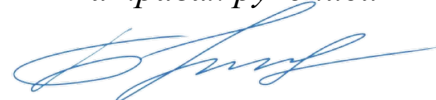


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И. И. МЕЧНИКОВА»

На правах рукописи



Быстрицкая Елизавета Петровна

**Молекулярные и эпигенетические механизмы иммунитета в патогенезе
атопического дерматита у детей**

3.2.7. Иммунология

3.1.23. Дерматовенерология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук,

член-корреспондент РАН

Свитич Оксана Анатольевна

доктор медицинских наук, профессор

Мурашкин Николай Николаевич

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Атопический дерматит – основная концепция клинической картины аллергического заболевания	14
1.2. Причины развития атопического дерматита и факторы риска	18
1.3. Роль иммунных механизмов в развитии атопического дерматита	25
1.4. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов при атопическом дерматите.....	30
1.5. Диагностика и лечение атопического дерматита – текущая ситуация.....	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	48
2.1. Характеристика клинических групп	48
2.2. Методы	52
2.2.1. Выделение ДНК из биоптатов кожи	52
2.2.2. Исследование паттернов метилирования методом глубокого (высокоэффективного) секвенирования	54
2.2.3. Биоинформатический анализ данных секвенирования	56
2.2.4. Выделение мононуклеарных клеток крови.....	60
2.2.5. Выделение РНК из клинического материала.....	61
2.2.6. Реакция обратной транскрипции.....	61
2.2.7. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	61
2.2.8. Иммуноферментный анализ	64
2.2.9. Статистические методы анализа	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	67
3.1. Сравнение профилей метилирования кожи пациентов с атопическим дерматитом и здоровых детей.....	68
3.2. Экспрессия генов <i>TLR2</i> , <i>TLR9</i> , <i>IL4</i> , <i>IL13</i> , <i>CAMP</i> , <i>DEFB1</i> при атопическом дерматите у детей	84

3.2.1. Экспрессия и корреляция генов иммунных факторов в пораженной коже пациентов с атопическим дерматитом	86
3.2.2. Экспрессия генов врожденного и адаптивного иммунитета в мононуклеарных клетках пациентов с атопическим дерматитом	93
3.3. Продукция цитокинов и IgE в периферической крови детей с атопическим дерматитом и в группе сравнения	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ	119
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	121
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Классификация дифференциально метилированных генов по их участию в биологических процессах и по наличию у них определенных молекулярных функций	143
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Визуализация дифференциально метилированных генов	145
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Графики экспрессии генов <i>TLR2</i> , <i>TLR9</i> , <i>IL4</i> , <i>IL13</i> , <i>CAMP</i> , <i>DEFB1</i> в коже и мононуклеарных клетках крови.....	151

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Атопический дерматит (АтД) – хроническое воспалительное иммуноопосредованное заболевание кожи, характеризующееся рецидивирующим течением и прогрессирующим снижением качества жизни [1,2].

От этого заболевания во всем мире страдают до 20 % детей и 8 % взрослых, поэтому данная патология представляет собой серьезную социальную и экономическую проблему [3]. АтД относится к группе атопических расстройств, характеризующихся выработкой антител IgE в ответ на аллергены. Однако только у 70–80 % пациентов с АтД регистрируется повышение уровня общего или специфического IgE, в то время как у остальных не наблюдается сенсibilизации [4]. Около 85 % пациентов демонстрируют дебют болезни в возрасте до 5 лет [5]. Более чем у 60 % детей с течением времени развиваются аллергический ринит и астма. Такое явление получило название «атопический марш», где АтД в определенных группах пациентов (в частности, с генетической предрасположенностью к атопии) может стать отправной точкой для последующего развития астмы [6]. Таким образом, знание основных звеньев патогенеза АтД, а также ключевых маркеров иммунопатогенеза будет способствовать предотвращению или модификации дальнейшего развития заболевания и атопического марша, что является многообещающей стратегией лечения в будущем. Однако для достижения этой цели необходимо получить существенные знания о сложных механизмах, лежащих в основе иммунопатогенеза АтД.

АтД принадлежит к группе многофакторных заболеваний, которое возникает в результате сложных взаимодействий между аллергическими реакциями, воспалительными реакциями в коже, влекущими за собой нарушение барьерной функции, а также влияния и взаимодействия генетических факторов, факторов окружающей среды и др. [7,8].

Различают несколько концепций, определяющих иммунологическую составляющую патогенеза АтД: более раннюю, где основная роль отводилась гиперчувствительности I типа, и поздние, где центральное значение отводится несостоятельности кожного покрова с нарушением барьерной функции, в том числе опосредованной мутациями в генах (филагтрина, десмоглеина-1 и др.), а также дисбалансом кожной микробиоты с преобладанием условно-патогенных микроорганизмов (стафилококков, стрептококков) и присоединением бактериальных или вирусных инфекций [9]. Высокая распространенность кожных инфекций при АтД свидетельствует о том, что нарушаются механизмы врожденного иммунитета, инициируемые паттерн-распознающими рецепторами (PRR) [10]. Известно, что полиморфизмы и нарушение экспрессии генов PRR связаны с патогенезом многих различных аутоиммунных и воспалительных заболеваний, включая АтД [11]. Нарушается и продукция антимикробных пептидов эпителиальными клетками, что также способствует дальнейшей сенсибилизации и поддержанию локального воспаления в коже.

Поскольку АтД является хроническим рецидивирующим воспалительным заболеванием кожи, изучается цитокиновый профиль в различные стадии проявления. Ранняя стадия заболевания экзогенного типа характеризуется превалированием Th2-клеток [12]. Под влиянием IL4 и IL13 усиливается продукция IgE плазматическими клетками. Также уделяется внимание изучению роли других субпопуляций Th-клеток, таких как Th1, Th17, Th22 и Th9 [13].

Во многом тот или иной вариант иммунного ответа связан с регуляцией генов его компонентов. Одними из механизмов, способных повлиять на активность этих генов, являются эпигенетические модификации. Эпигенетические механизмы, в частности метилирование, играют одну из ключевых ролей в иммунной регуляции и находятся под влиянием разнообразных факторов окружающей среды, приводящих к модификации активности генов [14]. Есть основания полагать, что изменения в процессах метилирования наблюдаются у пациентов с АтД. А также, вероятно, такие эпигенетические

механизмы, участвующие в осуществлении геномной адаптации к условиям среды, способны влиять на течение и тяжесть проявлений заболеваний.

Новые данные о закономерностях эпигенетических модификаций и экспрессионных профилей факторов иммунитета при АтД расширят понимание его иммунопатогенеза. Подобная оценка и уточнение изменений в ключевых звеньях патогенеза заболевания позволит выбрать наиболее подходящую стратегию терапии с минимальным риском развития побочных явлений, а также может служить основой для исследований в области фармакогеномики с целью персонализированного подхода к лечению пациентов с АтД.

Степень разработанности темы исследования

Варианты иммунного ответа при АтД связаны не только с генетическими характеристиками их компонентов, но и с регуляцией определяющих патогенез генов. Одними из механизмов, способных повлиять на активность этих генов, являются эпигенетические модификации.

Данных о роли эпигенетических механизмов регуляции врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе атопического дерматита недостаточно. Описаны профили метилирования некоторых генов (*DNMT1*, *FCER1G*, *TSLP*, *MICAL3*, *DEFB1*), ассоциированных с АтД [15–19]. Также существует несколько полногеномных исследований ДНК-метилирования [20–24]. Однако комплексное исследование роли эпигенетической регуляции механизмов иммунитета на уровне экспрессии генов и белковых молекул у пациентов детского возраста до сих пор не проводилось.

Эти данные важны, не только по причине уточнения иммунопатогенеза заболевания, но и ввиду того, что могут являться потенциальными мишенями при диагностике и терапии АтД.

Цель исследования

Комплексное изучение влияния изменения активности генов на иммунные показатели при атопическом дерматите в детском возрасте.

Задачи исследования

1. Провести полногеномное исследование метилирования в биоптатах кожи детей с атопическим дерматитом и определить дифференциально метилированные гены, белковые продукты которых участвуют в нарушении барьерной функции кожи и опосредуют иммунопатогенез данного заболевания.
2. Определить уровень экспрессии генов распознающих рецепторов врожденного иммунитета (*TLR2*, *TLR9*), цитокинов (*IL4*, *IL13*), антимикробных пептидов (*CAMP*, *DEFB1*) на локальном уровне (в биоптатах кожи) детей с атопическим дерматитом младшей и старшей возрастной группы.
3. Оценить уровень экспрессии генов *TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, *DEFB1* на системном уровне (в мононуклеарных клетках крови) и установить связь с тяжестью течения атопического дерматита и возрастом пациентов.
4. Изучить показатели экспрессии иммунных факторов в мононуклеарных клетках крови до и после лечения у пациентов, получающих системную и наружную терапию, сопоставив полученные данные с клиническими изменениями.
5. Представить сравнительный анализ уровня экспрессии цитокинов (*IL3*, *IL18*), хемокинов (*CXCL9*, *CXCL10*), *IFN- γ* , и общего *IgE* в сыворотке у детей с атопическим дерматитом.
6. Провести корреляционный анализ факторов иммунитета *TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, *DEFB1* в коже и в иммунных клетках крови пациентов детского возраста с атопическим дерматитом, а также данных цитокинового профиля.

Научная новизна

Впервые изучен профиль метилирования в коже у детей с АтД российской популяции. Выявлен список генов, изменение степени метилирования в которых может объяснять нарушения барьерной функции кератиноцитов и изменения в механизме иммунных реакций при манифестации заболевания. По полученным данным визуализированы наиболее релевантные сигнальные пути, из которых отобраны гены для экспрессионного анализа.

Впервые проведена комплексная оценка факторов врожденного иммунитета (Toll-подобных рецепторов и АМП), ключевых молекул адаптивного иммунного ответа и влияния метилирования на связанные с ними сигнальные пути.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты работы раскрывают некоторые фундаментальные механизмы регуляции иммунопатогенеза среднетяжелого и тяжелого течения АтД у детей, обусловленной метилированием в кератиноцитах. Показано изменение иммунофенотипа заболевания на локальном и системном уровне.

Полученные данные по полногеномному метилированию могут служить основой в области разработки и применения новых лекарственных средств, механизм которых, в частности, связан с влиянием на процессы метилирования/деметиления. Результаты могут использоваться для разработки диагностических систем. Комплексный подход, включающий изучение экспрессии генов иммунных факторов и цитокиновой продукции в крови, может применяться в качестве подтверждения фенотипа заболевания, инициированного профилем метилирования в стадии обострения.

В результате исследования разработана панель диагностических маркеров, позволяющая оценить эффективность применяемой терапии в МНК (TLR2, TLR9, CAMP, IL4, IL13). Комплексная панель маркеров позволит применять подходы персонализированной медицины с целью коррекции терапии.

Методология и методы исследования

Методологической основой данного исследования являлись работы в области изучения молекулярных основ атопического дерматита, эпигенетической регуляции экспрессии генов, вовлеченных в патогенез этого заболевания.

Методы исследования включали сбор биологического материала (биоптаты кожи, цельная кровь, сыворотка крови) и необходимых медицинских данных от групп пациентов с АД и группы сравнения. В работе использовались молекулярно-генетические методы (полногеномное секвенирование третьего поколения, ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией), иммунодиагностический метод (мультиплексный и твердофазный иммуноферментный анализ). Результаты, полученные в ходе исследования, регистрировались и подвергались статистической обработке и визуализации.

Личный вклад

Автор принимал личное участие в выборе направления исследования, разработке дизайна исследования, определении цели и задач исследования, транспортировке биологического материала, экспериментальной части исследования (выделение ДНК и РНК, проведение пробоподготовки для секвенирования, секвенирование, проведение реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), проведение мультиплексного и твердофазного иммуноферментного анализа), анализе данных, в том числе и в статистической обработке результатов, в интерпретации и визуализации полученных данных, а также в формулировании выводов и практических рекомендаций. Подготовка публикаций по проведенной работе, апробация результатов исследования, написание и оформление данной рукописи выполнены автором самостоятельно.

Положения, выносимые на защиту

1. Выявлены значимые дифференциально метилированные гены, связанные с барьерной функцией кожи (*EHMT1*, *RUNX3*, *CEPBG*, *MAPK14*, *CARD11*, *DOCK2*, *DOCK1*, *CCR7*, *FAT1*, *XIRP2*, *FYN*, *HIC1*, *CTNNBIP1*, *BARX1*, *TLE1* и *GRB10*) и иммунными реакциями (*SLC9A6*, *EPHB2*, *PAK2*, *MAP2K4*, *MAP2K2*, *JAK3*, *GATA3*, *GATA4*, *VAV1*, *MAP2K6* и *MAP3K8*), которые вовлечены в каскады регуляции, участвующие в иммунопатогенезе АтД.

2. При анализе данных по экспрессии факторов иммунитета в кератиноцитах определено снижение экспрессии генов *TLR2*, *TLR9*, *IL4*. По данным в МНК для всех маркеров наблюдаются сходные тенденции изменения уровня экспрессии с учетом терапии (повышается до терапии, затем нормализуется), возраста (более выраженные изменения выявляются в группе 12-18 лет) и тяжести заболевания (сходные изменения проявляются как при среднетяжелом, так и при тяжелом течении). При системной терапии показана нормализация иммунологических показателей после лечения.

3. У пациентов с АтД выявлено снижение уровня продукции Th1-цитокинов: IFN- γ , IL18, IL3, CXCL9, CXCL10. В то же время общий уровень IgE в сыворотке крови пациентов повышен, свидетельствуя о преобладании Th2-иммунного ответа у пациентов с АтД.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Направление диссертационного исследования соответствует п. 2 «Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии», п. 5. «Изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний», п. 6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов» паспорта специальности 3.2.7. Иммунология

(медицинские науки); п. 2 «Этиология и патогенез дерматозов, лимфопролиферативных заболеваний кожи, новообразований кожи и ИППП (изучение причинно-следственных связей между генетическими, патоморфологическими, иммунологическими, биохимическими, функциональными особенностями и клиническими проявлениями заболеваний)» паспорта специальности 3.1.23. Дерматовенерология (медицинские науки).

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов определяется достаточной выборкой включенных в исследование пациентов, тщательным подходом к выбору лабораторных методов исследования, а также применением статистических подходов обработки полученных результатов. Сформулированные выводы и практические рекомендации отражают результаты проделанной работы и согласуются с поставленными целью и задачами исследования. Апробация материалов диссертации проведена на заседании Отдела иммунологии и аллергологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» 01 сентября 2023 года (протокол № 3).

Материалы работы доложены на конференциях с международным участием: International Student Congress of (bio)Medical Sciences (ISCOMS) (г. Гронинген, Нидерланды, 06-09 июня 2017, победа в секции «Иммунология»); Европейская академия аллергологии и клинической иммунологии (EAACI) International Symposium on Molecular Allergology (ISMA) (г. Люксембург, Люксембург, 09-11 ноября 2017); EAACI Annual Congress (г. Мюнхен, Германия, 26-30 мая 2018); XII World Congress on Asthma, COPD & Immunopathology and the I International Congress on Molecular Allergology (г. Москва, Россия, 18-21 октября 2018, первое место); International Student Congress (г. Грац, Австрия, 31 мая – 02 июня 2019); EAACI Annual Congress (г. Лиссабон, Португалия, 01-05 июня 2019); EAACI International Symposium on Molecular Allergology (ISMA) (г. Амстердам,

Нидерланды, 28-30 ноября 2019); EAACI Annual Congress (г. Лондон, Великобритания, 06-08 июня 2020, онлайн); EAACI Pediatric Allergy and Asthma Meeting (РААМ) (12-13 ноября 2021, онлайн, победа в секции «2.3 Атопический и контактный дерматит»); 14th International Conference on Allergy, Immunology and Rheumatology (03 декабря 2021, онлайн); EAACI-ESCD Skin Allergy Meeting (SAM) (24-25 марта 2023, онлайн); на конгрессе European Society for Pediatric Dermatology (22nd ESPD Congress) (г. Малага, Испания, 04-06 мая 2023, онлайн); EAACI Annual Congress (г. Гамбург, Германия, 09-11 июня 2023, гибридный формат). В 2022 г. по проведенной работе была присуждена премия им. Андрея Дмитриевича Адо Российского Аллергологического Журнала в специальной номинации «Будущее науки» от генерального спонсора АО МБНПК «Цитомед».

Внедрение результатов в практику

Основные результаты и выводы работы внедрены в учебный и научный процесс кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А. А. Воробьева ИОЗ им. Ф. Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И. М. Сеченова при изучении дисциплин микробиологии и иммунологии, читаемых студентам по направлениям подготовки «Лечебное дело», «Стоматология», «Медико-профилактическое дело», «Фармация», «Педиатрия».

