

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Потапова Мария Борисовна

**Иммунотропная коррекция микробиома кожи у больных атопическим
дерматитом**

3.1.23. Дерматовенерология

3.2.7. Иммунология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор,

член-корреспондент РАН

Олисова Ольга Юрьевна

доктор медицинских наук, профессор,

член-корреспондент РАН

Свитич Оксана Анатольевна

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 14 |
| 1.1. Атопический дерматит и особенности клинической картины..... | 14 |
| 1.2. Этиология атопического дерматита..... | 17 |
| 1.3. Иммунопатогенез атопического дерматита..... | 20 |
| 1.3.1. Роль IL-33 в патогенезе атопического дерматита..... | 23 |
| 1.3.2. IL-37 и атопический дерматит..... | 25 |
| 1.3.3. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе атопического дерматита..... | 27 |
| 1.4. Микробиом кожи при атопическом дерматите..... | 29 |
| 1.5. Методы лечения атопического дерматита..... | 33 |
| 1.5.1. Основные принципы лечения согласно действующим клиническим рекомендациям..... | 34 |
| 1.5.2. Моноклональные антитела и ингибиторы янус-киназы в лечении атопического дерматита..... | 36 |
| 1.5.3. Влияние различных методов терапии на микробиом кожи..... | 37 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 41 |
| 2.1. Дизайн исследования..... | 41 |
| 2.2. Характеристика групп..... | 42 |
| 2.3. Методы исследования..... | 45 |
| 2.3.1. Контактный посев..... | 45 |
| 2.3.2. Получение чистых культур..... | 47 |
| 2.3.3. Выделение нуклеиновых кислот..... | 48 |
| 2.3.4. Реакция обратной транскрипции..... | 49 |
| 2.3.5. Постановка полимеразной цепной реакции в режиме реального времени..... | 50 |
| 2.4. Статистическая обработка данных..... | 51 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ..... | 53 |
| 3.1. Общая характеристика пациентов с атопическим дерматитом..... | 53 |
| 3.2. Особенности экспрессии генов IL-4, IL-13, IL-33 и TNF- α в группе пациентов с атопическим дерматитом на системном уровне..... | 55 |

| | |
|---|-----|
| 3.3. Изучение ассоциаций полиморфных маркеров rs7019575 в гене IL-33, rs3811046 и rs3811047 в гене IL-37 с риском развития atopического дерматита... | 59 |
| 3.4. Поиск ассоциаций полиморфных маркеров rs5743708 в гене TLR2, rs11536889 и rs4986791 в гене TLR4 и rs352140 в гене TLR9 с риском развития atopического дерматита..... | 64 |
| 3.5. Анализ бактериальной составляющей микробиома пораженных и неизмененных участков кожного покрова в динамике..... | 71 |
| 3.6. Исследование генетических особенностей стафилококков, выделенных с поверхности кожи пациентов с atopическим дерматитом..... | 80 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 86 |
| ВЫВОДЫ..... | 90 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... | 91 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ..... | 92 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 94 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ А. Перечень последовательностей праймеров..... | 114 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Частота встречаемости аллелей, генотипов и гаплотипов полиморфных маркеров генов TLRs и ILs..... | 116 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Атопический дерматит – хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание кожи, характеризующееся эритематозно-сквамозными высыпаниями, ксерозом и интенсивным зудом. Рецидивы заболевания связаны со значительным снижением качества жизни и продуктивности в учебное или рабочее время [35, 63, 93].

Атопический дерматит является одним из наиболее распространенных заболеваний кожи, распространенность которого достигает до 20% среди детей и 10% – взрослых. Манифестация кожного процесса в 50% случаев происходит на первом году жизни и в 85% – до пятилетнего возраста, и может быть предвестником развития других аллергических заболеваний: аллергического ринита, бронхиальной астмы и пищевой аллергии [98, 110, 156, 160, 167].

Клинические проявления разнообразны и могут меняться с течением времени в зависимости от возраста пациента, а также продолжительности течения заболевания [57]. Острая фаза атопического дерматита характеризуется яркой эритемой и отеком, тогда как в период хронической фазы клиническая картина представлена участками выраженного ксероза, лихенификации и остаточной гипо- или гиперпигментации [2, 92, 155].

Значимую роль в развитии атопического дерматита играет взаимодействие внутренних и внешних этиологических факторов. Среди них выделяют воздействие факторов окружающей среды, отягощенный семейный анамнез в отношении атопических заболеваний (атопический дерматит, бронхиальная астма и аллергический ринит), дефекты эпидермального барьера, дисбаланс микробиома кожи, дисрегуляцию врожденного и адаптивного иммунитета, а также различные эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов [107, 80, 168].

Центральное место в патогенезе атопического дерматита занимает воспалительный процесс в коже, характеризующийся активацией клеток Лангерганса, дендритных и врожденных лимфоидных клеток. В результате

дефекта эпидермального барьера цитокиновый профиль смещается в сторону Th2-опосредованного иммунного ответа, что ведет к подавлению Th1-опосредованного противоинфекционного иммунного ответа, тем самым способствуя колонизации кожи *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), различными видами *Malassezia* и вирусами [105, 147, 178].

К ключевыми цитокинам, вовлеченным в патогенез атопического дерматита, относятся IL-4, IL-5, IL-13, IL-31 и TNF- α [52, 192]. Вместе с открытием новых цитокинов исследователи сосредотачиваются на поиске их места в патогенезе различных заболеваний. Так, в настоящий момент уточняется роль IL-33 и IL-37 в развитии и поддержании воспалительного процесса при атопическом дерматите [127].

Важным связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом являются рецепторы опознавания паттерна (Pattern recognition receptor – PRRs) [184]. Среди различных видов PRRs первыми были открыты и широко изучены Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors – TLRs). Результатом активации TLRs является выраженная продукция противовоспалительных цитокинов, созревание дендритных клеток, а также развитие антибактериальной защиты путем активации клеток Th1- и Th17-типа. Было показано, что нарушение передачи сигналов через TLRs с последующим формированием Th2-доминантного иммунного фенотипа способствуют обострению и поддержанию воспалительного процесса при атопическом дерматите [150, 178].

Тем не менее взаимосвязь между генетической регуляцией активности TLRs и развитием атопического дерматита до конца не изучена. И поскольку определенный полиморфный вариант TLRs определяет регуляцию передачи сигналов при взаимодействии с микроорганизмами или их компонентами, выявление маркеров имеет большое значение с точки зрения как диагностики, так и прогностической оценки течения заболевания [48].

Снижение активности TLRs при атопическом дерматите сопровождается колонизацией кожи стафилококками, в частности *S. aureus*, с одновременным уменьшением видового разнообразия других микроорганизмов, что в свою

очередь приводит к нарушению эпидермального барьера и развитию Th2-опосредованного иммунного ответа [10, 48].

Такие изменения микробиома кожи во многом обусловлены способностью *S. aureus* и других представителей коагулазонегативных стафилококков, таких как *S. epidermidis*, *S. warneri* и *S. haemolyticus*, продуцировать стафилококковые энтеротоксины и энтеротоксин-подобные вещества, которые обуславливают их патогенность и выживаемость [135, 174].

В настоящий момент исследования по изучению факторов патогенности стафилококков, выделенных от пациентов с атопическим дерматитом, сфокусированы на определении их наличия лишь у *S. aureus*, либо исследован ограниченный их спектр. Кроме того, исследования проводились одномоментно, без повторного изучения на фоне терапии [123, 135, 177].

Таким образом, комплексное изучение иммунологических и микробиологических факторов позволит расширить представление о патофизиологических механизмах атопического дерматита у взрослых.

Степень разработанности темы

Тенденция к росту заболеваемости атопическим дерматитом по всему миру обуславливает необходимость уточнения патогенеза заболевания и поиска маркеров, обладающих предиктивной ценностью в отношении риска развития заболевания, в том числе у людей с отягощенным семейным анамнезом по атопическому дерматиту [46]. На настоящий момент роль распознающих структур врожденного иммунитета и недавно открытых цитокинов IL-33 и IL-37 в патогенезе атопического дерматита уточняется [127]. Исходя из этого одной из задач исследования было определение молекулярно-генетических особенностей иммунитета у больных атопическим дерматитом.

Кроме того, активное развитие технологий в области секвенирования и масс-спектрометрии позволило выявить характерные изменения микробиома кожи у больных атопическим дерматитом, выраженность которых коррелирует со степенью тяжести процесса [30, 62, 194]. Однако ранее при оценке изменений

бактериальной составляющей микробиома кожи на фоне проводимой терапии изучалась эффективность лишь монотерапии: средствами с содержанием лизатов комменсальных бактерий, такролимусом, аутологичной трансплантацией, узкополосной средневолновой ультрафиолетовой терапии с длиной волны 311 нм [68, 104, 118, 146]. Таким образом, до настоящего времени не проводилось изучение влияния комплексной терапии, проводимой в соответствии с клиническими рекомендациями, на микробиом кожи у больных atopическим дерматитом как на пораженных, так и неизмененных участках кожного покрова.

Цели и задачи

Оценить влияние молекулярно-генетических особенностей иммунитета на формирование микробиома кожи у больных atopическим дерматитом на фоне стандартной терапии.

1. Выявить особенности экспрессии генов IL-4, IL-13, IL-33 и TNF- α в периферической крови у взрослых пациентов с atopическим дерматитом средней и тяжелой степени тяжести.

2. Изучить наличие ассоциаций аллелей, генотипов и гаплотипов полиморфных маркеров в генах IL-33 и IL-37 с риском развития atopического дерматита.

3. Исследовать ассоциацию полиморфных маркеров в генах TLRs с риском развития среднетяжелых и тяжелых форм atopического дерматита.

4. Оценить видовой состав бактерий на пораженных и неизмененных участках кожи в период обострения atopического дерматита с учетом генетических особенностей стафилококков.

5. Изучить эффективность терапии, проводимой в соответствии с действующими клиническими рекомендациями, на уровне изменений микробиома кожи.

Научная новизна

Выявлен дисбаланс цитокинового профиля на системном уровне у взрослых пациентов с atopическим дерматитом средней и тяжелой степени тяжести. Показано, что на фоне достоверного увеличения экспрессии генов *IL-13* и *TNF- α* отмечается снижение экспрессии гена *IL-33* в периферической крови в 1,5 раза.

Впервые были изучены генетические маркеры распознающих структур врожденного иммунитета в генах *TLR2*, *TLR4* и *TLR9*, а также в гене *IL-37* при atopическом дерматите.

Впервые изучена динамика изменения бактериального состава микробиома кожи и проведена количественная оценка факторов патогенности стафилококков у пациентов с atopическим дерматитом на фоне стандартной терапии, проводимой в соответствии с действующими клиническими рекомендациями.

Теоретическая и практическая значимость работы

Определение экспрессионного профиля генов *IL-13*, *IL-33* и *TNF- α* на системном уровне может быть использовано как дополнительный критерий оценки активности заболевания у больных atopическим дерматитом во взрослом возрасте.

Показано, что полиморфные маркеры в генах *IL-37*, *TLR2*, *TLR4* и *TLR9* ассоциированы с риском развития atopического дерматита и могут рассматриваться в качестве предикторов развития заболевания у здоровых лиц с отягощенным семейным анамнезом.

По результатам проведенного исследования доказана целесообразность использования метода контактного посева на бакпечатки с целью изучения микробиома кожи у пациентов с atopическим дерматитом. Данный метод может быть применен как для оценки прогноза течения заболевания, так и контроля эффективности терапии.

Выявленные в ходе работы закономерности в изменениях иммунологических и микробиологических показателей дополняют представление

о патогенезе атопического дерматита, что в дальнейшем позволит разработать новые подходы в терапии и профилактике рецидивов заболевания.

Методология и методы исследования

В рамках работы проведено проспективное нерандомизированное исследование с формированием двух выборок: пациенты с атопическим дерматитом и условно-здоровые люди в возрасте от 18 до 65 лет. Набор пациентов проводился в стационарном отделении клиники кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова Сеченовского Университета, где проводилась терапия в соответствии с действующими клиническими рекомендациями по ведению больных с атопическим дерматитом.

Материалами исследования являлись образцы периферической крови и посевы с поверхности кожи, которые осуществлялись методом контактного посева на бакпечатки.

Дальнейшие микробиологические и иммунологические исследования проводились на базе лаборатории Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова».

Видовая идентификация выделенных микроорганизмов проводилась с использованием метода масс-спектрометрии (MALDI Biotyper Sirius). Изучение факторов патогенности стафилококков, экспрессии генов цитокинов, а также полиморфных маркеров в генах интерлейкинов и факторов врожденного иммунитета осуществлялось посредством проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Средний возраст пациентов и значения индекса SCORAD представлены в виде среднего арифметического значения со стандартным отклонением.

Статистическая обработка данных при анализе экспрессии ключевых цитокинов была осуществлена с использованием U-критерия Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы.

Критерий χ^2 и точный критерий Фишера были использованы при исследовании ассоциаций полиморфизмов в генах факторов врожденного иммунитета и интерлейкинов.

При изучении особенностей микробиома кожи использованы критерий Вилкоксона, критерий МакНемара, U-критерий Манна-Уитни и точного критерий Фишера.

Статистически достоверными считались результаты при значении $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

1. У взрослых пациентов с атопическим дерматитом средней и тяжелой степени тяжести отмечается достоверное повышение экспрессии цитокинов *IL-13* и *TNF- α* на фоне низкого экспрессионного профиля *IL-33* в сыворотке крови.

2. Выявленные SNP-маркеры в гене *IL-37* обладают как протективными свойствами, так и повышают риск развития среднетяжелых форм атопического дерматита.

3. Полиморфные маркеры rs5743708 в гене *TLR2*, rs11536889 и rs4986791 в гене *TLR4* и rs352140 в гене *TLR9* ассоциированы с риском развития атопического дерматита средней и тяжелой степени тяжести.

4. Дисбаланс микробиома пораженных и неизмененных участков кожи у пациентов с атопическим дерматитом связан с повышенной колонизацией *Staphylococcus spp.* с большим набором генов энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных веществ.

5. Проведение терапии в соответствии с действующими клиническими рекомендациями приводит к увеличению видового разнообразия бактериального сообщества с одновременным снижением доли *S. aureus* как на пораженных участках кожного покрова, так и вне очагов поражения.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспортам научных специальностей: 3.1.23. Дерматовенерология, в частности пунктам 2 и 4, и 3.2.7. Иммунология, в частности пунктам 2 и 5. Результаты, выводы и научные положения работы соотносятся с перечисленными областями исследования.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов работы подтверждается большим объемом выборки и проведением лабораторных исследований, соответствующих поставленным цели и задачам.

Материалы диссертационной работы были доложены на Юбилейной конференции, посвященной 130-летию Московского общества дерматовенерологов (Москва, 2021); на конгрессах Европейской Академии аллергологии и клинической иммунологии: EAACI Hybrid Annual Congress 2021 (Краков, Польша, 2021) и EAACI Hybrid Congress 2022 (Прага, Чехия, 2022); на XII межвузовской научно-практической конференции «Научная весна 2022» (Москва, 2022); на X Российской научной конференции с международным участием «Персистенция и симбиоз микроорганизмов» посвященной 300-летию Российской академии наук (Оренбург, 2023), на XXIII Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (Москва, 2023).

Апробация состоялась на заседании кафедры клиники кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол №7 от 19 декабря 2023 года).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты, практические рекомендации и выводы диссертационной работы внедрены в клиническую практику врачей-дерматовенерологов дерматовенерологического отделения УКБ №2 Клинического

Центра ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также в педагогический процесс кафедры кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет). Получено свидетельство о депонировании авторского штамма *Corynebacterium minutissimum* 23035 №682 от 5 декабря 2022 года.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в сборе первичных данных пациентов, заборе биоматериала и дальнейшей работы с ним в лаборатории, обработке полученных данных и формировании выводов, а также в подготовке всех публикаций по выполненной работе в рамках исследования и написании всех глав диссертации.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 1 обзорная статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, 2 публикации в журналах, включенных в международную базу Scopus и 4 иные работы.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из оглавления, введения, трех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений в соответствии с установленными требованиями, предъявляемым к работе на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Диссертационный материал изложен на 119 страницах машинописного текста. Список литературы включает в себя 197 источников, из них 139 зарубежных и

58 отечественных авторов. Диссертация иллюстрирована 40 рисунками и 11 таблицами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Атопический дерматит и особенности клинической картины

Атопический дерматит (АтД) – распространенное воспалительное заболевание кожи с широким спектром клинических проявлений, которые могут широко варьировать в зависимости от возраста, этнической принадлежности и климата. Долгое время считалось, что атопический дерматит встречается преимущественно в раннем детстве [41, 88, 195]. Однако полное разрешение заболевания наблюдается менее чем у половины пациентов к 7-летнему и только у 60% – к 18-летнему возрасту, что свидетельствует о хронической природе атопического дерматита [81].

В 2016 году был проведен международный web-опрос по оценке встречаемости и степени тяжести атопического дерматита среди взрослого населения (от 18 до 65 лет включительно) в США, Канаде, Франции, Германии, Италии, Испании, Великобритании и Японии. По результатам исследования показатель распространенности атопического дерматита среди взрослого населения по всему миру варьировал от 2,1% (Япония) до 8,1% (Италия), что соотносится с цифрами 2-10%, о которых ранее сообщала Всемирная организация по аллергии (World Allergy Organization). Наиболее высокие показатели распространенности заболевания наблюдались в странах южной Европы (Италия и Испания), в то время как штаты Среднего Запада США были ассоциированы с самой низкой распространенностью [183].

В России эпидемиологические данные распространенности атопического дерматита сильно варьируют в зависимости от региона и выбранного метода изучения. В отчете Кубанова А.А. и соавторы за 2018 год сообщается, что распространенность заболевания среди всего населения Российской Федерации составила около 0,4% (426,3 случая на 100 тысяч всего населения), при этом среди детей в возрасте 0-14 лет – 1,6% (1589 случаев на 100 тысяч) и среди детей в возрасте 15-17 лет – 1,1% (1134,0 случая на 100 тысяч) [2]. Более того, согласно данным другого отчета в период с 2011 по 2018 года отслеживается снижение

распространенности заболевания на 6,7% среди всего населения [22]. В 2020 году в разгар пандемии коронавирусной инфекции COVID-19 распространенность атопического дерматита у взрослых составила 0.1% (122,2 случая на 100 тысяч населения) [21]. Такие низкие показатели отчета объясняются тем, что в тот период были введены строгие карантинные меры, по причине которых у пациентов не было возможности обратиться за специализированной медицинской помощью.

Повсеместно наблюдается преобладание распространенности атопического дерматита и других атопических заболеваний среди женщин, особенно в подростковом и взрослом возрасте. Предположительно, эстрадиол и другие женские половые гормоны обуславливают преобладание Th2-опосредованного иммунного ответа [168]. По данным крупномасштабного международного исследования в Испании были отмечены самые большие различия между полами: распространенность атопического дерматита составила 9,3% среди женщин и 5,1% среди мужчин. Исключение составили Великобритания и США, где распространенность была одинаковой у мужчин и женщин (2,5%) и незначительно выше у мужчин, по сравнению с женщинами, (5,1% против 4,6%) соответственно [183].

Атопический дерматит характеризуется гетерогенностью клинических проявлений, тяжести кожного процесса и течения заболевания [147]. К основным диагностическим критериям атопического дерматита относят 4 компонента: зуд кожи, наличие характерных для заболевания высыпаний, хроническое рецидивирующее течение и отягощенный анамнез по атопическим заболеваниям у самого пациента и членов его семьи. При этом для постановки диагноза атопический дерматит необходимо наличие трех из вышеперечисленных критериев [2, 101].

Основные симптомы заболевания у детей и взрослых схожи. Среди них выделяют высыпания в типичных для возраста локализациях, кожный зуд и ксероз. Однако для взрослого возраста более свойственно хроническое течение и распространенная форма с частым вовлечением кожи кистей, шеи и головы [91, 165, 193]. Несмотря на то что типичными локализациями у взрослых являются

сгибательные поверхности, отдельно выделяют и другие подтипы, при которых исключительно поражается область век, гениталий, сосков и/или кистей [101]. Во взрослом периоде атопического дерматита наблюдается морфологическое разнообразие клинической картины: от локализованных эритематозно-сквамозных пятен до эритродермии и обширных участков лихенификации [108, 162]. Острая фаза заболевания характеризуется наличием эритематозных папул и везикул, в то время как подострая – эритематозно-сквамозными очагами. В период хронической фазы атопического дерматита характерны явления лихенизации. Одновременно с этим все вышеперечисленные фазы заболевания могут сопровождаться ксерозом и выраженным зудом на неизмененных участках кожи [101, 147].

Выделяют три степени тяжести атопического дерматита: легкую, среднюю и тяжелую. В настоящее время существует более 20 различных методов оценки степени тяжести заболевания, каждый из которых включает в себя оценку клинических и/или субъективных показателей. Во всем мире наиболее широко используется шкала SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis), разработанная группой европейских ученых в 1993 году. При расчете индекса SCORAD проводится оценка трех параметров: распространенность (А) и выраженность (В) кожного процесса, а также оценка субъективного состояния, проводимая самим пациентом (С) [36, 88].

Чаще всего манифестация атопического дерматита происходит в возрасте от 3 до 6 месяцев, причем примерно у 50% детей с атопическим дерматитом первые симптомы появляются в течение первого года жизни [99]. После начала заболевания симптомы могут сохраняться на протяжении многих лет или возникать вновь после периодов ремиссии [77]. Согласно данным мета-анализа, опубликованного Lee Н.Н. с соавторами в 2018 году, совокупная доля лиц с возрастом начала заболевания старше 16 лет составила 26,1% [61].

У большинства пациентов с тяжелым течением атопического дерматита может развиваться IgE-опосредованная сенсibilизация к распространенным аллергенам. По имеющимся оценкам, распространенность пищевой аллергии составляет около 37% среди детей дошкольного возраста и примерно 10% – взрослого населения с атопическим дерматитом [77]. В дополнение, с течением

времени у пациентов с атопическим дерматитом может произойти развитие остальных заболеваний атопической триады – бронхиальной астмы и/или аллергического ринита, которые также будут влиять на выраженность симптомов атопического дерматита [3, 20, 79].

Кроме того, течение атопического дерматита может быть отягощено сопутствующими патологиями, в частности другими иммуноопосредованными заболеваниями и психоэмоциональными нарушениями [152, 153]. У взрослых с атопическим дерматитом чаще наблюдается депрессия и тревожность по сравнению со здоровыми людьми [71, 83]. Также отмечается повышенный риск развития ревматоидного артрита, воспалительных заболеваний кишечника и других дерматологических патологий, включая витилиго и очаговую алопецию [77].

1.2. Этиология атопического дерматита

Известно, что атопический дерматит является мультифакториальным заболеванием, среди ключевых этиологических факторов которого выделяют наличие генетической предрасположенности к атопии, воздействие факторов окружающей среды, иммунную дисрегуляцию, изменения в составе микробиома кожи и состоянии кожных покровов [99, 155] (Рисунок 1).

Согласно последним исследованиям, более 70 генов могут быть ассоциированы с развитием атопического дерматита в разных популяциях. Полиморфизм генов и мутации, связанные с дефектами функции эпидермального барьера, имеют решающее значение для пациентов, страдающих атопическим дерматитом [99, 124]. Наиболее часто определяемым генетическим фактором риска развития атопического дерматита являются мутации с потерей функции в гене филаггрина (*FLG*). По некоторым данным, приблизительно 10% европейского населения - гетерозиготные носители мутаций в гене *FLG*, которые ассоциированы со снижением экспрессии белка на 50%, что приводит к нарушению барьерной функции кожных покровов [115, 142, 147].

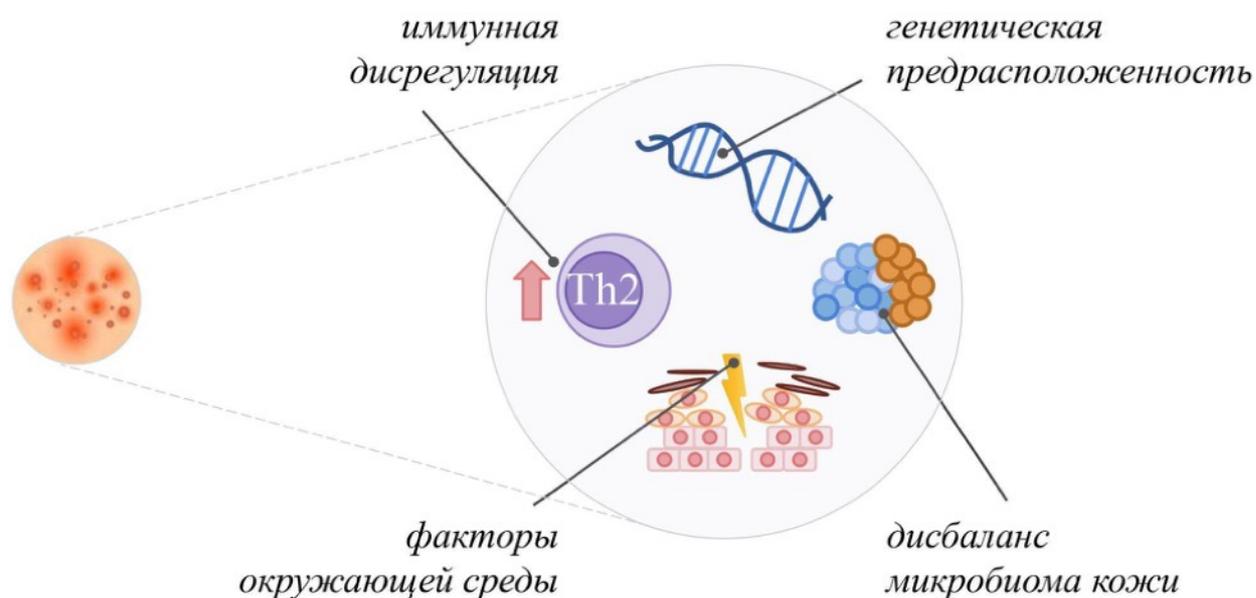


Рисунок 1 – Основные этиологические факторы АД

Ген *FLG* расположен на хромосоме 1q2 и кодирует белок филаггрин – основной структурный белок рогового слоя эпидермиса, который влияет на дифференцировку клеток эпидермиса и препятствует чрезмерной трансэпидермальной потере воды [76, 142]. Было доказано, что изменения кожного барьера, обусловленные некоторыми вариантами нуклеотидной последовательности гена *FLG*, могут способствовать сенсibilизации организма к различным антигенным структурам и в последующем приводить к развитию аллергических заболеваний, таких как атопический дерматит, аллергический ринит, пищевая аллергия и бронхиальная астма [115, 166]. Кроме того, была обнаружена ассоциация атопического дерматита с другими генами комплекса эпидермального дифференцирования (EDC - epidermal differentiation complex) на хромосоме 1q21, включая клаудин, лорикрин, инволюкрин [40, 115].

Среди других генетических факторов выделяют также роль генов, участвующих в метаболических процессах кожи и регулирующих врожденные и адаптивные иммунные реакции. Например, точечные изменения в

последовательности нуклеотидов могут обуславливать гиперпродукцию цитокинов Th2-профиля и нарушение функций TLRs [110].

Известно, что различные факторы окружающей среды оказывают влияние на эпигенетические механизмы, которые, в свою очередь, могут регулировать экспрессию генов без изменения последовательности ДНК [50]. Наиболее распространенными провоцирующими факторами являются влажность и уровень загрязненности воздуха, низкие или высокие температуры, жесткость воды, погрешность в диете и табачный дым [76, 80, 142].

В частности, исследование, направленное на изучение влияния табачного дыма, показало прямую взаимосвязь между количеством выкуриваемых сигарет и манифестацией или ухудшением кожного процесса у взрослых. Подобная взаимосвязь была отмечена и у некурящих лиц, подвергающихся воздействию окружающего табачного дыма. У всех участников исследования отмечались изменения иммунологических показателей, которые характеризовались увеличением уровня провоспалительных цитокинов с одновременным снижением уровня противовоспалительных цитокинов [70, 72, 185].

Также в ряде работ была выявлена взаимосвязь между употреблением алкоголя во время беременности и развитием атопического дерматита у потомства [78].

Погодные условия также могут вносить определенный вклад в развитие заболевания. Например, холодный климат увеличивает не только частоту обострений у пациентов с атопическим дерматитом, но и общую распространенность в популяции. Поэтому существует условное разделение на два типа в зависимости от сезона: для одной группы характерно обострение зимой, а другой – в летний период. При этом ухудшение течения заболевания зимнего типа связывают с воздействием низких температур, а летнего типа – с цветением растений и повышенным потоотделением, усиливающим интенсивность кожного зуда [45, 131, 181, 185].

Несколько исследовательских групп независимо друг от друга выявили корреляцию между психологическим стрессом и обострениями атопического дерматита [144, 159]. В периоды эмоционального стресса происходит повышенная

выработка различных нейроэндокринных медиаторов, включая катехоламины, кортизол, адренкортикотропный гормон и β -эндорфин, которые, в свою очередь, стимулируют развитие локального нейрогенного воспаления. Это приводит к формированию кожного зуда и впоследствии к нарушению барьерной функции кожи [100, 158].

1.3. Иммунопатогенез атопического дерматита

Развитие иммуноопосредованного воспалительного процесса в коже занимает центральное место в патогенезе атопического дерматита. При этом характер изменений во многом зависит от фазы заболевания [130].

Для атопического дерматита острой фазы характерна поляризация иммунного ответа по Th2-пути, сопровождающаяся повышением синтеза цитокинов IL-4, IL-5, IL-13 и IL-31 [43, 162, 186] (Рисунок 2).

В пораженной коже при атопическом дерматите выявляется Т-клеточный инфильтрат, в котором преобладает экспрессия CD4+. Высвобождение аларминов (TSLP, IL-25 и IL-33), инициированное дефектом эпидермального барьера, активирует дендритные клетки (ДК) и способствует развитию Th2-опосредованных иммунных реакций. В свою очередь, активированные Th2-клетки высвобождают IL-4 и IL-13, способствуя переключению В-клеток на синтез IgE через сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции (STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription) [115, 147].

При исследовании непораженных участков кожи у больных атопическим дерматитом также обнаруживаются гистологические и иммуногистохимические изменения, включая спонгиоз и инфильтрацию кожи Т-лимфоцитами, которая схожа с инфильтрацией пораженных участков кожи. Аналогичным образом, Th1/Th2 баланс в непораженной коже смещается в сторону Th2-субпопуляций лимфоцитов [168].

IL-4 и IL-13 считаются ключевыми цитокинами при развитии воспалительного ответа 2 типа, вызванного контактом с паразитами или аллергенами. Несмотря на то что IL-4 и IL-13 имеют общую субъединицу

рецептора (цепь $IL-4R\alpha$), было показано, что $IL-4$ играет центральную роль в регуляции функций лимфоцитов, способствуя дифференцировке $Th2$ -клеток и переключению B -клеток на синтез $IgG1$ и IgE . В то время как $IL-13$ является эффекторным цитокином, который в большей степени участвует в регуляции сокращения гладких мышц и продукции слизи эпителием слизистой оболочки дыхательных путей [85, 138].

$IL-5$ секретируется тучными и $Th2$ -клетками. Этот цитокин считается основным фактором роста как B -клеток (индуцирует пролиферацию и секрецию иммуноглобулинов активированными B -клетками), так и эозинофилов (стимулирует рост и дифференцировку эозинофилов из стволовых клеток костного мозга). При этом обнаружена взаимосвязь между уровнем $IL-5$ в сыворотке крови и степенью тяжести заболевания при atopическом дерматите [85, 168].

