

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н, доцента Воропаевой Елены Александровны
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 диссертационной работы

Диссертационная работа К.К. Носыревой посвящена актуальной проблеме современной иммунологии и эпидемиологии инфекционных заболеваний – изучению роли микробного дисбиоза кожи в патогенезе атопического дерматита. Заболеваемость АтД неуклонно растёт во всём мире: по данным глобальных эпидемиологических исследований, распространённость заболевания среди детей достигает 15–20%, среди взрослого населения составляет 2–10%, при этом в индустриально развитых странах эти показатели ежегодно увеличиваются на 3–5%. В Российской Федерации, согласно официальным статистическим данным, заболеваемость АтД за последнее десятилетие возросла почти вдвое, что делает проблему особенно значимой для отечественного здравоохранения.

АтД является мультифакторным заболеванием, в основе которого лежит сложная дисрегуляция врождённого и адаптивного иммунитета. В острой фазе заболевания доминирует Th2-иммунный ответ с продукцией IL-4, IL-5, IL-13 и IL-31, что приводит к переключению синтеза иммуноглобулинов на IgE, повышению числа эозинофилов и активации тучных клеток. При хроническом течении к Th2-ответу присоединяются Th1, Th17 и Th22-субпопуляции, что формирует сложный иммунопатологический каскад.

Особое место в патогенезе АтД занимает микробный фактор. В многочисленных исследованиях показано, что колонизация кожи *Staphylococcus aureus* наблюдается у 70–90% пациентов с АтД, тогда как у здоровых лиц этот показатель не превышает 5–10%. Однако остаётся не до конца ясным, каким образом количественные параметры микробной колонизации соотносятся с активностью иммунопатологического процесса, а также какую роль в патогенезе играют другие компоненты микробиома, в частности грибы рода *Malassezia* и *Candida*.

Разработка новых высокочувствительных количественных методов диагностики микробного дисбиоза кожи является крайне актуальной как для фундаментальной иммунологии, так и для практического здравоохранения.

Таким образом, диссертационная работа К.К. Носыревой, направленная на разработку количественной ПЦР-РВ методики для комплексной оценки микробного дисбиоза кожи и

установление его иммунологической значимости при атопическом дерматите, является своевременной, методологически обоснованной и значимой.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Диссертационная работа соответствует специальности «3.2.7. Иммунология» (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 центре внимания находится разработка и валидация оригинальной мультиплексной методики количественной ПЦР-РВ, предназначенной для комплексной диагностики бактериально-грибкового дисбиоза кожи при АД. В отличие от традиционных культуральных подходов, которые требуют длительного времени и не всегда позволяют выявить труднокультивируемые микроорганизмы, разработанная панель даёт возможность в рамках одного анализа одновременно оценивать широкий спектр патогенов и комменсалов, ассоциированных с иммунопатогенезом заболевания. Проведена тщательная оптимизация всех этапов методического процесса — от подбора олигонуклеотидных последовательностей и условий амплификации до построения калибровочных кривых, что обеспечило высокую эффективность и воспроизводимость метода. Специфичность разработанных праймерных систем подтверждена как с использованием биоинформатического анализа, так и экспериментально на коллекционных штаммах микроорганизмов с последующей верификацией методом секвенирования по Сэнгеру. Сравнительный анализ диагностической эффективности разработанной методики и классического культурального метода продемонстрировал её значительное превосходство по чувствительности, особенно в отношении грибковых компонентов микробиоты, что открывает новые возможности для изучения микробного пейзажа кожи при АД.

С применением разработанной методики автором проведён комплексный анализ микробиоты кожи значительной группы пациентов с АД различной степени тяжести и условно-здоровых лиц. Ключевым результатом этого этапа исследования является доказательство избирательного характера дисбиотических нарушений при данном заболевании. Удалось показать, что патогенетически значимым является не столько общее увеличение бактериальной обсеменённости кожи, сколько специфическая гиперколонизация *S. aureus* на фоне относительной стабильности других бактериальных таксонов. Установлены

сильные корреляционные связи между уровнем колонизации *S. aureus* и клинической тяжестью заболевания, оцениваемой по индексу SCORAD, а также с концентрацией общего IgE и выраженностью эозинофилии. Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что стафилококковая колонизация представляет собой не пассивный сопутствующий феномен, а активный триггер иммунного воспаления, способный самостоятельно инициировать и поддерживать патологический процесс.