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 3 оригинальных статьи, индексируемых в международных базах данных Web of Science, Scopus, PubMed, Chemical Abstracts, Springer и включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / в Перечень ВАК при Минобрнауки России («Иммунология»; «Молекулярная медицина»; «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины»), 1 монография (глава в книге «Atopic Dermatitis - Essential Issues», IntechOpen) и 8 иных публикаций в изданиях

«Allergy»; «Clinical and Translational Allergy»; «Pediatric Dermatology»; «Медицинская иммунология»; «Российский иммунологический журнал»; «Врач»).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 161 странице машинописного текста, содержит 12 таблиц, 63 рисунка. Работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы, приложения. Список литературы включает 183 источника, из них 42 отечественных и 141 иностранный.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Атопический дерматит – основная концепция клинической картины аллергического заболевания

Атопический дерматит (АтД) – многофакторное хроническое воспалительное иммуноопосредованное заболевание, характеризующееся рецидивирующим течением, сухой кожей, эритемой и сильным зудом [1,2,25,26].

Заболевание распространено среди детей (20 % общей доли случаев, зафиксированных в развитых странах) и взрослых (до 8 %) [3]. Начиная с 70-х годов прошлого столетия, заболеваемость АтД в развитых индустриальных странах увеличилась в 2-3 раза, и главным образом это связано с образом жизни, наследственностью, загрязнением окружающей среды, а также психологической нагрузкой, зачастую выражающейся в виде тревоги и депрессии. В настоящее время клинические проявления АтД регистрируются у 15 – 20 % детей и у 5 % – 8 % взрослых [27]. Около 85 % пациентов демонстрируют дебют болезни в возрасте до 5 лет [5]. При этом АтД может возникнуть в любом возрасте. Зачастую ремиссия заболевания наступает в связи с гормональной перестройкой. В то же время, у 10-30 % пациентов этого не происходит [28]. У мужчин болезнь в целом протекает тяжелее, чем у женщин, а сами проявления болезни становятся заметны позже.

Клиническая картина атопического дерматита

АтД чаще всего развивается в детском возрасте и характеризуется сильным зудом, наличием рецидивирующих экзематозных поражений кожи в виде плохо очерченных эритематозных (красных) пятен с экссудацией, пузырей и корок на ранних стадиях (в острую и подострую фазы), а также шелушения, трещин и лихенификаций (утолщений) на более поздних стадиях болезни (в хроническую фазу) [29]. Выделяется ряд подтипов с различными и частично совпадающими патологическими механизмами. Морфологически подтипы АтД подразделяются на фолликулярный вариант, характеризующийся плотно агрегированными

фолликулярными папулами (небольшими плотными возвышениями на коже), а также вариант пруриго, характеризующийся эритемой и зачастую наблюдающийся у пациентов с длительным течением заболевания [7].

Морфологические элементы кожной сыпи при АтД обычно локализуются на коже сгибательных поверхностей конечностей, на передней и боковой поверхности шеи, веках, лбу, лице, запястьях, тыльной поверхности стоп и рук. Течение АтД может варьировать у разных пациентов. По данным клинических исследований [30,31] можно выделить три основных формы заболевания:

- 1) персистирующую, при которой характерны повторяющиеся частые обострения болезни, как правило, до возраста 7 лет (~ 20 % случаев);
- 2) интермиттирующую, при которой АтД не соответствует критериям обострения или ремиссии (~ 40 % случаев);
- 3) ремиссию, при которой клинические признаки АтД не проявляются (40-45 % случаев).

Исходя из этого, важно уметь правильно распознавать и классифицировать АтД, чтобы повысить эффективность применяемого лечения.

Клиническая картина заболевания различается у больных разных возрастных групп. У новорожденных АтД диагностируют по ранним проявлениям ксероза (сухости кожи). Обычно ксероз поражает всю поверхность тела [32]. В младенчестве АтД характеризуется появлением на теле ребенка эритематозной папулезной кожной сыпи, которая локализована на сгибательных поверхностях конечностей, особенно в области локтевой и подколенной ямок [33]. Появившаяся сыпь приводит к покраснению, шелушению и экссудации. Она может затрагивать щеки, лоб, кожу волосяного покрова головы, подбородок и заднюю часть ушей, не затрагивая при этом нос. Прогрессированию поражений кожи способствует неконтролируемый зуд, приводящий к расчесам (в том числе на лице).

Зуд при АтД является основным и ведущим клиническим признаком, необходимым для диагностики этого заболевания [34–36]. Он также может возникать в ночное время во время сна, тем самым усугубляя течение болезни. Дополнительно проявлению зуда могут способствовать такие факторы, как

повышение температуры воздуха и потоотделение, материалы из шерсти, соприкасающиеся с пораженными участками кожи, различные эмоциональные переживания, употребление определенных продуктов питания, инфекции верхних дыхательных путей и пылевые клещи. Расчески влекут за собой появление корковых эрозий, эксфолиаций, что нередко сопровождается развитием вторичных инфекций [37].

У детей дошкольного возраста ксероз приводит к появлению огрубевшей, шелушащейся или потрескавшейся кожи. Для детей старшего возраста и взрослых характерна лихенификация кожи, которая является следствием постоянного трения пораженных участков. Под глазами могут быть заметны складки Денни-Моргана. Нередко отмечается наличие белого лишая (*pityriasis alba*), представляющего из себя характерные округлые или овальные гипопигментированные поражения кожи [38]. Для детей характерен белый дермографизм. Заболеванию может сопутствовать хейлит, простой ихтиоз, фолликулярный кератоз. Болезнь часто поражает сгибательные поверхности конечностей [33]. Кожные проявления также могут быть заметны в области бедер и ягодиц.

У взрослых ксероз носит постоянный характер [39]. Кожа лица выглядит сухой и воспаленной. Возможно развитие генерализованной формы заболевания. Если АтД у пациента начинается в детском возрасте и продолжается во взрослом периоде, то течение болезни по тяжести и симптоматике, скорее всего, будет сходным. При дебюте атопического дерматита во взрослом возрасте типичные симптомы, характерные для АтД, могут отсутствовать, а места локализации поражений отличаться. Так, при позднем начале болезни чаще поражена кожа туловища, а также разгибательные поверхности конечностей в виде нуммулярной экземы или пруриго. Сопутствующие заболевания, такие как аллергический ринит, астма или пищевая аллергия, в анамнезе у большинства пациентов отсутствуют.

По данным ряда опросников, в том числе SCORAD и EASI, градация степени тяжести остается сходной при любом возрасте дебюта АтД [40]. Помимо

этого, при АтД с дебютом во взрослом возрасте реже детектируется высокий уровень общего сывороточного IgE, а также практически не выявляется сенсibilизации к пищевым и аэроаллергенам [41]. Это, в свою очередь, связано с более низкой предрасположенностью к сопутствующим атопическим заболеваниям и частично объясняет различия в клинической картине.

При диагностике АтД в любом возрасте золотым стандартом принято считать критерии J. M. Hanifin и G. Rajka, опубликованные в 1980 году [42]. Однако поскольку такой диагностический подход был изначально разработан для пациентов детского возраста, его чувствительность и специфичность могут снижаться для взрослых пациентов. Поэтому важно принимать во внимание гетерогенность заболевания в старшем возрасте и проводить дифференциальную диагностику с другими дерматозами.

У 15-30 % детей с атопическим дерматитом в возрасте до 6 лет развивается сопутствующая пищевая аллергия, которая в отдельных случаях способна усугубить течение основного заболевания [43,44]. Кроме того, в детском и подростковом возрасте могут развиваться такие заболевания, как бронхиальная астма и аллергический ринит, вместе составляющие атопический марш [6,45]. Не исключен и сопутствующий аллергический контактный дерматит, встречающийся при вариантах средней и тяжелой степени АтД, не поддающихся лечению, а также при нетипичной локализации атопического дерматита [46].

Постановка диагноза при АтД нередко осложняется, поскольку это заболевание необходимо дифференцировать от других типов дерматита, некоторых кожных заболеваний, например, псориаза, а также метаболических, генетических и аутоиммунных нарушений [47,48].

При АтД повышается риск развития других воспалительных заболеваний (например, артрита, воспалительных заболеваний кишечника), кардиоваскулярных нарушений, нейропсихиатрических расстройств и даже злокачественных новообразований [49]. Помимо этого, в ходе изменения иммунного ответа, у пациентов увеличивается вероятность возникновения

бактериальных, вирусных и грибковых инфекций кожи, вызванных, в частности, грамположительными бактериями и вирусом простого герпеса типа 1 [50].

1.2. Причины развития атопического дерматита и факторы риска

Среди этиологических факторов, способствующих развитию АД, принято выделять несколько составляющих (Рисунок 1). К ним относятся, в первую очередь, аллергические реакции, воспалительные реакции в коже, влекущие за собой нарушение барьерной функции, влияние и взаимодействие генетических факторов и факторов окружающей среды [7,8]. Помимо активации факторов врожденного и приобретенного иммунного ответа, вовлеченных в патогенез заболевания, значимые изменения затрагивают барьерную функцию кожи [51]. Нарушения, происходящие в эпидермисе, не только способствуют усилению трансэпидермальной потери воды и проникновению антигенов из окружающей среды, но и поддерживают локальные воспалительные реакции (преимущественно Th2 типа) [4,12].

Продолжающееся воспаление, в свою очередь, вызывает последующее ослабление функций кожного барьера, что приводит к дополнительной нагрузке аллергенами извне [52].

В настоящее время существует, по крайней мере, две основные гипотезы относительно этиологии АД. Согласно одной из них, некий провоцирующий аллергическую реакцию фактор приводит к нарушению нормальной функции кожного барьера [9]. Это, в свою очередь, сопровождается распознаванием, процессингом и презентацией аллергена. Таким образом, причиной нарушения функции кожного барьера является развитие воспалительного процесса, которое облегчает проникновение новых аллергенов и микроорганизмов [53].

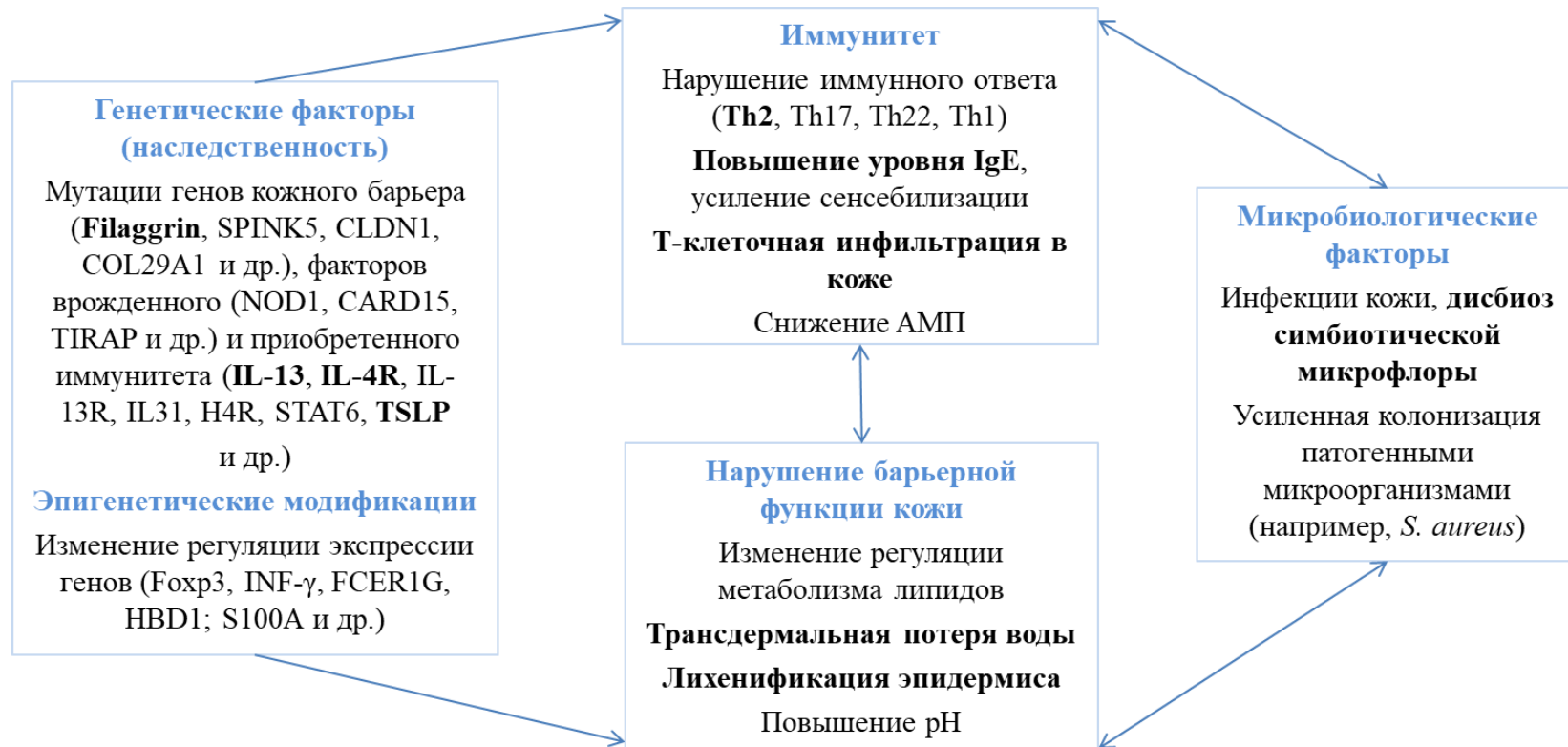


Рисунок 1 – Взаимосвязь различных этиологических факторов в патогенезе АтД

Другая, противоположная ей гипотеза предполагает, что вначале происходит локальное повреждение кожного барьера, которое приводит к нарушениям в работе иммунной системы. Так, снижение экспрессии гена филаггрина (*FLG*), необходимого для поддержания барьерной функции кожи, повышает ее восприимчивость к механическим повреждениям и провоцирует развитие иммунного ответа [54].

Верхний слой кожи, эпидермис, делат на несколько слоев, в зависимости от степени дифференцировки входящих в них кератиноцитов. Выполняя защитную функцию, эпидермис образует физический барьер, который предотвращает потерю воды и перекрывает доступ извне патогенным микроорганизмам, токсинам и аллергенам [29,52].

Пораженная кожа при АтД гистологически отличается от кожи здорового человека, как показано на Рисунке 2 [55]. При патологии в эпидермисе пораженных участков часто наблюдается спонгиоз (отек) и увеличенное количество слоев кератиноцитов, подвергающихся паракератозу, гиперкератозу или дискератозу. Роговой слой, являющийся самым верхним слоем эпидермиса, утрачивает свою нормальную барьерную функцию в пораженной АтД коже. В дерме наблюдается клеточная инфильтрация, преимущественно локализованная вокруг мелких сосудов. Клеточный инфильтрат в основном состоит из лимфоцитов, макрофагов, в том числе, клеток Лангерганса, дермальных и воспалительных дендритных клеток, тучных клеток и эозинофилов. Необходимо отметить, что и в видимо неизменной коже при острой форме АтД также наблюдаются признаки межклеточного отека и инфильтрация Т-клетками (в меньшей степени, чем в пораженных участках).