Хроническая фаза atopического дерматита сопровождается активацией лимфоцитов $Th1$ -профиля ($IL-2$, $TNF-\alpha$ и $INF-\gamma$) в присутствии $IL-12$, который синтезируется эозинофилами, дендритными клетками и макрофагами в ответ на антигенную стимуляцию [52, 173]. Кроме того, в последние годы доказана роль $Th17$ - и $Th22$ -клеток ($IL-17$, $IL-19$ и $IL-22$) в поддержании воспалительного процесса при atopическом дерматите, особенно у детей, представителей монголоидной расы и в целом генетически предрасположенных людей [182] (Рисунок 2).

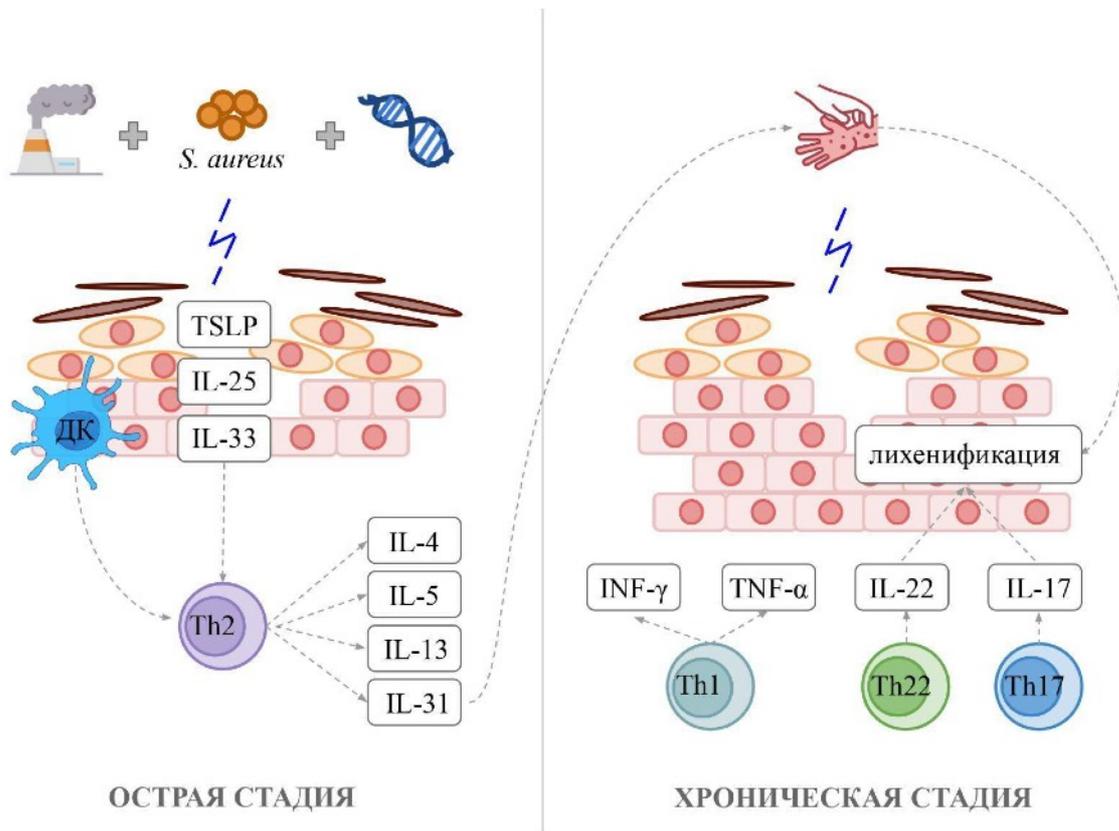


Рисунок 2 – Иммунопатогенез атопического дерматита при острой и хронической фазе

Th17-лимфоциты характеризуются экспрессией IL-17A, IL-17F и IL-22, которые регулируют пролиферацию клеток и стимулируют макрофаги к высвобождению медиаторов воспаления. Несмотря на то что IL-17 не является ключевым цитокином в патогенезе атопического дерматита, в отличие от псориаза, ряд исследований показал, что IL-17 может регулировать секрецию иммуноглобулинов, инициируя дифференцировку В-лимфоцитов в плазматические клетки, и способствовать высвобождению IL-8, TNF-α и тимусный стромальный лимфопоэтин (TSLP), тем самым поддерживая хроническую фазу заболевания [120].

Пораженные участки кожи у больных атопическим дерматитом характеризуются также привлечением Th22-клеток в очаг воспаления, уровень которых коррелирует со степенью тяжести заболевания. Было показано, что трансэпидермальная экспозиция аллергенов может приводить к активации Th22-клеток, основной эффекторной молекулой которых является IL-22. Этот цитокин оказывает непосредственное воздействие на кератиноциты, приводя к нарушению

целостности кожного барьера за счет угнетения экспрессии структурных белков, таких как филаггрин, инволюкрин и лорикрин [6, 126].

Патогенез атопического дерматита до конца не изучен, поэтому исследование его потенциальных звеньев способствует выявлению новых терапевтических мишеней и маркеров активности заболевания. В последнее время в литературе появляются сведения о том, что в развитии атопического дерматита могут быть вовлечены цитокины IL-33 и IL-37 [133, 171, 191].

1.3.1. Роль IL-33 в патогенезе атопического дерматита

IL-33 был открыт относительно недавно – в 2003 году, и с тех пор его роль активно исследуется при различных воспалительных процессах, включая атопический дерматит [197]. Этот цитокин является представителем семейства IL-1 и конституционально экспрессируется кератиноцитами. IL-33 выполняет роль эндогенного сигнала тревоги (алармина), который быстро высвобождается в ответ на повреждение тканей или апоптоз [19, 127, 130]. Алармины участвуют в передаче межклеточных сигналов, взаимодействуя с хемокиновыми рецепторами и рецепторами опознавания паттерна. Кроме того, благодаря способности активировать дендритные клетки, алармины взаимодействуют с адаптивным иммунитетом и Т-клетками памяти [128] (Рисунок 3).

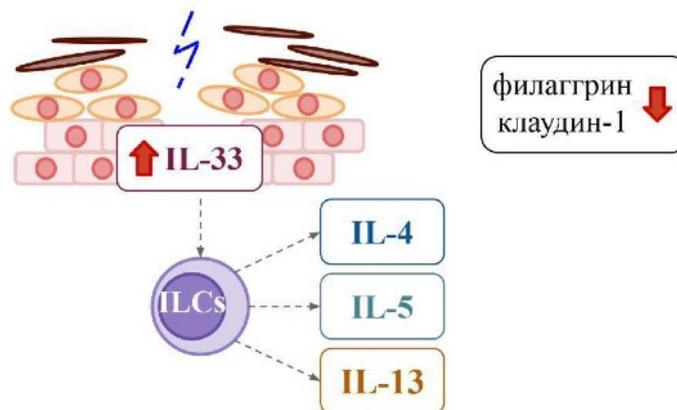


Рисунок 3 – Роль IL-33 в патогенезе атопического дерматита

IL-33 способствует развитию кожного зуда посредством стимулирования выработки Th2-ассоциированных цитокинов, среди которых можно выделить IL-31 [130]. Источники IL-31 и факторы, модулирующие его экспрессию, пока еще плохо изучены. Однако известно, что активация рецепторов A IL-31 (IL-31RAs) на чувствительных нервных окончаниях способствует передаче сигнала периферического зуда в центральную нервную систему [136, 140]. Экспрессия IL-31 при атопическом дерматите значительно повышается и коррелирует со степенью выраженности зуда [125].

При расчесывании вследствие выраженного зуда отмечается повреждение кожного барьера, что приводит к высвобождению IL-33 кератиноцитами и, соответственно, поддержанию воспалительного процесса. Таким образом, IL-33 вносит значительный вклад в формирование цикла “зуд-расчесывание” у больных атопическим дерматитом [130] (Рисунок 4).

Также IL-33 способствует снижению барьерной функции кожи за счет подавления экспрессии структурных белков эпидермиса, таких как клаудин-1 и филаггрин [187] (Рисунок 4).

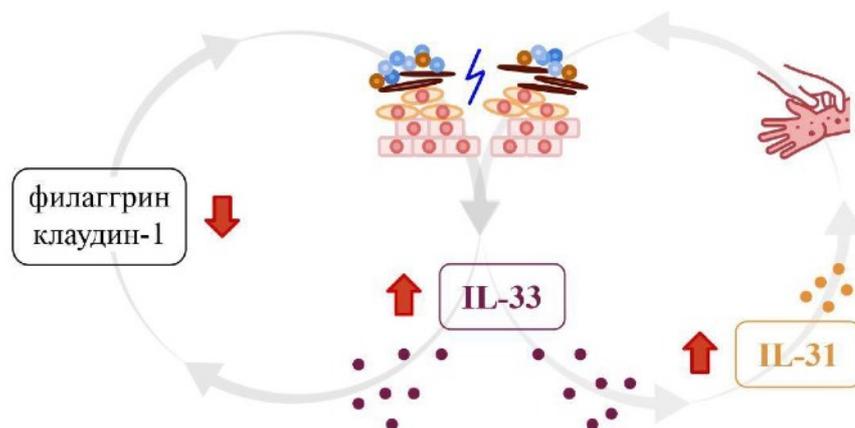


Рисунок 4 – Нарушение целостности кожного барьера и возникновение кожного зуда под влиянием IL-33

Клаудин-1 представляет собой белок, обеспечивающий плотные контакты клеток эпидермиса между собой, поэтому снижение плотности межклеточных контактов может привести к нарушению барьерной функции кожи и нормального

функционирования дендритных клеток. Основным последствием таких изменений при атопическом дерматите является повышенный риск проникновения антигенных структур в различные слои эпидермиса [4, 9].

Известно, что экспрессия филаггрина у пациентов с атопическим дерматитом снижена, вне зависимости от наличия или отсутствия мутации в гене FLG. Это обусловлено действием Th2-цитокинов, в том числе IL-4, IL-13 и IL-33, которые напрямую ингибируют экспрессию филаггрина в эпидермисе, приводя к увеличению риска присоединения вторичной инфекции [11, 54, 130].

Результаты исследования Tamagawa-Mineoka R. et al. показали, что уровень IL-33 в сыворотке крови был значительно повышен у пациентов с атопическим дерматитом по сравнению с контрольной группы. Также была выявлена корреляция между повышенным уровнем IL-33 в сыворотке крови и значением оценочной шкалы EASI (Eczema Area and Severity Index). Более того, на фоне улучшения клинической картины отмечалось снижение уровня IL-33, что свидетельствует о важной роли данного цитокина в патогенезе заболевания [133].

1.3.2. IL-37 и атопический дерматит

IL-37 был открыт в 2000 году одновременно сразу же несколькими независимыми лабораториями. Этот цитокин также относится к семейству IL-1 и является связующим звеном между врожденной и адаптивной иммунной системами. Однако, в отличие от IL-33, относящегося к группе провоспалительных цитокинов, IL-37 обладает противовоспалительными свойствами, ингибируя продукцию провоспалительных цитокинов, и из-за противоположного действия часто изучение этих цитокинов проводят совместно [39, 129, 191].

В норме IL-37 экспрессируется широким спектром различных типов тканей и клеток, включая моноциты, плазматические клетки, тканевые макрофаги, эпителиальные клетки кожи и кишечника. Основной функцией IL-37 является ингибирование воспалительных реакций по принципу отрицательной обратной связи как на внутриклеточном, так и внеклеточном уровне. Экспрессия IL-37

увеличивается под влиянием провоспалительных (IL-1 β , IL-18, TNF- α и IFN- γ) и противовоспалительных (TGF- β , IL-10) цитокинов, а также инициируется широким спектром лигандов TLRs [27, 75, 124].

В процессинге IL-37 при внутриклеточном синтезе участвует каспаза-1, в результате чего образуется комплекс IL-37-Smad3 со SMAD3 (SMAD3 - Mothers against decapentaplegic homolog 3). Образованный комплекс попадает в ядро клетки и, действуя как транскрипционный фактор, оказывает влияние на транскрипцию, созревание и продукцию цитокинов. Во внеклеточном пространстве IL-37 оказывает противовоспалительное действие, связываясь с рецепторами интерлейкина-1 (IL-1R8) и интерлейкина-18 (IL-18R α). При этом сродство IL-18 к IL-18R α значительно выше по сравнению с IL-37, по некоторым оценкам более чем в 50 раз [121, 122] (Рисунок 5).

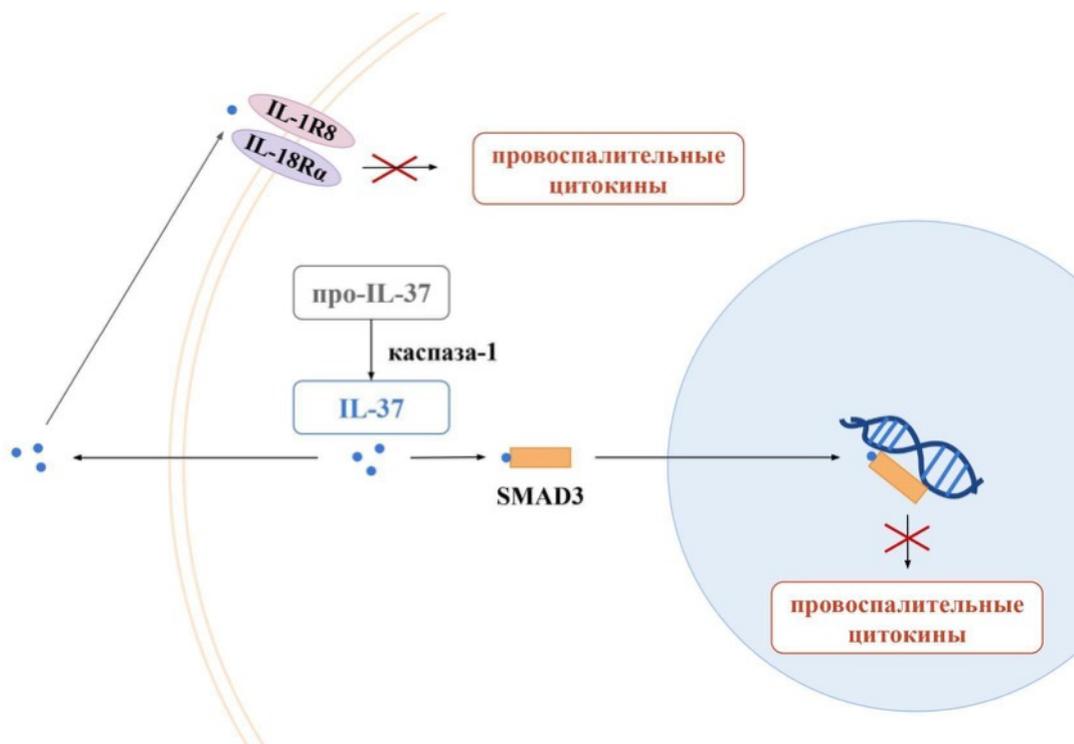


Рисунок 5 – Внутриклеточный и внеклеточный пути реализации противовоспалительного действия IL-37

Результаты клинических исследований по изучению уровня экспрессии IL-37 в выборке пациентов с атопическим дерматитом значительно варьируют. В то время как результаты одних исследований свидетельствуют о снижении

продукции IL-37 при атопическом дерматите в сыворотке крови, другие авторы сообщают о статистически значимом повышении уровня IL-37 вследствие активации TLRs [171, 191]. Такое расхождение в результатах может быть связано с особенностями патогенеза заболевания, острая фаза которого характеризуется развитием иммунного ответа по Th2-пути, а хроническая – по Th1-пути [39]. На локальном уровне в области очагов поражения у больных атопическим дерматитом отмечается значительное снижение экспрессии IL-37 по сравнению с группой условно-здоровых людей [116, 179].

1.3.3. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе атопического дерматита

Помимо дисбаланса продукции цитокинов Th1/Th2 профиля, важное место в патогенезе атопического дерматита занимают факторы врожденного иммунного ответа, включая TLRs. Эти рецепторы взаимодействуют с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs), такими как липополисахариды грамотрицательных бактерий, пептидогликаны и липотейхоевая кислота грамположительных бактерий, инициируя развитие как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа [17, 55].

TLRs широко представлены как в клетках врожденного иммунитета (дендритные клетки, макрофаги, естественные киллеры), так и неиммунных клетках (кератиноциты и эндотелиоциты). Кератиноциты составляют 90-95% всей популяции эпидермальных клеток и, соответственно, первые реагируют на внешние патогены и повреждения. В настоящее время наиболее изученными TLRs в кератиноцитах являются TLR2 и TLR3 [114, 157, 180, 184, 188].

Посредством активации клеток врожденного иммунитета большинство лигандов TLRs способствуют продукции Th1- и Th17-профиля цитокинов. Такая регуляция адаптивной иммунной системы необходима для развития антибактериального, противогрибкового и противовирусного иммунного ответа.

Таким образом, TLRs являются важным связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом [184].

На сегодняшний день у человека охарактеризовано 10 видов TLRs (TLR1-10), локализованных на поверхности клеток (TLR1, 2, 4-6, 10) и внутриклеточно (TLR3, 7-9) [157]. Известно, что TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 участвуют в распознавании различных компонентов клеточной стенки грамположительных бактерий и белковых структур поврежденных клеток-хозяина. Так, TLR2 взаимодействует с PAMPs грамположительных бактерий (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*), включая липотейхоевую кислоту, пептидогликаны и некоторые компоненты микобактерий. В то же время TLR4 взаимодействует с липополисахаридами грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*), а TLR5 распознает флагеллин как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. Кроме того, активация TLR2 и TLR4 может происходить при связывании эндогенных лигандов, включая белки теплового шока и гиалуроновую кислоту. Расположенные на мембранах внутриклеточных органелл TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 участвуют в обнаружении нуклеиновых кислот вирусов, бактерий и поврежденных клеток организма [106, 178].

Ряд исследований показал, что повышенная восприимчивость к бактериальным и вирусным инфекциям кожи у пациентов с атопическим дерматитом связана с дефектами TLR-зависимого сигнального пути [10, 178].

В норме взаимодействие PAMPs с TLRs инициирует запуск сигнального каскада, приводя к выработке провоспалительных цитокинов, тогда как нарушение передачи TLR2-сигналов может искажать иммунный ответ на *S. aureus* в сторону доминирования Th2-зависимого иммунного ответа, приводя к повышенной выработке ряда цитокинов. К таким цитокинам относятся интерлейкин-(IL-)4, IL-5 и IL-13, которые играют центральную роль в патогенезе атопических заболеваний. И несмотря на то что передача сигналов TLR2 нарушается во время острой фазы атопического дерматита, существует предположение, что aberrantная активация TLR2 также может способствовать

обострению и поддержанию воспалительного процесса в хронической фазе заболевания [10, 55, 150, 178].

1.4. Микробиом кожи при atopическом дерматите

Нарушение передачи сигналов посредством TLRs у пациентов с atopическим дерматитом приводит не только к изменению цитокинового профиля, но и состава микробиома кожи [48]. Сбалансированный микробиом является важным элементом в поддержании барьерной функции кожи, который непрерывно взаимодействуя с кератиноцитами и резидентными иммунными клетками, участвует в расщеплении метаболитов, а также в обучении иммунной системы хозяина адекватно реагировать на контакт с патогенными микроорганизмами. Состав микробного сообщества кожи с возрастом претерпевает изменения. Однако, по некоторым данным микробиом кожи взрослого человека может оставаться стабильным на протяжении двух лет и более вне зависимости от влияния окружающих условий. Среди многочисленных факторов внешней среды, формирующих состав нормального микробиома кожи, выделяют воздействие ультрафиолета, образ жизни, использование антибактериальных средств и этническую принадлежность [15, 149, 151].

По некоторым оценкам на поверхности кожи человека обитает более 1000 видов бактерий, каждый из которых адаптирован к определенной нише [89]. Так, бактерии рода *Propionibacterium* преобладают на сальных участках кожи, в то время как представители *Corynebacterium* и *Staphylococcus* обнаруживаются во влажной среде [62, 142]. Для сухих участков кожных покровов характерны виды *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Enhydrobacter* и *Streptococcus*. Всего выделяют четыре основных типа: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Bacteroides*, из которых наиболее распространенными родами являются *Corynebacterium*, *Propionibacterium* и *Staphylococci* [193].

Среди всех видов стафилококков, обитающих на поверхности кожи, наибольшее значение имеют комменсальные коагулазонегативные стафилококки

(CoNS): *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *S. hominis* и *S. lugdunensis*. Перечисленные представители стафилококков способны регулировать состав микробиома кожи либо напрямую, благодаря продукции антимикробных пептидов (Antimicrobial peptides, AMPs) и других антимикробных факторов, либо косвенно, посредством активации сигнальных путей врожденного и адаптивного иммунитета. В частности, некоторые штаммы *S. epidermidis* вырабатывают сериновые протеазы, которые подавляют образование биопленок и чрезмерную колонизацию кожи *S. aureus* [16, 89, 145].

Таким образом, комменсальные бактерии способствуют поддержанию целостности кожных барьеров благодаря постоянному взаимодействию с иммунной системой хозяина и самостоятельному производству широкого спектра антимикробных веществ [194].

У пациентов с атопическим дерматитом присутствуют характерные изменения в составе микробиома кожи по сравнению со здоровыми людьми. Отличительными особенностями атопического дерматита являются уменьшение микробного разнообразия на фоне чрезмерной колонизация кожи стафилококками, преимущественно *S. aureus* [23, 29, 194]. В частности, отмечается снижение частоты встречаемости *Cutibacterium*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium* и *Prevotella*. Причем данные изменения типичны как для пораженных, так и непораженных участков кожного покрова [141].

Взаимосвязь между нарушенным микробным балансом кожи и развитием заболевания до конца не изучена. Однако согласно результатам некоторых исследований колонизация кожи *S. aureus* в раннем периоде жизни, как правило, предшествует клинической манифестации атопического дерматита, и наоборот колонизация комменсальными стафилококками снижает риск развития заболевания [147]. Более того, Aguilera и соавторы выявили корреляцию между плотностью колонизации кожи *S. aureus* и степенью тяжести заболевания [62].

Среди факторов риска колонизации *S. aureus* при наличии атопического дерматита выделяют дефицит AMPs, снижение уровня филаггрина, увеличение экспрессии цитокинов Th2-профиля и нарушение микробного баланса. Помимо

этого, щелочной рН, пот и уровень секреции кожного сала благоприятствуют росту *S. aureus* [135, 172] (Рисунок 6).

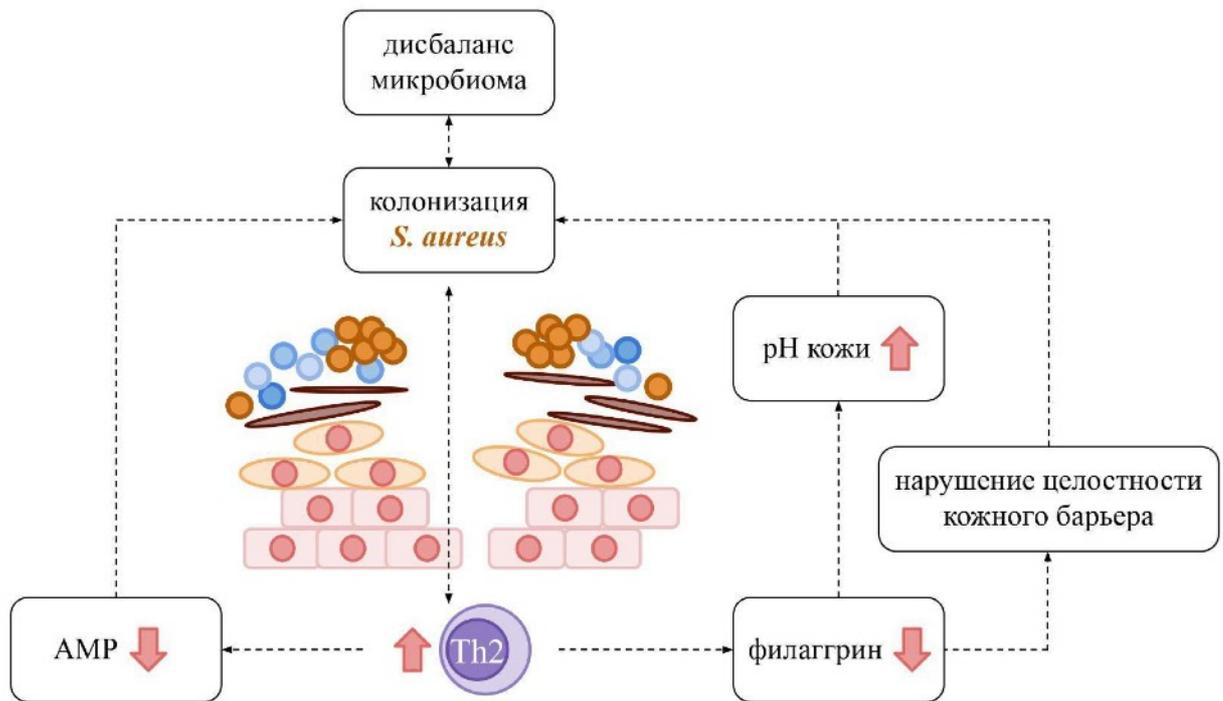


Рисунок 6 – Факторы, способствующие колонизации *S. aureus* при атопическом дерматите

Штаммы *S. aureus* продуцируют многочисленные факторы, которые определяют их патогенность и выживаемость. К таким факторам патогенности стафилококков относятся токсины, ферменты и другие антигенные структуры, ассоциированные с клеточной поверхностью бактерий [56, 162] (Рисунок 7).

Например, α -токсин *S. aureus*, секретируемый в виде водорастворимого мономера, способствует образованию пор в мембранах клеток-хозяев [84]. Непосредственно в эпидермисе α -токсин образует поры в кератиноцитах, нарушая целостность эпидермального барьера. Кроме того, α -токсин в значительной степени вовлечен в процесс формирования биопленок, что в дальнейшем может определять устойчивость к элиминации стафилококков при проведении терапии [65, 66, 183].

Усугублению клинической картины при атопическом дерматите способствуют δ -токсин или аналогичные цитолитические пептиды, так

называемые фенол-растворимые модулины (Phenol-soluble modulin - PSM), путем активации тучных клеток [29, 90].

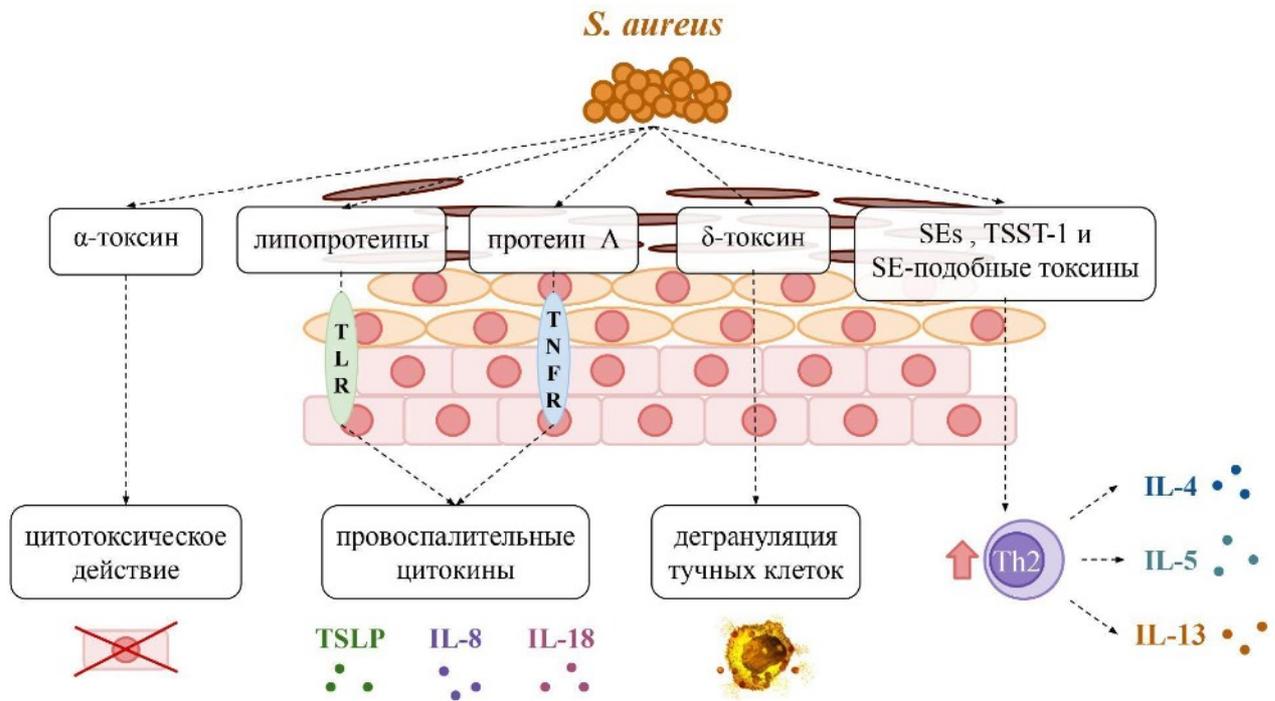


Рисунок 7 – Факторы патогенности *S. aureus* в патогенезе АтД

Липопроотеины и протеин А *S. aureus* индуцируют синтез провоспалительных цитокинов (TSLP, IL-8 и IL-18) посредством активации TLR2 и рецептора фактора некроза опухоли-1 (TNFR1), соответственно [135, 175].

Все штаммы *S. aureus* продуцируют суперантигены в различных комбинациях и количестве [112]. На сегодняшний день описано более 20 различных суперантигенов, встречающихся у *S. aureus*: токсин-1 синдрома токсического шока (toxic shock syndrome toxin-1 - TSST-1), 11 стафилококковые энтеротоксины (SEs): SEA–SEE, SEG–SEI, SER–SET и 14 энтеротоксин (SE)-подобных веществ: SELJ – SELQ, SELU – SELZ [64, 174].

Как правило, клинические изоляты *S. aureus* от пациентов с атопическим дерматитом большее количество токсинов, включая суперантигены [175]. Выработка последних приводит к активации Т-лимфоцитов с последующей продукцией цитокинов Th2-профиля. Таким образом, возникает порочный круг,

где гиперпродукция цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13 способствует дальнейшему увеличению численности *S. aureus* на поверхности кожных покровов [82, 94]. Помимо этого, стафилококковые суперантигены могут выступать в роли аллергенов, способствуя высвобождению гистамина тучными клетками и базофилами [135].

Известно, что представители рода стафилококков имеют мобильные генетические элементы, которые кодируют многочисленные факторы вирулентности. Гены SEs и SE-подобных веществ часто входят в состав этих мобильных генетических элементов, что способствует горизонтальному переносу генов суперантигенов между штаммами различных стафилококков [64, 96, 119].

Ранее считалось, что секреция SEs и SE-подобных веществ преимущественно встречается у *S. aureus*. Однако последние исследования выявили их наличие у некоторых коагулазонегативных стафилококков, включая *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. delphini* и *S. intermedius* [123, 135]. В частности, энтеротоксины SEA, SEB и SEC были выявлены у клинических изолятов *S. epidermidis* и SEC – у *S. haemolyticus*, при этом большинство из них имело по 2 и более токсина каждый [177].

Таким образом, наличие большого количества факторов патогенности у представителей *Staphylococcus spp.* и их доказанная роль в поддержании воспалительного процесса при atopическом дерматите обуславливают необходимость изучения эффективности существующих методов лечения в отношении этих возбудителей.

1.5. Методы лечения atopического дерматита

Многообразие этиологических факторов развития atopического дерматита и его хроническое течение обуславливают необходимость в индивидуальном подходе к каждому пациенту, а также в постоянном поиске новых методов терапии.

Основной целью при лечении больных atopическим дерматитом является уменьшение выраженности симптомов заболевания, профилактика обострений и

развития вторичных бактериальных, грибковых или вирусных инфекций. В большинстве случаев легкая степень тяжести заболевания поддается адекватному контролю при использовании местных средств, в отличие от средней и тяжелой степени тяжести, лечение которых представляет собой непростую задачу [28, 30].