Принципиально новые результаты получены автором в отношении грибкового компонента микробиоты кожи. До настоящего времени роль грибов рода *Malassezia* и *Candida* в патогенезе атопического дерматита оставалась недостаточно изученной, что было связано в первую очередь с методическими трудностями их культивирования и идентификации. Применение количественного молекулярно-генетического подхода позволило не только подтвердить повышенную частоту носительства *Candida* spp. у пациентов с АД, но и впервые продемонстрировать качественную перестройку видового спектра *Malassezia*. Выявлена корреляционная связь между уровнем колонизации *Malassezia* и тяжестью заболевания, при этом отсутствие аналогичной корреляции с концентрацией общего IgE указывает на то, что патогенное действие грибов может реализовываться и через альтернативные иммунные механизмы. Важно отметить, что дерматофитные грибы не были обнаружены ни в одной из исследуемых групп, что подтверждает специфичность выявленных изменений микобиома и позволяет сфокусировать внимание именно на тех таксонах, которые действительно вовлечены в иммунопатогенез атопического дерматита.

На основе ROC-анализа количественных данных автором впервые определены диагностически значимые пороговые значения микробной нагрузки, позволяющие дифференцировать патологическую колонизацию от бессимптомного носительства: для *S. aureus* и *Staphylococcus* spp. — >4,0 lg копий/мл, для *Malassezia* spp. — >3,0 lg копий/мл, для общей бактериальной нагрузки — >5,0 lg копий/мл. Установлено, что превышение указанных порогов коррелирует с клиническими признаками инфекционного осложнения и может служить объективным лабораторным критерием для назначения таргетной антимикробной терапии.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа К.К. Носыревой выполнена на высоком научно-методическом уровне. В работе использованы современные методы исследования. Результаты исследования получены с использованием сертифицированного и откалиброванного оборудования, обработка результатов выполнена с использованием адекватных методов математической статистики. Полученные результаты достоверны.

Научная новизна диссертационной работы

Впервые разработана и валидирована оригинальная мультиплексная методика количественной ПЦР-РВ для комплексной диагностики бактериально-грибкового дисбиоза кожи при АтД, включающая 27 аналитов, охватывающих все клинически значимые таксоны, ассоциированные с иммунопатогенезом заболевания. Методика позволяет в одном анализе проводить количественную оценку как бактериальных, так и грибковых патогенов с высокой чувствительностью и специфичностью, что принципиально расширяет диагностические возможности по сравнению с традиционными культуральными методами.

Впервые с помощью количественного ПЦР-анализа установлено, что колонизация *S. aureus* является самостоятельным триггером иммунного воспаления при АтД. Продемонстрирована прямая сильная корреляция между уровнем колонизации *S. aureus* и концентрации общего IgE, эозинофилией, а также клинической тяжестью заболевания, что позволяет рассматривать стафилококковую гиперколонизацию как ключевое звено патогенеза, а не как пассивный сопутствующий феномен.

Впервые с применением количественного молекулярно-генетического подхода проведён детальный анализ грибкового компонента микробиоты кожи при АтД. Установлено, что АтД ассоциирован не только с повышением частоты носительства *Candida* spp., но и с качественной перестройкой видового спектра *Malassezia*, проявляющейся в достоверном снижении доли комменсального вида *M. sympodialis*. Это указывает на нарушение конкурентных взаимоотношений внутри микробного сообщества и свидетельствует о снижении колонизационной резистентности кожи, что может способствовать персистенции и патогенному действию условно-патогенных микроорганизмов.

Впервые установлена корреляционная связь между количественной нагрузкой *Malassezia* spp. и тяжестью атопического дерматита, что обосновывает патогенетическую значимость грибкового дисбиоза в поддержании хронического воспалительного процесса. Отсутствие корреляции с уровнем IgE свидетельствует о том, что патогенное действие грибов может реализовываться через альтернативные иммунные механизмы, в частности через активацию инфламмасомных путей в кератиноцитах.

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

подходы к интерпретации микробиологических данных и обосновывает необходимость количественной, а не качественной оценки микробного пейзажа кожи.

Теоретическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в фундаментальном пересмотре представлений о роли микробного фактора в иммунопатогенезе атопического дерматита и формировании новой парадигмы, в которой микробиота рассматривается как активный участник патологического процесса, а не пассивный сопутствующий компонент.

Прежде всего убедительно доказано, что микробный дисбиоз кожи при АД не является вторичным феноменом, возникающим исключительно вследствие нарушения эпидермального барьера, а представляет собой самостоятельное патогенетическое звено, способное инициировать и поддерживать воспаление. Это существенно расширяет существующие теоретические модели патогенеза АД, которые традиционно рассматривали микробную колонизацию как следствие, а не как причину воспалительного процесса.

Особую теоретическую ценность имеет установленный автором факт избирательного характера дисбиотических нарушений. Показано, что патогенетически значимым является не общее увеличение бактериальной обсеменённости кожи, а специфическая колонизация *S. aureus* на фоне относительной стабильности других бактериальных таксонов. Это указывает на то, что иммунопатологический эффект реализуется через специфические механизмы взаимодействия именно *S. aureus* с иммунной системой хозяина.

Принципиально новым теоретическим обобщением является обоснование существования «иммунологически безопасного» уровня колонизации. Данное понятие меняет фундаментальный подход к оценке результатов микробиологического исследования: диагностическое и прогностическое значение имеет не сам факт обнаружения микроорганизма, а превышение количественного порога его колонизации, за которым следует активация каскада иммунопатологических реакций. Это положение согласуется с современными представлениями о том, что иммунная система поддерживает толерантность к комменсальным микроорганизмам до тех пор, пока их количество не превышает определённого порога, после чего запускаются провоспалительные механизмы.

Кроме того, работа вносит вклад в развитие представлений о гетерогенности АД и формировании различных эндотипов заболевания. Выявленные различия в микробных профилях пациентов с разной степенью тяжести заболевания, а также дифференцированная связь бактериального и грибкового дисбиоза с иммунологическими маркерами позволяют рассматривать АД не как монолитное заболевание, а как группу состояний с различной

этиопатогенетической основой, что требует дифференцированного терапевтического подхода.

Практическая значимость диссертационной работы

Практическая значимость диссертационной работы определяется как разработкой нового диагностического инструмента, так и внедрением объективных количественных критериев для клинического принятия решений.

Разработанная и валидированная методика мультиплексной количественной ПЦР-РВ представляет собой готовый к широкому внедрению диагностический продукт, не имеющий аналогов по полноте охвата клинически значимых мишеней. В отличие от традиционных культуральных методов, занимающих от нескольких дней до нескольких недель и требующих специальных условий для выращивания труднокультивируемых микроорганизмов, ПЦР-РВ методика позволяет получить количественный результат в течение нескольких часов. Это имеет критическое значение для принятия своевременных клинических решений, особенно у пациентов с тяжёлым течением АтД, требующих быстрой коррекции терапии. Одновременное выявление бактериальных и грибковых патогенов в одном анализе позволяет оценить сочетанный характер дисбиоза и выбрать оптимальную стратегию этиотропной терапии.

Установленные автором пороговые значения микробной нагрузки для *S. aureus* ($>4,0$ lg копий/мл), *Malassezia* spp. ($>3,0$ lg копий/мл) и общей бактериальной нагрузки ($>5,0$ lg копий/мл) являются первыми в мировой практике объективными лабораторными критериями, позволяющими дифференцировать инфекционное обострение АтД от неинфекционного. Эти пороговые значения могут быть непосредственно использованы в клинической практике для обоснованного назначения антибактериальной или противогрибковой терапии, что позволит избежать эмпирического применения антимикробных препаратов, снизить риски развития антибиотикорезистентности и нерационального использования лекарственных средств. Применение количественных критериев также способствует более точному определению показаний к госпитализации и выбору тактики ведения пациентов.

Разработанная методика может служить инструментом объективного мониторинга эффективности проводимой терапии. Динамическая оценка микробной нагрузки на фоне лечения позволяет оценить адекватность подобранной схемы терапии, своевременно выявить реколонизацию патогенами после отмены антибиотиков и при необходимости скорректировать лечение. Это особенно актуально для пациентов с часто рецидивирующим течением заболевания, у которых стандартная терапия оказывается недостаточно

эффективной. Внедрение методики в клиническую практику позволит повысить контроль над течением заболевания, уменьшить частоту обострений и улучшить качество жизни пациентов.