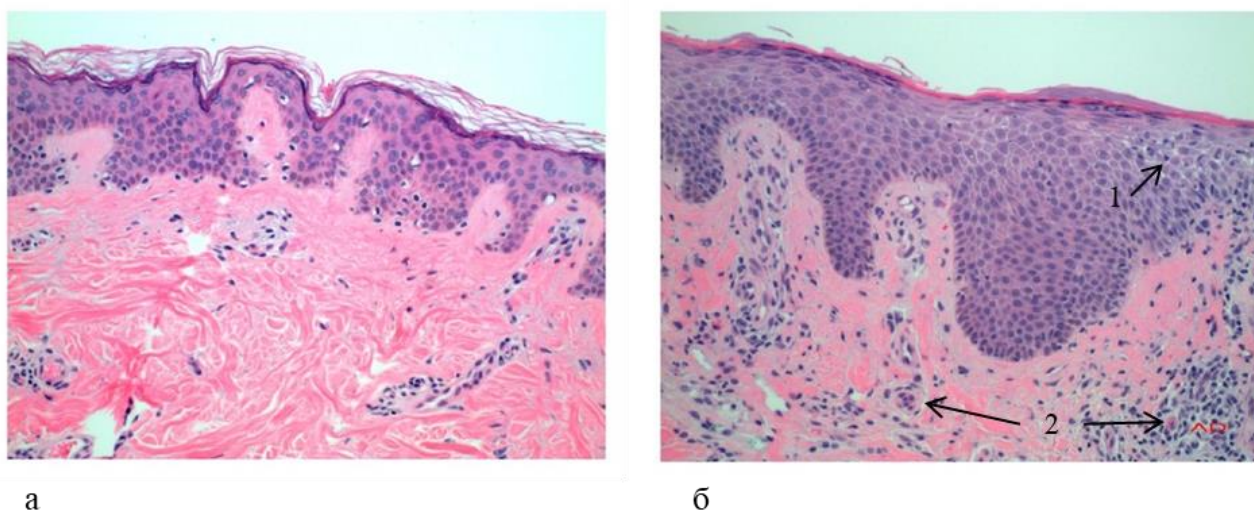


Рисунок 2 – Гистологическая картина нормальной кожи по сравнению с кожей пациента с АтД. (а) Гистология нормальной кожи. Эпидермис нормальной толщины (верхний слой), состоит из нескольких слоев плоскоклеточных клеток с тонкой каемкой кератинового слоя на поверхности (роговой слой). Дерма (нижняя часть) состоит из редких фибробластов с обильными пучками внеклеточного коллагена и капиллярами, выстланными одним слоем эндотелиальных клеток. (б) Гистология подострого варианта спонгиозического дерматита в пораженной коже пациента с АтД. Эпидермис утолщен. Наблюдаются щелевидные промежутки между плоскими клетками (1), что указывает на отек. Вышележащий слой кератиноцитов подвергается гиперкератозу и паракератозу. В дерме наблюдается клеточная инфильтрация, преимущественно локализованная вокруг мелких сосудов (2). Увеличение 200х. Модифицированный рисунок из статьи Hongxiu и соавт. [55]

Кератиноциты обладают способностью обнаруживать патогены благодаря паттерн-распознающим рецепторам врожденного иммунитета. Передача сигналов от них вызывает инициацию врожденного иммунного ответа. Эпидермальные клетки Лангерганса и дермальные дендритные клетки участвуют в презентации антигенов. Т-лимфоциты в норме всегда присутствуют в коже, а общий специфичный маркер – антиген лимфоцитов кожи (CLA) – обеспечивает средство Т-лимфоцитов к дерме. Тучные клетки способны к дегрануляции и высвобождению гистамина и других вазоактивных молекул. Помимо этого они выделяют широкий спектр цитокинов (в том числе $TNF\alpha$), что вносит вклад в поддержание местных иммунных реакций.

Как отмечалось ранее, различают несколько концепций, определяющих иммунологическую составляющую патогенеза АтД: более раннюю, где основная роль отводилась гиперчувствительности I типа (IgE-опосредованный иммунный ответ), и поздние, где центральное значение отводится несостоятельности кожного покрова с нарушением барьерной функции (в том числе опосредованным мутациями в генах филаггрина, десмоглеина-1, корнеодесмозина, ингибитора сериновой протеазы Kazal type 5), дисбалансу кожной микробиоты [9].

При среднетяжелом и тяжелом течении этого заболевания может регистрироваться увеличение количества Т- и В-клеток как на системном уровне в кровотоке, так и локально в коже [56,57]. Более подробно реакции иммунитета в патогенезе АтД будут освещены в разделе 1.3.

Генетические нарушения, характерные для АтД

В литературе рассматривают несколько основных факторов, способствующих развитию заболевания: мутации *FLG* и полиморфизм других ключевых генов, участвующих в патогенезе АтД [58,59]. Результаты генетического анализа свидетельствуют о том, что наибольшее число полиморфизмов и мутаций, связанных с болезнью, находятся на первой хромосоме, в области 1q21 [60]. Примерно у 70 % пациентов с АтД были родственники с тем же или аналогичным диагнозом [61].

Мутация в гене филаггрина является доказанным фактором, влияющим на дифференцировку клеток эпидермиса. Ген, кодирующий предшественник филаггрина (профилаггрин), находится в составе первой хромосомы, в области 1q21.3.

Экспрессия профилаггрина происходит в зернистом слое эпидермиса. Вначале профилаггрин протеолитически расщепляется до филаггрина. Затем филаггрин сшивается трансглутаминазами с другими структурными белками эпидермиса. Вместе они образуют белковый каркас в ороговевшем слое кожи [62]. Мутации в *FLG* либо меняют структуру белка, приводя к изменениям его свойств, либо снижают экспрессию гена и уровень процессированного филаггрина в коже [63]. С АтД могут быть также связаны мутации в генах,

кодирующих пептидазы, ингибиторы протеаз, а также в генах, кодирующих белки липидного метаболизма.

Мутации, затрагивающие кодирующие последовательности в еще одном гене, *LRRC32* (также известного как трансмембранный рецептор, белок 32, содержащий лейцин-обогащенные повторы), расположенного на хромосоме 11q13.5, вызывают снижение его экспрессии. В норме этот рецептор активирует латентный трансформирующий фактор роста- β (TGF β), связываясь с ним. Снижение экспрессии *LRRC32*, вероятно, нарушает взаимодействие T-регуляторных клеток с циркулирующим латентным TGF β , препятствуя активации последнего [64].

Другие мутации генов кожного барьера (например, *CLDN1*, *KLK7*, *SPINK5*), скорее всего, также способствуют развитию АтД, хотя связь между возникновением изменений в этих генах на фоне развития заболевания не столь очевидна [65].

С АтД связаны изменения в генах, отвечающих за работу иммунной системы. Значительная часть этих генов находится на пятой хромосоме, в областях 5q31-5q33 [66]. К числу таких факторов относятся гены цитокинов: интерлейкинов 4, 5, 12, 13, а также гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF).

Регуляция экспрессионной активности генов иммунитета, кожного барьера может нарушаться ввиду различных причин, не связанных с генными мутациями и однонуклеотидными заменами. Так, все большее внимание уделяют изучению эпигенетической регуляции, влияющей на степень выработки белкового продукта гена. Подробно этот механизм будет рассмотрен в разделе 1.4.

Кожная микробиота при АтД

Кожа при АтД, особенно в детском возрасте, характеризуется снижением разнообразия нормальной микробиоты и преобладанием условно-патогенных представителей, например, *Staphylococci spp.* (*S. aureus*), *Streptococci spp.* (*S. epidermidis*, *S. pyogenes*) [67]. Интересно, что *S. epidermidis* определяется при менее выраженном по тяжести течении АтД. Золотистый стафилококк нередко

детектируется в коже пациентов с тяжелым течением АтД. Однако вопрос о том, вызывает ли *S. aureus* дерматит или является следствием воспаления кожи, до сих пор остается открытым. По некоторым данным усиленная колонизация *S. aureus* может наблюдаться у младенцев за ~ 2 месяца до начала заболевания [68].

Существуют данные, что от увеличения колонизации *S. aureus* зависит обострение заболевания. Поэтапное геномное секвенирование 16S рНК бактерий, выделенных от детей с АтД, показало, что число бактерий, в особенности доля *S. aureus*, значительно увеличивается во время обострения заболевания [69]. В другом исследовании, при изучении микробного разнообразия в коже здоровых людей, было обнаружено преобладание видов бактерий *Pseudomonas* и *Janthinobacterium* над *Staphylococcus* [70]. Также было выявлено, что снижение микробного разнообразия наблюдалось у пациентов с АтД, не применяющих никакой поддерживающей терапии в стадии ремиссии дерматита.

Наиболее изученными бактериальными факторами вирулентности при АтД являются стафилококковые энтеротоксины, SE, (суперантигены), из которых выделяют SEA, SEB, SEC, SED и токсин синдрома токсического шока (TSST-1), а также SEG-SEQ. Более 80 % *S. aureus*, выделенных от пациентов с АтД, продуцируют суперантигены. Метициллин-резистентный *S. aureus* (MRSA) продуцирует больше суперантигенов, чем метициллин-чувствительный *S. aureus* (MSSA) [71]. Распространенность колонизации MRSA у пациентов с АтД достигает 12 %.

Численность условно-патогенных микроорганизмов (*S. epidermidis*) также увеличивается. А количество таких бактерий, как *Streptococcus*, *Propionibacterium* и *Corynebacterium*, являющимися представителями нормальной микробиоты, увеличивается только после проведения комплексной терапии, включающей в себя применение местных антисептических аппликаций, противомикробных средств и иммуномодуляторов по показаниям [72].

Пациенты с АтД также восприимчивы к вирусным инфекциям кожи [73]. Однако по сравнению с бактериальными инфекциями, вирусные инфекции встречаются относительно реже. Герпетическая экзема, вызванная вирусом

простого герпеса, – одна из наиболее частых сопутствующих вирусных инфекций у пациентов с АтД. В дополнение к терапии в таком случае назначают противовирусные препараты, снижающие риск развития осложнений.

Также описана инфекция кожи при АтД, вызываемая вирусом Коксаки из группы энтеровирусов [74]. При таком осложнении у пациентов развиваются язвы в полости рта, папулы на ладонях и подошвах стоп, сопровождающиеся болевым синдромом.

Другие микроорганизмы, в том числе, дрожжевые грибы (например, вид *Malassezia*), вероятно, играют роль в патогенезе АтД, поскольку непосредственно стимулируют воспаление в коже [75].

В основе изменения микробного состава кожи пациентов с АтД лежат молекулярные иммунологические механизмы, которые описаны разделе 1.3.

1.3. Роль иммунных механизмов в развитии атопического дерматита

Эффекты от взаимодействий между генами, а также между генами и факторами окружающей среды запускают механизмы нарушения функций эпидермального барьера и активации воспалительных реакций в коже, опосредованных Т-клеточным воздействием. Дисбиоз кожи также играет значимую роль в патогенезе АтД. Таким образом, ввиду влияния различных факторов имеет место неоднородность клинических проявлений этого заболевания среди пациентов [18], что также неизменно отражается на реакциях иммунитета.

Дисфункция эпидермального барьера, наблюдаемая у пациентов с АтД, может быть опосредована первичными механизмами, связанными с мутациями и/или вторичными механизмами, связанными с зудом и расчесыванием. Экспрессия эпидермальных структурных белков или липидов снижается в ответ на воздействие главным образом Th2-цитокинов (IL4, IL13, IL25 и IL33) [76]. Кожа пациентов также характеризуется повышенным рН, сухостью, раздражением, повышенной проницаемостью для низкомолекулярных веществ и

восприимчивостью к инфекциям. На молекулярном уровне наблюдается снижение экспрессии структурных белков, связанных с дифференцировкой эпидермиса, дисбаланс между протеазами и их ингибиторами, изменение состава и пластинчатой организации эпидермальных липидов, а также снижение экспрессии белков замыкающих контактов [77].

Иммунопатогенез АтД (Рисунок 3) связан с развитием воспалительных реакций за счет нарушения регуляции иммуномодулирующих белков и высвобождения цитокинов, в частности $IL1\beta$, $IL25$, $IL33$ и тимусного стромального лимфопоэтина (thymic stromal lymphopoietin - TSLP) [78,79]. Сочетание воспалительного процесса и нарушения кожного барьера приводит к усилению первичной сенсibilизации аллергеном в коже. Напротив, воспалительная реакция может, в свою очередь, вызвать нарушение эпидермального барьера и снижение экспрессии белков рогового слоя и замыкающих контактов.

В острой фазе АтД поражение в эпидермисе в первую очередь способствует экспрессии кератиноцитами хемокинов, таких как CCL17 (известный как TARC, thymus and activation-regulated chemokine), макрофагальный хемокин – CCL22 (MDC, macrophage-derived chemokine), а также цитокинов $IL1\beta$, $IL33$ и TSLP. Эти медиаторы активируют в коже резидентные лимфоидные клетки врожденного иммунитета 2 типа (ILC2) и Th2-зависимый иммунный ответ. TSLP индуцирует экспрессию дендритными клетками лиганда OX40 (OX40L, цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд рецептора CD134), который связывается с рецептором OX40L на наивных Т-клетках и стимулирует продукцию $IL4$, $IL5$ и $IL13$. Воспалительные дендритные клетки эпидермиса (IDEC, inflammatory dendritic epidermal cells), а также дермальные дендритные клетки поглощают экзогенные антигены и аутоантигены, высвобождаемые из поврежденных клеток, тем самым поддерживая Th2-зависимый иммунный ответ. Активированные Th2-клетки высвобождают $IL4$ и $IL13$, способствующие выработке IgE посредством В-клеток. ILC2 являются источником $IL5$ и $IL13$ и могут дополнительно усиливать иммунный ответ и, как следствие, продукцию IgE [78].

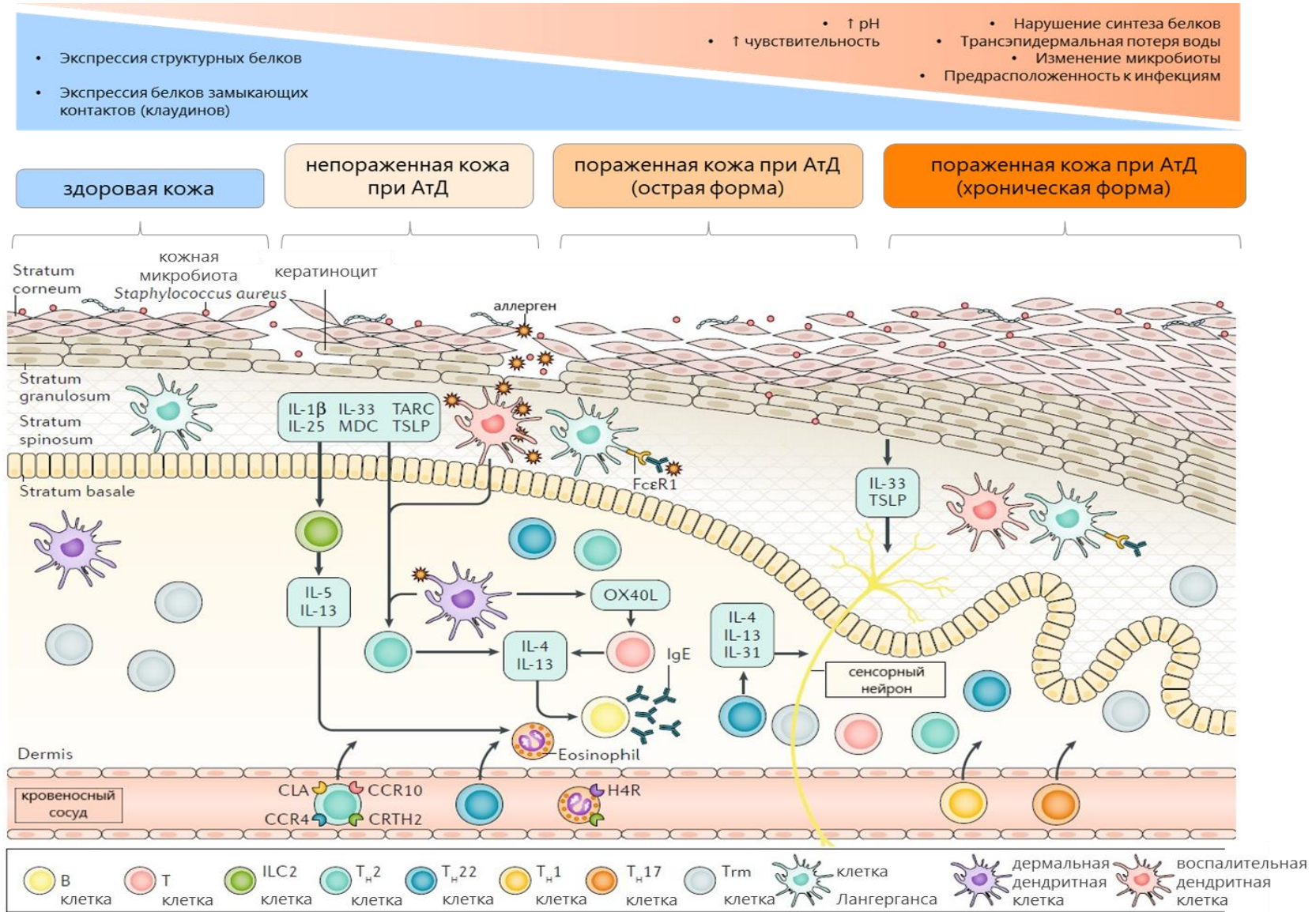


Рисунок 3 – Стадии иммунопатогенеза атопического дерматита.
 Модифицированный рисунок Weidinger и соавт. [78]

T-клетки экспрессируют различные молекулы адгезии, обеспечивающие сродство к коже, в частности антиген лимфоцитов кожи (CLA), а также хемокины (CCR4 и CCR10) и липидные хемоаттрактантные рецепторы (молекула, гомологичная хемоаттрактантному рецептору, экспрессируемая на Th2-клетках, – CRTH2). В поврежденную кожу также привлекаются эозинофилы, экспрессирующие CRTH2 и гистаминовый рецептор (H4R). В отличие от здоровой кожи, кожа пациентов с АтД обладает повышенным количеством дендритных клеток, включая клетки Лангерганса, экспрессирующие высокоаффинные рецепторы IgE (FcεR1s). Антитела IgE, связанные с дендритными клетками с помощью FcεR1, способствуют поглощению аллергенов и иницированию реакции гиперчувствительности 4 (замедленного) типа [80]. IL33, TSLP и связанные Th2-цитокины напрямую взаимодействуют с сенсорными нейронами кожи, усиливая зуд. В патогенезе АтД также отведена роль T-клеточному цитокину IL31. Сигнал от IL31 передается непосредственно на нейроны, что вызывает зуд, а уровень этого цитокина в сыворотке крови коррелирует с тяжестью заболевания. Однако блокирующее воздействие на IL31, по-видимому, уменьшает только зуд, не влияя при этом на степень тяжести [81].