Существуют общие принципы терапии, включающие в себя увлажнение кожи на постоянной основе, устранение провоцирующих факторов и обучение пациентов и членов их семей. Около двадцати лет назад в России была создана школа атопического дерматита, главной задачей которой является просветительская деятельность по формированию образа жизни и устранению факторов риска. Подобные меры способствуют увеличению как приверженности к лечению, так и длительности ремиссии [24].

До недавнего времени схемы лечения были представлены местными и системными противовоспалительными средствами и фототерапией. Однако перечисленные способы лечения не всегда оказываются эффективными, а также имеют ограничения по длительности их применения из-за побочных эффектов. В последнее десятилетие активно исследуются и внедряются в практику новые таргетные препараты для лечения атопического дерматита, включая препараты моноклональных антител [37, 47, 168]. Другими многообещающими направлениями является разработка смягчающих и увлажняющих средств, способствующих восстановлению микробиома кожи, а также же ингибиторов янус-киназы [154].

1.5.1. Основные принципы лечения согласно действующим клиническим рекомендациям

В соответствии с действующими федеральными клиническими рекомендациями «Атопический дерматит», утвержденными Минздравом РФ в 2021 году, всем пациентам вне зависимости от тяжести процесса рекомендовано использование эмолентов на постоянной основе [2]. Так как при ежедневном

использовании смягчающих средств при атопическом дерматите отмечается снижение выраженности зуда и частоты рецидивов [41].

В качестве местной терапии при легкой, средней и тяжелой степени предлагается применение топических глюкокортикостероидных средств (тГКС), выбор активности которых определяется тяжестью процесса. Так, при легком течении предпочтительно использование низко- и умеренно-активных тГКС, а при среднем и тяжелом течении – активных и высокоактивных [2]. К другим местным средствам с противовоспалительными свойствами относятся топические ингибиторы кальциневрина (Такролимус и Пимекролимус), пиритион цинка и нафталанская нефть 10%, применение которых позволяет сократить сроки использования тГКС [5, 57].

Для снижения выраженности зуда вне зависимости от степени тяжести заболевания рекомендовано назначение антигистаминных препаратов в различных формах. Кроме того, при средней и тяжелой степени тяжести целесообразно добавление в схему лечения физиотерапевтических методов: узкополосной средневолновой ультрафиолетовой терапии с длиной волны 311 нм (УФБ-311 нм), ультрафиолетовой терапии дальнего длинноволнового диапазона с длиной волны 340-400 нм и широкополосной средневолновой ультрафиолетовой терапии с длиной волны 280–320 нм [2]. В случае выраженной инфильтрации кожи или отсутствии эффекта от вышеперечисленных методов возможно проведение фотохимиотерапии, основанной на сочетанном воздействии УФА-лучей с применением псораленовых фотосенсибилизаторов (ПУВА-терапия) [7].

Пациентам с тяжелым течением атопического дерматита показаны системные кортикостероиды (Метилпреднизолон или Преднизолон), Циклоспорин и Дупилумаб [2]. Последний препарат представляет собой человеческое моноклональное антитело, который блокирует сигнальные пути IL-4 и IL-13, и может назначаться больным от средней до тяжелой степени тяжести [13].

Присоединение вторичной инфекции требует назначения местных и/или системных антибактериальных, антимикотических и противовирусных

препаратов. В некоторых случаях целесообразно назначение этих средств в комбинации с топическими глюкокортикоидами [2].

Пациентам с сопутствующими atopическими заболеваниями (аллергический ринит, бронхиальная астма) рекомендовано проведение аллергологического обследования с последующим лечением, в частности проведением аллерген-специфической иммунотерапии [2]. Было показано, что у пациентов с выявленной ингаляционной сенсibilизацией отмечается снижением выраженности клинических проявлений atopического дерматита на фоне проведения аллерген-специфической иммунотерапии [51].

1.5.2. Моноклональные антитела и ингибиторы янус-киназы в лечении atopического дерматита

Более глубокое понимание роли цитокинов Th2-профиля в патогенезе atopического дерматита позволило разработать таргетную терапию на основе применения моноклональных антител и ингибиторов янус-киназы.

Исследования по изучению эффективности антагонистов рецепторов IL-4, IL-13 и IL-31, таких как Дупилумаб (IL-4/IL-13), Питракинра (IL-4/IL-13), Тралокинумаб (IL-13), Лебрикизумаб (IL-13) и Немолизумаб (IL-31RA), показали положительную динамику в виде уменьшения выраженности клинических проявлений заболевания. Однако в настоящее время практически все вышеперечисленные препараты находятся на начальных стадиях клинических исследований [87, 102].

Дупилумаб является единственным биологическим препаратом, одобренным Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA – Food and Drug Administration) в 2017 году и Европейским агентством лекарственных средств (EMA – European Medicines Agency) в 2019 году для лечения средней и тяжелой форм atopического дерматита у взрослых и детей от 6 лет [133, 178]. В России Дупилумаб был зарегистрирован в апреле 2019 года и разрешен к применению при аналогичных формах заболеваний в возрастной группе от 6 лет и старше [14].

Дупилумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело против α -субъединицы рецептора IL-4 (IL4R α), которое способно ингибировать сигнальные пути IL-4 и IL-13 [88, 109]. Несмотря на то что Дупилумаб доказал свою эффективность и хорошую переносимость у взрослых, лишь у одной трети пациентов наблюдается полный регресс высыпаний после проведенного курса лечения [86].

Ингибиторы янус-киназы (JAK) являются еще одной новой группой таргетных препаратов, эффективность использования которых активно изучается в группе пациентов с атопическим дерматитом [12]. Янус-киназы представляют собой семейство регуляторных белков, которые регулируют передачу сигнала от цитокинов к ядру клетки посредством фосфорилирования активаторов транскрипции семейства STAT. Вслед за тем молекулы STAT транспортируются в ядро клетки и, связываясь с регуляторными участками генов цитокинов, активируют их транскрипцию [43, 58].

В России в июне 2021 года был зарегистрирован селективный ингибитор JAK - Упадацитиниб. Препарат разрешен к применению для лечения больных со среднетяжелым и тяжелым течением атопического дерматита в качестве монотерапии или же в сочетании с местными средствами. По результатам проведенных исследований Упадацитиниб продемонстрировал свою эффективность и хорошую переносимость при атопическом дерматите, позволяя достичь ремиссии заболевания и положительно влияя на психоэмоциональное состояние пациента [30, 44].

Таким образом, выявление новых звеньев в патогенезе атопического дерматита позволяет находить новые терапевтические возможности для ведения пациентов с данным заболеванием.

1.5.3. Влияние различных методов терапии на микробиом кожи

Одним из активно развивающихся направлений исследовательской деятельности является изучение влияния терапии на микробиом кожи при различных заболеваниях, и так как у пациентов с атопическим дерматитом

отмечаются выраженные изменения микробного состава кожи в сторону уменьшения микробного разнообразия и увеличения доли стафилококков, важно понимать, какой эффект существующие методы лечения оказывают на микробиом кожи [141]. Развитие технологий, позволяющих относительно быстро и точно идентифицировать микроорганизмы, уже позволило охарактеризовать изменения в динамике показателей микробиома кожи при некоторых видах вмешательства на небольших выборках.

В настоящий момент широко применяются средства, содержащие лизаты комменсальных бактерий, которые способствуют восстановлению микробиома и, следовательно, барьерной функции кожи. Несмотря на то что точный механизм действия пробиотических компонентов неизвестен, их эффективность объясняют активацией Т-клеток, сопровождающейся синтезом противовоспалительных цитокинов. На примере штаммов комменсальных бактерий, таких как *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* или *Streptococcus*, были продемонстрированы иммунорегуляторные эффекты, обусловленные ингибированием образования биопленки, а также снижением уровней провоспалительных цитокинов [148, 186].

В 2008 году Gueniche и его соавторы опубликовали результаты слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования с участием больных atopическим дерматитом легкой степени тяжести, в котором изучался эффект местного средства, содержащего лизат 5% *Vitreoscilla filiformis*. При его двукратном нанесении на пораженные участки кожи в течение 29 дней в основной группе было отмечена положительная динамика со стороны клинической картины, подкрепленная значениями среднего индекса SCORAD. Однако, при анализе бактериального состава микробиома в динамике между основной и контрольной группами статистически значимых различий выявлено не было [118].

В еще одном исследовании пациентам с atopическим дерматитом (n=15: 10 взрослых и 5 детей) проводили трансплантацию лизата *Roseomonas mucosa*, предварительно выделенную от здоровых добровольцев. Данный вид бактерий является частью нормального микробиома кожи, и его нанесение на поверхность кожи у больных atopическим дерматитом сопровождалось снижением значения индекса SCORAD более чем на 50% у 10 пациентов [148].

Группа исследователей во главе с Nakatsuji провели процедуру аутологичной трансплантации микробиома кожи среди взрослых с клиническими проявлениями атопического дерматита. Однократное нанесение средства с содержанием штаммов CoNS способствовало значительному снижению степени колонизации *S. aureus* уже через 24 часа, что позволило авторам заключить об эффективности данного метода [68].

Несмотря на многообещающие результаты некоторых исследований, побочные эффекты топических пробиотиков пока не изучены. Среди потенциальных нежелательных явлений выделяют следующие: передачу резистентных штаммов микроорганизмов, развитие бактериемии или аллергических реакций на вспомогательные неактивные компоненты препарата [133].

В 2019 году было доказано положительное влияние такролимуса на микробный состав кожи. Через 4 недели от начала монотерапии ингибитором кальциневрина у пациентов с атопическим дерматитом было зафиксировано значительное увеличение доли комменсальных микроорганизмов, таких как *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Proteus* [104].

Эффект узкополосной ультрафиолетовой терапии на восстановление микробиома кожи при атопическом дерматите хорошо продемонстрирован в ряде исследований. Примечательно, что наблюдается снижение как самой степени колонизации кожных покровов *S. aureus*, так и уровня выработки стафилококковых токсинов [141, 146, 155].

Таким образом, необходимо продолжить дальнейшее изучение динамики микробиома кожи после проведенного местного и/или системного лечения, а также применения различных физиотерапевтических методов.

Контроль течения атопического дерматита важен не только с точки зрения клинических проявлений, но и его социально-психологических аспектов. Среди пациентов с атопическим дерматитом значительно чаще отмечаются нарушение сна и психоэмоциональные изменения, а также снижение концентрации внимания и трудоспособности [18, 53, 132]. Такое влияние на качество жизни пациентов обуславливает необходимость проведения дальнейших исследований,

направленных на расширение понимания патогенеза заболевания и разработки новых методов лечения [26].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн исследования

Проведено проспективное одноцентровое нерандомизированное исследование. Для исследования факторов врожденного и адаптивного иммунитета и микробиома кожи был разработан комплексный подход. Общая схема наглядно представлена на рисунке 8.

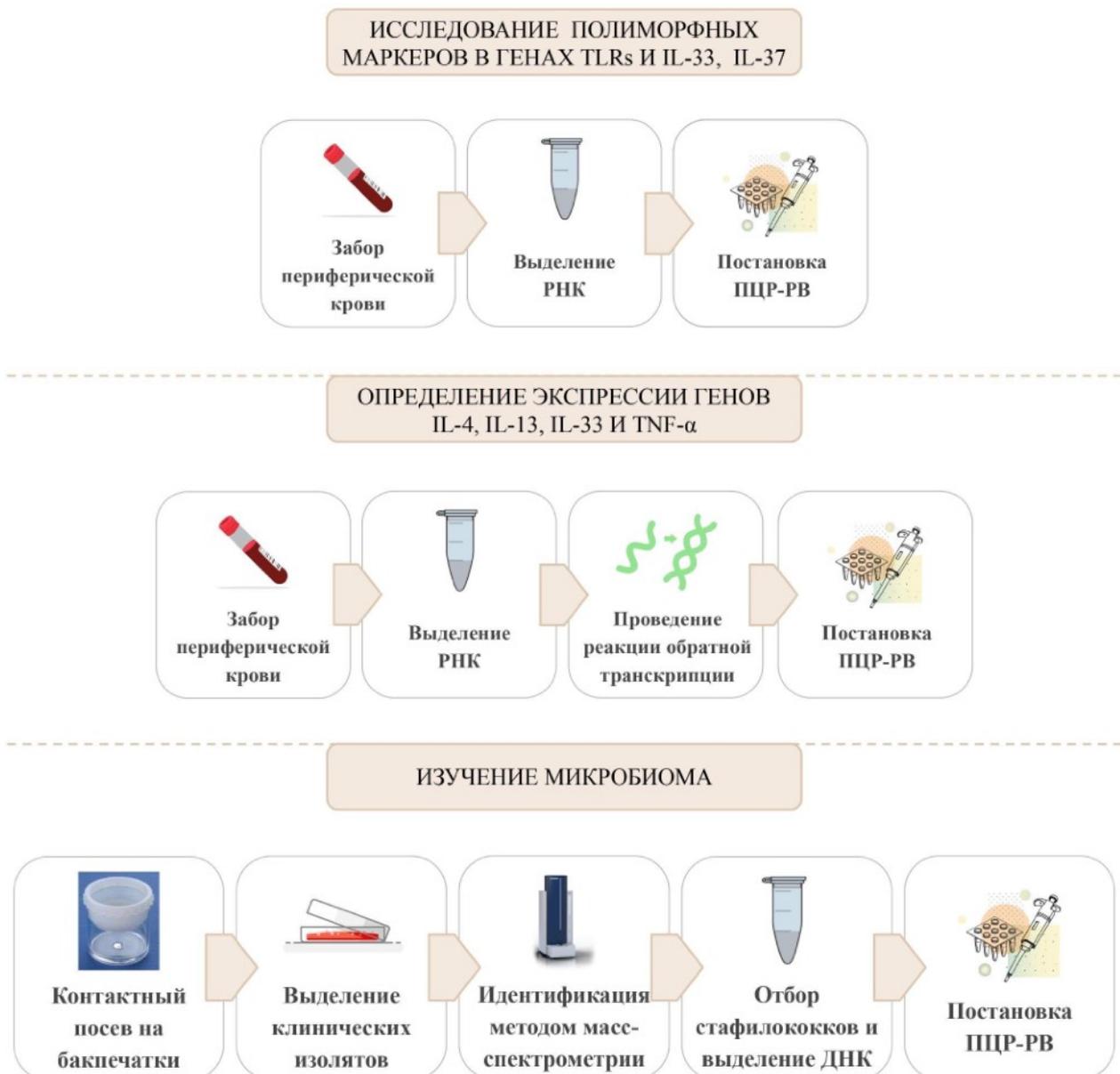


Рисунок 8 – Дизайн исследования

В качестве материала исследования были использованы периферическая кровь и контактный посев на бакпечатки. Общее количество проведенных исследование отображено в Таблице 1.

Таблица 1 – Общее количество биоматериала, полученного от пациентов с атопическим дерматитом и группы сравнения

| Материал исследования | АтД, количество человек | Группа сравнения, количество человек |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Венозная кровь | 98 | 72 |
| Контактный посев | 30 | 27 |

2.2. Характеристика групп

Набор участников исследования осуществлялся в клинике кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова Сеченовского Университета в период с февраля 2021 года по январь 2023 года включительно.

В качестве биоматериалов были использованы образцы венозной крови и посевы с поверхности кожи. Забор венозной крови осуществлялся вакуумными пробирками с ЭДТА объемом 4 мл (VACUETTE® TUBE K3EDTA, Greiner Bio-One, Австрия).

В основную группу были включены пациенты (n=102) с установленным диагнозом “L20.8 Другие атопические дерматиты” по Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), получавшие лечение в условиях стационара.

Критерии включения:

1. Информированное согласие на участие в исследовании.
2. Госпитализация в стационар клиники кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова Сеченовского Университета.

3. Диагноз “Атопический дерматит”, установленный в соответствии с международными диагностическими критериям Hanifin J.M. и Rajka G. [117]

4. Возраст: от 18 до 65 лет.

5. Пол: женский и мужской.

6. Фаза заболевания: обострение кожного процесса или наличие выраженных клинических проявлений.

7. Форма заболевания: распространенная или диффузная.

8. Отсутствие местной и/или системной антибактериальной терапии в течение одного месяца до поступления в стационар.

Критерии включения:

1. Информированное согласие на участие в исследовании.

2. Госпитализация в стационар клиники кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова Сеченовского Университета.

3. Диагноз “Атопический дерматит”, установленный в соответствии с международными диагностическими критериям Hanifin J.M. и Rajka G. [117].

4. Возраст: от 18 до 65 лет.

5. Пол: женский и мужской.

6. Фаза заболевания: обострение кожного процесса или наличие выраженных клинических проявлений.

7. Форма заболевания: распространенная или диффузная.

8. Отсутствие местной и/или системной антибактериальной терапии в течение одного месяца до поступления в стационар.

Критерии невключения:

1. Несоответствие критериям включения.

2. Отказ пациента от участия в исследовании.

3. Наличие хронических заболеваний в стадии декомпенсации и онкологических заболеваний.

4. Беременность и период лактации.

5. Психические заболевания в период обострения.

Критерии исключения:

1. Отказ пациента от дальнейшего участия в исследовании на любом этапе.

2. Обострение хронических заболеваний.

Степень тяжести заболевания устанавливалась при поступлении в стационар на основании полученных значений индекса SCORAD. Согласно действующим клиническим рекомендациям значения индекса SCORAD от 25 до 50 баллов соответствуют средней степени тяжести заболевания, а более 50 баллов – тяжелой [2].

Стационарное лечение проводилось с учетом степени тяжести заболевания в соответствии с действующими клиническими рекомендациями «Атопический дерматит», утвержденными Минздравом РФ в 2021 году [2]. Схемы назначений пациентов включали антигистаминные препараты, тГКС и УФБ-311 нм. При атопическом дерматите тяжелой степени тяжести план лечения дополнялся системными ГКС, а при присоединении вторичной бактериальной инфекции – системными антибактериальными препаратами (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Базисная терапия участников исследования в соответствии с действующими клиническими рекомендациями

Группа сравнения состояла из добровольцев (n=99), не имеющих в анамнезе аллергических заболеваний кожи и системных хронических воспалительных процессов. Лица с отягощенным семейным анамнезом по атопическим заболеваниям в исследование не были включены.

Критерии включения:

1. Возраст: от 18 до 65 лет.
2. Пол: женский и мужской.

3. Отсутствие в анамнезе атопического дерматита и других кожных заболеваний.

4. Отсутствие системных хронических воспалительных заболеваний.

5. Согласие добровольца на участие в исследовании.

Критерии невключения:

1. Несоответствие критериям включения.

2. Наличие отягощенного семейного анамнеза по атопическим заболеваниям (атопический дерматит, бронхиальная астма, аллергический ринит).

3. Наличие хронических заболеваний в стадии декомпенсации и онкологических заболеваний.

4. Беременность и период лактации.

5. Психические заболевания в период обострения.

6. Отказ от участия в исследовании.

Критерии исключения:

1. Отказ участника от дальнейшего участия в исследовании на любом этапе.

2. Обострение хронических заболеваний.

2.3. Методы исследования

2.3.1. Контактный посев

Забор материала с поверхности кожи пациентов и условно-здоровых людей проводился с использованием стерильных бакпечаток однократного применения (Медполимер, Россия) в соответствии с методическими рекомендациями “Определение кокковой и дрожжевой микрофлоры кожи у больных с кожной патологией” [34]. Бакпечатка однократного применения состоит из крышки-бакпечатки и прозрачного контейнера, изготовленных из биологически инертного материала, и после предварительной стерилизации плотно закрывается для избежания контаминации микроорганизмами окружающей среды. На крышке бакпечатки имеется углубление, которое в дальнейшем заполняется питательной

средой объемом 1,5 мл в зависимости от целей исследования. Площадь рабочей поверхности бакпечатки составляет 4,5 см².

Перед использованием одноразовые бакпечатки заполнялись селективными питательными средами: желточно-солевым агаром (ЖСА) – для выделения стафилококков, и кровяным агаром – для изоляции более требовательных к питательной среде микроорганизмов, таких как *Neisseria* и *Streptococcus* [99, 124].

Для изготовления питательных сред были использованы готовые сухие смеси ингредиентов для культивирования микроорганизмов: питательные среды № 1 ГРМ (желточно-солевой агар) и № 10 ГРМ (кровяной агар) (Оболенск, Россия).

Питательная среда № 1 ГРМ 38,0 г размешивается в 1 л дистиллированной воды и кипятится в течение 2 минут до полного расплавления агара. Затем полученную смесь пропускают через ватно-марлевый фильтр, разливают в стерильные флаконы с добавлением 8 мл гентамицина, 48 мл желтка и стерилизуют методом автоклавирования при температуре 121 °С в течение 15 мин. После питательную среду охлаждают до температуры 45-50°С, разливают в стерильные бакпечатки однократного применения и после застывания подсушивают при температуре (37±1)°С в течение 40-60 минут. Готовая питательная среда плотная, от светло-желтого до светло-коричневого цвета.

Перед приготовлением среды № 10 ГРМ содержимое банки тщательно перемешивают. 123,0 г питательной среды размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2 минуты до полного расплавления агара. Далее пропускают через ватно-марлевый фильтр, добавляют 8 мл гентамицина, 48 мл лошадиной крови, 8 капель генцианового фиолетового и стерилизуют автоклавированием при температуре 121°С в течение 15 минут. Готовую питательную среду охлаждают до температуры 45-50°С, разливают в стерильную крышку-бакпечатки и после застывания подсушивают. Готовая среда плотная, красно-багрового цвета.

Для забора материала крышка бакпечатки открывалась стерильным пинцетом и затем ее поверхность, предварительно заполненная селективной питательной средой, прикладывалась на 20 секунд к кожным покровам без дополнительного давления или скольжения.

Посев микроорганизмов с поверхности кожи больных атопическим дерматитом осуществлялся в первый день поступления в стационар и выполнялся повторно на 14-е сутки госпитализации и начала терапии. Более того, в основной группе контактный посев проводился как с пораженных, так и неизмененных участков сгибательной поверхности верхних конечностей. Забор материала у группы сравнения был выполнен однократно с внутренней поверхности плеча (Рисунок 10).

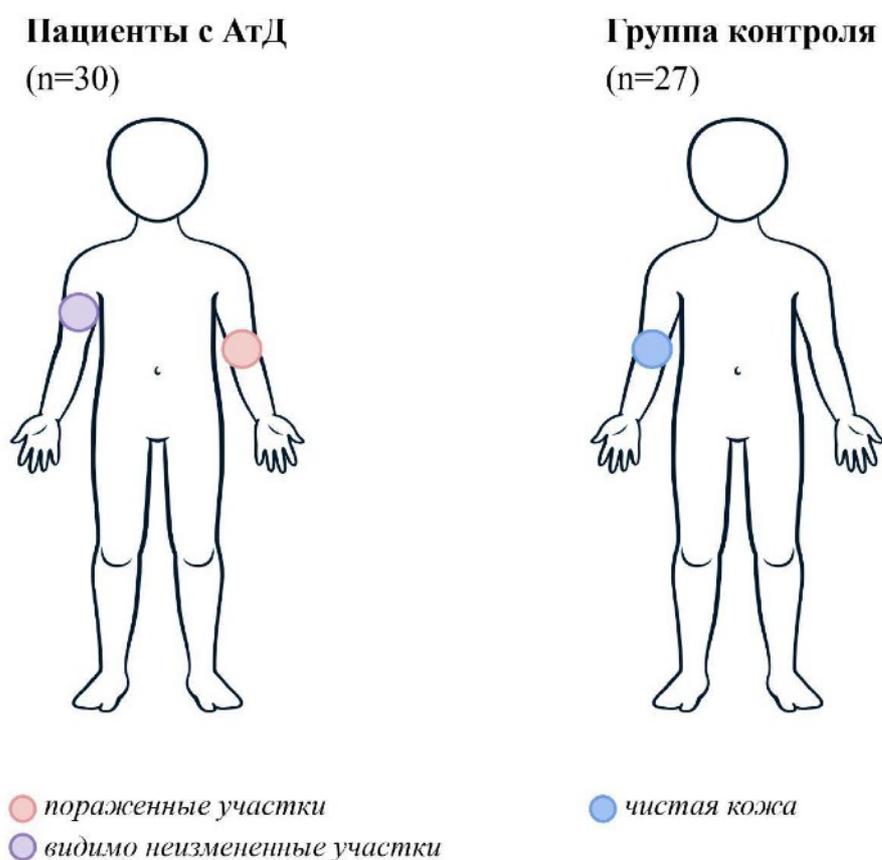


Рисунок 10 – Локализация забора материала для изучения особенностей микробиома кожи у больных АтД

2.3.2. Получение чистых культур

Для получения чистых культур и идентификация микроорганизмов бакпечатки с биоматериалом помещались в термостат на 24-48 часов с установленной температурой 37 °С. На следующем этапе проводилась визуальная оценка вида и количества выросших колоний. Для получения чистых культур

характерные однотипные колонии отбирались для посева методом штрихов на стерильные чашки Петри с желточно-солевым и кровяным агаром. Видовая идентификация выделенных чистых культур бактерий проводилась при помощи метода масс-спектрометрии на приборе MALDI Biotyper Sirius (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, Германия).

2.3.3. Выделение нуклеиновых кислот

Для выделения нуклеиновых кислот был использован набор реактивов «AmpliPRIME RIBO-sorb» (Amplisens, Россия). Перед началом работы проводилась подготовка проб и реагентов в соответствии с инструкцией, маркировались пробирки. В каждый промаркированный эппендорф добавляли лизирующий раствор объемом 450 мкл и образец – 100 мкл. Пробирки тщательно перемешивали на вортексе и центрифугировали при 5 тыс.об/мин в течение 5 секунд, а затем вносили по 25 мкл сорбента с последующим удалением надосадочной жидкости. Далее были использованы растворы для отмывки 1, 3 и 4 со строгим соблюдением протокола. После последнего удаления надосадочной жидкости эппендорфы с открытыми крышками помещались в термостат при температуре 60°C для подсушивания сорбента в течение 12-15 минут. Затем добавляли по 50 мкл РНК-буфера, перемешивали на вортексе, помещали в термостат на 2-3 минуты, снова перемешивали на вортексе с последующим центрифугированием на 13 тыс. об/мин в течение 1 мин. Полученная надосадочная жидкость вносилась в стерильные промаркированные пробирки. Очищенная нуклеиновая кислота хранилась при температуре минус 70°C до проведения последующих этапов исследования не более 1 года.

Проверка качества и концентрации выделенной нуклеиновой кислоты проводилась с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США).

2.3.4. Реакция обратной транскрипции

Комплементарная ДНК (кДНК) синтезирована на матрице мРНК изучаемых генов с использованием набора реагентов «ОТ-1» для обратной транскрипции (ОТ) (Синтол, Россия) в полном соответствии с инструкцией производителя (Таблица 2). В стерильной пробирке объемом 1,5 мл подготавливали реакционную смесь №1 для исследуемых образцов из расчета $n+1$, где n – количество образцов и 1 – отрицательный контроль (ОК): праймеры Олиго(dT)15 и Random-6 по 1 мкл, деионизированная вода 6 мкл. В предварительно пронумерованные пробирки вносили по 6 мкл смеси праймеров и по 5 мкл выделенной РНК. Помимо клинических образцов с целью проверки качества проведенной реакции использовали ОК, добавляя 5 мкл деионизированной воды вместо выделенной РНК. Далее реакционную смесь перемешивали на вортексе, инкубировали в термостате при температуре 75°C в течение 3 минут и охлаждали при температуре 4°C в течение 3 минут. Далее в отдельном эппендорфе объемом 1,5 мл подготавливали реакционную смесь №2: 2,5xРеакционная смесь в объеме 11 мкл и MMLV-RT – 1 мкл. Готовую реакционную смесь вносили в каждую пробирку по 12 мкл, затем помещали в термостат и инкубировали при температуре 37°C на протяжении 40 минут. Для инактивации MMLV-RT пробирки нагревали до 92°C в течение 5 минут. Готовая синтезированная кДНК хранилась при температуре минус 70°C до выполнения последующих этапов работы не более 1 года.

Таблица 2 – Объем компонентов для приготовления реакционной смеси из расчета на один образец

| Реактив | Объем, мкл |
|---------------------------|------------|
| 2,5xРеакционная смесь | 11 |
| Фермент, MMLV-RT | 1 |
| Праймер Random-6 | 1 |
| Праймер Олиго(dT)15 | 1 |
| Вода свободная от нуклеаз | 6 |

2.3.5. Постановка полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Для постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) был использован коммерческий набор реагентов для ПЦР-РВ с интеркалирующим красителем SYBR Green I (Синтол, Россия) и праймеры (Синтол, Россия), последовательности которых были синтезированы в соответствии с поставленными задачами нашего исследования. Для изучения полиморфных маркеров rs5743708 в гене *TLR2* и rs4986791 в гене *TLR4* осуществлялись с использованием коммерческих наборов SNP-экспресс-ЭФ «Мутация толл-подобного рецептора 2» и «Мутация толл-подобного рецептора 4», соответственно (Литех, Россия).

Подготовка ПЦР-смеси осуществлялась в стерильных пробирках объемом 1,5 мл. Объемы реактивов в расчете на 1 образце представлены в таблице 3.

Готовую реакционную смесь добавляли в ПЦР-пробирки в объеме 12 мкл, затем вносили по 3 мкл образца или отрицательного контроля, в качестве которого была использована деионизированная вода. Амплификация проводилась на приборе DТprime 5 (ДНК-Технология, Россия).

Таблица 3 – Компоненты реакционной смеси и их объемы для проведения ПЦР-РВ из расчета на 1 образец

| Реактивы | Объем, мкл |
|-------------------------|------------|
| 10 x буфер SYBR Green I | 1,5 |
| mM MgCl ₂ | 2,5 |
| dNTP | 2,5 |
| dd H ₂ O | 3,5 |
| Taq ДНК-полимераза | 0,2 |
| Праймер 1 | 1 |
| Праймер 2 | 1 |
| Общий объем на 1 пробу | 12 |

Последовательности праймеров для изучения генетических особенностей стафилококков были взяты из статьи Отое К. и соавторами [141]. Амплификация проводилась в следующей последовательности:

1. Денатурация ДНК при 95°C в течение 15 мин.
2. 35 циклов амплификации: 95°C – 30 сек.; 57°C – 90 сек.; 72°C – 90 сек.
3. Выявление кривых плавления с нагревом от 55°C до 95°C с шагом 0.5°C

Изученные в ходе исследования полиморфные маркеры в генах *TLRs* и *IL-33*, *IL-37* и их последовательности представлены в Таблице А.1. Амплификация при изучении полиморфных маркеров rs5743708 в гене *TLR2* и rs4986791 в гене *TLR4* проводилась по следующему протоколу:

1. Денатурация ДНК при 95°C в течение 5 мин.
2. 35 циклов амплификации: 95°C – 20 сек.; 64°C – 20 сек.; 72°C – 20 сек.

Режим реакции амплификации при изучении полиморфного маркера rs11536889 в гене *TLR4* включал: денатурацию ДНК при температуре 95°C – 3 мин. и 40 циклов амплификации: 95°C – 20 сек. и 60°C – 40 сек.

Амплификация при исследовании полиморфного маркера rs352140 в гене *TLR9* проводилась по протоколу: денатурация ДНК при температуре 95°C – 3 мин. и 40 циклов амплификации: 95°C – 20 сек. и 62°C – 30 сек..

Исследование полиморфных маркеров генов *IL-33* и *IL-37* проводилось по следующему протоколу: денатурация ДНК в течение 3 мин. при температуре 95°C и 40 циклов амплификации: 95°C – 20 секунд и 65°C – 40 сек.

