаления; впервые установлены объективные пороговые значения микробной нагрузки, позволяющие дифференцировать патологическую колонизацию от бессимптомного носительства; полученные результаты имеют существенное значение для понимания иммунопатогенеза АД и обладают выраженной практической ценностью, поскольку предложенный диагностический подход может служить основой для персонализированной терапии и мониторинга эффективности лечения.

Диссертационная работа Носыревой К.К. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. в актуальной редакции), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» (биологические науки).

Официальный оппонент:
доктор биологических наук,
профессор, главный научный
сотрудник лаборатории
экспериментальной иммунологии и
вирусологии Федерального
государственного автономного
учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр
здоровья детей» Министерства
здравоохранения Российской
Федерации



Петричук Светлана Валентиновна

27.08.2016г

Подпись д.б.н. С.В. Петричук заверяю:

Заместитель директора по научной
работе ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»
Минздрава России,
доктор медицинских наук



Макарова Светлана Геннадьевна

Контактная информация: Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Адрес: 119991, Россия, г. Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр.1. Тел.: +7 (495) 698-45-38, e-mail: info@nczd.ru сайт: <https://nczd.ru/about/>