На стадии хронического заболевания смешанный T-клеточный инфильтрат и возможные аутоиммунные механизмы поддерживают длительное воспаление в коже и способствуют ее перестройке.

При АтД в пораженных участках кожи, как правило, клеточный инфильтрат, в основном состоит из CD4⁺ T-клеток, ключевых факторов воспаления, а также различных дендритных клеток, включая клетки Лангерганса, участвующие в усиленной презентации антигена. Более того, экспрессия генов, кодирующих белки, вовлеченные в поддержание целостности эпидермального барьера, снижается, а экспрессия генов Th-клеток увеличивается как в пораженной, так и в непораженной коже. В пораженных участках закономерно наблюдается изменение экспрессии гораздо большего числа генов, в основном связанных с активностью кератиноцитов и инфильтрацией T-клетками. Так, в частности, гены, кодирующие белки Th2-клеточного ответа (IL4, IL10 и IL13) и

Th22-клеточного ответа (IL22), находятся в активированном состоянии [12,57]. При этом в случае преобладания Th2-лимфоцитов происходит повышение уровня общего IgE, хотя воспалительные изменения в коже могут развиваться и без участия этого иммуноглобулина. Представленный вариант будет относиться к неаллергическому или смешанному эндотипу АтД.

В последние годы стали активно изучаться другие варианты Th-иммунного ответа, определяющие так называемые эндотипы заболевания. Множество работ указывает на то, что АтД является заболеванием, опосредованным не только Th2-вариантом иммунного ответа. Были выявлены Th17- и Th22-клетки в пораженной коже, как при остром, так и при хроническом течении, и продуцирующие, соответственно, IL17, IL22 и TNF α . Считается, что вариант иммунного ответа, или эндотип, зависит от течения заболевания, возраста пациента и его принадлежности к определенной этнической группе. Роль Th1- и Th17-зависимых вариантов иммунного ответа пока до конца не ясна, однако повышение уровня экспрессии соответствующих цитокинов, наблюдается при хронической стадии заболевания, в том числе у детей (хотя Th1-ответ характерен для старшей возрастной группы). Поэтому при АтД возможна зависимость от стадии заболевания (от острой к хронической) последовательная активация цитокинов Th2, Th17 и Th22 [82]. Кроме того, у детей с АтД наблюдается экспрессия Th9-цитокинов в пораженной коже по сравнению со взрослыми пациентами [13,76].

АтД классифицируется на фенотипы, исходя из уровня IgE (повышенного или нормального относительно возрастной нормы) [83]. Классический, или иначе, экзогенный фенотип (~ 70-80 % случаев заболевания) характеризуется высокими уровнями общего и/или аллерген-специфических IgE. Он коррелирует с Th2-иммунным ответом. Неаллергический тип, или эндогенный, не связан с сенсibilизацией к аллергенам [13]. Оба типа имеют сходную клиническую картину, связаны с эозинофилией. Однако эндогенный вариант АтД имеет отсроченный период манифестации заболевания, чаще всего развивается у женщин; нормальная барьерная функция кожи, как правило, не нарушена, а вероятность развития каких-либо сопутствующих атопических заболеваний

снижена [84]. В крови преобладают молекулы Th1-ответа, а локально в коже наблюдается более выраженная инфильтрация Т-клетками, клетками Лангерганса, миелоидными дендритными клетками; экспрессия АМП также выше, чем при экзогенном варианте фенотипа.

Во многом тот или иной вариант иммунного ответа связан с регуляцией генов его компонентов. Одними из механизмов, способных повлиять на активность этих генов, являются эпигенетические модификации, которые описаны в разделе 1.4.

1.4. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов при атопическом дерматите

Одни лишь генетические или экспрессионные изменения не дают полного понимания молекулярных механизмов, задействованных в патогенезе атопического дерматита. Объяснить то, каким образом воздействие окружающей среды влияет на риск развития аллергии, возможно, опираясь на эпигенетические механизмы, участвующие в осуществлении геномной адаптации к условиям среды.

Эпигенетические механизмы играют одну из ключевых ролей в иммунной регуляции и находятся под влиянием разнообразных факторов окружающей среды, приводящих к модификации активности генов.

Эпигенетика – определение, основные механизмы

Эпигенетика – это область исследований, посвященная изменениям в ДНК, которые не связаны с модификациями в ее основной последовательности. По сути, это факторы, опосредующие различные модификации ДНК, влияющие, в свою очередь, на работу генов [85]. Определенные эпигенетические модификации могут передаваться дочерним клеткам во время клеточного деления или от одного поколения к другому. Совокупность всех эпигенетических изменений в геноме называется эпигеномом.

В ядре ДНК плотно упакована, и, объединяясь с белками-гистонами, она образует хроматин, единицей которого служит нуклеосома, состоящая из молекул гистонов (H1, H2A, H2B, H3, H4) и намотанной на них ДНК (около 160 п.н.) [86].

К вариантам модификаций хроматина относятся:

- 1) ковалентные изменения гистоновых белков;
- 2) метилирование ДНК;
- 3) некодирующая РНК-зависимая регуляция.

Именно эти реакции и составляют основные эпигенетические механизмы, которые способны регулировать транскрипцию генов.

Посттрансляционные изменения гистоновых белков влияют на архитектуру хроматина, а также на его плотность и доступность для ферментных комплексов. На уровень сжатия хроматина влияют посттрансляционные модификации гистонов (ацетилирование, фосфорилирование, метилирование, убиквитинирование, сумоилирование). Ацетилирование гистонов приводит к тому, что хроматин становится более плотно упакованным, что блокирует транскрипцию, в то время как деацетилирование ослабляет структуру хроматина, активируя транскрипцию генов в этой области. Точно так же метилирование лизина в гистоне H3 (Lys 9 или Lys 27) приводит к подавлению гена, в то время как добавление метильной группы к лизину в положении 4 или 79 или к аргинину в положении 17 полипептидной цепи гистона H3 приводит к активации транскрипции генов [87].

Некодирующие РНК также являются важным сигнальным и регуляторным фактором. Они влияют на процесс транскрипции и изменение экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Микро-РНК (миРНК) состоят из класса небольших эволюционно консервативных некодирующих молекул длиной примерно 19-25 пар оснований, которые играют жизненно важную роль в регуляции посттранскрипционной экспрессии генов у эукариот [88]. Как только миРНК покидает ядро, она подвергается процессингу в цитоплазме под воздействием фермента DICER, и в ходе последовательных реакций происходит прекращение трансляции и, как следствие, ингибирование функции гена.

Считается, что 1-3 % генома человека регулируется этим эпигенетическим механизмом [89].

Тканеспецифичные миРНК функционируют на различных уровнях регуляции генов. Такие миРНК, как miR-21, miR-146 и miR-223, активируемые у пациентов с аллергическими расстройствами, также активируются в коже пациентов с атопическим дерматитом. В одном из исследований было показано, что miR-155 является наиболее активированной миРНК в образцах пораженной кожи от пациентов с атопическим дерматитом по сравнению с образцами кожи от здоровых людей. Функционально miR-155 подавляет цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 - CTLA-4), отрицательно регулирующий функции Т-клеток. Такая супрессия усиливает пролиферативный ответ Т-клеток, что приводит к длительно поддерживающимся хроническим воспалительным реакциям [90].

Процессы метилирования, гидроксиметилирования или деметилирования цитозина в регуляторных последовательностях гена (промоторном или энхансерном участке) изменяют транскрипцию этого гена. В случае если основания ДНК цитозин и гуанин находятся рядом друг с другом, а к цитозину добавляется метильная группа, это может приводить к «молчанию» определенных генов, характеризующемуся их инактивацией и предотвращением транскрипции. Метилирование цитозина представляет собой один из наиболее распространенных эпигенетических механизмов, регулирующих экспрессию генов [91].

Метилирование ДНК

Метилирование ДНК было исследовано у большого количества организмов. Оно связано с различными биологическими процессами и механизмами, включая регуляцию генов, организацию генома, размножение и развитие организма, а также патогенез заболеваний (в том числе онкологических) и процессы старения. Это наиболее хорошо изученный эпигенетический механизм, который часто используется как классический пример эпигенетического наследования [92].

Метилирование является эпигенетической модификацией ДНК, которая позволяет регулировать экспрессию гена. Метилирование в промоторной зоне гена, как правило, приводит к подавлению его транскрипции (Рисунок 4).

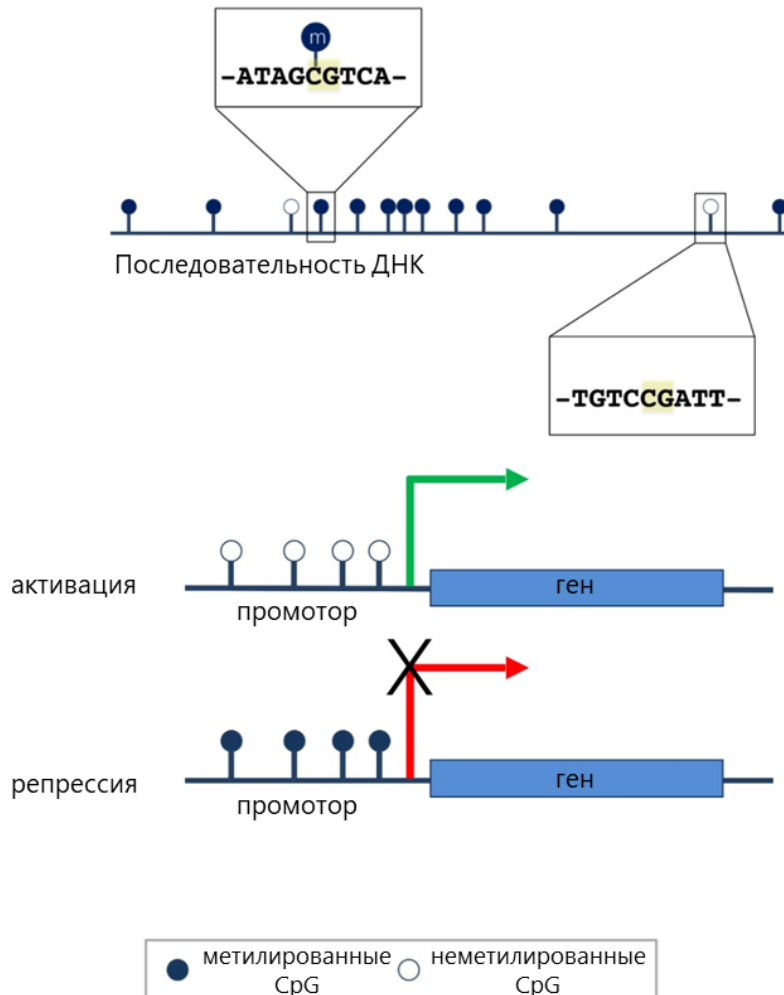


Рисунок 4 – Метилирование ДНК в CpG-островках. Влияние метилирования на регуляцию генов

Как отмечалось ранее, наиболее распространенный пример метилирования – это присоединение метильной группы к C_5 атому цитозина, который расположен рядом с гуанином (так называемый CpG димер) [91]. Метилированный цитозин может окисляться особыми ферментами, что в конечном итоге приводит к его деметилированию обратно в цитозин и восстановлению транскрипционной активности. CpG-островки расположены в ~

40 % промоторных областей генов млекопитающих. При этом около 80 % от общего числа динуклеотидов CpG генома находятся в метилированном состоянии. В промоторах активно транскрибируемых генов динуклеотиды CpG, как правило, деметилированы.

Процесс метилирования катализируется определенными ферментами — ДНК-метилтрансферазами (ДНК-МТ). Считается, что около 60–70 % оснований цитозина постоянно находятся в метилированном состоянии. Остатки последовательностей CpG-островков составляют около 70 % промоторных областей генома человека и указывают направление транскрипции. Механизм метилирования включает в себя специфический сигнальный инструмент, который, по-видимому, сдерживает добавление специфических регуляторных белков к цепи ДНК, ингибируя процесс транскрипции. Напротив, деметилирование цитозина, катализируемое ферментами транслокации TET (Ten-Eleven-Translocation), запускает промотор и стимулирует транскрипцию определенных последовательностей. Было показано, что клетки со сходной функцией имеют аналогичные паттерны метилирования генов [91,93].

На экспрессию генов также может оказывать влияние метилирование участков супер-энхансеров (SE, super-enhancers), которые представляют собой тканеспецифичные регуляторные геномные элементы, связанные с хроматином и запускающие специфические изменения активности генов при процессах развития, дифференцировке, а также при патологических состояниях [94]. Как показано на Рисунке 5, метилирование в промоторной области предотвращает экспрессию гена независимо от метилирования энхансерного участка.

Гены могут быть минимально экспрессированы при неметилированном промоторном участке, даже при метилировании области SE, но максимальная экспрессия гена достигается как с неметилированным промотором, так и с неметилированным SE.

Разные клетки при различных физиологических условиях обладают индивидуальным паттерном метилирования. Это означает, что цитозин может быть либо метилирован, либо нет, а порядок расположения метильных групп в

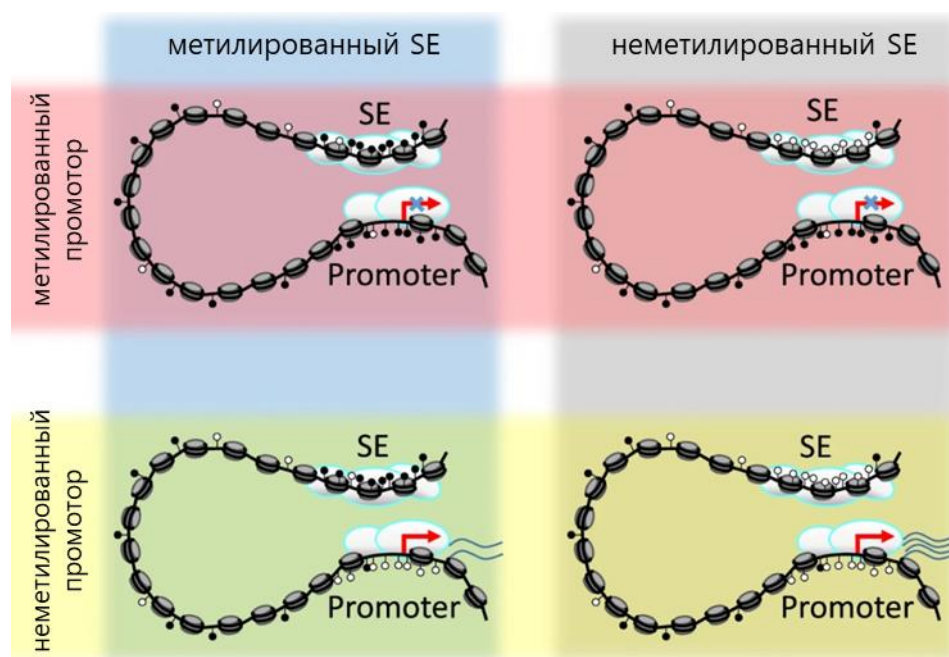


Рисунок 5 – Схематическое изображение влияния метилирования ДНК в промоторном и супер-энхансерном участке (SE) на экспрессию гена. Модифицированный рисунок Flam и соавт. [94]

молекуле ДНК определяет, какие гены и с какой интенсивностью будут участвовать в биосинтезе кодируемых ими белков. Так, без существенного изменения паттерна метилирования невозможно представить ни деление клетки, ни ее принадлежность к определенной ткани или субпопуляции. Метилирование участвует в регуляции гаметогенеза, эмбрионального и плацентарного роста, а также процессах импринтинга и эпигенеза [95].

Открытие гидроксиметилированной ДНК (5hmC), образующейся в ходе окисления 5mC ферментами транслокации ТЕТ, вызвало широкий интерес к определению потенциальной роли 5hmC в ремоделировании метилома. Способность белков ТЕТ дополнительно окислять 5hmC до 5-формилцитозина (5fC) и 5-карбокситозина (5caC), которые затем могут быть вырезаны тимин-ДНК-гликозилазой при репарации оснований и заменены на немодифицированный цитозин, вероятно, влияет на динамику паттерна метилирования ДНК при раннем эмбриогенезе, в нормальной клетке, а также при развитии патологических процессов [96].