Для исследования уровней экспрессии цитокинов в периферической крови была следующая программа амплификации:

1. 1 цикл: 94°C в течение 3 мин.
2. 40 циклов: 94°C - 15 сек.; 60°C - 15 сек.; 72°C - 60 сек.

Последовательности праймеров указаны в таблице А.2.

2.4. Статистическая обработка данных

Количественные показатели, характеризующие средний возраст пациентов и значения индекса SCORAD, представлены в виде среднего арифметического

значения со стандартным отклонением. Статистический анализ данных и формирование таблиц осуществлялись с использованием программ EXCEL 2003 и GraphPad Prism 7 и R (версия 3.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). При анализе изменений микробиома кожи у пациентов с атопическим дерматитом до и после терапии использовались критерия Вилкоксона для связанных выборок и критерия МакНемара. Сравнение количественных показателей между выборкой пациентов с атопическим дерматитом и группы условно-здоровых людей при изучении микробиома кожи проводилось с помощью теста Манна-Уитни и точного теста Фишера. В случае исследования ассоциаций полиморфизмов в генах факторов врожденного иммунитета и цитокинов с риском развития заболевания использован критерий χ^2 и точный критерий Фишера. Обработка результатов экспрессии ключевых цитокинов в патогенезе атопического дерматит осуществлялась с использованием U-критерия Манна-Уитни, данные были представлены в виде медианы. Пороговыми значениями при выявлении статистически значимых различий считался общепринятый уровень значимости 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Общая характеристика пациентов с атопическим дерматитом

Основная группа состояла из 102 пациентов с диагнозом “L20.8 Другие атопические дерматиты” по МКБ-10. При оценке степени тяжести заболевания были получены следующие результаты: у 59 пациентов была выявлена средняя степень тяжести заболевания с медианой индекса SCORAD равной $38 \pm 7,18$ баллов и у 43 человек - тяжелая степень со значением медианы – $60 \pm 10,33$ (Рисунок 11).



Рисунок 11 – Распределение пациентов с атопическим дерматитом по степени тяжести заболевания (n=102)

Средний возраст пациентов с атопическим дерматитом составил $32,17 \pm 10,68$ года. При распределении по половой принадлежности среди пациентов с атопическим дерматитом средней степени тяжести доля женщин составила 56,5%, а то время как доля мужчин - 43,5%. В группе тяжелой степени тяжести заболевания процентное соотношение женщин и мужчин было 60% и 40% соответственно (Рисунок 12).

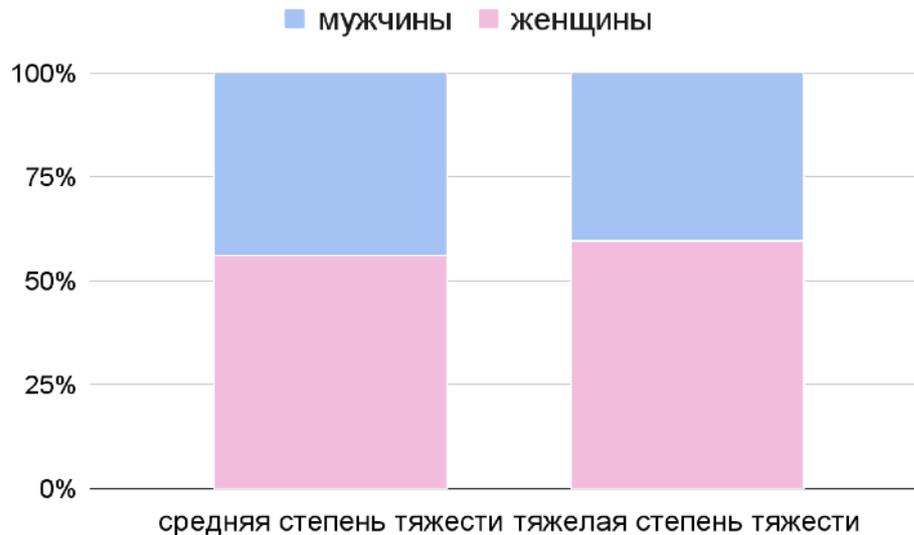


Рисунок 12 – Распределение по половой принадлежности пациентов основной группы (n=102)

Полученные значения соотносятся с данными литературных источников. В детском возрасте распространенность атопического дерматита выше у мальчиков, чем у девочек. В 2008 году в Нидерландах среди детей первых 4 лет жизни эти цифры составили 8,7% и 5,6% соответственно. Напротив, после полового созревания распространенность заболевания превалирует среди женщин: в Европе составляет 5,7% у мужчин и 8,1% у женщин. Такое различие между полами объясняется физиологическими эффектами половых гормонов [139, 163].

При анализе особенностей локализации очагов поражения в зависимости от анатомической зоны наиболее часто отмечалось вовлечение кожи верхних конечностей – 28,4% (n=87) и области лица и шеи – 27,8% (n=85). Реже встречалось поражение кожи туловища и нижних конечностей – 21,6% (n=66) и 19,9% (n=61) соответственно. При этом частота встречаемости эритродермии составила 2,3% (n=7) (Рисунок 13).



Рисунок 13 – Особенности локализации очагов поражения по анатомическим зонам

Известно, что атопический дерматит ассоциирован с повышенным риском развития других аллергических заболеваний, так как и аллергический ринит (АР) и бронхиальная астма (БА) [20, 79]. Нами было отмечено, что частота встречаемости в изучаемой выборке пациентов с атопическим дерматитом составила 34,3% (n=35) и 7,8% (n=8) соответственно. Кроме того, у пациентов были установлены сопутствующие заболевания неаллергического характера. Наиболее распространенными были хронический гастрит – 71,6% (n=73), дискинезия желчевыводящих путей – 52,9% (n=54) и хронический тонзиллит – 10,8% (n=11).

3.2. Особенности экспрессии генов *IL-4*, *IL-13*, *IL-33* и *TNF-α* в группе пациентов с атопическим дерматитом на системном уровне

Одной из задач настоящего исследования являлось изучение экспрессии генов цитокинов у взрослых пациентов с атопическим дерматитом средней и тяжелой степени тяжести на системном уровне. Нами были выбраны как ключевые цитокины (*IL-4*, *IL-13* и *TNF-α*), вовлеченные в патогенез атопического дерматита, так и относительно недавно открытый *IL-33*, роль которого в развитии

заболевания еще уточняется [133, 147, 191]. Полученные результаты анализа цитокинового профиля (IL-4, IL-13 и TNF- α) представлены в относительных единицах (отн. ед.).

У пациентов с атопическим дерматитом средней и тяжелой степени тяжести уровень экспрессии *IL-4* достоверно не отличался от контрольной группы (Рисунок 14).

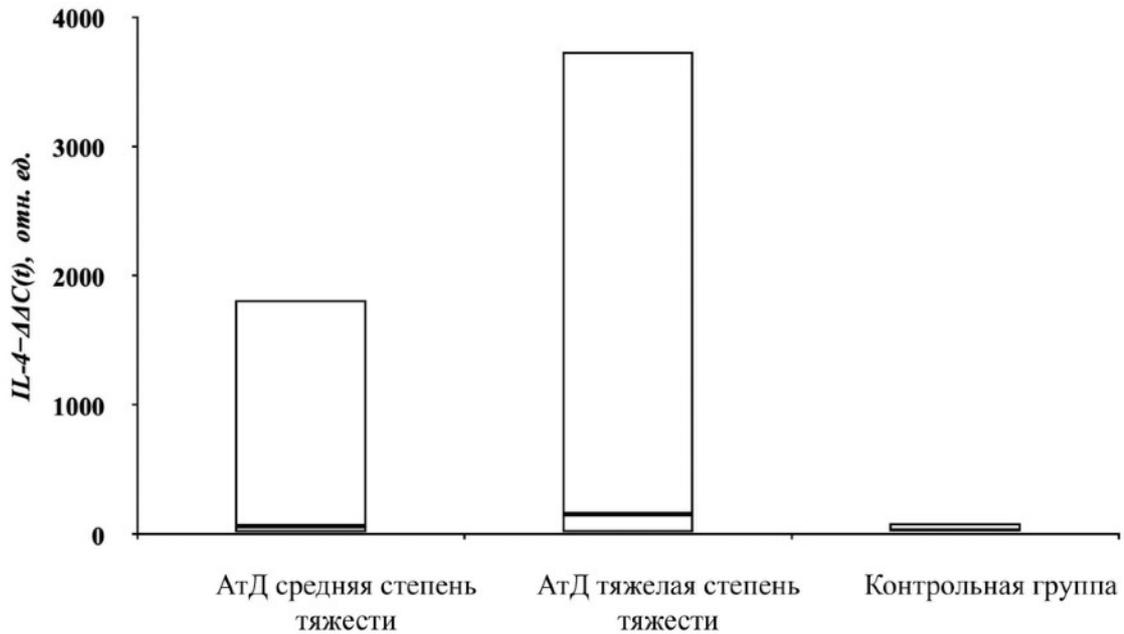


Рисунок 14 – Экспрессия гена *IL-4* у больных атопическим дерматитом и группы контроля

При сопоставлении значений экспрессии *IL-13* отмечено статистически значимое повышение его уровня в 100 раз ($p \leq 0,01$) у пациентов со средней степенью тяжести и в 81 раз ($p \leq 0,01$) – при тяжелом течении заболевания по сравнению с группой контроля (Рисунок 15).

Экспрессия гена *TNF- α* в группе атопического дерматита тяжелой степени тяжести превышала его значение относительно контрольной группы более чем в 12 раз ($p \leq 0,01$). В то же время при сравнении уровня экспрессии между двумя группами пациентов была отмечена повышенная активация экспрессии гена *TNF- α* при тяжелом течении атопического дерматита, отличающаяся более чем в 4 раза ($p \leq 0,05$) (Рисунок 16).

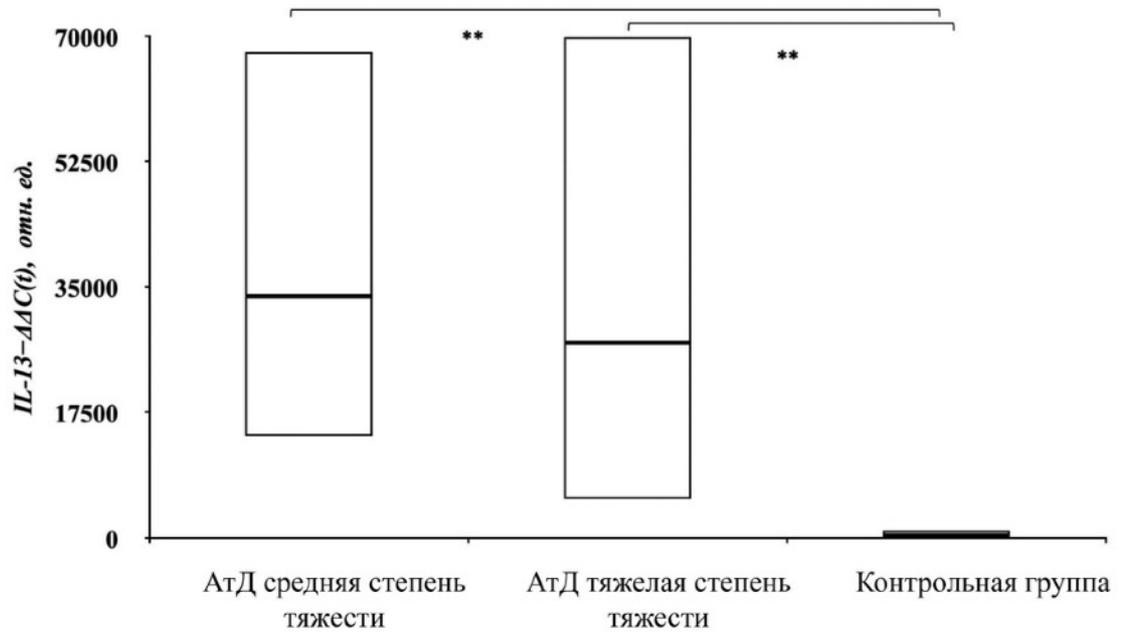


Рисунок 15 – Экспрессия гена *IL-13* у больных атопическим дерматитом и группы контроля (** – $p \leq 0,01$)

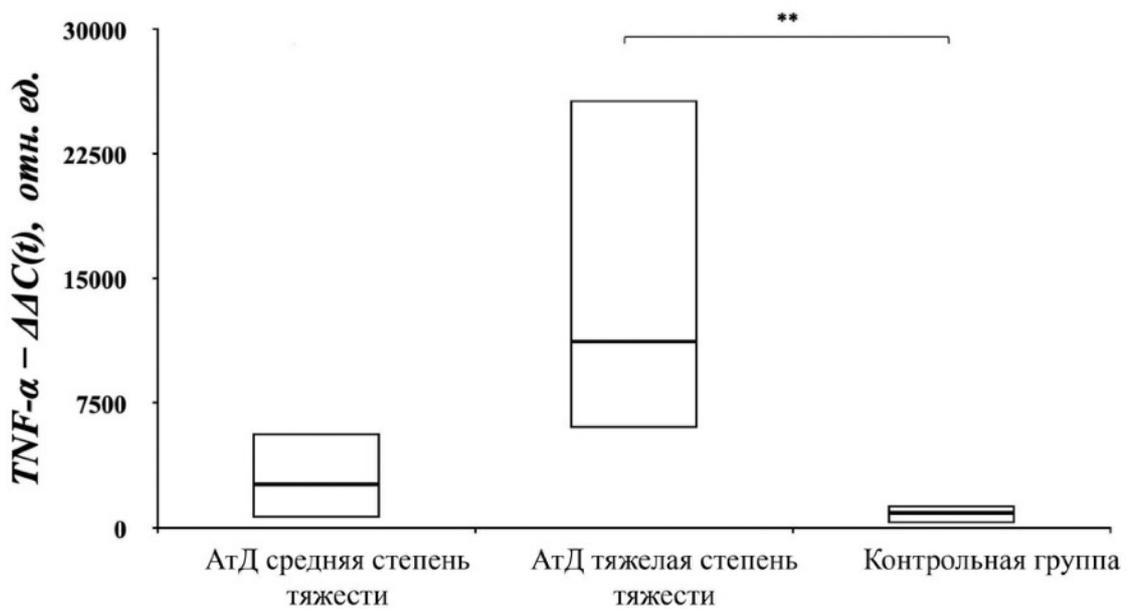


Рисунок 16 – Экспрессия гена *TNF-α* у больных атопическим дерматитом и группы контроля (** – $p \leq 0,01$)

При анализе результатов исследования не было отмечено статистически значимого различия между двумя группами пациентов с атопическим дерматитом ($p=0,0607$) (Рисунок 17). В то же время при сравнении экспрессии гена *IL-33* в группе пациентов с атопическим дерматитом средней степени тяжести

относительно здоровых, выявлено снижение относительно здоровых в 1,5 раза ($p \leq 0,05$) (Рисунок 18) [33].



Рисунок 17 – Экспрессия гена *IL-33* у больных atopическим дерматитом

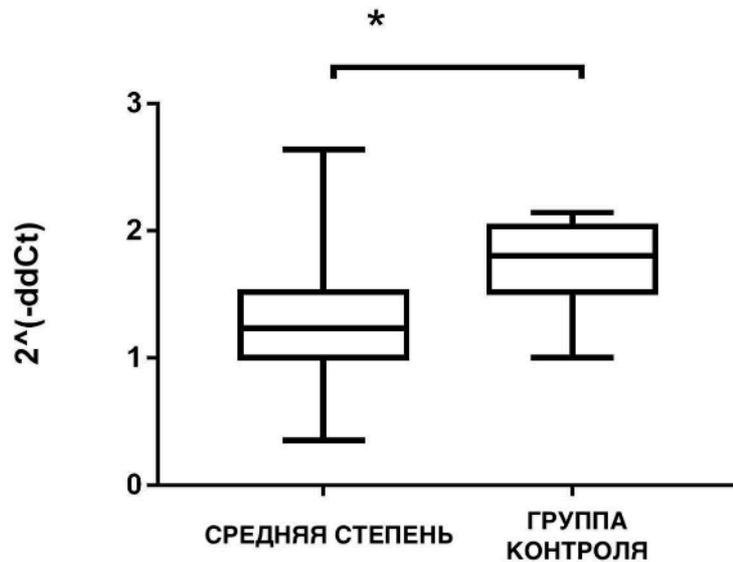


Рисунок 18 – Экспрессия гена *IL-33* в группе пациентов с atopическим дерматитом средней степени и группы контроля (* – $p \leq 0,05$)

Ранее другими исследователями было показано, что в период обострения atopического дерматита отмечается повышение экспрессии генов *IL-4*, *IL-13*, *IL-33* и *TNF-α* на локальном уровне, которое положительно коррелирует с тяжестью заболевания [6, 60, 97, 143].

В ходе же нашего исследования был проанализирован цитокиновый профиль на системном уровне у пациентов с атопическим дерматитом средней и тяжелой степени тяжести, и выявлено выявлено выраженное повышение экспрессии генов *IL-4*, *IL-13* и *TNF- α* на фоне снижения экспрессии *IL-33* в сыворотке крови [33, 38]. Таким образом, оценка экспрессионного профиля изученных генов имеет важное прогностическое значение в отношении развития атопического дерматита.

3.3. Изучение ассоциаций полиморфных маркеров rs7019575 в гене *IL-33*, rs3811046 и rs3811047 в гене *IL-37* с риском развития атопического дерматита

Кроме того, для выявления потенциальных генетических маркеров, ассоциированных с повышенным риском атопического дерматита, мы изучили однонуклеотидные полиморфизмы *IL-33* и *IL-37*.

Исследование аллелей и генотипов полиморфного маркера rs7019575 в гене *IL-33* не выявил статистически значимых различий между пациентами с атопическим дерматитом и в контрольной выборке. Аллель G в обеих группах встречался чаще (0,655 и 0,664 соответственно), чем аллель C (0,345 и 0,336). Гомозигота CC встречалась с частотой 0,093, гетерозигота – 0,505, а гомозигота GG – 0,402 в группе у больных атопическим дерматитом. Распределение генотипов в контрольной выборке было 0,119, 0,433 и 0,448 соответственно. Данные значения представлены в Таблице Б.3.

Исследование полиморфного маркера rs3811046 в гене *IL-37* выявило преобладание аллеля T как в группе АтД (0,755), так и в контрольной выборке (0,625). Аллель G встречался с частотой 0,245 и 0,375 соответственно ($\chi^2=6,44$; $p<0,05$). Было выявлено, что риск развития атопического дерматита у носителей аллеля G уменьшается почти в 2 раза (OR=0,54; 95%CI=0,33-0,87) (Рисунок 19). Гомозигота TT была выявлена в группе пациентов с частотой 0,510, а в контрольной выборке – 0,309. Гетерозигота – 0,490 и 0,632, а гомозигота GG – 0,000 и 0,059 соответственно. Анализ генотипов показал ассоциацию гомозиготы TT с риском развития заболевания ($\chi^2=6,44$; $p<0,05$). Носительство генотипа TT

увеличивает риск развития атопического дерматита более чем в 2 раза ($OR=2,33$; $95\%CI=1,22-4,48$) (Рисунок 20) Полученные значения остальных гаплотипов отображены в Таблице Б.3.

Исследование полиморфного маркера rs3811047 в гене *IL-37* не выявило статистически значимых различий при распределении аллелей и генотипов. В обеих группах отмечалось преобладание аллеля G, с частотой встречаемости 0,679 в группе атопического дерматита и 0,713 - условно-здоровых лиц. Аллель A встречался с частотой 0,321 и 0,287 соответственно. Гомозигота AA была выявлена в группе пациентов с частотой 0,137, а в контрольной выборке – 0,074. Гетерозигота – 0,368 и 0,426, а гомозигота GG – 0,495 и 0,5 соответственно. Полученные данные представлены в Таблице Б.3.

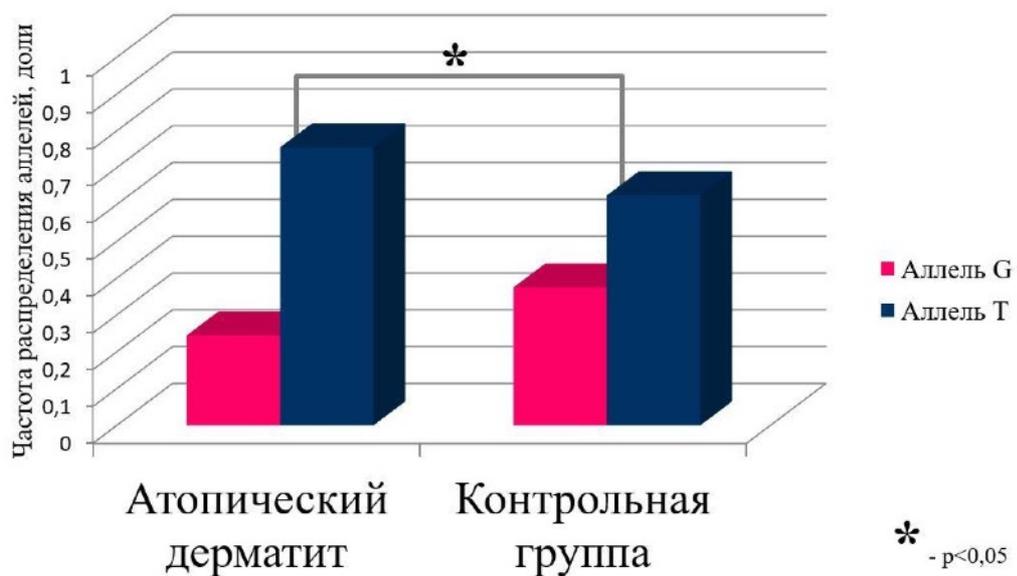


Рисунок 19 - Распределение частот аллелей полиморфного маркера rs3811046 в гене *IL-37* в группе пациентов с АтД и контрольной группе

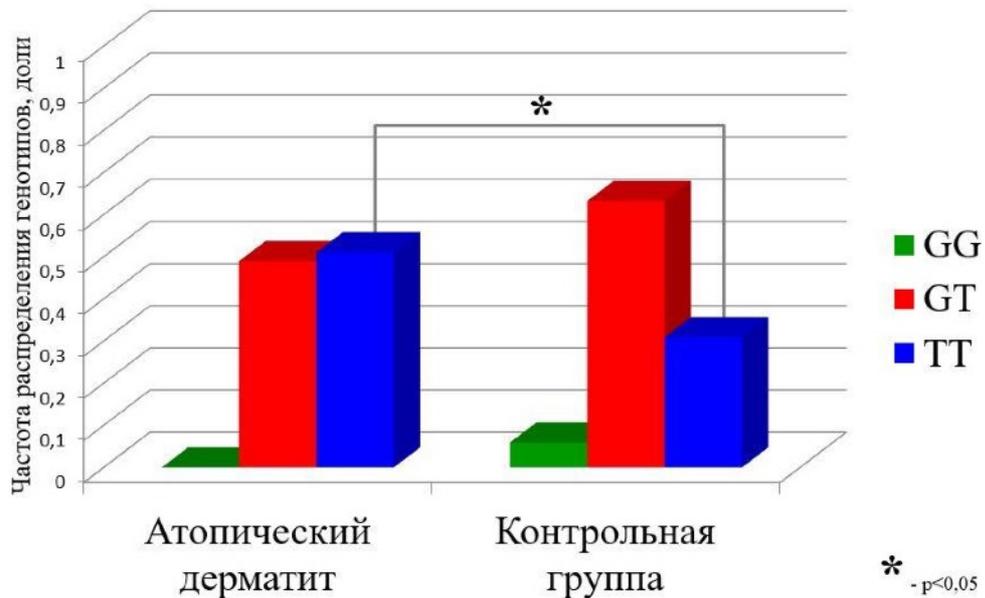


Рисунок 20 - Распределение частот генотипов полиморфного маркера rs3811046 в гене *IL-37* в группе пациентов с АД и контрольной группе

На следующем этапе проводился анализ распределения гаплотипов полиморфных маркеров rs3811046 - rs3811047 в гене *IL-37*. Анализ гаплотипов выявил ассоциацию гаплотипов TTGG ($\chi^2=5,04$; $p<0,05$), GTAA ($\chi^2=6,05$; $p<0,05$) и GTGG ($\chi^2=14,25$; $p<0,01$) с риском развития заболевания. При этом гаплотип TTGG встречался в группе пациентов с частотой 0,484, а в контрольной – 0,309. Риск развития заболевания увеличивался в 2 раза (OR=2,10; 95%CI=1,09-4,04) (Рисунок 21). Гаплотип GTAA встречался в исследуемых выборках с частотой 0,137 и 0,015 соответственно, носительство которого было ассоциировано с повышенным риском развития атопического дерматита более чем в 10 раз (OR=10,62; 95%CI=1,35-83,29) (Рисунок 22). Также выявлена тенденция к снижению вероятности развития заболевания при наличии гаплотипа GTGG (OR=0,05; 95%CI=0,01-0,35). Частота встречаемости данного гаплотипа была 0,011 в выборке пациентов и 0,191 - контроля (Рисунок 23). Полученные значения по всем гаплотипам представлены в Таблице Б.4.

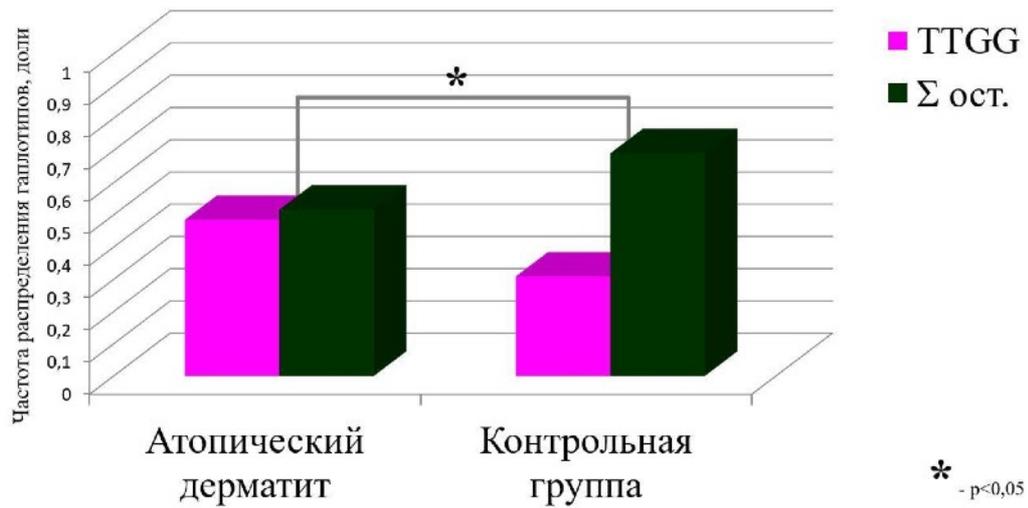


Рисунок 21 - Частота встречаемости гаплотипа TTGG полиморфных маркеров rs3811046 - rs3811047 в гене *IL-37* в группе пациентов с атопическим дерматитом и контрольной выборке

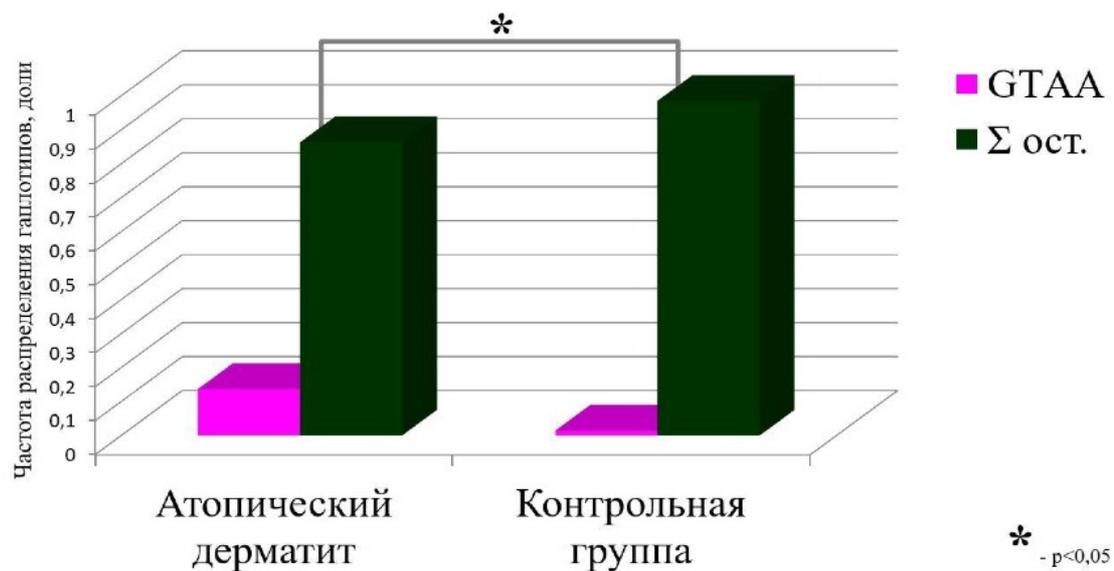


Рисунок 22 - Частота встречаемости гаплотипа GTAA полиморфных маркеров rs3811046 - rs3811047 в гене *IL-37* в группе пациентов с атопическим дерматитом и контрольной выборке

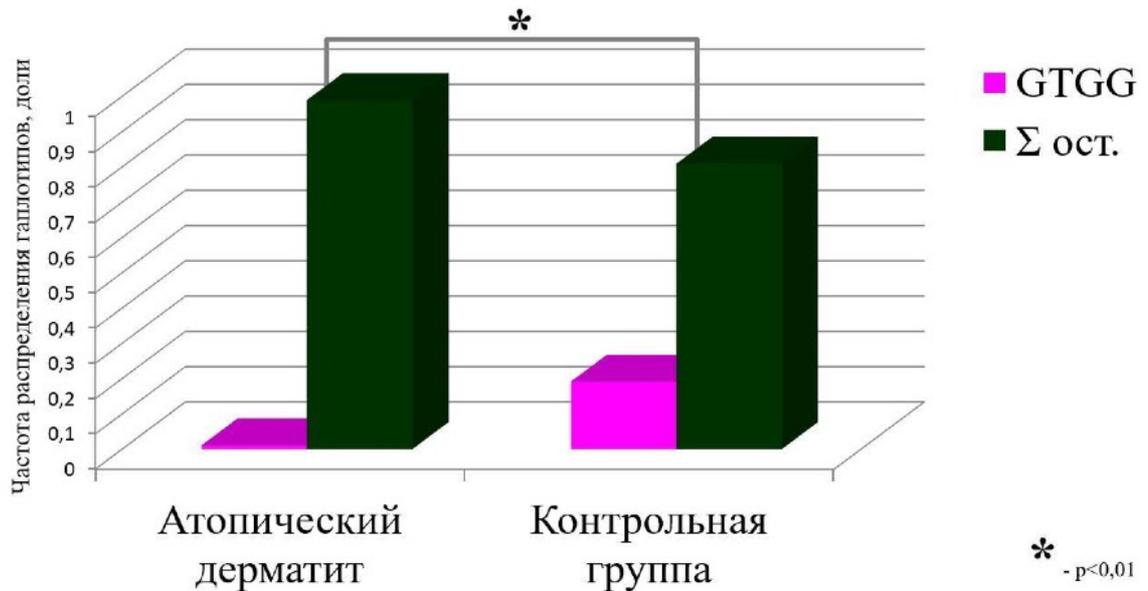


Рисунок 23 - Частота встречаемости гаплотипа GTGG полиморфных маркеров rs3811046 - rs3811047 в гене *IL-37* в группе пациентов с атопическим дерматитом и контрольной выборке

Отсутствие статистически значимых различий между группами при анализе маркера rs7019575 в гене *IL-33* в нашем исследовании может объяснено размером выборки. Изучение данного полиморфизма на большей выборке возможно приведет к установлению определенной ассоциации. Ранее данный полиморфный маркер при атопическом дерматите и других заболеваниях атопической триады не изучался.