Разработанный подход может быть использован для стратификации пациентов по эндотипам, что откроет перспективы для персонализированной терапии АтД. Такой дифференцированный подход, основанный на объективных лабораторных данных, позволит оптимизировать терапевтические стратегии и повысить их эффективность.

Разработанная панель анализов, включающая помимо основных патогенов также комменсальные микроорганизмы, предоставляет возможность для изучения конкурентных взаимоотношений внутри микробиома и оценки влияния проводимой терапии на микробное сообщество в целом. Это имеет значение для разработки стратегий, направленных не только на эрадикацию патогенов, но и на восстановление нормального микробиома кожи, что может рассматриваться как перспективное направление профилактики рецидивов.

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 собственных исследований, обсуждение, выводы, список литературы и приложение. Работа иллюстрирована 13 рисунками и 12 таблицами, что способствует лучшему 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 аргументированы и соответствуют поставленным задачам.

Материалы диссертации прошли широкую апробацию на всероссийских и международных конференциях. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 7 печатных работах, в том числе 5 статьях в рецензируемых научных журналах, которые включены в перечень периодических научных изданий,

рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций, 2 публикации в материалах конгрессов и конференций. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

При рассмотрении диссертации возникли следующие вопросы:

- 1) На основании анализа литературных данных в целевую панель разрабатываемой ПЦР тест-системы был включен широкий спектр микроорганизмов, определяющих инфекционно-воспалительные осложнения при atopическом дерматите, но при обследовании пациентов выявлены только некоторые из них с преобладанием *S. aureus* и *Malassezia spp.*? С чем может быть связано такое ограничение?
- 2) Вы обнаружили, что у пациентов с АД снижена частота колонизации комменсальным видом *Malassezia sympodialis*, тогда как общая частота *Malassezia spp.* повышена. Как вы интерпретируете это с иммунологической точки зрения?
- 3) При верификации мультиплексной ПЦР-РВ методом секвенирования по Сэнгеру (таблица 8) число исследований для некоторых мишеней составляет всего 2 образца, для других — 3, 5, 7 или 10. С чем связано разное количество образцов и подтверждает ли это 100% конкордантность?
- 4) Проводилась ли при выполнении работы оценка внутри- и межсерийной прецизионности ПЦР-РВ, а также воспроизводимость постановки разными операторами? Для каких моделей амплификаторов подходит данная тест-система?
- 5) В диссертационной работе указано, что экспериментальная оптимизация условий ПЦР-РВ для каждой мишени проводилась в моноплексном формате (стр. 50), тогда как разработанная методика в последующих разделах характеризуется как мультиплексная ПЦР-РВ (стр. 58, 96). В связи с этим требует уточнения состав мультиплексных реакций и экспериментальное обоснование объединения отдельных мишеней в мультиплексный формат, включая оценку возможного взаимного влияния компонентов реакции на аналитические характеристики метода.

Заключение

Диссертационная работа Носыревой Ксении Константиновны «Роль микробного дисбиоза кожи в иммунопатогенезе atopического дерматита» на соискание учёной 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; доказано, что усиленная колонизация *Staphylococcus aureus* и *Malassezia* spp. является активным триггером воспаления; впервые установлены объективные пороговые значения микробной нагрузки, позволяющие дифференцировать патологическую колонизацию от бессимптомного носительства; полученные результаты имеют существенное значение для понимания иммунопатогенеза АД, объясняют клиническую гетерогенность заболевания 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 учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. в актуальной редакции), а её автор заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент,
заместитель директора по медицинской
биотехнологии Федерального бюджетного
учреждения науки «Московский научно-
исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.
Габричевского» Федеральной службы по
надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека



Воропаева Елена Александровна

«26» 08 2026 г.

Подпись д.б.н., доцента Е.А. Воропаевой заверяю;
Учёный секретарь, кандидат биологических наук



Гудова Наталия Владимировна

Контактная информация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Адрес: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10; тел.: +7 (495) 452-18-00; e-mail: info@gabrich.ru; сайт: <https://www.gabrich.ru>