Известно, что с возрастом метилом человека претерпевает существенные изменения, что влечет за собой развитие различных заболеваний (например, онкологических, сердечно-сосудистых). Сегодня стало возможно анализировать регуляторные модификации ДНК, определяющие биологический возраст человека (т.н. эпигенетические часы, представляющую из себя математическую модель).

Паттерн, или, другими словами, распределение метилированных оснований, меняется в патологических условиях. Так, в раковых клетках изменения паттерна метилирования существенным образом влияют на транскрипционную активность и нарушение сигнальных путей в клетке. Аналогичные изменения происходят при аутоиммунных заболеваниях. Гиперметилирование CpG-островков зачастую связано с сайленсингом (или подавлением) генов-супрессоров опухолевого роста, а также генов, контролирующих рост клеток и связанных с ними сигнальных путей [96]. Гипометилирование ДНК при опухоли связано с нестабильностью генома и увеличению вероятности анеуплоидии. Снижение уровня ДНК-МТ способно приводить к увеличению частоты мутаций, анеуплоидий и развитию опухолей. Аналогичные изменения происходят при аутоиммунных и, вероятно, при аллергических заболеваниях [97,98].

Метилирование при атопическом дерматите

Известно, что изменения эпигенетической регуляции факторов иммунной системы и кожного барьера вносят свой вклад в патогенез атопического дерматита. В период развития клеток иммунной системы эпигенетические механизмы участвуют в специфических изменениях вариантов иммунного ответа.

Эпигенетические изменения играют основную роль в процессах дифференцировки субпопуляций Т-лимфоцитов, ключевых клеток патогенеза АтД. Эпигенетическая активация Th2-лимфоцитов, продуцирующих цитокины IL4, IL5 и IL13 в результате активации фактора транскрипции GATA3, происходит за счет деметилирования промоторов гена *IL13*, *IL4* и метилирования гистона H3 в этой области. В случае смещения реакций в сторону Th1-клеток CpG-островки в промоторах генов *IL4*, *IL13*, *IL17A* и фактора транскрипции гена *RORC*, напротив, подвергаются метилированию, также происходит

деметилование фактора TBX21. В соответствующих гистонах H3 наблюдается снижение метилирования. Деметилование в гене *FOXP3*, ацетилование остатка H3 и метилирование, сопровождающееся гиперметилованием гена *RORC* и метилированием остатка H3, способствует дифференцировке клеток Th0 в направлении регуляторного фенотипа T (Treg). Напротив, метилирование промотора *FOXP3* и деметилование *RORC* приводит к дефициту Treg, что является одной из особенностей патогенеза АтД [93].

Регуляторные T-клетки (Tregs) играют важную роль в раннем иммунном программировании и формировании адекватного иммунного ответа в отношении проаллергического или толерантного состояний. Tregs лучше всего характеризуются экспрессией фактора транскрипции 3 (Foxp3), который важен для индукции и стабильности Treg [99]. Foxp3 контролируется метилированием его регуляторных областей транскрипции. Индуцированные естественным путем посредством TGF- β Foxp3⁺ Treg свидетельствуют о стабильной экспрессии Foxp3, которая связана с избирательным деметилованием эволюционно сохранившегося элемента в локусе Foxp3 – Treg-специфической деметилованной области (Treg-specific demethylated region, TSDR). Важно, что стабильная экспрессия Foxp3 была выявлена только в клетках с повышенным уровнем деметилования TSDR [100].

До сих пор не ясно, насколько постоянный характер носят модификации, вызванные процессом метилирования, и можно ли воздействовать на них, изменяя активность ферментов, запускающих реакции ремоделирования. В последнее время проводится все больше исследований в этой области. В Таблице 1 приведены изученные данные о процессах метилирования некоторых генов врожденного и адаптивного иммунитета, участвующих в патогенезе АтД.

Таблица 1 – Профиль метилирования некоторых генов, ассоциированных с атопическим дерматитом

Ген, белковый продукт и его функция	Краткое описание исследования
<p><i>DNMT1</i>, DNA methyltransferase 1. ДНК-метилтрансфераза 1 относится к основным ферментам, отвечающим за процесс метилирования.</p>	<p>В ходе оценки статуса метилирования у пациентов с атопическим дерматитом путем измерения экспрессии мРНК ДНК-метилтрансферазы-1 в мононуклеарных клетках крови методом количественной ПЦР-РВ было выявлено, что уровень экспрессии DNMT-1 мРНК имел тенденцию к снижению у пациентов по сравнению со здоровыми людьми, в особенности в тех случаях, когда уровень IgE был повышен [15].</p>
<p><i>FCER1G</i>, Fc epsilon receptor Ig. Высокоаффинный рецептор IgE – FcεRI.</p>	<p>В промоторной области <i>FCER1G</i> было выявлено тотальное гипометилирование в CD14⁺ моноцитах у пациентов с атопическим дерматитом, а также локус-специфическое гипометилирование промоторной области <i>FCER1G</i> по сравнению с контролем. Кроме того, гипометилирование <i>FCER1G</i> способствовало его повышенной экспрессии. Авторы показали, что деметилирование специфических регуляторных элементов в локусе <i>FCER1G</i> способствует увеличению экспрессии FcεRI в моноцитах у пациентов с атопическим дерматитом, что, в свою очередь, ведет к выраженному аллергическому ответу. В данном исследовании впервые было показано, что изменения эпигенетической регуляции гена <i>FCER1G</i> могут служить объяснением патологической активации FcεRI на моноцитах пациентов с АД [16].</p>

Продолжение Таблицы 1

<p><i>TSLP</i>, Thymic stromal lymphopoietin. Тимический стромальный лимфопоэтин поддерживает гомеостаз Т-клеток.</p>	<p>Уровни экспрессии мРНК и белка <i>TSLP</i> относительно β-актина были достоверно выше в участках пораженной кожи пациентов с атопическим дерматитом по сравнению со здоровым контролем. Помимо этого в пораженных участках кожи было выявлено гипометилирование промоторной области гена <i>TSLP</i>, содержащей 16 CG-пар. При обработке кератиноцитов клеточной линии HaCaT 5-aza уровень метилирования промотора <i>TSLP</i> достоверно снижался, а транскрипция увеличивалась, свидетельствуя о том, что aberrантные эпигенетические модификации играют важную роль в патогенезе данного заболевания [17]. В другом исследовании было выявлено, что изменения метилирования <i>TSLP</i> 5'CGI уменьшают регулируемую функцию иммунной системы и вызывают развитие аллергического воспаления Th2-типа при атопическом дерматите [101].</p>
<p><i>MICAL3</i>, Microtubule associated monoxygenase, calponin and LIM domain containing 3. Член семейства флавопротеинмонооксигеназ <i>MICAL</i>, участвующих в управлении аксонами и ремоделировании актина посредством окисления его молекул или продукции АФК.</p>	<p>АФК, индуцированные повышенной экспрессией <i>MICAL3</i>, способны подавлять антиоксидантную защиту плода, что приводит к последующему развитию атопического дерматита в течение первых 3-х лет жизни. Этот процесс, вероятно, также влияет на тяжесть протекания атопического дерматита, поскольку установлена корреляция между экспрессией мРНК <i>MICAL3</i> и индексом тяжести атопического дерматита [18].</p>

Продолжение Таблицы 1

<p><i>DEFB1</i>, Defensin beta 1. Человеческий β-дефензин-1 (HBD-1) – уникальный антимикробный пептид, экспрессируемый в различных тканях, в том числе и в коже.</p>	<p>Было показано, что подавление HBD1 в клеточной линии нормальных человеческих эпидермальных кератиноцитов регулируется механизмом эпигенетической инактивации, включающим метилирование ДНК 14 динуклеотидов CpG в 5'-области <i>DEFB1</i>. Для идентификации конкретных сайтов CpG, играющих существенную роль в экспрессии <i>DEFB1</i> в этих клетках, были определены профили метилирования шести динуклеотидов CpG (от CpG 3 до CpG 8). В пораженной АтД коже частота метилирования в сайтах CpG 3 и CpG 4 внутри промотора <i>DEFB1</i> была значительно выше, чем в здоровой коже [19].</p>
--	--

Также на сегодняшний день существует несколько полногеномных исследований ДНК-метилирования в контексте АтД [102]. Здесь из массива полученных данных отбирались гены, чей профиль метилирования различался в материале от пациентов и здоровых людей.

В работе Han и соавт. приводилось сравнение atopического дерматита и псориаза. Оба заболевания характеризуются наличием направленного иммунного ответа посредством поляризованных CD4⁺ Т-клеток. Во время поляризации наивных CD4⁺ Т-клеток метилирование ДНК играет важную роль в регуляции транскрипции генов. Было проведено исследование профиля метилирования полногеномной ДНК наивных CD4⁺ Т-клеток у пациентов с atopическим дерматитом, псориазом, а также у здоровых людей с применением метода ChIP-seq. Гипометилирование ДНК (более чем в 4 раза) было обнаружено в образцах Т-клеток, выделенных от пациентов с псориазом и здоровых людей, в 26 областях генома размером от 10 до 70 т.п.н. Эти регионы были в основном перичентромерными на 10 разных хромосомах и случайно совпадали с различными определяющими эпигеномными сигналами, такими как H3K4Me1, H3K27Ac и H3K4Me3, а также с сайтами связывания факторов транскрипции в различных типах клеточных линий. Пока неясно, какую роль эпигенетические изменения в этих областях играют в развитии Т-клеток. Тем не менее, полученные данные впервые указывают на важность таких изменений в развитии иммуноопосредованных кожных заболеваний [20,21].

В работе Rodríguez и соавт. был проведен анализ метилома цельной крови, Т-клеток, В-клеток, а также пораженного и непораженного эпидермиса пациентов с atopическим дерматитом и здоровых людей при помощи Human Methylation27 BeadChеар с целью определения связанных с atopическим дерматитом тканеспецифичных различий в метилировании ДНК. Связь прослеживалась именно в случае сравнения сходной ткани у разных индивидуумов для различных сайтов CpG, которые частично коррелировали с измененными уровнями транскриптов генов, главным образом относящихся к процессам дифференцировки эпидермиса (гены S100A) и реакциям врожденного иммунного

ответа – таким образом, данное исследование подтверждает высокий уровень тканеспецифичности для паттернов ДНК метилирования. Было выявлено 9 областей, достоверно связанных с атопическим дерматитом: в генах *CFLAR*, *GPR55*, *MMP7*, *LOC283487*, *SH2D2A* и *ERP27* эти области были гипометилированы, а в генах *LRRC8C*, *S100A5* и *EBP49* – гиперметилированы. В ходе проведенного анализа экспрессии полногеномной мРНК (с использованием HumanHT-12v3 Expression BeadChip) были выявлены достоверные различия в семи транскриптах при сравнении образцов пораженной кожи пациентов с атопическим дерматитом и кожи здоровых людей. Из девяти выбранных пар дифференциально экспрессированных транскриптов при помощи системы EpiTYPER и количественной ПЦР были успешно валидированы следующие комбинации, связанные с развитием атопического дерматита: *KRT6A/KRT6A* и *KRT6A/KRT6B* (кодируют кератин); *IFI27/IFI27*, *OAS2/OAS2* (относятся к семейству белков, регулируемых интерферонами), *GDPD3/GDPD3* и *S100A5/S100A2* (входят в состав эпидермального дифференциального комплекса) [22].

Еще одно полногеномное исследование метилирования ДНК было проведено с использованием технологии Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip. В ходе сравнения пораженных и непораженных участков кожи у пациентов с атопическим дерматитом различия в профиле метилирования выявлено не было. Это говорит о том, что эпигенетические изменения затронули всю кожу целиком, хотя и не проявились в клинически неизмененных ее участках. Однако при сравнении пораженной дерматитом кожи с кожей здоровых волонтеров были выделены дифференциально метилированные гены областей TSS200 и TSS1500, чьи белковые продукты были вовлечены в патогенез атопического дерматита и связанные с ним процессы: биосинтез стероидных гормонов и клеточный метаболизм (*HSD17B14*, *HSD17B*), дифференцировку эпителия (*KRT31*, *LCE3D*), регуляцию ДНК-зависимую транскрипцию и РНК-процессинг (*DMBX1*, *MTO1*, *SNORD93*, *WDR36*) иммунный ответ и активацию лимфоцитов (*AIM2*, *CD300E*, *CLEC1A*, *DEFB135*, *IL23A*), активацию

трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (*LTFP1*), клеточную пролиферацию и апоптоз (*SERPINB3*, *EPR1*) [23].

В другом полногеномном эпигенетическом исследовании рассматривались различия в метилировании ДНК при атопическом дерматите вкупе с герпетической экземой (ГЭ), и было выявлено, как меняется метилирование у пациентов с атопическим дерматитом, осложненным или неосложненным ГЭ. Было обнаружено 490 значимо дифференцированно метилированных CpG-сайта. Помимо этого была выявлена репликация для одного CpG-участка, связанного с общим сывороточным IgE, в гене *IL4*, а также возможная репликация для четырех CpG-участков, связанных с ГЭ, в генах *IL13* и *IL4*. Авторы также показали, что уровень эозинофилов играет важную роль в паттернах метилирования у людей с атопическим дерматитом, что посредством молекулярных механизмов может привести к фенотипическим изменениям заболевания [24].

Данных о роли эпигенетических механизмов регуляции врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе атопических заболеваний недостаточно, поскольку эти механизмы обладают определенной комплексностью. Описанные гены-кандидаты, вовлеченные в такие патологические процессы как дисфункция эпидермального барьера, усиленная передача сигналов Th2-иммунитета, ослабленные реакции врожденного иммунитета, играют роль в патогенезе атопического дерматита. Однако данных по их эпигенетическому профилю практически нет. Они важны, не только по причине уточнения патогенеза заболевания, но и ввиду того, что могут являться потенциальными мишенями при диагностике и терапии АтД [103]. Эти данные могут способствовать поиску и подбору новых лекарственных средств, направленных на эпигенетические механизмы при атопическом дерматите.

1.5. Диагностика и лечение атопического дерматита – текущая ситуация

При подборе лечения АтД зачастую не учитывается степень гетерогенности проявлений этого заболевания и его эндотипы [104]. Из-за отсутствия

персонализированного подхода в некоторых случаях положительного эффекта от лечения не наблюдается.

Надежных биомаркеров, которые позволили бы отличить АтД от других, близких к нему по симптоматике заболеваний кожи, в настоящее время нет. Примерно у 80 % больных АтД повышен уровень IgE [4]. Из оставшихся 20 % у некоторых пациентов уровень IgE возрастает по мере развития заболевания. При этом повышение IgE может быть вызвано другими причинами, например, неспецифичными аллергенами, инфекциями, некоторыми онкологическими и аутоиммунными заболеваниями.

Открытие новых разновидностей Т-лимфоцитов, новых цитокинов и хемокинов расширило границы по поиску специфичных биомаркеров АтД. К числу перспективных вариантов относятся определение концентраций в сыворотке крови CCL17, CD22, CD30, IL12, IL16, IL18 и IL31. Для некоторых из перечисленных цитокинов показана строгая корреляция со степенью тяжести АтД. С другой стороны, ни для одного из них не показана достаточная специфичность, чтобы их можно было использовать в клинической практике для диагностики АтД.

Лечение атопического дерматита

Традиционные подходы к лечению АтД включают в себя наружную (топическую) терапию (например, эмоленты, глюкокортикоидные препараты, ингибиторы кальциневрина), фототерапию и системные биологические препараты [29,72,105]. Также в лечебную практику вошли препараты-ингибиторы кальциневрина и фосфодиэстеразы-4.

Топическое, или местное, лечение атопического дерматита направлено на восстановление барьерной функции кожи и подавление воспалительной реакции [106]. Этот подход используется при заболеваниях легкой и средней степени тяжести, а также в качестве адъювантной терапии у пациентов, нуждающихся в системной иммуносупрессивной терапии [107]. Цель такого лечения также заключается в поддержании периодов ремиссии и снижении количества обострений.

Основой терапии АТД является ежедневное применение увлажняющих средств, поддерживающих целостность кожного барьера и тем самым подавляющих воспаление. У детей с высоким риском развития АТД раннее введение увлажняющих средств может снизить риск развития заболевания и развития аллергии первого типа. В случае легкой и среднетяжелой форм АТД как у взрослых, так и у детей необходимо устранять воспаление кожи, и препаратами выбора в таком случае являются топические глюкокортикоиды. Их следует наносить на пораженные участки один раз в день. Также можно использовать топические ингибиторы кальциневрина (такролимус и пимекролимус), их эффективность считается сходной с топическими глюкокортикоидами II класса. Появляются и новые препараты для лечения АТД, первыми из которых были зарегистрированы ингибиторы ФДЭ-4, а также ингибиторы JAK/STAT.