Полиморфные маркеры rs3811046 и rs3811047 в гене *IL-37* в выборке пациентов с атопическим дерматитом были изучены впервые. Ранее маркер rs3811047 в гене *IL-37* рассматривался в отношении ревматоидного артрита в популяции северного Китая, однако ассоциации с повышенным риском развития выявлено не было. Тем не менее была отмечена протективная роль аллеля А в виде уменьшения выраженности клинических проявлений, включая отек в области суставов и интенсивность боли [170]. Также было показано, что полиморфизмы rs3811046 и rs3811047 в гене *IL-37* были ассоциированы с COVID-19, тогда как между здоровым контролем и выборками пациентов с тиреоидитом Хашимото и болезнью Грейвса значимых различий при распределении по аллелям и генотипам выявлено не было [137, 161]. Кроме того,

SNP rs3811046 в бразильской популяции был ассоциирован с повышенным риском развития пародонтита среднетяжелой и тяжелой степени тяжести [196].

Проведение сравнительного анализа при распределении аллелей, генотипов и гаплотипов в группе пациентов с атопическим дерматитом и контрольной выборке выявило, что два из трех изучаемых SNP-маркеров ассоциированы с риском развития атопического дерматита (Рисунок 24). Так, у носителей генотипа ТТ (rs3811046), гаплотипов ТТGG и GTAA (rs3811046-rs3811047) в гене *IL-37* риск развития заболевания увеличивается в 2, 2 и 10 раз соответственно. И, напротив, носительство аллеля G (rs3811046) ассоциировано со снижением риска развития заболевания.



Рисунок 24 - SNP-маркеры в генах *IL-37*, ассоциированные с риском развития атопического дерматита

3.4. Поиск ассоциаций полиморфных маркеров rs5743708 в гене *TLR2*, rs11536889 и rs4986791 в гене *TLR4* и rs352140 в гене *TLR9* с риском развития атопического дерматита

Известно, что патогенезе атопического дерматита важное участие принимают распознающие структуры врожденного иммунитета, к которым, в первую очередь, относятся TLRs. Поэтому на следующем этапе исследования мы изучили ассоциацию полиморфных маркеров в генах *TLR2* (rs5743708), *TLR4* (rs11536889 и rs4986791) и *TLR9* (rs352140) с риском развития заболевания.

При исследовании полиморфного маркера rs5743708 в гене *TLR2* статистически значимых различий в распределении аллелей в группе пациентов с атопическим дерматитом и контрольной выборке выявлено не было. Как в группе с атопическим дерматитом, так и в группе контроля отмечалось преобладание аллеля G (0,985 и 0,951 соответственно) по сравнению с аллелем A (0,015 и 0,049 соответственно). Однако при распределении пациентов в соответствии со степенью тяжести было выявлено, что аллель A не встречался в группе больных атопическим дерматитом средней степени тяжести, в то время как в группе сравнения частота встречаемости составила 0,049 (Рисунок 25).

Гомозигота GG была выявлена в группе атопического дерматита с частотой 0,951, а в выборке условно-здоровых лиц – 0,903. Распределение по гетерозиготе показало – 0,024 и 0,097 соответственно, а гомозигота AA была выявлена только у пациентов с АтД – 0,024 (Таблица Б.1). Таким образом, генотип GA ассоциирован с протективной ролью в отношении риска развития атопического дерматита ($p < 0,05$) (Рисунок 26).

Анализ полиморфного маркера rs11536889 в гене *TLR4* не выявил статистически значимых различий в распределении аллелей и генотипов. Отмечалось преобладание аллеля G как в группе больных, так и в группе индивидов без атопического дерматита (0,865 и 0,915 соответственно). Частота аллеля C составила 0,135 и 0,085 соответственно. Частота встречаемости гомозиготы GG составила в основной группе 0,729 и контрольной – 0,831, гетерозигота GC – 0,271 и 0,169 соответственно. Данные значения наглядно представлены в Таблице Б.1.

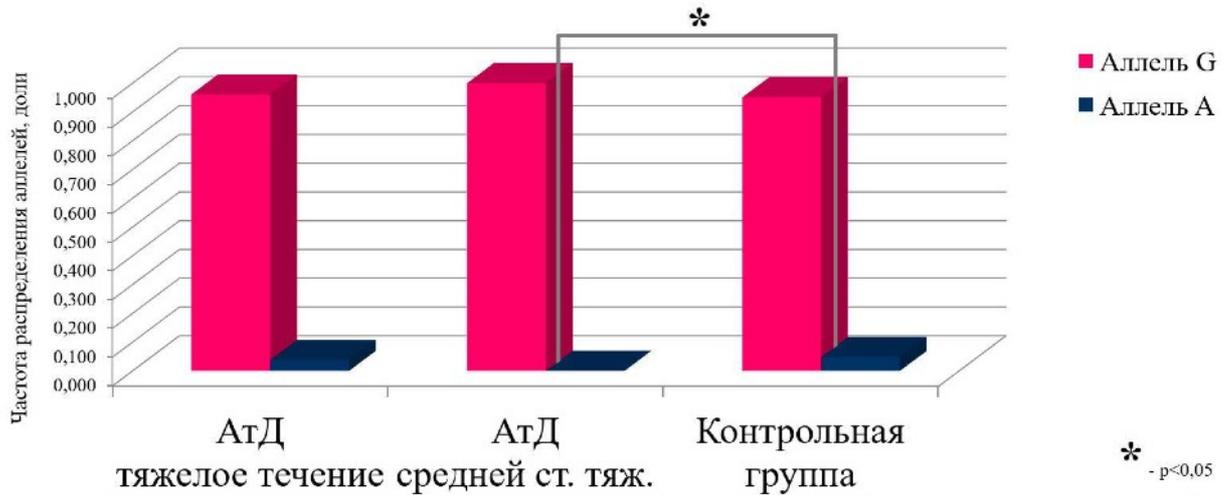


Рисунок 25 – Распределение частот аллелей в полиморфного маркера rs5743708 в гене *TLR2* в группе пациентов с АтД средней степени тяжести и контрольной группе

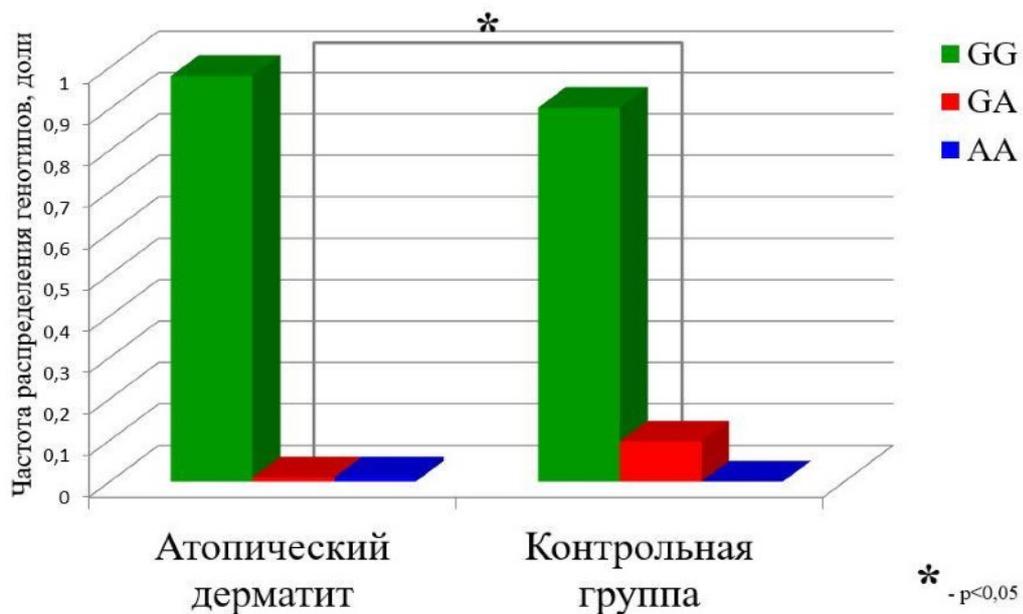


Рисунок 26 – Распределение частот генотипов полиморфного маркера rs5743708 в гене *TLR 2* в группе пациентов с атопическим дерматитом и контрольной группе

Вместе с тем была определена тенденция к повышенному риску развития атопического дерматита тяжелой степени тяжести примерно в 2,5 раза при носительстве гетерозиготы GC ($p < 0,05$; OR=2,46; 95% CI=0,99-6,11). Одновременно отмечена протективная роль гомозиготного генотипа GG относительно риска развития атопического дерматита ($p < 0,05$; OR=0,10; 95%CI=0,16-1,01) (Рисунок 27).

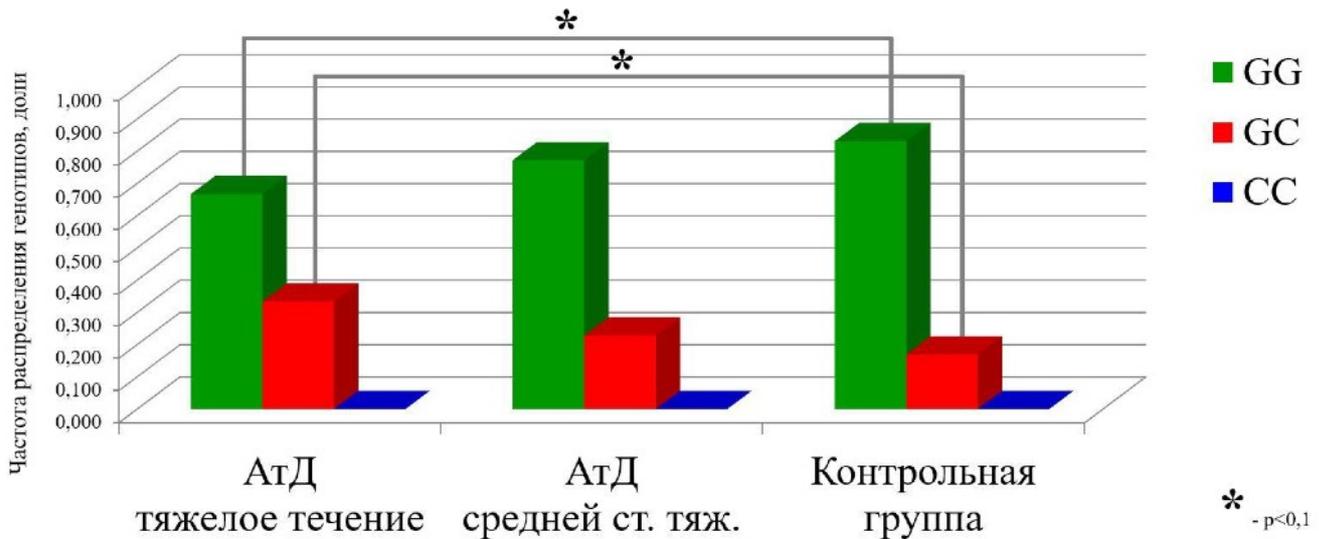


Рисунок 27 – Распределение частот генотипов полиморфного маркера rs11536889 в гене *TLR4* в группе больных атопическим дерматитом тяжелой степени тяжести и контрольной группе

Исследование аллелей и генотипов полиморфного маркера rs4986791 в гене *TLR4* не показало статистически значимых различий между группами. Было выявлено преобладание аллеля С как у пациентов с атопическим дерматитом (0,934), так и в группе контроля (0,961). Частота встречаемости Аллеля Т составила 0,066 и 0,039 соответственно. Гомозигота ТТ была выявлена в группе с ПНН с частотой 0,677, а в контрольной выборке – 0,717. Гетерозигота – 0,290 и 0,202, а гомозигота GG – 0,032 и 0,081 соответственно. Частота встречаемости гомозиготы CC составила 0,842 в группе заболевания и 0,922 в контрольной группе, гетерозигота СТ – 0,147 и 0,078 соответственно. Гомозигота ТТ встречалась только у пациентов с атопическим дерматитом – 0,011 (Таблица А.1).

Также был проведен анализ распределения гаплотипов полиморфных маркеров rs11536889 - rs4986791 в гене *TLR4*. Наиболее часто встречающимся как среди пациентов с атопическим дерматитом, так и условно-здоровых добровольцев был гаплотип GGCC с частотой встречаемости 0,602 и 0,841 соответственно. Гаплотип GCCC в группе атопического дерматита встречался значительно чаще (частота встречаемости – 0,237) по сравнению с контрольной выборкой (частота встречаемости – 0,079). Данные по остальным гаплотипам

представлены в Таблице Б.2. Таким образом, у носителей гаплотипа GGCC отмечается тенденция в сторону уменьшения риска развития атопического дерматита ($p < 0,01$; $OR = 0,29$; $95\%CI = 0,13-0,63$) (Рисунок 28). В то время как наличие гаплотипа GCCC в гене *TLR4* повышает риск развития заболевания в 3,5 раза ($p < 0,05$; $OR = 3,59$; $95\%CI = 1,28-10,08$) (Рисунок 29).

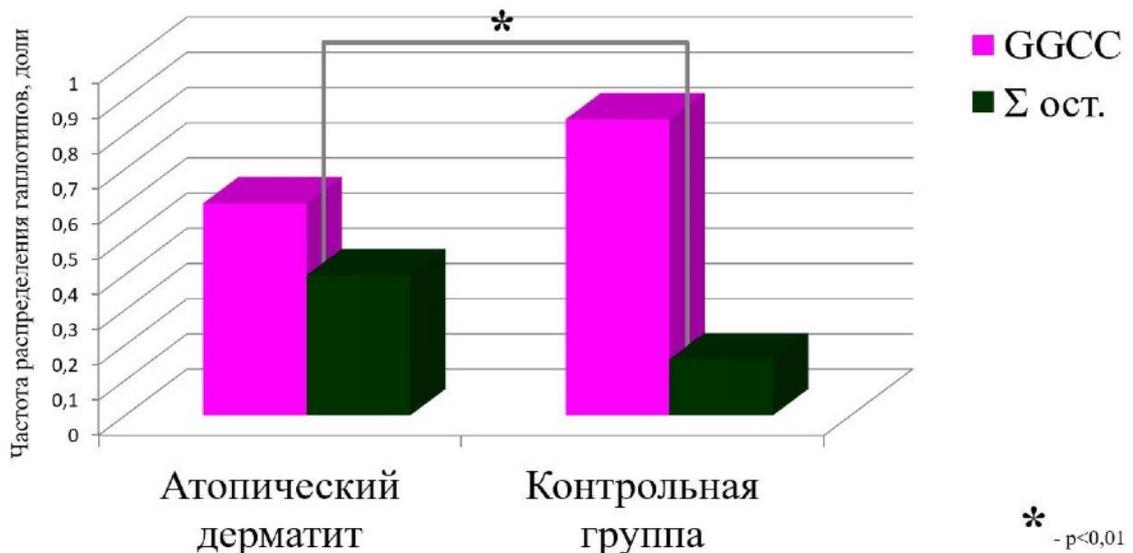


Рисунок 28 – Частота встречаемости гаплотипа GGCC полиморфных маркеров rs11536889-rs4986791 в гене *TLR4* в группе пациентов с атопическим дерматитом и контрольной выборке

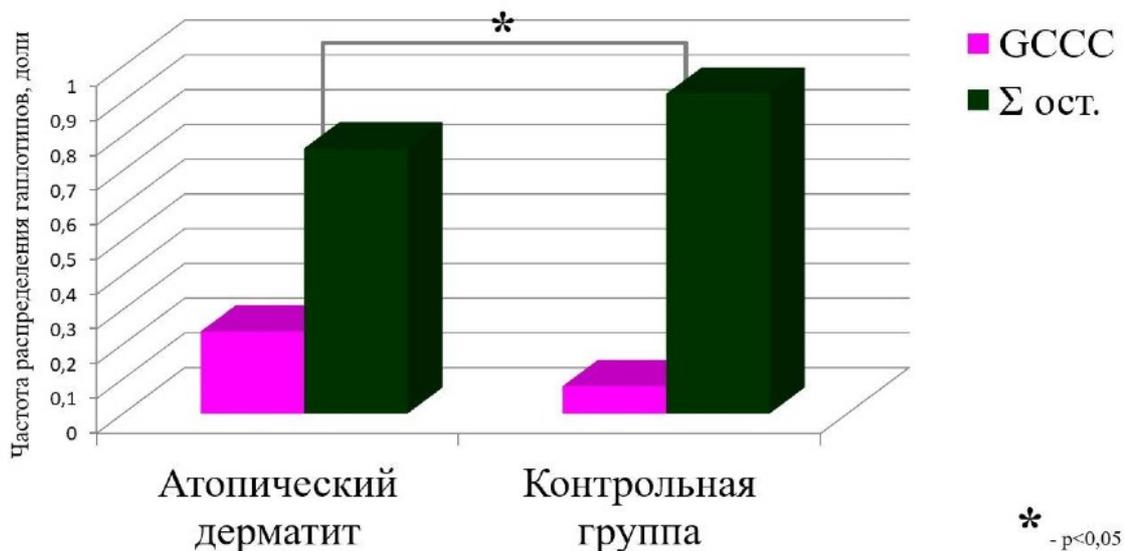


Рисунок 29 - Частота встречаемости гаплотипа GCCC полиморфных маркеров rs11536889 - rs4986791 в гене *TLR4* в группе пациентов с атопическим дерматитом и контрольной выборке

Изучение полиморфного маркера rs352140 в гене *TLR9* показало, что частота встречаемости аллеля А составила 0,552 у пациентов и 0,471 в группе контроля, а частота аллеля G – 0,448 и 0,529 соответственно. Гомозигота GG встречалась с частотой 0,206 у пациентов с атопическим дерматитом и 0,329 в контрольной выборке. Гетерозигота GA была выявлена с частотой 0,485 в группе с атопическим дерматитом и контрольной группе – 0,4. Гомозигота AA показала частоту встречаемости 0,309 и 0,271 соответственно.

При распределении пациентов по группам в зависимости от степени тяжести заболевания было выявлено статистически достоверное различие между группой средней степени тяжести и контрольной выборкой. Частота встречаемости гомозиготы GG в группе атопического дерматита составила 0,169, в то время как в группе контроля – 0,329 ($p < 0,05$; OR=0,42; 95%CI=0,18-0,97). Так, носительство гомозиготы GG в гене *TLR9* (rs352140) характеризуется протективной ролью в отношении риска развития АД средней степени тяжести ($p < 0,05$; OR=0,42; 0,18-0,97) (Рисунок 30).

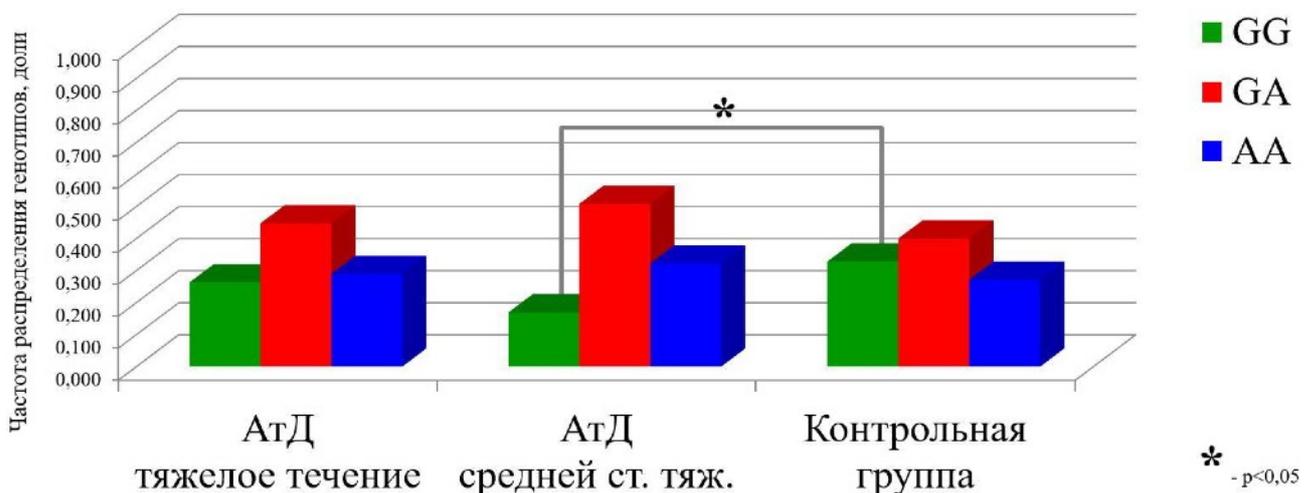


Рисунок 30 - Распределение частот генотипов полиморфного маркера rs352140 в гене *TLR9* в группе больных атопическим дерматитом средней степени тяжести и контрольной группе

Согласно данным мета-анализа Zhang Y. и его соавторов, опубликованного в 2019 году, носительство генотипа GA маркера rs5743708 в гене *TLR2* ассоциировано с повышенным риском развития атопического дерматита в

европеоидной популяции [67]. Вместе с тем результаты нашего исследования показывают обратную тенденцию: снижение риска развития данного заболевания среди носителей гетерозиготного генотипа.

В настоящее время имеется крайне мало исследований в отношении анализа полиморфизмов гена *TLR4* и их соотнесения с риском развития atopического дерматита. В 2022 году Shi J. и его коллеги опубликовали свои данные по исследованию полиморфного маркера rs11536889 в гене *TLR4* в группе детей с atopическим дерматитом Китая. По результатам исследования существенных различий между сравниваемыми группами выявлено не было [189]. Тем не менее в ходе нашего исследования генотип GG был ассоциирован с риском развития atopического дерматита тяжелой степени тяжести.

Полиморфный маркер rs4986791 в гене *TLR4* в группе пациентов с atopическим дерматитом был изучен впервые. Анализ распределения аллелей и генотипов данного маркера не выявил статистически значимых различий среди участников основной и контрольной групп. При проведении мета-анализа Zhao с соавторами проанализировали более 340 научных статей по изучению ассоциации полиморфизмов *TLR2* и *TLR4* с риском развития астмы. При статистической обработке данных было выявлено, что полиморфный маркер rs4986791 в гене *TLR4* ассоциирован с риском развития астмы. Ввиду большой выборки (общее количество объединенной выборки составило 7628 человек) и полученных результатов нам представилось интересным посмотреть ассоциацию маркера rs4986791 в гене *TLR4* с еще одним заболеванием atopической триады - atopическим дерматитом [73].

По данным литературы наиболее исследованными полиморфизмами *TLR9* являются rs5743836, rs187084, rs352140 и rs2066807. В частности, у пациентов с atopическим дерматитом ранее были исследованы полиморфизмы rs5743836 и rs187084, однако статистически значимой взаимосвязи выявлено не было [74]. И так как значимость rs352140 в гене *TLR9* была показана при других заболеваниях, нами был выбран именно этот маркер [69, 75, 190].

По итогам проведенного исследования были выявлены SNP-маркеры в генах *TLRs*, ассоциированные с риском развития atopического дерматита (Рисунок 31).

Установлено, что генотипы GA полиморфного локуса rs5743708 и GG полиморфного локуса rs352140 имеют протективные свойства, снижая риск развития заболевания в 10 и 4 раза соответственно. В то время как с повышенным риском развития заболевания были ассоциированы генотип GC полиморфного локуса rs11536889 и гаплотип GCCC (rs11536889-rs4986791). Это свидетельствует о том, что полиморфные маркеры rs5743708 (*TLR2*), rs11536889, rs4986791 (*TLR4*) и rs352140 (*TLR9*) могут служить предикторами развития заболевания у лиц с отягощенным семейный анамнезом в отношении атопического дерматита [1].



* - тяжелая степень тяжести АтД; × - средняя степень тяжести АтД

Рисунок 31 - SNP-маркеры в генах *TLRs*, ассоциированные с риском развития атопического дерматита

3.5. Анализ бактериальной составляющей микробиома пораженных и неизмененных участков кожного покрова в динамике

В результате снижения активности *TLRs* у пациентов с атопическим дерматитом развивается выраженный дисбаланс микробиома кожи, характеризующийся увеличением доли стафилококков и уменьшением доли других представителей [10, 32, 141].

В настоящее время в литературе мало данных о динамике изменения микробиома кожи на фоне проведения лечения. Как правило, исследователи изучали влияние монотерапии на микробный состав в очагах поражения [104, 118, 146, 148, 186].

Поэтому одной из задач диссертационного исследования было оценить изменение микробиома как пораженных, так и неизмененных участков кожного покрова на фоне проведения стандартной терапии, которая проводилась в соответствии с действующими клиническими рекомендациями 2021 года [2].

При анализе результатов весь спектр, выделенных с поверхности кожи бактерий, был условно разделен на три показателя: *S. aureus*, другие стафилококки и другие бактерии. Такое деление обусловлено тем, что именно *S. aureus* имеет особое значение как в развитии, так и в течении атопического дерматита [25, 62, 192].

На пораженных участках кожи доля *S. aureus* от всех выделенных бактерий составила 39% на исходном уровне (1-й день) и 15,4% после проведенной терапии (14-й день), в то время как на неизмененных участках – 28,3% и 14,9% соответственно. В группе сравнения *S. aureus* не определялся.

Доля других стафилококков у пациентов с атопическим дерматитом в первый день на пораженных участках кожи составила 39% и непораженных – 40%. После проведенной терапии удельный вес других стафилококков составил 60% на пораженных и 63,8% на неизмененных участках. При этом в группе сравнения значение данного показателя составило 76,2%.

В очагах поражения и неизмененной коже удельный вес других бактерий на момент поступления составил 22% и 31,7%, тогда как на 14-й день - 24,6% и 21,3% соответственно. В группе сравнения на долю других бактерий пришлось 23,8%.

Полученные результаты наглядно представлены на рисунке 32.

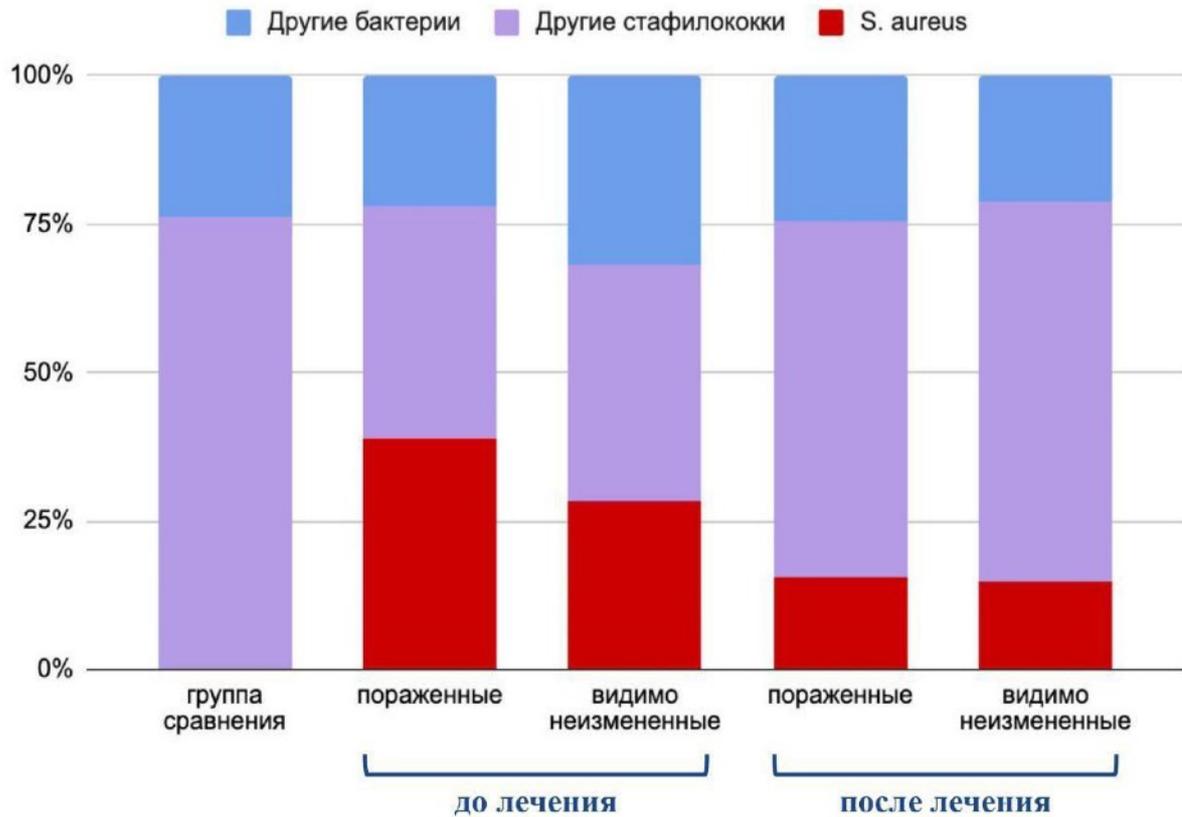


Рисунок 32 – Частота встречаемости микроорганизмов среди пациентов с атопическим дерматитом и группы сравнения (%)

Анализ динамики изучаемых показателей в выборке пациентов с атопическим дерматитом до и после терапии позволил выявить значимые различия. Так, частота обнаружения *S. aureus* на фоне проведенного лечения снижалась как на пораженных ($p < 0,05$), так и неизменных участках кожи ($p < 0,05$). И, напротив, было отмечено достоверное увеличение частоты выделения других стафилококков при проведении повторного посева ($p < 0,05$) (Рисунок 33).

При сравнении изучаемых показателей в выборке пациентов с атопическим дерматитом и группе контроля были выявлены значимые различия по двум ним: "*S. aureus*" и "Другие стафилококки". В 1- и 14-й дни как на пораженных, так и неизменных участках микробиом кожи характеризовался колонизацией *S. aureus*, а также сниженным количеством других стафилококков в первый день по сравнению со здоровыми ($p < 0,05$).

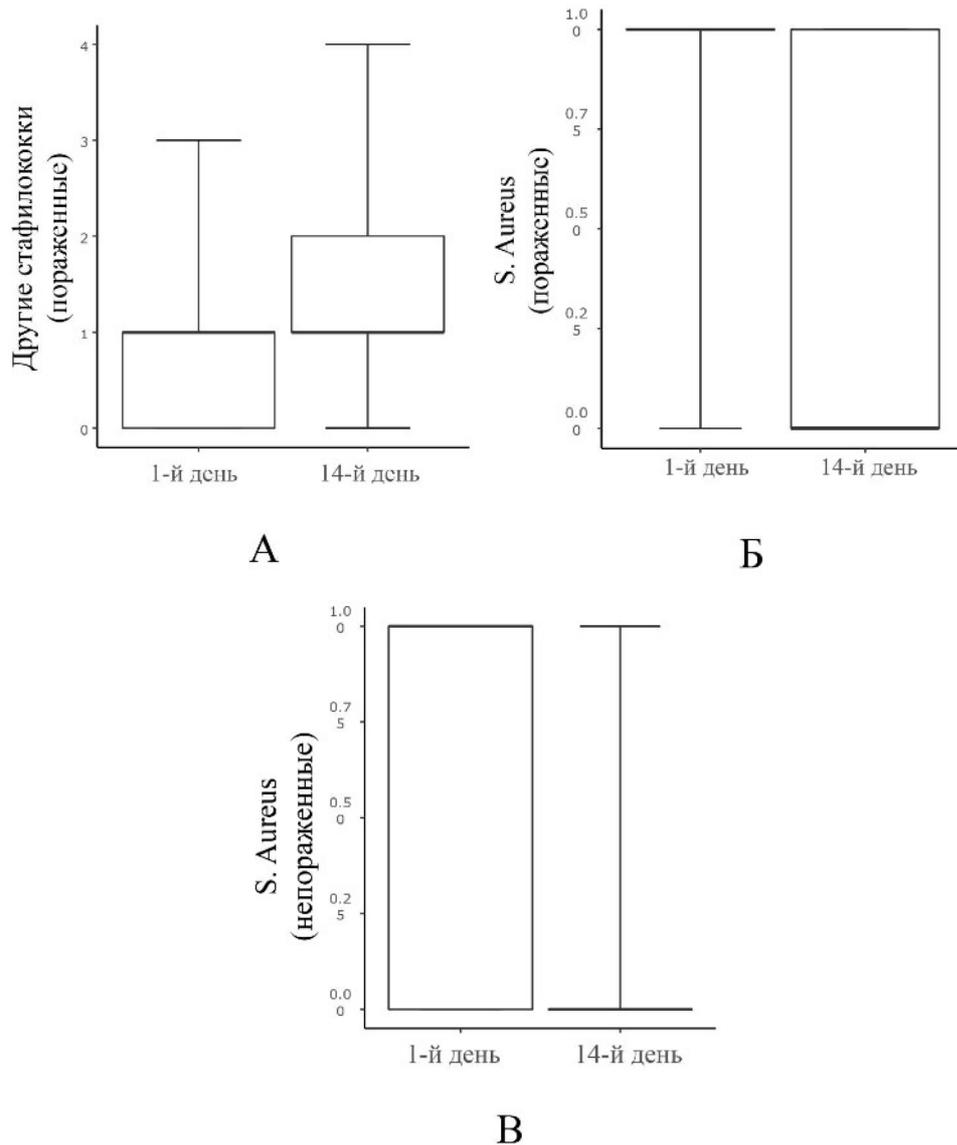


Рисунок 33 – Динамика изменения бактериального состава микробиома кожи у пациентов с АД на фоне терапии: А – другие стафилококки на пораженных участках, Б – *S. aureus* на пораженных участках и В – *S. aureus* на неизмененных участках

На рисунке 34 представлены результаты по частоте выделения других бактерий в выборке пациентов с атопическим дерматитом и группе сравнения.