В стадии обострения заболевания средства для наружной терапии применяют один раз в день до исчезновения экземы, обычно около двух недель. Если заболевание все же обостряется в течение короткого времени после прекращения терапии, в таком случае рассматривается возможность проактивного лечения с применением топических средств два раза в неделю.

У топических лекарственных средств есть ряд недостатков: они не устраняют системное воспаление, у пациентов часто возникают рецидивы, а в случае средней и тяжелой степени заболевания эффективность терапии может снижаться, поскольку площадь поражения кожи больше [105].

Системная иммуносупрессивная терапия в течение многих лет была вариантом лечения тяжелых форм АТД. На сегодняшний день для лечения атопического дерматита у взрослых в большинстве европейских стран одобрен только циклоспорин. Из-за некоторых побочных эффектов применение этого препарата стараются ограничить одним годом. Также ведутся контролируемые исследования по применению метотрексата, азатиоприна и микофенолата мофетила. Важно отметить, что системные кортикостероиды используют только для краткосрочных вмешательств (т. е. менее трех недель на курс) при тяжелых обострениях АТД. Системная терапия также имеет свои недостатки, поскольку

при долгосрочном применении повышается риск развития нежелательных явлений и индивидуальной непереносимости [105].

За последнее десятилетие подходы к лечению АтД расширились. Новый вариант терапии заключается в определении роли различных цитокинов и иммунных сигнальных путей, участвующих в АтД, и подбору терапевтических средств к ним.

При среднем и тяжелом течении заболевания и при отсутствии противопоказаний возможно применение альтернативных средств – системных биологических препаратов – человеческих моноклональных антител, которые блокируют эффекты некоторых цитокинов (в частности, IL4, IL13, IL31), а также ингибиторов сигнальных путей JAK/STAT (основной список лекарственных средств приведен в Таблице 2) [2,12,108,109].

Таблица 2 – Новые лекарственные средства для системного применения при АтД

Название лекарственного средства	Молекулярная мишень	Стадия клинического исследования
Антитела		
Dupilumab	Рецептор IL4, IL13	3 фаза
Lebrikizumab	IL13	2 фаза
Tralokinumab	Рецептор IL13	2 фаза
Nemolizumab	IL31	2 фаза
Fezakinumab	IL22	2 фаза
Tezepelumab	TSLP	2 фаза
Малые молекулы		
Baricitinib	JAK1 / JAK2	2 фаза
ZPL3893787	H4-гистаминовый рецептор	2 фаза

Накопленные знания о сложной взаимосвязи дисфункции эпидермального барьера и активации иммунного ответа позволяют лучше понимать концепцию атопического дерматита. Однако новые клинические и фундаментальные исследования необходимы для уточнения вовлеченных в патогенез АД механизмов, разработки эффективных лекарственных средств. Высокопроизводительные генетические, эпигенетические полногеномные исследования наряду с применением молекулярных технологий в сочетании с вычислительными инструментами для статистики дадут более широкое представление о патогенезе атопического дерматита, его эндотипам, позволяя реализовать подход персонализированной таргетной терапии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика клинических групп

В исследование был включен 81 ребенок. Из них в работе основную группу составили 55 пациентов с диагнозом «Атопический дерматит», проходивших лечение во ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (директор: д.м.н., профессор Фисенко А. П.) в отделении дерматологии и аллергологии (заведующий: д.м.н., профессор Мурашкин Н. Н.). Участниками исследования являлись 34 мальчика и 21 девочка; средний возраст составил 14 лет (от 6 до 18 лет). В исследуемые группы были включены пациенты с различной степенью тяжести АД: среднетяжелой (n=38) и тяжелой (n=17). Контрольную группу составили 26 относительно здоровых детей от 6 до 18 лет. Забор материала у представителей контрольной группы проводился в КДЦ ФГБНУ «НИИВС им. И. И. Мечникова».

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГБНУ «НИИВС им. И. И. Мечникова» (протокол заседания локального совета по этике № 5 от 12 мая 2022 г.). В установленном порядке пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании и согласие на обработку персональных данных.

Ниже приведены критерии включения и исключения для участников исследования.

Критерии включения для пациентов:

1. А. Дети в возрасте от 6 до 12 лет, находящиеся в стационаре, с подтвержденным диагнозом «Атопический дерматит» (МКБ-10: L20) в стадии обострения.
Б. Дети в возрасте от 12 до 18 лет, находящиеся в стационаре, с подтвержденным диагнозом «Атопический дерматит» (МКБ-10: L20) в стадии обострения.
2. Наличие очагов поражения (высыпаний) в области локтевых и подколенных сгибов, а также другой локализации.
3. А. Пациенты, получающие местную терапию (местные глюкокортикостероиды и ингибиторы кальциневрина; эмоленты).
Б. Пациенты, получающие системную терапию (дупилумаб).
4. Наличие подписанного информированного согласия.

Критерии включения для здоровых добровольцев:

1. Индивидуумы в возрасте от 6 до 18 лет.
2. Отсутствие любого дерматологического заболевания в анамнезе.

Критерии исключения для всех групп:

1. Сопутствующие заболевания иммунной системы.
2. Длительное применение (более 14 дней) иммунодепрессантов или других иммуномодулирующих препаратов в течение шести месяцев, предшествующих исследованию.
3. Прием антибактериальных препаратов, включая местные препараты, в течение месяца до участия в исследовании.
4. Выраженные врожденные дефекты или серьезные хронические заболевания, в том числе любые клинически значимые заболевания легких, почек, сердечно-сосудистой, нервной системы, психиатрических заболеваний или метаболических нарушений, подтвержденных данными анамнеза или объективным обследованием.

5. Наличие (подтвержденных лабораторными методами исследования) острых инфекционных и/или неинфекционных заболеваний на момент включения в исследование.
6. Одновременное участие в другом клиническом исследовании.
7. Неспособность соблюдения пациентом условий протокола (по мнению исследователя).
8. Отказ пациента, родителей или опекунов от участия в исследовании.

Все пациенты получали препараты наружного применения (местные глюкокортикостероиды средней и высокой активности, топические ингибиторы кальциневрина). 20 пациентов основной группы дополнительно получали системную терапию генно-инженерным биологическим препаратом дупилумаб. Препарат вводился подкожно в соответствии с инструкцией. Для пациентов с массой тела от 15 до 30 кг начальная двойная доза составляла 600 мг, далее по 300 мг каждые 4 недели; для пациентов с массой тела от 30 до 60 кг: начальная двойная доза – 400 мг, далее по 200 мг каждые 2 недели; для пациентов с массой тела 60 кг и более: начальная двойная доза – 600 мг, далее по 300 мг каждые 2 недели.

Тяжесть АД оценивали с применением метода SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis) [40]. При расчете индекса SCORAD принимаются во внимание три условных показателя: распространенность патологического кожного процесса, выраженность клинических проявлений и субъективная оценка пациентом своего состояния. Среднетяжелая форма АД коррелировала с показателями индекса от 25 до 50; тяжелая форма – более 50. Графический дизайн исследования представлен на Рисунке 6.

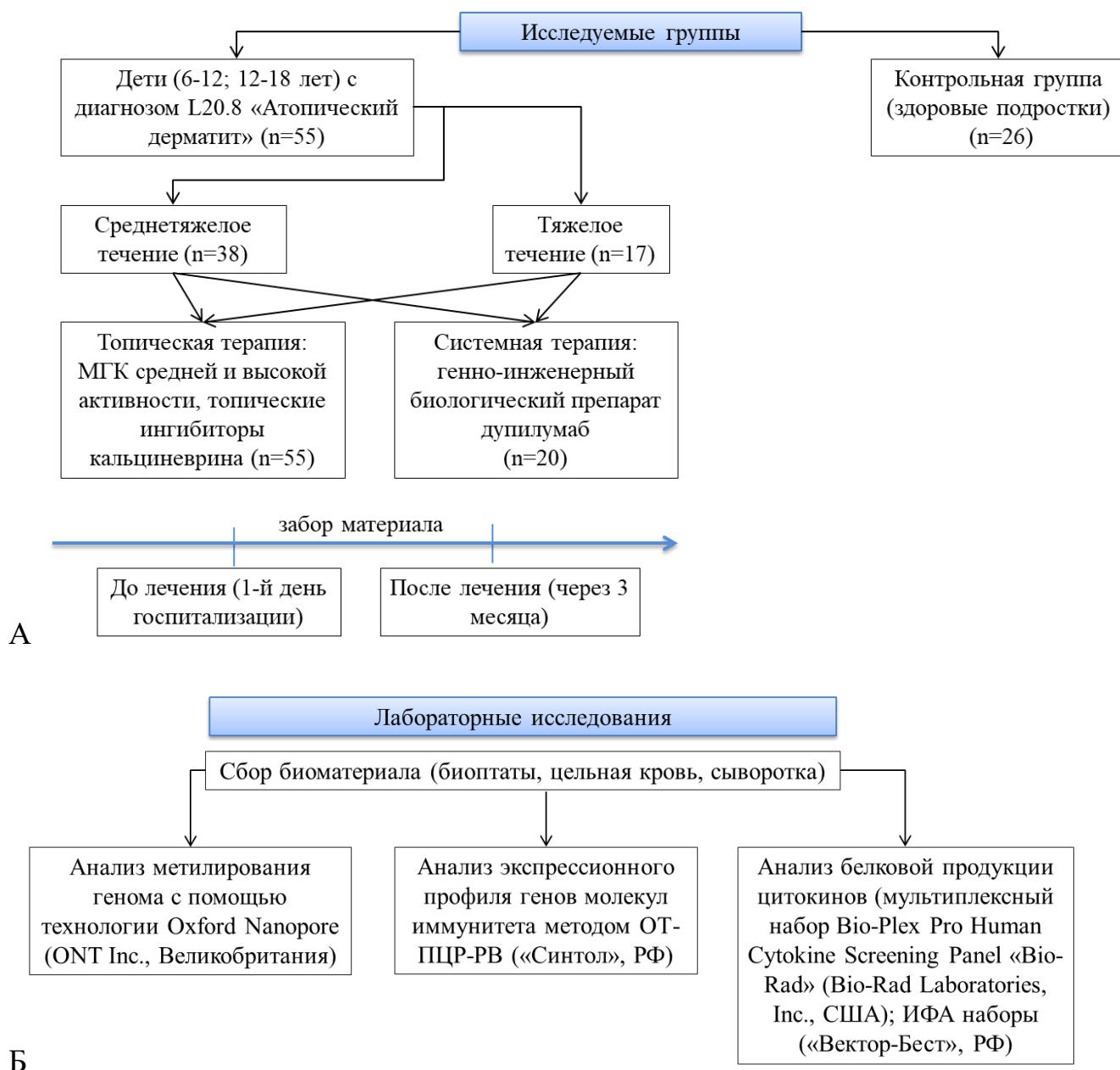


Рисунок 6 – Графическое изображение дизайна исследования: характеристика клинических групп (А) и проводимые лабораторные исследования (Б)

Материалом для исследования являлись биоптаты пораженных участков кожи, образцы цельной крови и сывороток.

При проведении биопсии использовали метод панч-биопсии с применением циркулярного ножа (пробойника) диаметром 2 мм (Dermo Punch, Sterylab, Италия). Этот подход позволяет получить столбик ткани кожи, содержащего все ее слои вплоть до подкожной жировой клетчатки. Манипуляцию осуществляли с

применением местной анестезии с 2 % раствором лидокаина строго до начала лечения. Свежие образцы помещали в пробирки эппендорф (1,5 мл) со стабилизационным раствором «RNA later» (Invitrogen, США) в объеме 1 мл и в тот же день передавали во ФГБНУ «НИИВС им. И. И. Мечникова», где хранили при температуре минус 80 °С.

Забор образцов цельной крови в объеме 6 мл осуществляли в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (K2EDTA), а образцов сывороток в объеме 2 мл – в пробирки с гелем и активатором свертывания (Vacuette, Greiner Bio-One, Австрия). Образцы крови собирали как до, так и после лечения (через 3 месяца) и не подвергали замораживанию. Пробирки с сыворотками центрифугировали 10 мин при 2500 g после чего сыворотки переливали в пробирки эппендорф объемом 2 мл и хранили при температуре минус 80 °С. Транспортировку образцов осуществляли с использованием холодной цепи.

2.2. Методы

Ниже представлен дизайн исследования. Учитывая тип и цель каждого эксперимента, в условиях лаборатории последовательно был проведен ряд манипуляций с клиническими образцами от пациентов с АтД и здоровых доноров. Все полученные результаты анализировались, подвергались статистической обработке и визуализации.

2.2.1. Выделение ДНК из биоптатов кожи

Для того чтобы провести полногеномное исследование метилома, были взяты образцы биоптатов от трех пациентов с АтД и трех здоровых доноров. Из биоптатов выделяли геномную ДНК согласно инструкции к набору «Monarch Genomic DNA purification kit» (New England Biolabs, США) методом экстракции нуклеиновой кислоты на спин-колонках. Для этого замороженные образцы биоптатов кожи гомогенизировали в ступке в присутствии жидкого азота, затем

добавляли фермент Proteinase K и приступали к лизированию ткани, выделению и очистке геномной ДНК. ДНК элюировали деионизированной водой «Nuclease-free water» (NEB, США). Полученная ДНК проходила двойную проверку по качеству, концентрации и фрагментированности. Эти параметры оценивали при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) и флуориметра Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). В норме для контроля чистоты ДНК соотношение оптических плотностей $A_{260}/A_{280} \sim 1,8$, а соотношение A_{260}/A_{230} находилось в диапазоне 2,0-2,2. Пример образца ДНК, соответствующий указанным параметрам, приведен на Рисунке 7.

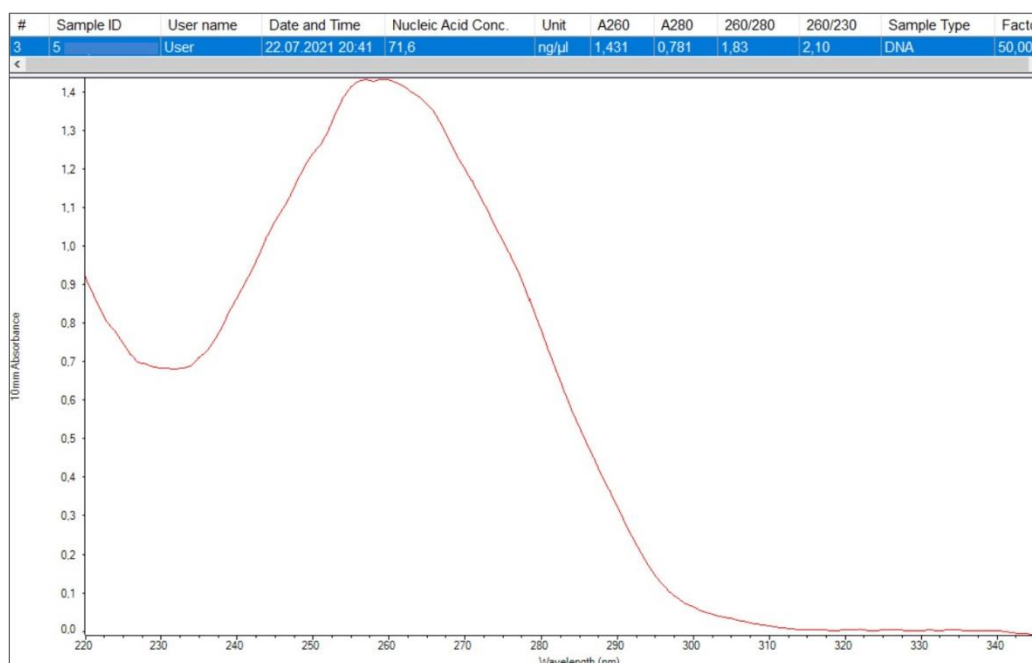


Рисунок 7 – Пример спектра геномной ДНК от здорового донора, взятой в работу.

По оси абсцисс показаны значения длины волны (нм), по оси ординат – степень поглощения. Концентрация нуклеиновой кислоты равна 71,6 нг/мкл; соотношение оптических плотностей $A_{260}/A_{280} = 1,83$, соотношение $A_{260}/A_{230} = 2,10$

2.2.2. Исследование паттернов метилирования методом глубокого (высокоэффективного) секвенирования

Метод высокоэффективного секвенирования – группа экспериментальных подходов, применяемых для выявления первичной структуры (последовательности нуклеотидов) в ДНК или РНК, а также для выявления ее характерных особенностей, одной из которых является паттерн метилирования. Благодаря тому, что прибор одновременно секвенирует множество разных биомолекул одного и того же типа, удается обработать существенно больший объем данных и при этом значительно сократить время, необходимое для проведения полногеномного исследования.

Для проведения секвенирования использовали секвенатор III поколения MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания), позволяющий делать прямое прочтение цепей ДНК. Длина прочтения при этом ограничена только размером фрагмента.