В первый день в очагах поражения было выделено 8 грамположительных и грамотрицательных родов бактерий: *Acinetobacter* с частотой выделения 30,8%, *Pseudomonas* и *Streptococcus* – по 15,4%, *Aerococcus*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Mixta* и *Pseudoxanthomonas* – по 7,7% каждый. На непораженных участках кожи среди 9 выделенных родов наиболее часто встречались бактерии рода *Micrococcus* с удельным весом 26,3% и *Acinetobacter* – 21,1%. В числе других представителей

других бактерий определялись *Corynebacterium*, *Moraxella* и *Pseudomonas* – 10,5% и *Brevibacterium*, *Pantoea*, *Pseudoxanthomonas* и *Streptococcus* – 5,3%.

После проведенной терапии на пораженных участках кожи преобладали бактерии рода *Acinetobacter* и *Micrococcus*, частота обнаружения которых составила 37,5% каждый. Доля *Brevibacillus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus* и *Pseudomonas* составила по 6,3 %. В числе бактерий, выделенных с поверхности непораженных участков кожи, были идентифицированы *Micrococcus* - 60%, *Acinetobacter* - 30% и *Corynebacterium* - 10% (Рисунок 34).

В группе сравнение чаще всего определялись представители *Acinetobacter*, *Cytobacillus* и *Micrococcus* с частотой встречаемости 20% каждый. В 2 раза реже встречались бактерии рода *Enterococcus*, *Moraxella*, *Neisseria* и *Pseudomonas* - 10%. Данные наглядно представлены на рисунке 34.

Результаты распределения стафилококковой составляющей микробиома по видам наглядно представлены на рисунке 35. При поступлении в стационар на пораженных и непораженных участках кожи отмечалось преобладание *S. aureus*, частота выделения которых составила 50% и 41,5%. На 14-й день исследования доля *S. aureus* составила 20,4% и 18,9% соответственно.

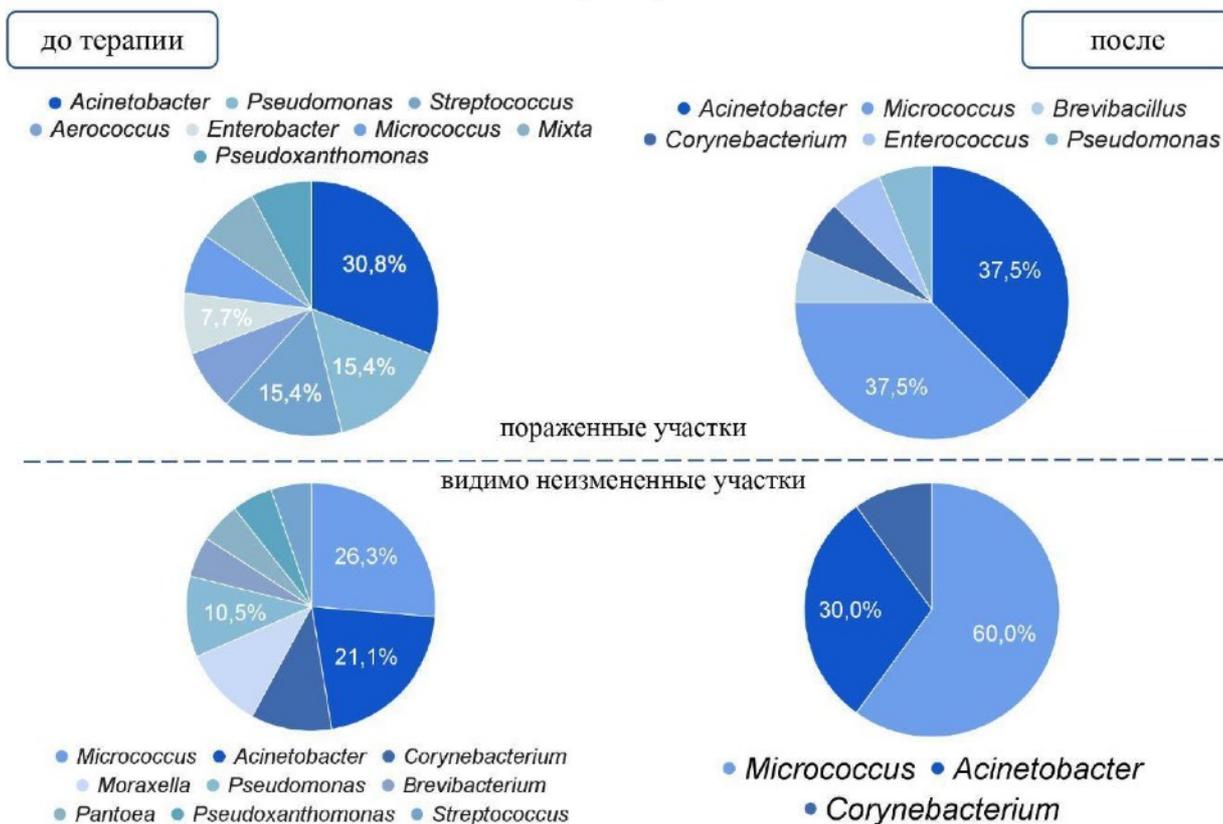
В первый день на пораженных участках среди представителей других стафилококков отмечалось преобладание *S. epidermidis* – 15,2% и *S. capitis* – 13%. Частота встречаемости *S. haemolyticus* и *S. hominis* составила по 8,7% и *S. hominis* и *S. salivarius* по 2,2% каждый. Неизмененные участки кожи характеризовались высоким удельным весом *S. haemolyticus* – 17,1%, *S. epidermidis* – 15,2% и *S. capitis* – 13%. В числе других стафилококков были выделены *S. hominis* – 4,9%, а также *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. pasteurii* и *S. lugdunensis* по 2,4% каждый (Рисунок 35).

При повторном изучении стафилококковой части микробиома в очагах поражения у больных атопическим дерматитом наиболее распространенными были *S. epidermidis* – 32,7% и *S. hominis* – 16,3%. Среди других представителей рода встречались *S. haemolyticus* и *S. capitis* с удельным весом 14,3% каждый и *S. warneri* – 2%. В непораженной области преобладали *S. epidermidis*, *S. capitis* и *S. haemolyticus*, удельный вес которых составил 21,6% каждый. С меньшей

частотой определялись *S. hominis* – 8,1% и *S. borealis*, *S. gallinarum* и *S. warneri*, составляя по 2,7% (Рисунок 35).

В группе сравнения всего было выделено 6 представителей *Staphylococcus spp.*, среди которых наиболее часто встречались *S. epidermidis* – 37,5%, *S. hominis* – 28,1% и *S. capitis* – 18,8%. Доля *S. haemolyticus* и *S. warneri* составила по 6,3%, а *S. pseudintermedius* – 3,1% (Рисунок 35).

Пациенты с АД (n=30)



Группа сравнения (n=27)

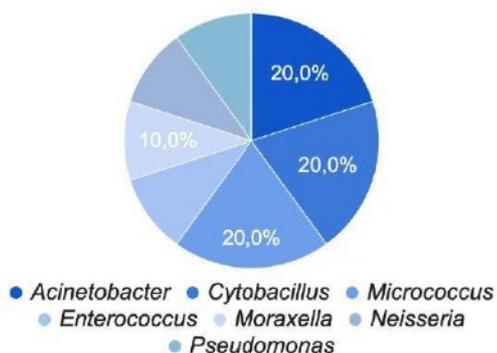


Рисунок 34 – Видовой состав других бактерий, выделенных от пациентов с атопическим дерматитом на пораженных и неизмененных участках кожного покрова и группы сравнения

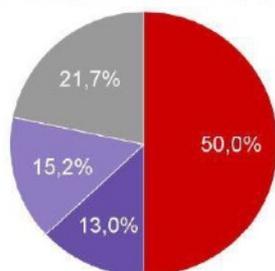
Пациенты с АгД

(n=30)

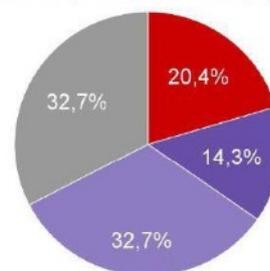
до терапии

после

● *Staphylococcus aureus* ● *Staphylococcus capitis*
● *Staphylococcus epidermidis* ● *Staphylococcus spp.*



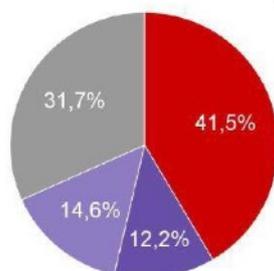
● *Staphylococcus aureus* ● *Staphylococcus capitis*
● *Staphylococcus epidermidis* ● *Staphylococcus spp.*



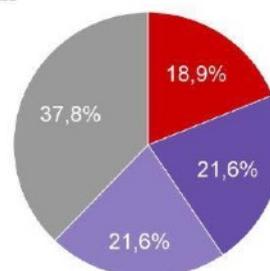
пораженные участки

видимо неизмененные участки

● *Staphylococcus aureus* ● *Staphylococcus capitis*
● *Staphylococcus epidermidis* ● *Staphylococcus spp.*



● *Staphylococcus aureus* ● *Staphylococcus capitis*
● *Staphylococcus epidermidis* ● *Staphylococcus spp.*



Группа сравнения

(n=27)

● *Staphylococcus epidermidis* ● *Staphylococcus hominis*
● *Staphylococcus capitis* ● *Staphylococcus spp.*

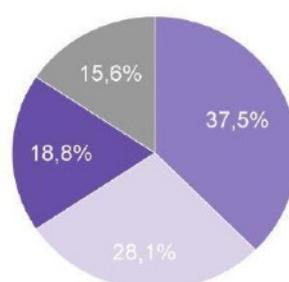


Рисунок 35 – Видовой состав *Staphylococcus spp.*, выделенных от пациентов с атопическим дерматитом на пораженных и неизмененных участках кожного покрова и группы сравнения

Для количественной оценки *S. aureus* использовалось разделение на подгруппы в соответствии со степенью колонизации: нет – данный вид не

определяется, низкая степень – от 1 до 100 КОЕ/дм², умеренная степень – от 101 КОЕ/дм² и сплошной рост – при количестве колоний, не поддающихся подсчету. Анализ изменения степени колонизации кожи *S. aureus* на фоне проведенного лечения как на пораженных, так и неизмененных участках достоверных различий не выявил. Полученные результаты представлены на рисунке 36.

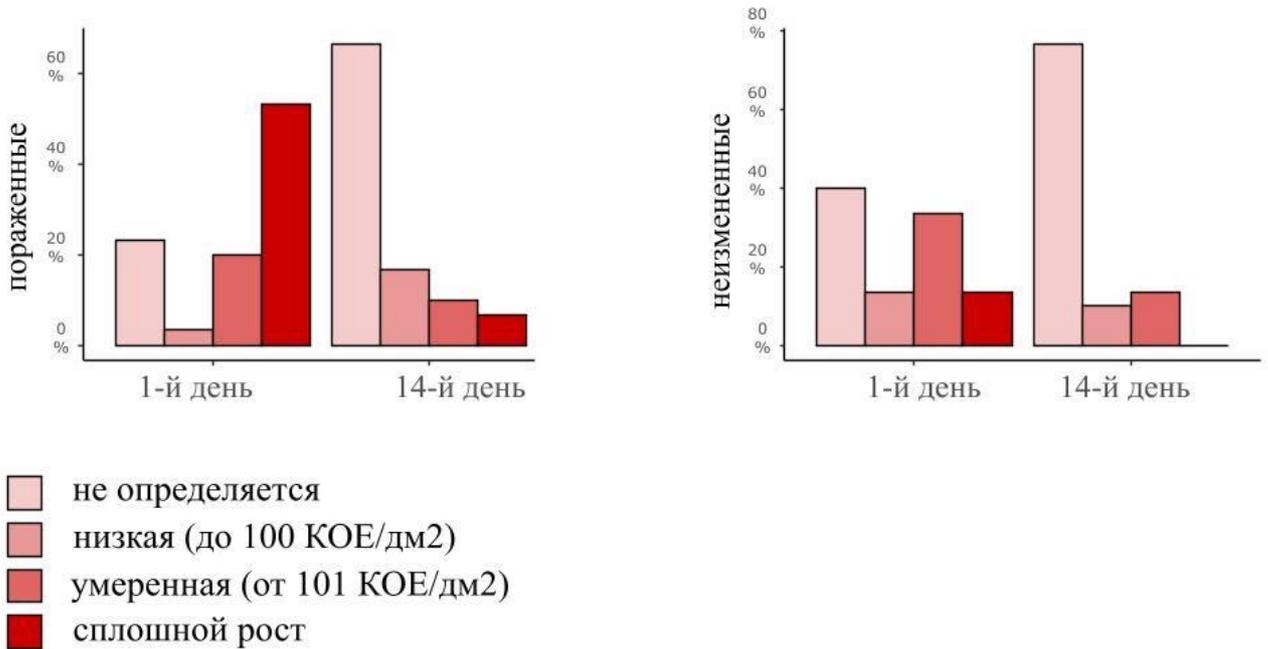


Рисунок 36 – Степень колонизации *S. aureus* в выборке пациентов с АД до и после терапии

Отличительной особенностью между изучаемыми выборками в отношении других бактерий было количество представителей рода *Acinetobacter*. Так, в группе пациентов с атопическим дерматитом были идентифицированы шесть видов данного рода: *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter radioresistens*, *Acinetobacter schindleri*, *Acinetobacter townneri*, *Acinetobacter ursingii* и *Acinetobacter variabilis*. Вместе с тем в группе условно-здоровых людей с поверхности кожи был выделен лишь *Acinetobacter lwoffii* [25].

Относительно *S. epidermidis* в литературе встречаются противоречивые данные. В то время как результаты ряда исследований сообщают о снижении или отсутствии изменений частоты встречаемости *S. epidermidis* у больных

атопическим дерматитом, Kong и соавторы в своем исследовании наблюдали избыточный рост *S. epidermidis* в периоды обострений, что по их мнению свидетельствует о развитии компенсаторного механизма в попытке контролировать рост *S. aureus* [194]. Нами было отмечено снижение частоты встречаемости *S. epidermidis* при обострении атопического дерматита по сравнению с группой контроля. При этом после проведенной терапии уменьшение частоты встречаемости *S. aureus* сопровождалось одновременным увеличением доли других стафилококков ($p < 0,05$).

По данным литературы частота носительства *S. aureus* у больных атопическим дерматитом достигает до 30-100%, в то время как у здоровых людей его распространенность не превышает 20% [162, 169]. По результатам нашего исследования в выборке пациентов с атопическим дерматитом его доля от числа всех выделенных бактерий на исходном уровне составила 39% на пораженных и 28,3% на неизмененных участках кожи, что соотносится с данными зарубежных исследований. Однако, в группе условно-здоровых людей *S. aureus* нами не обнаружен.

3.6. Исследование генетических особенностей стафилококков, выделенных с поверхности кожи пациентов с атопическим дерматитом

Характерной особенностью представителей *Staphylococcus spp.* является способность вырабатывать факторы патогенности, определяющие их выживаемость и степень патогенности [58, 64, 96]. К таким факторам относятся суперантигены: SEs, SE-подобные вещества и TSST-1, встречающихся у каждого штамма в различных количествах и сочетаниях [174, 177]. Кроме того, гены суперантигенов часто являются составляющими мобильных генетических элементов, которые обеспечивают горизонтальный перенос генов SEs, SE-подобных веществ и TSST-1 между штаммами *Staphylococcus spp.* [96, 119].

В ходе нашей работы было исследовано 11 факторов патогенности стафилококков: SEs (SEA, SEC, SEE, SEG, SEH, SEI), SE-подобные вещества (SELK, SELL, SELM, SELN) и TSST-1. Изоляты стафилококков от пациентов с

атопическим дерматитом продуцировали от 1 до 6 видов токсинов в различных комбинациях: до начала лечения среднее значение составило 3-4 фактора патогенности и после проведенной терапии – около 3. У стафилококков, выделенных от условно здоровых людей, частота встречаемости изучаемых факторов варьировала от 0 до 7 у одного штамма. При этом среднее значение частоты встречаемости было несколько ниже, чем у основной группы, и составило менее 2 (Рисунок 37).

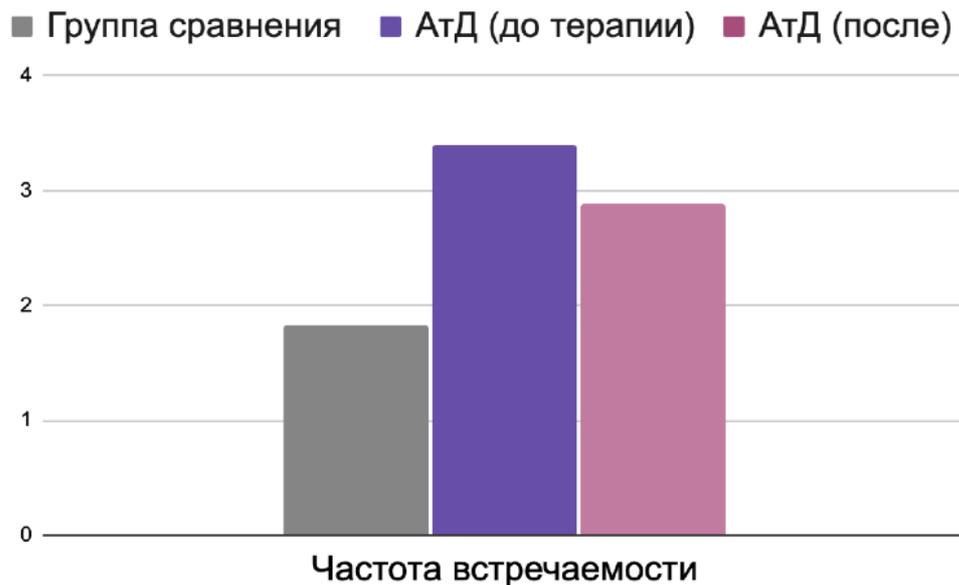


Рисунок 37 – Средние значения частоты встречаемости островков патогенности *Staphylococcus spp.*

В группе сравнения у штаммов стафилококков отмечалось преобладание генов SEE – 39%, SEG – 28% и TSST-1 – 28%. Частота встречаемости других факторов патогенности в данной выборке представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Сравнение частоты встречаемости факторов патогенности в выборке пациентов с АтД на исходном уровне и условно-здоровых людей

| | Группа АтД (n=18) | Группа сравнения (n=18) | p |
|--------|-------------------|-------------------------|------------------|
| SEA | 1 (6%) | 2 (11%) | 1.00 |
| SEC | 12 (67%) | 2 (11%) | 0.002 |
| SEE | 12 (67%) | 7 (39%) | 0.18 |
| SEG | 4 (22%) | 5 (28%) | 1.00 |
| SEH | 8 (44%) | 2 (11%) | 0.06 |
| SEI | 11 (61%) | 1 (6%) | <0.001 |
| SELK | 4 (22%) | 1 (6%) | 0.34 |
| SELL | 10 (56%) | 3 (17%) | 0.04 |
| SELM | 1 (6%) | 3 (17%) | 0.60 |
| SELN | 5 (28%) | 2 (11%) | 0.40 |
| TSST-1 | 2 (11%) | 5 (28%) | 0.40 |

Было установлено, что при поступлении в стационар у пациентов с атопическим дерматитом достоверно чаще встречались гены SEC – 67%, SEI – 61% и SELL – 56% ($p < 0,05$). При изучении динамики встречаемости признаков в группе пациентов выявлено снижение частоты обнаружения гена SEH на 14-й день по сравнению с исходным уровнем: 44% против 6% ($p < 0,05$) (Таблица 5, Рисунок 38).

По данным литературных источников клинический изолят *S. aureus*, выделенный с поверхности кожи во время обострения атопического дерматита, может выделять до 7 факторов патогенности [59, 95]. По нашим данным штаммы *S. aureus* обладали способностью продуцировать до 6 энтеротоксинов и энтеротоксин-подобных веществ одновременно, что соотносится с данными литературы [8].

Таблица 5 – Сравнение частоты встречаемости факторов патогенности в выборке пациентов с АтД до и после терапии

| | До терапии (n=18) | После (n=18) | p |
|--------|-------------------|--------------|-------------|
| SEA | 1 (6%) | 2 (11%) | 1.00 |
| SEC | 12 (67%) | 8 (44%) | 0.34 |
| SEE | 12 (67%) | 7 (39%) | 0.23 |
| SEG | 4 (22%) | 6 (33%) | 0.73 |
| SEH | 8 (44%) | 1 (6%) | 0.04 |
| SEI | 11 (61%) | 6 (33%) | 0.13 |
| SELK | 4 (22%) | 7 (39%) | 0.37 |
| SELL | 10 (56%) | 10 (56%) | 1.00 |
| SELM | 1 (6%) | 4 (22%) | 0.37 |
| SELN | 5 (28%) | 5 (28%) | 1.00 |
| TSST-1 | 2 (11%) | 5 (28%) | 0.45 |

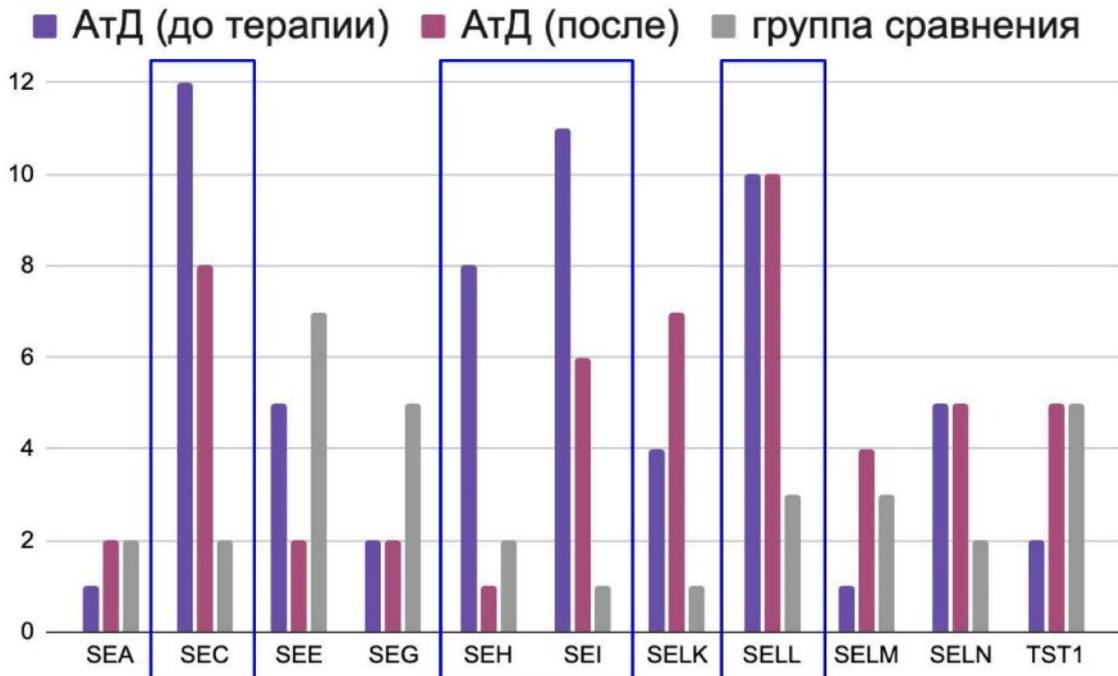


Рисунок 38 – Частота встречаемости SEs, SE-подобных веществ и TSST-1 стафилококков, выделенных с поверхности кожи у больных АтД и группы сравнения

Кроме того, гены энтеротоксинов встречаются также у представителей других коагулазонегативных стафилококков, таких как *S. epidermidis* (SEA, SEB и SEC) и *S. haemolyticus* (SEC) [111, 172, 177]. Согласно результатам нашего исследования, изучаемые гены были обнаружены также у штаммов *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* и *S. warneri*. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что увеличение колонизации кожных покровов *S. aureus* способствует обмену факторов патогенности как внутри своего вида, так и между другими представителями рода *Staphylococcus* [8].

В свою очередь, выработка стафилококковых токсинов приводит к увеличению продукции цитокинов Th2-профиля, способствуя дальнейшей колонизации кожи стафилококками, в частности *S. aureus* [82]. Следовательно, снижение общего количества факторов патогенности у стафилококков на фоне стационарного лечения свидетельствует об уменьшении выраженности воспалительного процесса.

Таким образом, в ходе исследования были изучены особенности врожденного и адаптивного иммунитета у взрослых пациентов с атопическим дерматитом. Так, при средней и тяжелой степени тяжести заболевания была отмечена повышенная экспрессия генов *IL-13* и *TNF- α* в сыворотке крови, сопровождающаяся снижением экспрессии гена *IL-33*. Также был выявлен ряд SNP-маркеров в генах *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *IL-37*, ассоциированных с риском развития заболевания и позволяющих прогнозировать индивидуальную предрасположенность к атопическому дерматиту. Кроме того, были исследованы изменения показателей микробиома кожи, в том числе факторов патогенности стафилококков, до и после терапии. После проведенного лечения у пациентов с атопическим дерматитом снижалась частота встречаемости *S. aureus* на измененных участках кожного покрова в 2,5 раза и вне очагов поражения почти в 2 раза, что свидетельствует об эффективности терапии, проводимой в соответствии с действующими клиническими рекомендациями. Изменения микробиологических показателей сопровождались уменьшением выраженности клинических проявлений заболевания в виде полного или практически полного регресса высыпаний и купирования зуда (Рисунки 39 и 40). Полученные

результаты свидетельствует о роли микробиома кожи в развитии различных форм атопического дерматита и могут быть использованы при выборе персонализированной схемы лечения обострений этого заболевания.



Рисунок 39 – Пациент с атопическим дерматитом средней степени тяжести до и после лечения



Рисунок 40 – Пациент с атопическим дерматитом тяжелой степени тяжести до и после лечения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Атопический дерматит является одним из наиболее часто встречающихся заболеваний в дерматологической практике. В промышленно развитых странах распространенность заболевания среди взрослого населения достигает 10% [147]. При этом отмечается тенденция к неуклонному росту заболеваемости, что обуславливает необходимость уточнения патофизиологических механизмов, лежащих в основе атопического дерматита [46].

В развитии атопического дерматита участвуют различные факторы, начиная от генетической предрасположенности и влияния внешней среды до иммунного дисбаланса, совместное действие которых влияет на клинические проявления заболевания [156, 162]. Так, несостоятельность кожного барьера, возникающая вследствие дефицита структурного белка филаггрина, может способствовать развитию воспалительного процесса с последующей инфильтрацией кожи Т-клетками. В свою очередь, Th2-опосредованный иммунный ответ приводит к возникновению зуда, а расчесывание еще в большей мере снижает барьерную функцию кожи, способствуя активной колонизации кожи стафилококками, в особенности *S. aureus* [147].

В настоящее время роль ряда цитокинов в развитии иммунопатологического процесса при атопическом дерматите хорошо доказана [85, 120]. И вместе с тем разработка новых биологических препаратов на основе моноклональных антител обуславливает необходимость постоянного поиска новых звеньев патогенеза заболевания.

В настоящей работе представлены данные по анализу экспрессии генов цитокинов *IL-4*, *IL-13*, *IL-33* и *TNF- α* у пациентов с атопическим дерматитом на системном уровне. Было отмечено достоверное увеличение экспрессии генов *IL-13* и *TNF- α* , что согласуется с результатами зарубежных исследований [92, 168]. Кроме того, по данным литературных источников в выборке пациентов отмечается повышенный уровень экспрессии гена *IL-4* и *IL-33* по сравнению с группой контроля [102, 133]. В то же время по результатам нашего исследования

экспрессия гена *IL-4* имела тенденцию к увеличению, а экспрессия гена *IL-33* снижалась при средней степени тяжести заболевания в 1,5 раза.

Одной из причин изменения экспрессии генов цитокинов являются особенности их генетических структур, в частности однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), возникающие в результате замены единичных нуклеотидов. Геном каждого человека содержит множество однонуклеотидных замен, которые могут определять как риск развития, так и течение заболевания [42]. На сегодняшний день поиск SNP-маркеров в генах и изучение их ассоциации с риском развития любой патологии является перспективным направлением научных исследований. Исследованные нами маркеры в выборке пациентов с атопическим дерматитом были изучены впервые.

В ходе работы мы провели анализ полиморфных маркеров в генах *IL-33* (rs7019575) и *IL-37* (rs3811046, rs3811047). Так, протективной ролью относительно риска развития атопического дерматита обладал аллель полиморфного маркера rs3811046. И, напротив, с повышенным риском развития заболевания был ассоциирован генотип (rs3811046) и два гаплотипа (rs3811046-rs3811047).

Немаловажную роль в патогенезе атопического дерматита играют TLRs, которые в настоящее время рассматривают как связующее звено между врожденным и адаптивным иммунитетом [184]. Основной функцией этих рецепторов является распознавание липополисахаридов, пептидогликанов и других чужеродных молекулярных структур микробного происхождения [17, 55]. Известно, что обострения атопического дерматита часто сопровождаются повышенной восприимчивостью к вирусным, бактериальным и грибковым инфекциям, которые возникают из-за дефектов в сигнальных путях TLRs [2, 150, 178].

В нашем исследовании были изучены полиморфные маркеры rs5743708, rs11536889, rs4986791 и rs352140. Статистически значимое уменьшение риска развития атопического дерматита в 10 раз отмечено у носителей генотипа GA (rs5743708). Гомозигота GG (rs352140) также обладает протективными свойствами, при носительстве которой вероятность развития атопического дерматита средней степени тяжести снижается в 4 раза. И, напротив, с

повышенным риском развития тяжелой формы заболевания в 2,5 раза был ассоциирован полиморфный маркер rs11536889. При анализе гаплотипов (rs11536889-rs4986791) аналогичным образом отмечалось увеличение риска развития изучаемого заболевания в 3,5 раза по сравнению с группой контроля.

При сопоставлении полученных данных с результатами мета-анализа Zhang Y. с его коллегами отмечено, что в то время как в европеоидной популяции полиморфный маркер rs5743708 ассоциирован с повышенным риском развития заболевания, по результатам нашего исследования, напротив, - со снижением в 10 раз [67].

Как было упомянуто ранее, TLRs осуществляют распознавание молекулярных структур микробного происхождения, поэтому на следующем этапе проводилось исследование микробиома на пораженных и неизмененных участках кожи [17, 55]. После проведенного лечения в условиях стационара отмечалось достоверное снижение частоты встречаемости *S. aureus* как на измененных участках кожного покрова, так и вне очагов поражения в 2,5 и почти 2 раза соответственно. Кроме того, при проведении повторного посева в области очага поражения отмечалось увеличение доли других стафилококков относительно всех выделенных бактерий. В группе сравнения *S. aureus* не определялся.

Полученные нами результаты согласуются с данными зарубежных источников, сообщающих о наличии выраженного дисбаланса микробиома кожи во время обострений атопического дерматита. Отличительными особенностями является снижением микробного разнообразия на фоне одновременного увеличения доли стафилококков, в частности *S. aureus* [29, 194]. По некоторым оценкам, носительство *S. aureus* на поверхности кожи в группе пациентов с атопическим дерматитом определяется с частотой от 30% до 100%, в то время как в группе условно-здоровых людей – до 20% [183].

В наших исследованиях и публикациях других авторов показана значительная роль стафилококков в патогенезе атопического дерматита, что связано не только со степенью колонизации, но и с наличием у представителей данного рода большого числа факторов патогенности [56, 169, 177].

Для изучения генетических особенностей факторов патогенности стафилококков были отобраны их клинические изоляты, выделенные с поверхности кожи у больных атопическим дерматитом и здоровых людей. С помощью метода ПЦР в режиме реального времени определялось наличие или отсутствие энтеротоксинов (SEA, SEC, SEE, SEG, SEH, SEI), энтеротоксин-подобных веществ (SELK, SELL, SELM, SELN) и токсина-1 синдрома токсического шока (TSST-1). На исходном уровне у пациентов с атопическим дерматитом среднее значение факторов патогенности у одного штамма варьировало от трех до четырех в различных сочетаниях, а при повторном исследовании после лечения – чуть менее трех. В группе сравнения этот показатель находился в диапазоне от одного до двух.

Известно, что факторы патогенности стафилококков опосредуют регуляцию иммунного ответа за счет привлечения Т-клеток в очаг воспаления. Помимо этого, они могут приводить к сенсибилизации организма, которая сопровождается выработкой специфического иммуноглобулина Е с последующей дегрануляцией тучных клеток и базофилов, что в конечном итоге способствует появлению высыпаний и зуда у больных атопическим дерматитом [142, 177]. Следовательно, уменьшение количества факторов патогенности, наблюдаемое у пациентов с атопическим дерматитом после лечения, свидетельствует об эффективности терапии, проводимой согласно действующими клиническими рекомендациями.

Таким образом, в ходе проведенного исследования были изучены молекулярно-генетические особенности иммунитета при атопическом дерматит. Кроме того, была показана эффективность стандартной терапии в отношении микробиома пораженных и неизмененных участков кожи у пациентов со средней и тяжелой степенью тяжести заболевания, в результате которой отмечалось восстановление естественного микробиома кожи. Полученные данные могут быть использованы как для оценки эффективности проводимого лечения, так и прогноза течения заболевания у лиц с отягощенным анамнезом.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенного исследования установлено, что при atopическом дерматите средней степени тяжести происходит увеличение экспрессии гена *IL-13* в 100 раз на фоне снижения экспрессии гена *IL-33* в периферической крови в 1,5 раза, в то время как при тяжелом течении отмечено повышение экспрессии *IL-13* и *TNF-α* в 81 и 4 раза соответственно.

2. При анализе распределения частот аллелей, генотипов и гаплотипов полиморфных маркеров в гене *IL-37* выявлено, что наличие аллеля G полиморфного маркера rs3811046 снижает риск развития atopического дерматита в 2 раза, тогда как генотипа TT – увеличивает в 2 раза. Гаплотипы TTGG и GTAA полиморфных вариантов rs3811046 и rs3811047 ассоциированы с риском развития atopического дерматита, увеличивая этот риск в 2 и 10 раз соответственно.

3. При исследовании ассоциаций полиморфных маркеров в генах *TLRs* с риском развития atopического дерматита определены протективные маркеры: генотип GA полиморфного маркера rs5743708 в гене *TLR2* и гомозигота GG полиморфного маркера rs352140 в гене *TLR9* ассоциированы со снижением риска развития заболевания в 10 и 4 раза соответственно. И, напротив, у носителей гаплотипа GCCC SNP rs11536889 и rs4986791 в гене *TLR4* риск развития заболевания выше в 3,5 раза.

4. При изучении видового состава бактерий на пораженных и непораженных участках кожи у пациентов с atopическим дерматитом выявлено снижение микробного разнообразия, сопровождающееся повышенной колонизацией *S. aureus*. При этом среднее количество факторов патогенности у одного штамма стафилококка варьировало от 3 до 4 в различных сочетаниях, тогда как в контрольной группе это значение составило от 1 до 2.

5. На фоне проводимой терапии у пациентов с atopическим дерматитом отмечалось снижение частоты встречаемости *S. aureus* на поверхности кожи: численность *S. aureus* в очагах поражения после лечения снизилась в 2,5 раза, в то время как на неизмененных участках – в 2 раза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовано проводить оценку экспрессионного профиля генов цитокинов *IL-13* и *TNF- α* у пациентов с атопическим дерматитом на системном уровне в качестве дополнительного критерия оценки активности заболевания у взрослых с атопическим дерматитом.

2. Для оценки индивидуального риска развития атопического дерматита, в частности у здоровых людей с отягощенным семейным анамнезом по атопическому дерматиту, рекомендовано проведение генотипирования однонуклеотидных полиморфных маркеров в генах *TLRs* и *IL-37*.

3. Целесообразно проведение контактного посева на бакпечатки у пациентов с атопическим дерматитом как на пораженных, так и непораженных участках кожи для оценки эффективности проводимой терапии и прогноза течения заболевания.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АР – аллергический ринит

АтД – атопический дерматит

БА – бронхиальная астма

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖСА – желточно-солевой агар

МКБ-10 – Международная классификация болезней 10-го пересмотра

ОТ – обратная транскрипция

отн. ед. – относительные единицы

ПУВА – сочетанное применение псораленовых фотосенсибилизаторов и облучение кожи длинноволновым ультрафиолетовым светом с длиной волны 320-400 нм

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – Полимеразная цепная реакция в реальном времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

УФБ-311 нм – узкополосная средневолновая ультрафиолетовая терапия с длиной волны 311 нм

тГКС – топические глюкокортикостероидные средства

AMPs (Antimicrobial peptides) – антимикробные пептиды

CD4+ – мономерный трансмембранный гликопротеин надсемейства Ig

CoNS (Coagulase-Negative Staphylococci) – коагулазо-негативные стафилококки

EASI (Eczema Area and Severity Index) – индекс распространенности и тяжести экземы

EDC (epidermal differentiation complex) – комплекс эпидермального дифференцирования

FLG (Filaggrin) – филаггрин

IL – интерлейкин

ILCs (Innate lymphoid cells) – врожденные лимфоидные клетки

INF- γ – интерферон гамма

ISAAC (The International Study of Asthma and Allergies in Childhood) –

Международное исследование астмы и аллергии у детей

Ig (immunoglobulin) – иммуноглобулин

IgE – иммуноглобулины класса E

PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

PRRs (Pattern recognition receptor) – рецепторы опознавания паттерна

PSM (Phenol-soluble modulins) – фенол-растворимые модулины

S. – Staphylococcus

SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis) – международная шкала оценки степени тяжести атопического дерматита

SEI toxins (SE-like toxins) – энтеротоксин-подобных вещества

SEs (Staphylococcal enterotoxins) – стафилококковые энтеротоксины

SMAD3 (Mothers against decapentaplegic homolog 3) – член семейства белков

SMAD

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм

STAT (Signal transducer and activator of transcription) – сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции

TLRs (Toll-like receptors) – Toll-подобные рецепторы

TNF- α (Tumor necrosis factor-alpha) – фактор некроза опухоли-альфа

TNFR1 (Tumor necrosis factor receptor 1) – рецептор фактора некроза опухоли-1

TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) – тимусный стромальный лимфопоэтин

TSST-1 (Toxic shock syndrome toxin-1) – токсин-1 синдрома токсического шока

Th (T-helper) – Т-хелперы

hBDs (Human β -defensins) – β -дефензины

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ассоциация полиморфизма генов TLR2, TLR4 и TLR9 с риском развития атопического дерматита / О.А. Свитич, О.Ю. Олисова, Е.А. Меремьянина [и др.] // Медицинская иммунология – 2023. – Т. 25. – №5 – С.1043-1048.
2. Атопический дерматит / А. А. Кубанов, Л. С. Намазова-Баранова, Р. М. Хаитов [и др.] // Российский Аллергологический Журнал. – 2021. – Т.18. – №.3. – С. 44-92.
3. Атопический дерматит у детей / Л. Ф. Ганиева, Р. М. Файзуллина, В. А. Ревякина[и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2021. – Т. 16. – No 1 (91). – С. 124–127.
4. Атопический дерматит: современный взгляд на межклеточные взаимодействия / Е. Л. Искра, А. С. Искра, В. О. Полякова [и др.] // Молекулярная медицина – 2021.–Т.19. – №.4. – С. 15-18.
5. Бакер, С. Современные подходы к терапии ограниченных форм атопического дерматита/ С. Бакер, Н. Г. Кочергин, С. Б. Ткаченко// Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2014. - №1. - С. 14-17.
6. Варламов, Е. Е. Значение цитокинов в патогенезе атопического дерматита / Е.Е. Варламов, А.Н. Пампура, В.С. Сухоруков // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2018. - Т. 13. – №. 1. - С. 28-33.
7. Волнухин, В. А. Фототерапия заболеваний кожи. Часть I: основные аспекты применения / В. А. Волнухин // Клиническая дерматология и венерология. - 2018. - №Т. 17. – №. 6. - С. 78-84.
8. Генетические особенности стафилококков кожи в норме и при атопическом дерматите / О.А. Свитич, О.Ю. Олисова, М.Б. Потапова [и др.] // Медицинский вестник МВД. – 2023. – Т. 124. – №3. – С. 77-79.
9. Грищенко, Е. А. Дендритные клетки кожи/ Е.А. Грищенко // Аллергология и иммунология в педиатрии – 2016. – Т.44. – №.1. – С. 20-33.
10. Дворянкова, Е. В. Инфекционные осложнения атопического дерматита / Е. В. Дворянкова, М. И. Дениева, Г. А. Шевченко // Медицинский совет – 2022.– Т.16. – №.3. – С. 18-24.

11. Дефект филагрина при атопическом дерматите: современные методы коррекции / Н. Н. Мурашкин, Л. А. Опрятин, Р. В. Епишев [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2022. – Т.21. – №.5. – С. 347-351.
12. Дрождина, М. Б. Атопический дерматит. Новые парадигмы диагностического и терапевтического поиска / М. Б. Дрождина, В. А. Бобро, Е. В. Сулова // Медицинский альманах – 2023.–Т.74. – №.1. – С. 101-110.
13. Дупилумаб в дерматологии: атопический дерматит и перспективные направления / Ю. В. Молочкова, О. В. Карзанов, В. А. Молочков [и др.] // Эффективная фармакотерапия. – 2022. – Т.18. – №.9. – С. 18–23.
14. Дупилумаб в практике врача: клинический случай пациента с тяжелой формой атопического дерматита / Е.В. Свечникова, З.Б. Маршани, Д.В. Ушакова [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. – 2019. – Т. 18. – №. 6. – С. 768-775.
15. Захарова, И. Н. Микробиом кожи: что нам известно сегодня? / И. Н. Захарова, А. Н. Касьянова // Медицинский совет – 2019.– №.17. – С. 160-168.
16. Исследование роли β -дефенсина-2 в грудном молоке при атопическом дерматите у детей/ Ю. А. Бунина, А. В. Кудрявцева, Е. П. Быстрицкая, Г. Н. [и др.] // Врач. - 2020. - Т. 31. - №. 5. - С. 85-87.
17. Козлов, И. Г. Микробиота, мукозальный иммунитет и антибиотики: тонкости взаимодействия/ И. Г. Козлов //Русский медицинский журнал. – 2018. – Т. 26. – №. 8-1. – С. 19-27.
18. Круглова, Л. С. Атопический дерматит: новые горизонты терапии / Л. С. Круглова, Е. М. Генслер // Медицинский алфавит. – 2019. – Т. 1. – №. 7. – С. 29-32.
19. Круглова, Л. С. Практические вопросы применения эмоленов, содержащих модуляторы филагрина, в ведении пациентов с атопическим дерматитом и ксерозом / Л. С. Круглова, А. Н. Львов, Е. Р. Аравийская // Кремлёвская медицина. Клинический вестник. – 2022. – №. 1. – С. 87.
20. Ксензова, Л. Д. Атопический марш. Риск развития аллергического ринита и бронхиальной астмы у детей с атопическим дерматитом / Л. Д. Ксензова // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2018.–Т.55. – №.4. – С. 25-30.

21. Кубанов, А.А. Итоги деятельности медицинских организаций, оказывающих медицинскую помощь по профилю дерматовенерология, в 2020 году: работа в условиях пандемии / А.А. Кубанов, Е.В. Богданова // Вестник дерматологии и венерологии. – 2021. – Т. 97. – № 4. – С. 8–32.

22. Кубанов, А.А. Организация и результаты оказания медицинской помощи по профилю «дерматовенерология» в Российской Федерации. Итоги 2018 года / А.А. Кубанов, Е.В. Богданова // Вестник дерматологии и венерологии. – 2019.– Т. 95. – №4. – С. 8-23.

23. Кудрявцева, А. В. Динамика колонизации кожи *Staphylococcus spp.* при атопическом дерматите у детей и подростков/ К. А. Гележе, А. В. Кудрявцева, О. А. Свитич // Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. – 2019. – Т. 98. – №3. – С. 88-93.

24. Львов, А. Н. Школа атопика-новая форма работы с больными атопическим дерматитом / А. Н. Львов, Т. Б. Косцова, А. А. Цыкин // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2005. – №. 5. – С. 66-68.

25. Микробиологическая оценка эффективности стандартной терапии при атопическом дерматите / О.Ю. Олисова, О.А. Свитич, А.В. Поддубиков [и др.] // Вестник дерматологии и венерологии. -- 2023. – Т. 99. – №3. – С. 44-52.

26. Микробиота кожи и атопический дерматит у детей: новые возможности лечения / Г. И. Смирнова, Д. Б. Мунблит, А. И. Колотилина [и др.] // Российский педиатрический журнал. – 2018. – Т. 21. – №. 2. – С. 106-113.

27. Морозова, О. В. Цитокины при аллергических заболеваниях / О. В. Морозова, Т. П. Оспельникова // Молекулярная медицина. – 2022. – Т.20. – №.2. – С. 3-10.

28. Ненашева, Н. М. Современная терапия атопического дерматита: роль эмоленгов и антигистаминных препаратов / Н. М. Ненашева // Эффективная фармакотерапия. – 2016. – №. 6. – С. 6-17.

29. Николаева, М. Ю. Нарушения микробиома кожи при атопическом дерматите/ М. Ю. Николаева, К. Н. Монахов, Е. В. Соколовский // Вестник дерматологии и венерологии. – 2021. – Т. 97. – №. 6. – С. 33-43.

30. Новые возможности системной терапии пациентов с тяжелым атопическим дерматитом / Н.М. Ненашева, Е.А. Орлова, Ю.А. Кандрашкина [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2022. – №.1. – С. 20–30.

31. Олисова, О. Ю. Новые возможности в лечении атопического дерматита / О. Ю. Олисова // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015. – Т. 18. – №. 6. – С. 38-41.

32. Олисова, О.Ю. Микробиом кожи и атопический дерматит: обзор литературы / О.Ю. Олисова, О.А. Свитич, М.Б. Потапова // Российский журнал кожных и венерических болезней – 2021 – Т. 24. – №5 – С. 443-450

33. Олисова, О.Ю. Экспрессия гена ИЛ-33 у пациентов с атопическим дерматитом средней и тяжелой степени тяжести / О.Ю. Олисова, М.Б. Потапова, А.Б. Винницкая // Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье – 2022. – Т. 56. – №2. – С. 205-206.

34. Определение кокковой и дрожжевой микрофлоры у больных с кожной патологией: Пособие для врачей / В. Г. Арзуманян, Е. В. Зайцева, Р. М. Темпер [и др.] – Москва, 2002. – С. 7 – Текст : непосредственный.

35. Особенности профиля метилирования ДНК кожи пациентов с атопическим дерматитом / Н. Г. Кочергин, Л. Н. Каюмова, Т. М. Заварыкина [и др.] // Вопросы практической педиатрии. – 2019. – Т. 14. – №. 5. – С. 66-70.

36. Оценка степени тяжести атопического дерматита — стандартизованные индексы тяжести SCORAD и EASI / А.Э. Карамова, В.В.Чикин, Л.Ф. Знаменская [и др.] // Вестник дерматологии и венерологии – 2022.–Т.98. – №.3. – С. 53-60.

37. Перспективные направления в терапии атопического дерматита / А. А. Кубанова, А. А. Кубанов, А. Э. Карамова [и др.] // Вестник дерматологии и венерологии. – 2017. – №.5. – С. 34-46.

38. Профили экспрессии факторов врожденного иммунитета у пациентов с атопическим дерматитом / Е.П. Быстрицкая, Н.Н. Мурашкин, А.И. Материкин [и др.] // Медицинская иммунология – 2023. – Т. 25. – №5 – С. 1037-1042

39. Роль интерлейкина-37 в патогенезе аллергических заболеваний / И.П. Шиловский, М.Е. Дынева, О.М. Курбачева [и др.] // Acta Naturae. - 2019. - Т. 11. - №4. - С. 54-64.

40. Роль нарушений эпидермального барьера при атопическом дерматите: современные концепции патогенеза заболевания / Н. Н. Мурашкин, Э.Т. Амбарчян, А. И. Материкин [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2018. – Т.17. – №.1. – С. 85-88.

41. Роль эмолентов в предотвращении развития аллергических заболеваний на фоне атопического дерматита у детей / Н. Н. Мурашкин, Р. А. Иванов, Д. В. Фёдоров [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2020. – Т.17. – №.4. – С. 334-339.

42. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека / Л. В. Ковальчук, О. А. Свитич, Л. В. Ганковская [и др.] // Человек и его здоровье – 2012. – №.2. – С. 147-153.

43. Свечникова, Е.В. Современный взгляд на патогенез и лечение атопического дерматита у взрослых. Опыт применения ингибитора JAK барицитиниба у пациентов с атопическим дерматитом среднетяжелого и тяжелого течения / Е.В. Свечникова, С.Е. Жуфина, Е.Ю. Евдокимов // Медицинский Совет. – 2022. – №. 6. – С. 193-201.

44. Селективное ингибирование JAK1 в лечении атопического дерматита: особенности назначения и опыт применения упадацитиниба/ Л.С. Круглова, А.В. Миченко, А.Н. Львов [и др.] // Медицинский алфавит. – 2022. – №. 8. – С. 35-40.

45. Скворцов, В. В. Атопический дерматит в практике работы терапевта / В. В. Скворцов, А. В. Тумаренко // Справочник врача общей практики. – 2019. – №. 7. – С. 18-27.

46. Смирнова, Г. И. Новое в патогенезе и лечении атопического дерматита у детей / Г. И. Смирнова // Российский педиатрический журнал. – 2013. – №. 6. – С. 56-63

47. Смолкин, Ю. С. Вопросы применения биологической терапии при атопическом дерматите: акцент на дупилумаб / Ю. С. Смолкин, С. С. Масальский, О. Ю. Смолкина //Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2020. – Т. 61. – №. 2 – С. 27-40.

48. Снарская, Е. С. Роль Толл-подобных рецепторов (TLR), активаторов врожденного иммунитета в патогенезе ряда дерматозов / Е. С. Снарская // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2012. – №. 2 – С. 47-50.

49. Современная концепция патогенеза atopических заболеваний / С.Ю. Петрова, С.В. Хлгатын, В.М. Бержец [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2019. – №. 1. – С. 72-79.

50. Современные представления об эпигенетических механизмах формирования atopического дерматита / Л. Н. Каюмова, Б. Сами, С. А. Брускин [и др.] // Российский журнал кожных и венерических болезней – 2014.–Т.17. – №.4. – С. 42-50.

51. Татаурщикова, Н.С. Аллерген-специфическая иммунотерапия: поиск эффективных решений / Н.С. Татаурщикова, А.В. Максимова // Эффективная фармакотерапия. – 2023. – Т. 19. – №. 26. – С. 34–42.

52. Участие Т-регуляторных клеток в иммунном ответе при atopическом дерматите / Д. С. Гонсорунова, Л. М. Огородова, О. С. Фёдорова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2011.–Т.10. – №.4. – С. 82-88.

53. Факторы риска развития прогрессирующего течения atopического дерматита у детей и подростков / В.А. Соболева, А.В. Кудрявцева, О.А. Свитич, Н.А. Геппе // Доктор.Ру. – 2022. – Т. 21. – № 7. – С. 41–44.

54. Филаггрин и atopический дерматит: клинико-патогенетические параллели и возможности терапевтической коррекции / Н. Н. Мурашкин, Р. А. Иванов, Э.Т. Амбарчян [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2021. – Т.20. – №.5. – С. 435-440.

55. Филатов, О. Ю. Образраспознающие рецепторы врожденного иммунитета и их роль в иммунотерапии (обзор) / О. Ю. Филатов, В. А. Назаров // Патогенез. – 2020. – Т. 18. – №. 4 – С. 4–15.

56. Флуер, Ф. С. Продукция энтеротоксинов А, В, С и токсина синдрома токсического шока различными видами стафилококков, выделенных с кожи детей больных atopическим дерматитом / Ф. С. Флуер, А.В. Кудрявцева, К.А. Нескородова // Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского – 2017. – Т. 96. – №6. – С. 87–92.

57. Ханбабян, А.Б. Некоторые аспекты патогенеза и терапии atopического дерматита / А. Б. Ханбабян, Л. Н. Каюмова, Н. Г. Кочергин // Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2014. - Т. 17. - №2. - С. 17-20.
58. Шапошников, А. В. Строение сигнального пути JAK/STAT и его взаимосвязь с аппаратом транскрипции / А. В. Шапошников, И. Ф. Комарьков, Л. А. Лебедева // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47. – №. 3. – С. 388-388.
59. A diversity profile from the staphylococcal community on atopic dermatitis skin: a molecular approach / J. Soares, C. Lopes, F. Tavarina, [et al.] // Journal of applied microbiology. – 2013. – Vol. 115. – №6. – P. 1411–1419.
60. A novel function of NLRP3 independent of inflammasome as a key transcription factor of IL-33 in epithelial cells of atopic dermatitis / J. Zheng, L. Yao, Y. Zhou, [et al.] // Cell death & disease. – 2021. – Vol. 12. – №10.
61. A systematic review and meta-analysis of the prevalence and phenotype of adult-onset atopic dermatitis / H. H. Lee, K. R. Patel, V. Singam, [et al.] // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2019. – Vol.80. – №6. – P. 1526-1532
62. Aguilera A. C. Role of the Microbiome in Allergic Disease Development / A. C. Aguilera, I. A. Dagher, K. M. Kloepfer // Current allergy and asthma reports. – 2020. – Vol. 20. – №9. – P. 44.
63. Ali, F. Counting the Burden: Atopic Dermatitis and Health-related Quality of Life / F. Ali, J. Vyas, A. Y. Finlay // Acta dermato-venereologica. – 2020. – Vol. 12. – P. 100.
64. Allergy – A New Role for T Cell Superantigens of Staphylococcus aureus? / G. Abdurrahman, F. Schmiedeke, C. Bachert, [et al.] // Toxins. – 2020. – Vol. 12. – №3. – P. 176.
65. Alpha-toxin is produced by skin colonizing Staphylococcus aureus and induces a T helper type 1 response in atopic dermatitis / K. Breuer, M. Wittmann, K. Kempe, [et al.] // Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. – 2005. – Vol. 35. – №8. – P. 1088–1095.
66. Alpha-toxin promotes Staphylococcus aureus mucosal biofilm formation/ M. J. Anderson., Y. C. Lin, A. N. Gillman, [et al.] // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2012. – №2. – P. 64.

67. Analysis of the Association of Polymorphisms rs5743708 in TLR2 and rs4986790 in TLR4 with Atopic Dermatitis Risk / Y. Zhang, H.C. Wang, C. Feng, [et al.] // Immunological investigations. – 2019. – Vol. 148. – №2. – P.169-180.

68. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis / T. Nakatsuji, T. H. Chen, S. Narala, [et al.] // Science translational medicine. – 2017. – Vol.9. – №378.

69. Association analysis between the TLR9 gene polymorphism rs352140 and type 1 diabetes / Y. Wang, Y. Xia, Y. Chen, [et al.] // Frontiers in endocrinology. – 2023. – Vol. 14.

70. Association of atopic dermatitis with active and passive smoking: A systematic review and meta-analysis / R. Kantor, A. Kim, J. Thyssen, [et al.] // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2016. – Vol.75. – P. 1119–1126.

71. Association of atopic dermatitis with depression, anxiety, and suicidal ideation in children and adults: A systematic review and meta-analysis / A.T.M. Rønstad, A.S. Halling-Overgaard, C.R. Hamann, [et al.] // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2018. – Vol. 79. – №3. – P. 448-456.

72. Association of atopic dermatitis with smoking: A systematic review and meta-analysis / R. Kantor, A. Kim, J. P. Thyssen, [et al.] // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2016. – Vol.75. – №6. – P. 1119-1125

73. Association of polymorphisms in TLR2 and TLR4 with asthma risk: An update meta-analysis / J. Zhao, H. Shang, X. Cao, [et al.] // Medicine. – 2017. – Vol. 96. – №35.

74. Association of TLR2 and TLR9 gene polymorphisms with atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis / Zhou B, Liang S, Shang S, [et al.] // Immunological medicine. – 2023. – Vol. 46. – №1. – P. 32-44.

75. Association of TLR9 polymorphisms with sporadic Parkinson's disease in Chinese Han population / K. Zhu, J. Teng, J. Zhao, [et al.] // The International journal of neuroscience. – 2016. – Vol. 126. – №7. – P. 612-616.

76. Atopic Dermatitis / A.R. Waldman, J. Ahluwalia, J. Udkoff, [et al.] // Pediatrics in review. – 2018. – Vol. 39. – №4. – P. 180-193.

77. Atopic dermatitis / S. Weidinger, L.A. Beck, T. Bieber, [et al.] // Nature reviews. Disease primers. – 2018. – Vol. 4. – №1.

78. Atopic dermatitis and alcohol use - a meta-analysis and systematic review / A. S. Halling-Overgaard, C. R. Hamann, R. P. Holm, [et al.] // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. – 2018. – Vol.32. – №8. – P. 1238-1245.

79. Atopic Dermatitis in Children and Adults—Diagnosis and Treatment / A. Wollenberg, T. Werfel, J. Ring, [et al.] // Deutsches Arzteblatt internationall. – 2023. – Vol. 120. – №13. – P. 224-234.

80. Atopic dermatitis: Role of the skin barrier, environment, microbiome, and therapeutic agents / T. Luger, M. Amagai, B. Dreno, [et al.] // Journal of dermatological science. – 2021. – Vol.102. – №3. – P. 142-157.

81. Bantz, S. K. The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma / S. K. Bantz, Z. Zhu, T. Zheng // Journal of clinical & cellular immunology. – 2014. – Vol. 5. – №2. – P. 202.

82. Basophil activation test for Staphylococcus aureus enterotoxins in severe asthmatic patients / M. Flora, F. Perna, S. Abbadessa, [et al.] // Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. – 2021. – Vol. 51. – №4. – P. 536-545.

83. Baurecht, H. Relationship between atopic dermatitis, depression and anxiety: a two-sample Mendelian randomization study / H. Baurecht, C. Welker, S. E. Baumeister // The British journal of dermatology. – 2021. – Vol.185. – №4. – P. 781-786.

84. Berube, B. J. Staphylococcus aureus α -toxin: nearly a century of intrigue / B. J. Berube, J. Wardenburg // Toxins. – 2013. – Vol.5. – №6. – P. 1140–1166.

85. Bieber, T. Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis / T. Bieber // Allergy. – 2020. – Vol.75. – №1. – P. 54–62.

86. Biologics for Treatment of Atopic Dermatitis: Current Status and Future Prospect / T. Ratchataswan, T.M. Banzon, J. Thyssen, [et al.] // The journal of allergy and clinical immunology. In practice. – 2021. – Vol.9. – №3. – P. 1053-1065.

87. Boguniewicz, M. Biologics for Atopic Dermatitis / M. Boguniewicz // Immunology and allergy clinics of North America. – 2020. – Vol.40. – №4. – P. 593-607.

88. Cabanillas, B. Atopic dermatitis phenotypes and the need for personalized medicine / B. Cabanillas, A. C. Brehler, N. Novak // Current opinion in allergy and clinical immunology. – 2017. – Vol. 17. – №4. – P. 309–315.

89. Changing our microbiome: probiotics in dermatology / Y. Yu, S. Dunaway, J. Champer, [et al.] // The British journal of dermatology. – 2020. – Vol. 182. – №1. – P. 39-46.

90. Cheung, G.Y. C. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus / G.Y.C. Cheung, J. S. Bae, M. Otto // Virulence. – 2021. – Vol. 12. – №1. – P. 547-569.

91. Chovatiya, R. The Heterogeneity of Atopic Dermatitis // R. Chovatiya, J. I. Silverberg // Journal of drugs in dermatology. – 2022. – Vol. 21. – №2. – P. 172-176.

92. Classifying atopic dermatitis: a systematic review of phenotypes and associated characteristics / A. L. Bosma, A. Ascott, R. Iskandar, [et al.] // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. – 2022. – Vol. 36. – №6. – P. 807-819.

93. Clebak, K. T. Atopic Dermatitis / K. T. Clebak, L. Helm, P. Uppal // Primary care. – 2023. – Vol. 50. – №2. – P. 191–203.

94. Colonization and infection of the skin by S. aureus: immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides / S. Ryu, P.I. Song, C. H. Seo, [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2014. – Vol. 15. – №5. – P. 8753-8772.

95. Colonization With Staphylococcus aureus in Atopic Dermatitis Patients: Attempts to Reveal the Unknown / P. Ogonowska, Y. Gilaberte, W., Barańska-Rybak [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2021. – Vol. 11.

96. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in Staphylococcus aureus isolates / K. Omoe, D. L. Hu, H. Takahashi-Omoe, [et al.] // FEMS microbiology letters. – 2005. – Vol. 246. – №2. – P. 191–198.

97. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes / I. Nomura, E. Goleva, M. D. Howell, [et al.] // *Journal of immunology*. – 2003. – Vol. 171. – №6. – P. 3262-3269.

98. de Lusignan, S. Epidemiology and management of atopic dermatitis in England: an observational cohort study protocol / S. de Lusignan, H. Alexander, C. Broderick // *BMJ open*. – 2020. – Vol. 10. – №9.

99. Developments and Advances in Atopic Dermatitis: A Focus on Epidemiology, Pathophysiology, and Treatment in the Pediatric Setting / L. F. Eichenfield, S. Stripling, S. Fung, [et al.] // *Paediatric drugs*. – 2022. – Vol. 24. – №4. – P. 293-305.

100. Dhabhar, F. S. Psychological stress and immunoprotection versus immunopathology in the skin / F. S. Dhabhar // *Clinics in dermatology*. – 2013. – Vol. 31. – №1. – P. 18-30.

101. Diagnosis and Management of Atopic Dermatitis for Primary Care Providers / P. Fleming, Y. B. Yang, C. Lynde, [et al.] // *Journal of the American Board of Family Medicine*. – 2020. – Vol. 33. – №4. – P. 626–635.