Принцип действия технологии основывается на взаимодействии белковой поры, или «нанопоры», которая служит биосенсором и встроена в электрически устойчивую полимерную мембрану, с нуклеиновой кислотой исследуемого образца. В условиях постоянного напряжения и при наличии раствора электролита через нанопору проходит ток ионов так, что отрицательно заряженные одноцепочечные молекулы ДНК или РНК проходят через ее мембрану с отрицательно заряженной «*cis*» стороны на положительно заряженную «*trans*» сторону. Скорость транслокации контролируется моторным белком, который поэтапно продвигает молекулу нуклеиновой кислоты через нанопору. Изменения ионного тока во время транслокации соответствуют нуклеотидной последовательности, проходящей через сенсорную область, и далее расшифровываются с использованием вычислительных алгоритмов, позволяющих секвенировать отдельные молекулы в реальном времени [110]. Схема принципа метода представлена на Рисунке 8.

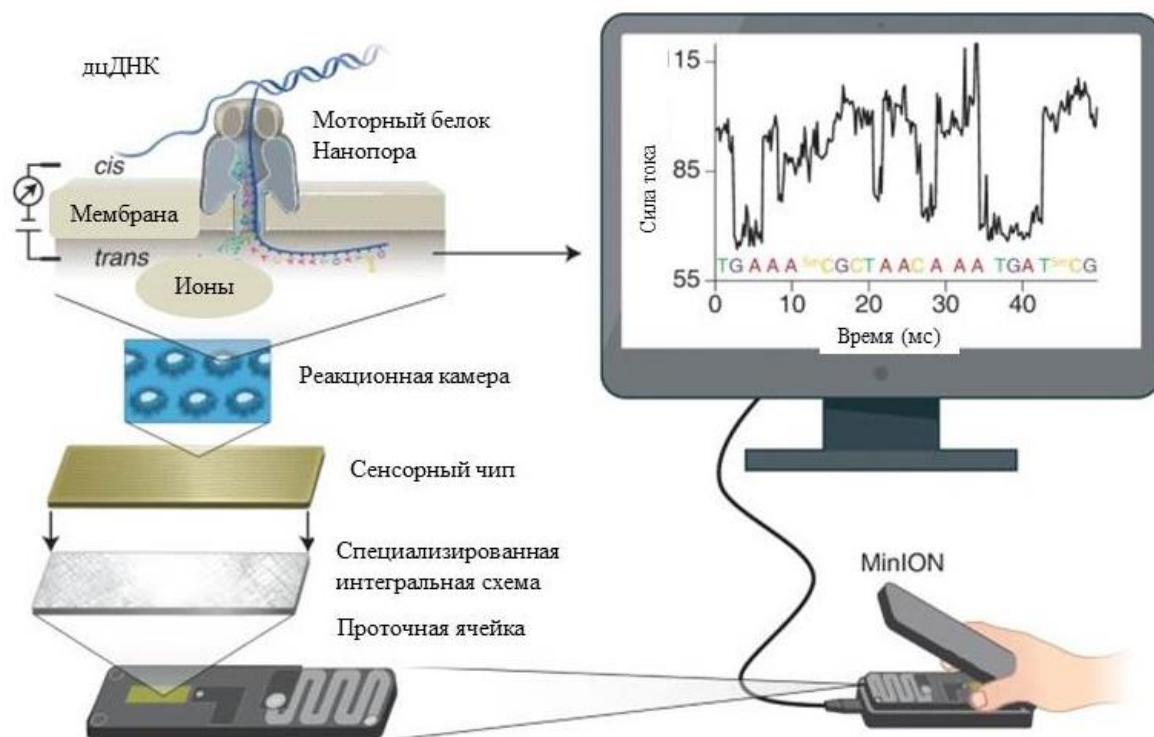


Рисунок 8 – Принцип технологии нанопорового секвенирования. Модифицированный рисунок из статьи Wang и соавт. [110]

В ходе работы применяли протокол лигирования ДНК (№SQK-LSK109), основными этапами которого являются восстановление концов высокомолекулярной ДНК образца, а именно затупление «липких концов» двуцепочечных фрагментов ДНК, аденилирование, восстановление ее целостности (комплект реагентов NEBNext FFPE Repair Mix и NEBNext Ultra II End repair/ dA-Tailing Module, New England Biolabs, США); лигирование белков-адаптеров, или моторных белков (набор реагентов Ligation Sequencing Kit, Oxford Nanopore Technologies, Великобритания); загрузка готового образца в прибор (Flow Cell Proming Kit, Oxford Nanopore Technologies, Великобритания), как представлено на Рисунке 9. Между ключевыми этапами подготовки ДНК проводили отмывку с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, США). Для анализа использовали проточные ячейки SpotON Flow Cell (R9.4.1).

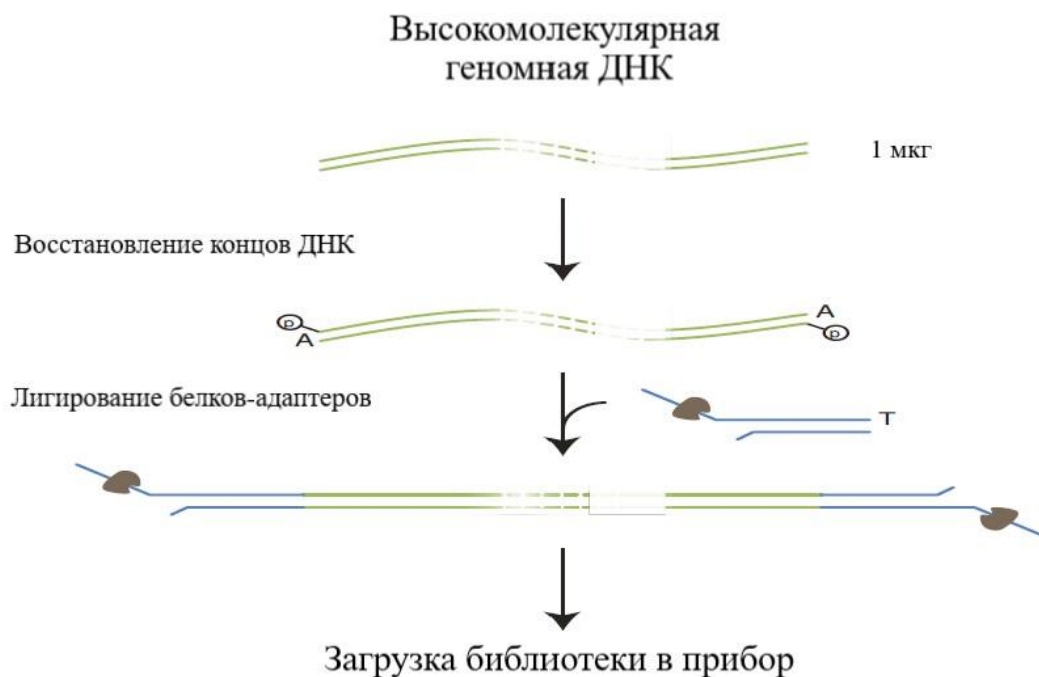


Рисунок 9 – Этапы пробоподготовки ДНК образцов перед загрузкой в секвенатор. Модифицированный рисунок из протокола 1D Genomic DNA by Ligation (SQK-LSK109), Oxford Nanopore, версия GDE_9063_v109_revA_23May2018

2.2.3. Биоинформатический анализ данных секвенирования

Проведение биоинформатического анализа проводилось совместно с научным сотрудником кафедры генетики биологического факультета МГУ им. И. М. Ломоносова Наумовой Е. А. Для бейсколлинга необработанных считываний нанопор FAST5 были использованы пакеты Guppy и Remora, инструменты, позволяющие получать высокоточные модифицированные вызовы из последовательности [111]. Была использована модифицированная расширенная модель вызова из репозитория Rerio R9.4.1, MinION / GridION, 5mC CpG от Rerio, с параметрами (guppy-config res_dna_r941_min_modbases_5mC_CpG_v001.cfg).

С помощью набора программ BWA bowtie, полученные FASTA файлы были сопоставлены с эталонным геномом человека Homo_sapiens.GRCh38.dna.primary_assembly.fa и исходящие .bam файлы отсортированы и проиндексированы с помощью samtools.

Для обнаружения метилированных оснований (5-метилцитозина в контексте CpG) с помощью программы modbam2bed модификации были агрегированы на геном. Полученные .bed-файлы далее подвергались фильтрации и объединению между собой.

С помощью пакета «DSS» для R и DMR алгоритмом был сопоставлен уровень метилирования между образцами здоровой и пораженной кожи [112]. В ходе анализа был получен интерактивный отчет для общего количества дифференциально метилированных интервалов (3441). В интервалах были определены гены, которые затем были отсортированы по функциям и уровню дифференциального метилирования. В то же время, при проведении анализа не рассматривали те участки генома, в которых различия по уровню метилирования между группами образцов составляли менее 10 %. На Рисунке 10 представлен обобщающий алгоритм действий, примененный для обработки первичных, или так называемых «сырых», прочтений.

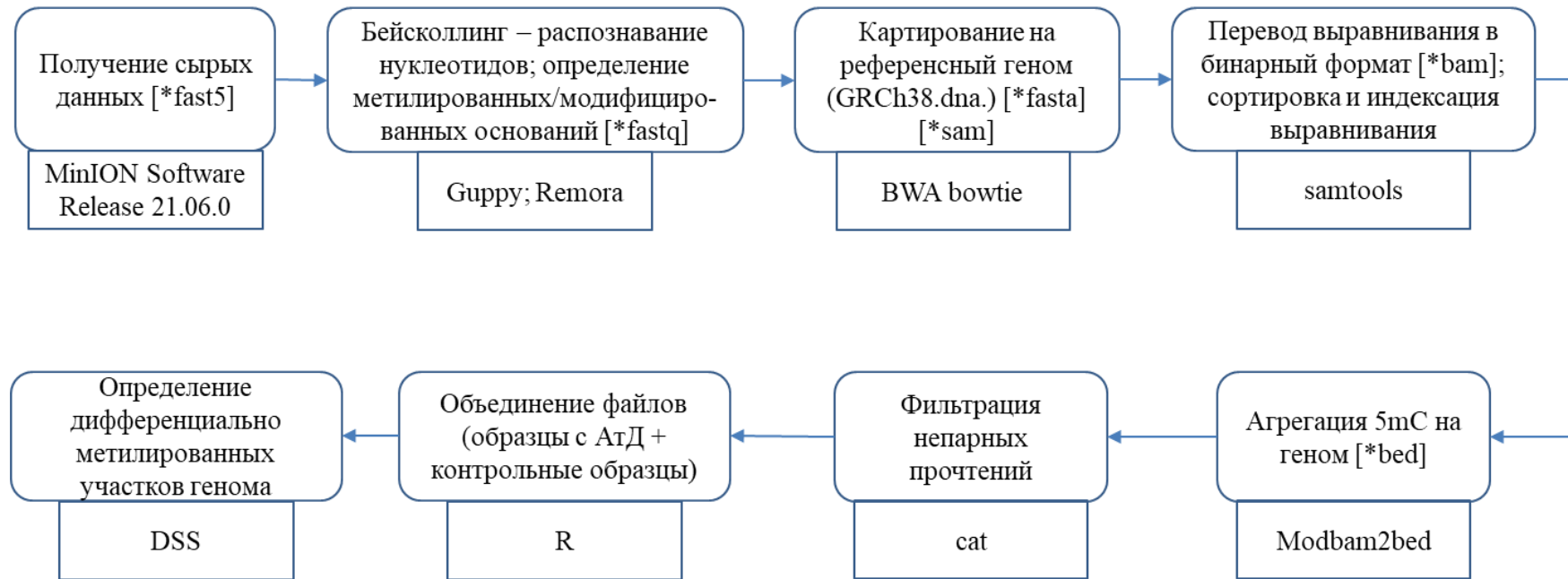


Рисунок 10 – Схема этапов биоинформатического анализа полученных данных по полногеномному метилированию. Представлен набор программ и инструментов для выполнения пошаговой обработки данных

При анализе паттернов метилирования (Рисунок 11) использовали статистический показатель *areaStat* (сумму значений t-тестов для каждого сайта дифференциального метилирования в последовательности гена или на выбранном интервале ДНК). При использовании этого параметра разница уровней метилирования у пациентов с АтД и здоровых добровольцев считалась тем больше, чем больше значение *areaStat*, и наоборот. Таким образом, значения ниже 0 на оси ординат соответствовали менее метилированным областям генома в коже больных АтД, а значения выше 0 – более метилированным участкам.

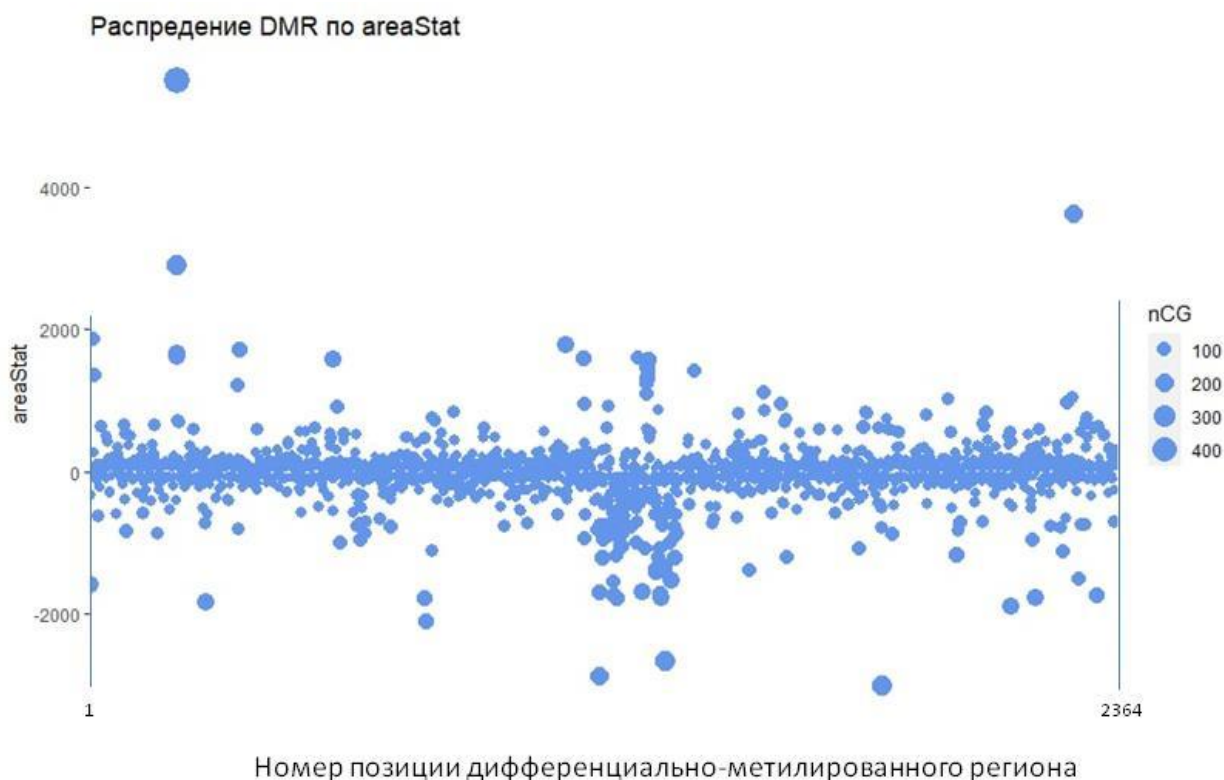


Рисунок 11 – Распределение дифференциально метилированных генов в геноме больных АтД. *nCG* – количество CpG сайтов на участке с дифференциальным метилированием. Чем больше количество CpG сайтов, тем больше диаметр обозначающего его круга. *areaStat* – статистический показатель, определяющий степень метилирования

Для предварительной систематизации выявленных дифференциально метилированных генов был проведен их онтологический анализ [113] с

использованием электронных ресурсов DAVID [114], Enrichr [115], а также геномного браузера UCSC Genome browser [116].

Для предварительной классификации компьютерная программа сортирует список генов по группам установленного состава в соответствии с указанными критериями. Затем программа определяет долю каждой группы в анализируемом списке генов и сравнивает ее с аналогичным показателем по геному в целом. Статистически достоверное превышение первого показателя над вторым указывает на то, что некоторая клиническая патология (развитие признаков АД в коже пациента) проявляет себя в изменении уровня метилирования конкретной группы генов. Такие группы генов определяют как наиболее встречающиеся в выборке по сравнению с другими группами, в которых статистически достоверного превышения показателя нет. Поскольку описываемый анализ основан на множественных сравнениях групп генов, чтобы уменьшить вероятность ложноположительного результата полученные значения вероятности (p) умножают на определенную величину, называемую поправкой. Всего существует несколько видов поправок, наиболее известны из которых поправки Бонферрони и Бенжамини.