102. Dubin, C. The IL-4, IL-13 and IL-31 pathways in atopic dermatitis / C. Dubin, E. Del Duca, E. Guttman-Yassky // *Expert review of clinical immunology*. – 2021. – Vol. 17. – №8. – P. 835-852.

103. Edslev, S. M. Skin Microbiome in Atopic Dermatitis / S. M. Edslev, T. Agner, P. S. Andersen // *Acta dermato-venereologica*. – 2020. – Vol. 100. – №12.

104. Effect of tacrolimus on skin microbiome in atopic dermatitis / J. Wongpiyabovorn, W. Soonthornchai, A. Wilantho, [et al.] // *Allergy*. – 2019. – Vol. 74. – №7. – P. 1400-1406.

105. Effects of nonpathogenic gram-negative bacterium *Vitreoscilla filiformis* lysate on atopic dermatitis: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study / A. Gueniche, B. Knaudt, E. Schuck, [et al.] // *The British journal of dermatology*. – 2008. – Vol.159. – №6. – P. 1357–1363.

106. Effects of tacrolimus ointment on Toll-like receptors in atopic dermatitis / E. Antiga, W. Volpi, D. Torchia, [et al.] // *Clinical and experimental dermatology*. – 2011. – Vol. 36. – №3. – P. 235-241.

107. Epidermal Lipids: Key Mediators of Atopic Dermatitis Pathogenesis / N. Bhattacharya, W. J. Sato, A. Kelly, [et al.] // Trends in molecular medicine. – 2019. – Vol. 25. – №6. – P. 551-562.
108. Flohr, C. New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis / C. Flohr, J. Mann // Allergy. – 2014. – Vol.69. – №1. – P. 3–16.
109. Gavrilova, T. Immune Dysregulation in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis / T. Gavrilova // Dermatitis : contact, atopic, occupational, drug. – 2018. – Vol.29. – №2. – P. 57–62.
110. Genetic and Epigenetic Aspects of Atopic Dermatitis / B. Nedoszytko, E. Reszka, D. Gutowska-Owsiak, [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol.21. – №28.
111. Genetic Diversity of Composite Enterotoxigenic Staphylococcus epidermidis Pathogenicity Islands / S. Banaszkiwicz, J. K. Calland, E. Mourkas, // Genome biology and evolution. – 2020. – Vol. 11. – №12. – P. 3498–3509.
112. Geoghegan, J. A. Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship / J. A. Geoghegan, A. D., Irvine, T. J. Foster // Trends in microbiology. – 2018. – Vol.26. – №6. – P. 484–497.
113. Georas, S. N. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease / S. N. Georas, J. Guo, U. De Fanis // The European respiratory journal. – 2005. – Vol.26. – №6. – P. 1119–1137.
114. Grice, E. A. The skin microbiome / E. A., Grice, J. A. Segre // Nature reviews. Microbiology. – 2011. – Vol.9. – №4. – P. 244–253.
115. Guttman-Yassky, E. Atopic dermatitis: pathogenesis. Seminars in cutaneous medicine and surgery / E. Guttman-Yassky, A. Waldman, J. Ahluwalia // Seminars in cutaneous medicine and surgery. – 2017. – Vol.36. – №3. – P. 100–103.
116. Guttman-Yassky, E. Use of Tape Strips to Detect Immune and Barrier Abnormalities in the Skin of Children With Early-Onset Atopic Dermatitis / E. Guttman-Yassky, A. Diaz, A. B. Pavel // JAMA dermatology. – 2019. – Vol.155. – №12. – P. 1358-1370.
117. Hanifin, J.M. Diagnostic features of atopic dermatitis / J.M. Hanifin, G. Rajka // Acta Dermato-Venereologica. – 1980. – Vol.92. – P. 44–47.

118. Hendricks, A. J. Skin bacterial transplant in atopic dermatitis: Knowns, unknowns and emerging trends / A. J. Hendricks, B.W. Mills, V. Y. Shi // *Journal of dermatological science*. – 2019. – Vol.95. – №2. – P. 56-61.

119. Holtfreter, S. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? / S. Holtfreter, B. M. Bröker // *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. – 2005. – Vol.53. – №1. – P. 13–27.

120. Huang, I. H. JAK-STAT signaling pathway in the pathogenesis of atopic dermatitis: An updated review / I. H. Huang, W. H. Chung, P. C. Wu // *Frontiers in immunology*. – 2022. – Vol.13.

121. Huang, Z. Insight into interleukin-37: The potential therapeutic target in allergic diseases / Z. Huang, L. Xie, H. Li // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2019. – Vol.49. – P. 32-41.

122. Human β -defensin-3 increases the expression of interleukin-37 through CCR6 in human keratinocytes / R. Smithrithee, F. Niyonsaba, C. Kiatsurayanon, [et al.] // *Journal of dermatological science*. – 2015. – Vol. 77. – №1. – P. 46-53.

123. Identification and characterization of two novel superantigens among *Staphylococcus aureus* complex / D. Zhang, F., X.Y. Yang, J. Zhang, [et al.] // *International journal of medical microbiology*. – 2018. – Vol. 308. – №4. – P. 438–446.

124. Igawa, K. Future trends in the treatment of atopic dermatitis / K. Igawa // *Immunological medicine*. – 2019. – Vol.42. – №1. – P. 10–15.

125. IL-31 expression by inflammatory cells is preferentially elevated in atopic dermatitis / S. Nobbe, P. Dziunycz, B. Mühleisen, [et al.] // *Acta dermato-venereologica*. – 2012. – Vol. 91. – №1. – P. 24–28.

126. IL-33 and IL-37: A Possible Axis in Skin and Allergic Diseases / F. Borgia, P. Custurone, F. Li Pomi, [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol. 24. – №1. – P. 372.

127. IL-33/IL-31 Axis in Immune-Mediated and Allergic Diseases / G. Murdaca, M. Greco, A. Tonacci, [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol.20. – №23.

128. IL-37 Ameliorating Allergic Inflammation in Atopic Dermatitis Through Regulating Microbiota and AMPK-mTOR Signaling Pathway-Modulated Autophagy

Mechanism / T. Hou, X. Sun, J. Zhu, [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol.11. – P. 752.

129. Imai, Y. Interleukin-33 in atopic dermatitis / Y. Imai // *Journal of dermatological science*. – 2019. – Vol.96. – №1. – P. 2–7.

130. Immunological Changes of Basophil Hyperreactivity to Sweat in Patients With Well-Controlled Atopic Dermatitis / T. Numata, S. Takahagi, K. Ishii, [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2022. – Vol. 13.

131. Impact of atopic dermatitis on health-related quality of life and productivity in adults in the United States: An analysis using the National Health and Wellness Survey / L. Eckert, S. Gupta, C. Amand, [et al.] // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2017. – Vol. 77. – №2. – P. 274-279.

132. Increased serum levels of interleukin 33 in patients with atopic dermatitis / R. Tamagawa-Mineoka, Y. Okuzawa, K. Masuda, N. Katoh, [et al.] // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2014. – Vol. 70. – №5. – P. 882-888.

133. Innate immunity mediated by the cytokine IL-1 homologue 4 (IL-1H4/IL-1F7) induces IL-12-dependent adaptive and profound antitumor immunity / W. Gao, S. Kumar, M. T. Lotze, [et al.] // *Journal of immunology*. – 2003. – №170. – P. 107–113.

134. Interactions Between Atopic Dermatitis and Staphylococcus aureus Infection: Clinical Implications / J. Kim, B. E. Kim, K. Ahn, [et al.] // *Allergy, asthma & immunology research*. – 2019. – Vol.11. – №5. – P. 93-603.

135. Interleukin-31: The "itchy" cytokine in inflammation and therapy / A. Datsi, M. Steinhoff, F. Ahmad, [et al.] // *Allergy*. – 2021. – Vol. 76. – №10. – P. 2982–2997.

136. Interleukin-37: A Link Between COVID-19, Diabetes, and the Black Fungus / S. Tokajian, G. Merhi, C. Khoury, [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2022. – Vol. 12.

137. Junttila, I. S. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes / I. S. Junttila // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol.9. – P. 888.

138. Kanda, N. The Roles of Sex Hormones in the Course of Atopic Dermatitis / N. Kanda, T. Hoashi, H. Saeki // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol.20. – №19. – P. 4660.

139. Kido-Nakahara, M. Itch in Atopic Dermatitis / M. Kido-Nakahara, M. Furue, D. Ulzii // *Immunology and allergy clinics of North America*. – 2017. – Vol.37. – №1. – P. 113–122.
140. Kim, J. E. Microbiome of the Skin and Gut in Atopic Dermatitis (AD): Understanding the Pathophysiology and Finding Novel Management Strategies / J. E. Kim, H. S. Kim // *Journal of clinical medicine*. – 2019. – Vol.8. – №4. – P. 444.
141. Kim, J. Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications / J. Kim, B. E. Kim, D. Leung // *Allergy and asthma proceedings*. – 2019. – Vol.40. – №2. – P. 84–92.
142. Kim. K. Interleukin-4 and Interleukin-13 Induced Atopic Dermatitis Human Skin Equivalent Model by a Skin-On-A-Chip / K. Kim, H. Kim, G. Y. Sung // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol.23. – №4. – P.2116.
143. Kimyai-Asadi, A. The role of psychological stress in skin disease / A. Kimyai-Asadi, A. Usman // *Journal of cutaneous medicine and surgery*. – 2001. – Vol.5. – №2. – P. 140-145.
144. Koh, L.F. Skin microbiome of atopic dermatitis / L. F. Koh, R.Y. Ong, J. E.Common // *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. – 2022. – Vol.71. – №1. – P.31-39.
145. Kurosaki, Y. Effects of 308 nm excimer light treatment on the skin microbiome of atopic dermatitis patients / Y. Kurosaki, M. Tsurumachi, Y. Kamata // *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. – 2020. – Vol.36. – №3. – P. 185-191.
146. Langan, S. M. Atopic dermatitis /S. M. Langan, A. D. Irvine, S. Weidinger // *Lancet*. – 2020. – Vol.396. – №3. – P. 345–360.
147. Lee G. R. Topical probiotics: the unknowns behind their rising popularity / G. R. Lee, M. Maarouf, A. J. Hendricks // *Dermatology online journal*. – 2019. – Vol.25. – №5.
148. Lee, H. J. Skin Barrier Function and the Microbiome / H.J. Lee, M. Kim // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol.23. – №21.

149. Lesiak, A. The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors 2 and 4 in atopic dermatitis / A. Lesiak, P. Smolewski, D. Sobolewska-Sztychny // *Scandinavian journal of immunology*. – 2012. – Vol.76. – №4. – P. 405–410.

150. Lunjani, N. Microbiome and skin biology / N. Lunjani, C. Hlela, L. O'Mahony // *Current opinion in allergy and clinical immunology*. – 2019. – Vol.19. – №4. – P. 328-333.

151. Major Comorbidities of Atopic Dermatitis: Beyond Allergic Disorders / A. Paller, J. C. Jaworski, E. L. Simpson, [et al.] // *American journal of clinical dermatology*. – 2018. – Vol. 19. – №6. – P. 821-838.

152. Mental health comorbidity in patients with atopic dermatitis / P. Yaghmaie, C.W. Koudelka, E.L. Simpson, [et al.] // *The Journal of allergy and clinical immunology*. – 2013. – Vol. 131. – №2. – P. 428-433.

153. Microbiome in healthy skin, update for dermatologists / B. Dreno, E. Araviiskaia, E. Berardesca, [et al.] // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2016. – Vol. 30. – №12. – P. 2038-2047.

154. Microbiota in Atopic Dermatitis / D. Hrestak, M. Matijašić, H. Čipčić Paljetak, [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol.23. – №7. – P. 3503.

155. Nutten, S. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors / S. Nutten // *Annals of nutrition & metabolism*. – 2015. – Vol. 66. – №1. – P. 8–16.

156. Ong, P. Y. Is/are pattern recognition receptor(s) for *Staphylococcus aureus* defective in atopic dermatitis? / P. Y. Ong // *Dermatology (Basel, Switzerland)*. – 2006. – Vol.212. – №1. – P. 19–22.

157. Park, H. Association of Perceived Stress with Atopic Dermatitis in Adults: A Population-Based Study in Korea / H. Park, K. Kim // *International journal of environmental research and public health*. – 2016. – Vol. 13. – №8.

158. Picardi, A. Stressful life events and skin diseases: disentangling evidence from myth / A. Picardi, D. Abeni // *Psychotherapy and psychosomatics*. – 2001. – Vol. 70. – №3. – P. 118-136.

159. Placebo response in phase 2 and 3 trials of systemic and biological therapies for atopic dermatitis-a systematic review and meta-analysis / T. H. Andreassen, M. O.

Christensen, A. S. Halling, , [et al.] // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. – 2020. – Vol. 34. – №6. – P. 1143–1150.

160. Polymorphism of IL37 gene as a protective factor for autoimmune thyroid disease / N. Yan, S. Meng, R.H. Song, [et al.] // Journal of molecular endocrinology. – 2015. – Vol. 55. – №3. – P. 209-218.

161. Pothmann, A. The Microbiome and Atopic Dermatitis: A Review / A. Pothmann, T. Illing, C. Wiegand // American journal of clinical dermatology. – 2019. – Vol. 20. – №6. – P. 749–761.

162. Prevalence of atopic dermatitis in children younger than 4 years in a demarcated area in central Netherlands: the West Veluwe Study Group / P. C. Dirven-Meijer, E. J. Glazenburg, P. G. Mulder // The British journal of dermatology. – 2008. – Vol. 158. – №4. – P. 846-847.

163. Puar, N. New treatments in atopic dermatitis / N. Puar, R. Chovatiya, A.S. Paller // Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology. – 2021. – Vol. 126. – №1. – P. 21-31.

164. Ramírez-Marín, HA. Differences between pediatric and adult atopic dermatitis / H.A. Ramírez-Marín, J.I. Silverberg // Pediatric dermatology. – 2022. – Vol. 39. – №3. – P. 345-353.

165. Rare occurrence of common filaggrin mutations in Turkish children with food allergy and atopic dermatitis / N. Vardar Acar., Ö. Cavkaytar, E. Arik Yilmaz, [et al.] // Turkish journal of medical sciences. – 2020. – Vol. 50. – №8. – P. 1865-1871.

166. Sacotte, R. Epidemiology of adult atopic dermatitis / R. Sacotte, J.I. Silverberg // Clinics in dermatology. – 2018. – Vol. 36. – №5. – P. 595–605.

167. Saini, S. New Insights and Treatments in Atopic Dermatitis / S. Saini, M. Pansare // Pediatric clinics of North America. – 2019. – Vol. 66. – №5. – P. 1021–1033.

168. Seiti, Y.Y. Exploring the Role of Staphylococcus Aureus Toxins in Atopic Dermatitis / Y.Y. Seiti, F., F. de Lima, J., N. Sato // Toxins. – 2019. – Vol. 11. – №6. – P. 321.

169. Shi, L.P. Correlation between single nucleotide polymorphism of rs3811047 in IL-1 F7 gene and rheumatoid arthritis susceptibility among Han population in central

plains of China / L.P. Shi, Y. He, Z.D. Liu // Asian Pacific journal of tropical medicine. – 2013. – Vol. 6. – №1. – P. 73-75.

170. Skewed inflammation is associated with aberrant interleukin-37 signaling pathway in atopic dermatitis / T. Hou, M. S. Tsang, I. M. Chu, [et al.] // Allergy. – 2021. – Vol.76. – №7. – P. 2102-2114.

171. Skin microbiome dysbiosis and the role of Staphylococcus aureus in atopic dermatitis in adults and children: A narrative review / A. L. Demessant-Flavigny, S. Connétable, D. Kero, [et al.] // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. – 2023. – Vol. 37. – №5. – P. 3-17.

172. Sroka-Tomaszewska, J. Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis / J. Sroka-Tomaszewska, M. Trzeciak // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22. – №8.

173. Staphylococcal Virulence Factors on the Skin of Atopic Dermatitis Patients / M. C. Moran, M.P. Cahill, M. G. Brewer, [et al.] // mSphere. – 2019. – Vol.4. – №6.

174. Staphylococcus aureus in atopic dermatitis: Strain-specific cell wall proteins and skin immunity / K. Iwamoto, M. Moriwaki, R. Miyake, [et al.] // Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology. – 2019. – Vol.68. – №3. – P. 309-315.

175. Staphylococcus aureus Isolated from Skin from Atopic-Dermatitis Patients Produces Staphylococcal Enterotoxin Y, Which Predominantly Induces T-Cell Receptor V α -Specific Expansion of T Cells / F. Aziz, J. Hisatsune, L. Yu, , [et al.] // Infection and immunity. – 2020. – Vol. 88. – №2.

176. Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus: Molecular Detection of Cytotoxin and Enterotoxin Genes / L. Pinheiro, C.I. Brito, A. de Oliveira, [et al.] // Toxins (Basel). – 2015. – Vol. 7. – №9. – P. 3688-3699.

177. Sun, L. The Role of Toll-Like Receptors in Skin Host Defense, Psoriasis, and Atopic Dermatitis / L. Sun, W. Liu, L.J. Zhang // Journal of immunology research. – 2019. – Vol. 2019.

178. Tape strips detect distinct immune and barrier profiles in atopic dermatitis and psoriasis / H. He, R. Bissonnette, J. Wu, [et al.] // The Journal of allergy and clinical immunology. – 2021. – Vol.147. – №1. – P. 199-212.

179. The Commensal Microbiota and Viral Infection: A Comprehensive Review / N. Li, W. Ma, M. Pang, [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2019. – Vol.10. – P. 1551.
180. The effect of environmental humidity and temperature on skin barrier function and dermatitis / K A Engebretsen, J.D. Johansen, S. Kezic, [et al.] // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2016. – Vol. 30. – №2. – P. 223-249.
181. The IL-23/IL-17 Pathway in Inflammatory Skin Diseases: From Bench to Bedside / T. Liu, S. Li, S. Ying, [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol.11.
182. The microbiome in patients with atopic dermatitis / A.S. Paller, H.H. Kong, P. Seed, [et al.] // *The Journal of allergy and clinical immunology*. – 2019. – Vol. 143. – №1. – P. 26-35.
183. The role of innate immune signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis and consequences for treatments / Y. Skabytska, S. Kaesler, T.Volz, [et al.] // *Seminars in immunopathology*. – 2016. – Vol. 38. – №1. – P. 29–43.
184. The Role of the Environmental Risk Factors in the Pathogenesis and Clinical Outcome of Atopic Dermatitis / D. Bonamonte, A. Filoni, M. Vestita, [et al.] // *BioMed research international*. – 2019.
185. The Skin Microbiome in Atopic Dermatitis and Its Relationship to Emollients / C.W. Lynde, A. Andriessen, V. Bertucci, [et al.] // *Journal of cutaneous medicine and surgery*. – 2016. – Vol.20. – №1. – P. 21-28.
186. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis / A. De Benedetto, N. M. Rafaels, L. Y. McGirt, [et al.] // *The Journal of allergy and clinical immunology*. – 2011. – Vol. 127. – №3. – P. 773-786
187. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity / U. Zähringer, B. Lindner, S. Inamura, [et al.] // *Immunobiology*. – 2008. – Vol. 213. – P. 205–224.
188. TLR4 polymorphisms as potential predictors of atopic dermatitis in Chinese Han children / J. Shi, L. He, R. Tao, [et al.] // *Journal of clinical laboratory analysis*. – 2022. – Vol. 36. – №5.

189. TLR9 Rs352140 polymorphism contributes to a decreased risk of bacterial meningitis: evidence from a meta-analysis / H. Xue, H. Peng, J. Li, [et al.] // *Epidemiology and infection*. – 2020. – Vol. 148.

190. Transcriptomic Analysis of Healthy and Atopic Dermatitis Samples Reveals the Role of IL-37 in Human Skin / J. Zhou, D.C. Gemperline, M.J. Turner, [et al.] // *ImmunoHorizons*. – 2021. – Vol. 5. – №10. – P. 830–843.

191. Update on Atopic Dermatitis / T. Torres, E.O. Ferreira, M. Gonçalo, [et al.] // *Acta medica portuguesa*. – 2019. – Vol. 32. – №9. – P. 606-613.

192. Update on Atopic Dermatitis: Diagnosis, Severity Assessment, and Treatment Selection / A. B. Fishbein, J. I. Silverberg, E. J. Wilson, [et al.] // *The journal of allergy and clinical immunology*. – 2020. – Vol. 8. – №1. – P. 91–101.

193. Updated understanding of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: From virulence factors to commensals and clonal complexes / J. Hwang, A. Thompson, J. Jaros, [et al.] // *Experimental dermatology*. – 2021. – Vol.30. – №10. – P. 1532-1545.

194. Vakharia, P.P. Adult-Onset Atopic Dermatitis: Characteristics and Management / P.P. Vakharia, J.I. Silverberg // *American journal of clinical dermatology*. – 2019. – Vol. 20. – №6. – P. 771-779.

195. Validation in a Brazilian population of gene markers of periodontitis previously investigated by GWAS and bioinformatic studies / T. Cirelli, R. Nepomuceno, S.R. P. Orrico, [et al.] // *Journal of periodontology*. – 2021. – Vol. 92. – №5. – P. 689-703.

196. Vasanthakumar, A. Interleukin (IL)-33 and the IL-1 Family of Cytokines-Regulators of Inflammation and Tissue Homeostasis / A. Vasanthakumar, A. Kallies // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2019. – Vol. 11. – №3.

197. Zhang, L. The potential of interleukin-37 as an effective therapeutic agent in asthma / L. Zhang, J. Zhang, P // *Respiratory research*. – 2017. – Vol. 18. – №1.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Перечень последовательностей праймеров

Таблица А.1 - Последовательности праймеров, использованных при изучении полиморфизмов в генах TLRs и ILs

| Ген | rs | Название праймера | Последовательность 5'-3' |
|------|--------------------------|-------------------|--|
| TLR4 | rs11536889 | TLR4_889_f | tgt-cag-gag-aac-tac-gtg-tg |
| | | TLR4_889_r | gtt-tct-gag-gag-gct-gga-tg |
| | | TLR4_889_z1 | R6G-gaa-cag-tgg-atg-tta-tca-ttg-aga-a-RTQ1 |
| | | TLR4_889_z2 | ROX-gaa-gag-tgg-atg-tta-tca-ttg-aga-a-BHQ2 |
| TLR9 | rs352140 | T9_TM_f | tga-ccg-gtc-tgc-agg-tgc-tag-a |
| | | T9_TM_r | aag-ggc-tgg-ctg-tgg-tag-ctg-a |
| | | T9_TM_z1 | ROX-agc-tac-cgc-gac-tgg-BHQ2 |
| | | T9_TM_z2 | R6G-agc-tag-cac-gac-tgg-BHQ1 |
| IL33 | rs7019575 | IL33_575_F | ccc-aca-ctg-ttc-ttt-ggt-g |
| | | IL33_575_R | agg-caa-ttt-agg-gat-gca-a |
| | | IL33_575_Z1 | FAM-tgg-ttt-ctg-aac-aac-cag-gaa-atc-RTQ1 |
| | | IL33_575_Z2 | ROX-tgc-ttt-ctg-aac-aac-cag-gaa-atc-BHQ2 |
| IL37 | rs3811046 - rs3811047 | IL37_046/047_F | aac-ctc-act-gcg-tct-gac-tg |
| | | IL37_046/047_R | cga-ggc-ctt-act-tgt-gtg-aac |
| | | IL37_046_Z1 | FAM-tgg-aag-ccc-cct-gga-acc-ag-RTQ1 |
| | | IL37_046_Z2 | R6G-tgt-aag-ccc-cct-gga-acc-ag-BHQ1 |
| | | IL37_047_Z3 | ROX-caa-gcc-tcc-ccg-cca-tga-a-BHQ2 |
| | | IL37_047_Z4 | Cy5-caa-gcc-tcc-cca-cca-tga-a-RTQ2 |

Таблица А.2 - Последовательности праймеров при изучении экспрессии IL-4, IL-13, IL-33 и TNF- α

| Маркер | Тип праймера | Последовательность праймера |
|---------------|---------------------|------------------------------------|
| IL-4 | <i>прямой</i> | TCCACGGACACAAGTGCGA |
| | <i>обратный</i> | GAAGGGACACGGGCTGATGG |
| IL-13 | <i>прямой</i> | CGGTCATTGCTCTCACTTGCCT |
| | <i>обратный</i> | GTTGATCAGGGATTCCAGGGC |
| IL-33 | <i>прямой</i> | TGGCCTACCATCCCTTCTGA |
| | <i>обратный</i> | ACGTTTTGGCATCCAGAGGT |
| TNF- α | <i>прямой</i> | TCTCGGTTTCTTCTCCATCG |
| | <i>обратный</i> | ATAGGTTTTGAGGGGCATGG |

**ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Частота встречаемости аллелей, генотипов и гаплотипов
полиморфных маркеров генов TLRs и ILs**

Таблица Б.1 – Распределение частот аллелей и генотипов в изучаемых генах TLRs и их ассоциация с атопическим дерматитом

| SNP | Аллели/ Генотип | Частоты | | χ^2 | p-value | OR (95% CI) |
|--------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|-------------|------------------|--------------------------|
| | | Атопический дерматит | Контрольная группа | | | |
| TLR2 rs5743708 | Аллель G | 0,985 | 0,951 | 2,16 | p>0,05 | 3,29 (0,84 – 12,94) |
| | Аллель A | 0,015 | 0,049 | | | |
| | GG | 0,980 | 0,903 | 3,47 | p>0,05 | 5,17 (1,04 – 25,67) |
| | GA | 0,010 | 0,097 | 5,20 | p<0,05 | 0,10 (0,01 – 0,8) |
| | AA | 0,010 | 0,000 | 0,02 | p>0,05 | – |
| TLR4 rs11536889 | Аллель G | 0,865 | 0,915 | 2,10 | p>0,05 | 0,59 (0,29 – 1,21) |
| | Аллель C | 0,135 | 0,085 | | | |
| | GG | 0,729 | 0,831 | 2,41 | p>0,05 | 0,55 (0,25 – 1,18) |
| | GC | 0,271 | 0,169 | 2,41 | p>0,05 | 1,83 (0,85 – 3,93) |
| | CC | 0,000 | 0,000 | – | – | – |
| TLR4 rs4986791 | Аллель C | 0,916 | 0,961 | 1,85 | p>0,05 | 0,44 (0,16 – 1,24) |
| | Аллель T | 0,084 | 0,039 | | | |
| | CC | 0,842 | 0,922 | 1,55 | p>0,05 | 0,45 (0,16 – 1,31) |
| | CT | 0,147 | 0,078 | 1,15 | p>0,05 | 2,04 (0,7 – 5,97) |
| | TT | 0,011 | 0,000 | 0,04 | p>0,05 | – |
| TLR9 rs352140 | Аллель G | 0,448 | 0,529 | 2,09 | p>0,05 | 0,73 (0,47 – 1,12) |
| | Аллель A | 0,552 | 0,471 | | | |
| | GG | 0,206 | 0,329 | 3,19 | p>0,05 | 0,53 (0,26 – 1,07) |
| | GA | 0,485 | 0,400 | 1,17 | p>0,05 | 1,41 (0,76 – 2,63) |
| | AA | 0,309 | 0,271 | 0,28 | p>0,05 | 1,20 (0,61 – 2,37) |

Таблица Б.2 – Распределение частот гаплотипов в исследуемых полиморфизмах гена TLR4 и их ассоциация с атопическим дерматитом

| SNP | Аллели/ Генотип | Частоты | | χ^2 | p-value | OR (95% CI) |
|--------------------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|--------------|------------------|----------------------------|
| | | Атопический дерматит | Контрольная группа | | | |
| TLR4 rs11536889 - rs4986791 | GGCC | 0,602 | 0,841 | 10,20 | p<0,01 | 0,29 (0,13 – 0,63) |
| | GGCT | 0,108 | 0,048 | 1,07 | p>0,05 | 2,41 (0,64 – 9,13) |
| | GGTT | 0,011 | 0,000 | 0,04 | p>0,05 | – |
| | GCCC | 0,237 | 0,079 | 5,43 | p<0,05 | 3,59 (1,28 – 10,08) |
| | GCCT | 0,043 | 0,032 | 0,00 | p>0,05 | 1,37 (0,24 – 7,72) |
| | GCTT | 0,000 | 0,000 | – | – | – |
| | CCCC | 0,000 | 0,000 | – | – | – |
| | CCCT | 0,000 | 0,000 | – | – | – |
| | CCTT | 0,000 | 0,000 | – | – | – |

Таблица Б.3 – Распределение частот аллелей и генотипов в изучаемых генах интерлейкинов и их ассоциация с атопическим дерматитом

| SNP | Аллели/ Генотип | Частоты | | χ^2 | p-value | OR (95% CI) |
|-------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|-------------|------------------|---------------------------|
| | | Атопический дерматит | Контрольная группа | | | |
| IL33 rs7019575 | Аллель G | 0,655 | 0,664 | 0,03 | p>0,05 | 0,96 (0,6 – 1,53) |
| | Аллель C | 0,345 | 0,336 | | | |
| | GG | 0,402 | 0,448 | 0,34 | p>0,05 | 0,83 (0,44 – 1,56) |
| | GC | 0,505 | 0,433 | 0,83 | p>0,05 | 1,34 (0,72 – 2,5) |
| | CC | 0,093 | 0,119 | 0,30 | p>0,05 | 0,75 (0,28 – 2,07) |
| IL37 rs3811046 | Аллель G | 0,245 | 0,375 | 6,44 | p<0,05 | 0,54 (0,33 – 0,87) |
| | Аллель T | 0,755 | 0,625 | | | |
| | GG | 0,000 | 0,059 | 3,58 | p>0,05 | – |
| | GT | 0,490 | 0,632 | 3,28 | p>0,05 | 0,56 (0,3 – 1,05) |
| | TT | 0,510 | 0,309 | 6,61 | p<0,05 | 2,33 (1,22 – 4,48) |
| IL37 rs3811047 | Аллель A | 0,321 | 0,287 | 0,44 | p>0,05 | 1,18 (0,73 – 1,9) |
| | Аллель G | 0,679 | 0,713 | | | |
| | AA | 0,137 | 0,074 | 1,04 | p>0,05 | 2,00 (0,68 – 5,9) |
| | AG | 0,368 | 0,426 | 0,56 | p>0,05 | 0,78 (0,42 – 1,48) |
| | GG | 0,495 | 0,500 | 0,00 | p>0,05 | 0,98 (0,53 – 1,83) |

Таблица Б.4 – Распределение частот гаплотипов в исследуемых полиморфизмах гена IL-37 и их ассоциация с атопическим дерматитом

| SNP | Аллели/ Генотип | Частоты | | χ^2 | p-value | OR (95% CI) |
|-------------------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|--------------|------------------|-----------------------------|
| | | Атопический дерматит | Контрольная группа | | | |
| IL37 rs3811046 - rs3811047 | GGAA | 0,000 | 0,059 | 3,53 | p>0,05 | – |
| | GGAG | 0,000 | 0,000 | – | – | – |
| | GGGG | 0,000 | 0,000 | – | – | – |
| | GTAA | 0,137 | 0,015 | 6,05 | p<0,05 | 10,62 (1,35 – 83,29) |
| | GTAG | 0,337 | 0,426 | 1,36 | p>0,05 | 0,68 (0,36 – 1,3) |
| | GTGG | 0,011 | 0,191 | 14,25 | p<0,01 | 0,05 (0,01 – 0,35) |
| | TTAA | 0,000 | 0,000 | – | – | – |
| | TTAG | 0,032 | 0,000 | 0,79 | p>0,05 | – |
| | TTGG | 0,484 | 0,309 | 5,04 | p<0,05 | 2,10 (1,09 – 4,04) |