2.2.4. Выделение мононуклеарных клеток крови

Выделение МНК проводили методом седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фикола ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) [117]. Кровь из пробирок с ЭДТА наслаивали на 7мл фикола (ПанЭко, Россия) и центрифугировали 25 мин при 1200 g, +20 °С. Затем отбирали слой мононуклеарных клеток и два раза проводили отмывку раствором DPBS (ПанЭко, Россия), центрифугировали в течение 15 мин при 400 g, +20 °С. Надосадочную жидкость отбирали. После этого сразу переходили к протоколу выделения РНК из осадка МНК. Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева, стандартная концентрация клеток составляла млн/мл.

2.2.5. Выделение РНК из клинического материала

Выделение РНК из МНК и биоптатов кожи проводили при помощи реагента «Extract RNA» (Евроген, Россия), являющимся монофазным водным раствором фенола и гуанидин-изотиоцианата. МНК из пробы брали в полном объеме ($\sim 1 \times 10^6$ клеток), а биоптат кожи массой ~ 100 мг измельчали пестиком в ступке под жидким азотом. Экстракцию осуществляли в соответствии с прилагаемым к реагенту протоколом. После добавления к лизату хлороформа в объеме 200 мкл и центрифугирования при 12000g 15 мин отбирали водную фазу (~ 400 мкл), содержащую общую РНК. После осаждения РНК растворяли в деионизированной воде (Синтол, Россия), хранили при температуре минус 80 °С. Для контроля чистоты РНК соотношение оптических плотностей $A_{260}/A_{280} \sim 2,0$, а соотношение A_{260}/A_{230} находилось в диапазоне 2,0-2,2.

2.2.6. Реакция обратной транскрипции

Выделенную РНК из образцов биоптатов кожи и МНК пациентов с АтД и здоровых людей использовали для проведения реакции обратной транскрипции (набор «ОТ-1», Синтол, Россия) строго при прилагаемому протоколу с целью получения первой цепи кДНК. Для реакции в работу брали образцы тотальной РНК массой ~ 1 мкг. Полученную кДНК хранили при температуре минус 80 °С и далее использовали для проведения полимеразной цепной реакции.

2.2.7. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Полимеразная цепная реакция (избирательная амплификация ДНК) – это наиболее часто применяемый «валидационный» метод. Амплификацию ДНК часто используют для независимого подтверждения результата, полученного другим методом.

Комплементарная ДНК (кДНК), полученная в ходе реакции обратной транскрипции, использовалась для определения экспрессии выбранных генов (*TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, *DEFB1*) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Для этого с помощью программы Primer-BLAST (NCBI, США) подбирали специфичные последовательности праймеров, комплементарных участкам определяемых генов, как видно из Таблицы 3 [118].

Таблица 3 – Специфичные последовательности праймеров (F – прямые, R – обратные)

Название гена	Последовательности праймеров
<i>TLR2</i>	F5`CCAGCAAATTACCTGTGTGA3` R5`CCCACATCATTTTCATATAC3`
<i>TLR9</i>	F5`TGGTGTGGAAGGACAGTTCTCTC3` R5`CACTCGGAGGTTTCCCAGC3`
<i>CAMP</i>	F5`TGGTGAAGCGGTGTATGGGG3` R5`TCCGGAAGAAATCACCCAGCA3`
<i>IL4</i>	F5`TCCACGGACACAAGTGCGA3` R5`GAAGGGACACGGGCTGATGG3`
<i>IL13</i>	F5`CGGTCATTGCTCTCACTTGCCT3` R5`GTTGATCAGGGATTCCAGGGC3`
<i>DEFB1</i>	F5`GCAGTGGAGGGCAATGTCTC3` R5`TTCCCTCTGTAACAGGTGCCTT3`

Для проведения реакции использовали «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» (Синтол, Россия) в соответствии с прилагаемой методикой. Матрицу кДНК добавляли в объеме 2 мкл. Реакционная смесь содержала 2,5 мкл 10х ПЦР-буфера Б, 1 мкл каждого праймера (10 пкмоль/мкл), 2,5 мкл MgCl₂ (25 мМ), 2,5 мкл dNTP (2,5 мМ), 0,3 мкл SynTaq ДНК-полимеразы (5 Е/мкл), 13,5 мкл деионизированной воды. Общий объем смеси составлял 25 мкл. ПЦР-анализ в режиме реального времени проводили на приборе «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Hiden, Германия). Реакция проводилась при условиях, представленных в Таблице 4.

Таблица 4 – Условия проведения ПЦР для заданных генов

Температура	Время	Количество повторов (циклов)	Этап
95 °С	5 мин	1	прогрев
95 °С	15 с	40	отжиг и элонгация
60 °С (или 58 °С)*	50 с		
95 °С	15 с	100	плавление

Примечание – 60 °С для *TLR2*, *TLR9*, *IL13*, *DEFB*; 58 °С для *IL4*, *SAMP*

Программное обеспечение амплификатора позволяет получить данные по пороговому циклу (C_t), при котором кривая амплификации и прямая порога чувствительности прибора пересекаются. На Рисунке 12 показана детекция сигнала флуоресценции при определении экспрессии гена *TLR9* у части образцов.

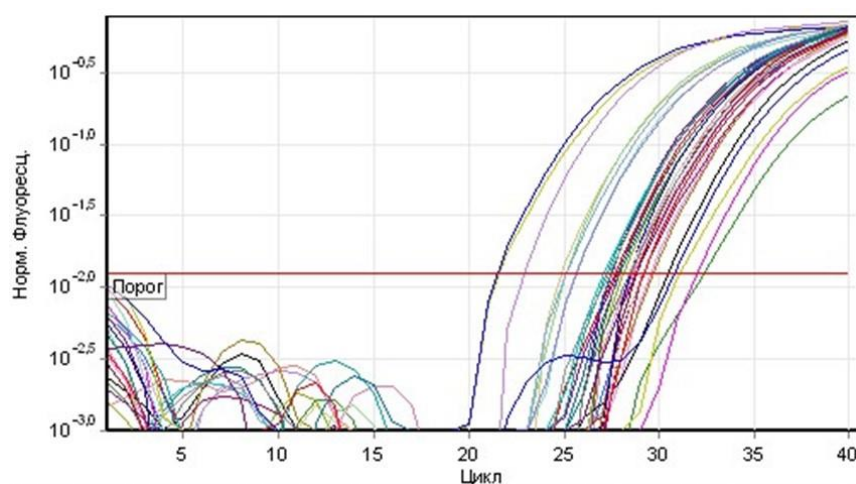


Рисунок 12 – Пример детектируемых пороговых циклов некоторых образцов при определении экспрессии гена *TLR9*

Обработка полученных данных (C_t) осуществлялась методом $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства β -актина (*ACTB*) [119]. Так, на первом этапе определяли ΔC_t :

$$\Delta C_t = C_t(\text{интересующего гена}) - C_t(\text{гена домашнего хозяйства})$$

Далее определяли $\Delta\Delta C_t$:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{группа с АтД}) - C_t(\text{контрольная группа})$$

Для определения значений относительной экспрессии полученный результат преобразовывали следующим образом: $2^{-\Delta\Delta C_t}$

Полученные значения $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ использовали далее для статистического анализа и построения графиков.

2.2.8. Иммуноферментный анализ

Мультиплексный иммуноферментный анализ (ИФА) – разновидность ELISA, которая позволяет одновременно (в одной пробе) определить несколько десятков растворимых белков. Определение уровня цитокинов в сыворотке крови проводили с использованием системы мультиплексного анализа MAGPIX (Bio-Rad, США). Для измерения использовали набор реактивов Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel (Bio-Rad). Были получены данные для 48 аналитов.

Анализ проводили строго по прилагаемой к набору методике. В основе метода, при помощи которого проводили измерение, лежит реакция взаимодействия антиген-антитело на поверхности окрашенных магнитных микросфер – группу флуоресцентно меченых микросфер диаметром около 6,5 мкм. Флуоресцентная метка обеспечивает идентификацию типа микросфер с нанесенными на них антителами, с которыми впоследствии связываются исследуемые антигены. После связывания тестового образца захватывается частицей, вводятся биотинилированные антитела для детекции. Для завершения реакции реакционную смесь затем инкубируют со стрептавидиновым – PE конъюгатом, репортной молекулой. Качественный и количественный анализ осуществлялся с помощью двух светодиодных источников, возбуждающих

внутренние красители каждого набора микрочастиц, и флуоресцентный краситель PE на репортерной молекуле.

Также определяли уровень общего IgE с помощью наборов реагентов (Вектор-Бест, Россия) методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител к IgE. Анализ проводили строго по прилагаемой инструкции. Детекцию проводили в диапазоне длин волн от 460 до 620 нм. Для измерения оптической плотности использовался спектрофотометр (EL_x800, «BIO-TEK INSTRUMENTS INC.», США). Полученные данные переводили в значения концентраций с использованием калибровочной кривой.

Все полученные данные концентраций далее подвергали статистическому анализу.

2.2.9. Статистические методы анализа

Полногеномный анализ дифференциально метилированных участков ДНК проводили при помощи пакета программ DSS для R, где применялся статистический показатель areaStat как сумма значений t-тестов [112].

Анализ полученных данных проводился в несколько этапов в программах Excel (Microsoft, США), GraphPad Prism (GraphPad Software, США).

В случае анализа экспрессии генов были посчитаны медианы значений $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ для каждого ряда данных с учетом группы, типа клинического материала, периода забора клинического материала. В случае мультиплексного ИФА были посчитаны медианы значений концентраций по каждому параметру. На основании этих данных были построены графики медианных значений уровней маркеров, представляющих из себя диаграммы размаха (box-plots) для визуального изображения групп числовых данных через квартили. «Box» диаграммы размаха представляет собой квартили Q₁ и Q₃, линия между которыми обозначает медиану; «планки» указывают на степень разброса данных.

Каждую отдельную анализируемую выборку проверяли на нормальность распределения данных при помощи построение графика типа «Q-Q plot»

(квантиль-квантиль график) с целью дальнейшего подбора критериев достоверности.

Статистическая достоверность между двумя группами данных была рассчитана при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни. В случае сравнения трех и более групп данных использовали непараметрический H-критерий Краскела-Уоллиса.

Оценку корреляционной зависимости для непараметрических ранговых величин проводили по методу Спирмена [120].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При атопическом дерматите происходят молекулярные перестройки, затрагивающие как локальный уровень (кератиноциты, иммунные клетки кожи), так и системный уровень (клеточные и гуморальные факторы иммунитета). Однако информации о механизмах, регулирующих эти изменения, практически нет.

В иммунопатогенезе АтД участвуют описанные ранее различные факторы, в том числе характеризующие нарушение баланса Th-клеток и соответствующих им цитокинов, опосредующие продукцию сывороточного IgE и сенсibilизацию к аллергенам, нарушенную продукцию АМП и так далее. Крайне важно исследовать не только степень выработки этих иммунологических факторов (например, экспрессию кодирующих их генов, или количество их белковой продукции в определенной ткани), но и регуляцию этого процесса в клетках. Так, в частности, вызванные метилированием изменения генной экспрессии оказывают влияние на уровень продукции иммунологического фактора и опосредованно на развитие патологического процесса, связанного с нарушением барьерной функции кожи и инициацией иммунного ответа в ней.

Таким образом, целью данной работы является изучение изменений некоторых ключевых иммунологических факторов на молекулярном уровне в патогенезе АтД. На первом этапе работы в кератиноцитах кожи были определены и выделены группы дифференциально метилированных генов, отличающихся в образцах пораженной кожи пациентов и непораженной кожи здоровых детей (раздел 3.1.). Полученные метелированные и деметелированные гены были определены в иммунных сигнальных путях, в большей степени задействованных в патогенезе АтД. По этим данным был сформирован список генов (рецепторов, цитокинов, противомикробных пептидов), по уровню экспрессии которых можно было бы сделать выводы о влиянии метилирования на патологический процесс в период обострения АтД (раздел 3.2.). Их экспрессия оценивалась не только в кератиноцитах кожи, но и в мононуклеарных клетках крови. На следующем этапе

определялось количество белка ряда эффекторных молекул в сыворотке крови (раздел 3.3.). Эти данные сопоставлялись с результатами по экспрессии, а также оценивался комплексный вклад метилирования в регуляцию генов, чьи белковые продукты формируют общие сигнальные пути, характерные для АтД.

3.1. Сравнение профилей метилирования кожи пациентов с атопическим дерматитом и здоровых детей

В данном исследовании описаны ключевые изменения паттерна метилирования при АтД, поскольку это может способствовать более детальному пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе заболевания, а также определению его специфичных биомаркеров.

Для первого этапа исследования был взят материал от детей с тяжелой формой атопического дерматита. При сравнении образцов от пациентов с АтД и здоровых детей были показаны изменения в метилировании 3441 участка геномной ДНК. Из числа установленных дифференциально метилированных участков ДНК были отобраны 2364 области с соответствующими им конкретными генами. Среди выявленных генов отбирались те, которые имеют отношение к процессам, связанным с патогенезом АтД (~ 24 % генов).

Для предварительной систематизации выявленных дифференциально метилированных генов был проведен их онтологический анализ с использованием электронного ресурса DAVID (см. раздел 2.2.3.). Это позволило выделить несколько кластеров генов, белковые продукты которых участвовали в сигнальных путях, характерных для АтД. Гены проклассифицировали по их участию в иммунных процессах, как представлено в таблице А.1 Приложения А, а также по наличию у них определенных молекулярных функций, как показано в таблице А.2 Приложения А.

Согласно полученным результатам, классификация дифференциально метилированных генов по их участию в иммунологических процессах выявила 14 групп. На основании этого было сделано предположение о том, что работа

составляющих их генов будет зависеть от изменений в паттерне метилирования. Соответствующий дифференциально метилированным генам уровень белковой продукции связан с развитием АтД. Стоит отметить, что в группе клеточных процессов были также выявлены кластеры генов, связанных с функционированием клеток нервной системы (образование синапсов, развитие нервной системы, формирование аксонов, дифференцировка нейронов, миграция нейронов). Наличие категорий процессов, связанных с работой нервной системы, среди дифференциально метилированных генов при АтД в первую очередь объясняется полифункциональностью генов, экспрессия которых не ограничена конкретным органом или тканью. Во-вторых, клетки кожи и нервной системы связывает общность их происхождения. По этой причине, нарушение регуляторных механизмов в клетках кожи приводит к изменению экспрессии генов в нервной ткани.

Далее представлены описания выявленных генов по группам, для которых были установлены наиболее достоверные статистические отличия. Гены объединены по функциям и по процессам, имеющим место в определенных клетках (кератиноцитах или иммунных клетках кожи). Для генов, вовлеченных в патогенез АтД, были представлены соответствующие им дифференциально метилированные участки (см. Приложение Б).

Несколько групп генов из Таблицы А.1. были связаны с изменением транскрипции. Сюда в первую очередь относятся транскрипционные факторы. Стоит отметить, что транскрипционные изменения являются одной из сторон, способствующих развитию АтД. Транскрипционные исследования позволяют определить роль генов, кодирующих различные ферменты и белки, задействованные в нарушении проницаемости эпидермального барьера, изменениях в системе врожденного и приобретенного иммунитета [121].

Так, в кератиноцитах ген транскрипционного фактора *ENMT1*, чей белковый продукт представляет собой гистоновую метилтрансферазу, показал повышенный уровень метилирования по сравнению с контролем. Поскольку ген *ENMT1* является одним из ключевых регуляторов модификации хроматина, при

снижении его активности посредством метилирования процессы, на которые он влияет (в частности, обновление клеток), будут нарушены при АтД. По литературным данным известно, что этот ген расположен в одном из локусов генома, связанных с развитием экзематозных проявлений при АтД [122].

Ген следующего транскрипционного фактора, *RUNX3*, по результатам данного исследования имел повышенную степень метилирования. В норме этот фактор в антигенпрезентирующих клетках (в том числе в кератиноцитах) подавляет транскрипцию генов, в частности, отвечающих за дифференцировку Th2-клеток и связанных с ними цитокинов, посредством взаимодействия с их энхансерами. Поэтому при подавлении активности *RUNX3*, как представлено в этой работе, баланс Т-клеток будет сдвигаться в сторону Th2. На Рисунке 13 показана визуализация гиперметирированной области для гена *RUNX3* в коже пациентов с АтД по сравнению с контролем. На парных графиках изображен выбранный интервал с указанным уровнем метилирования. В качестве статистического критерия дан параметр *areaStat* (см. раздел 2.2.3.), который в данном случае равен 1409,76, что подтверждает гиперметирирование кожи с АтД в указанной области.

Согласно ранее опубликованным исследованиям, полиморфизмы в последовательности *RUNX3* относятся к числу потенциальных биомаркеров и факторам риска АтД [123].

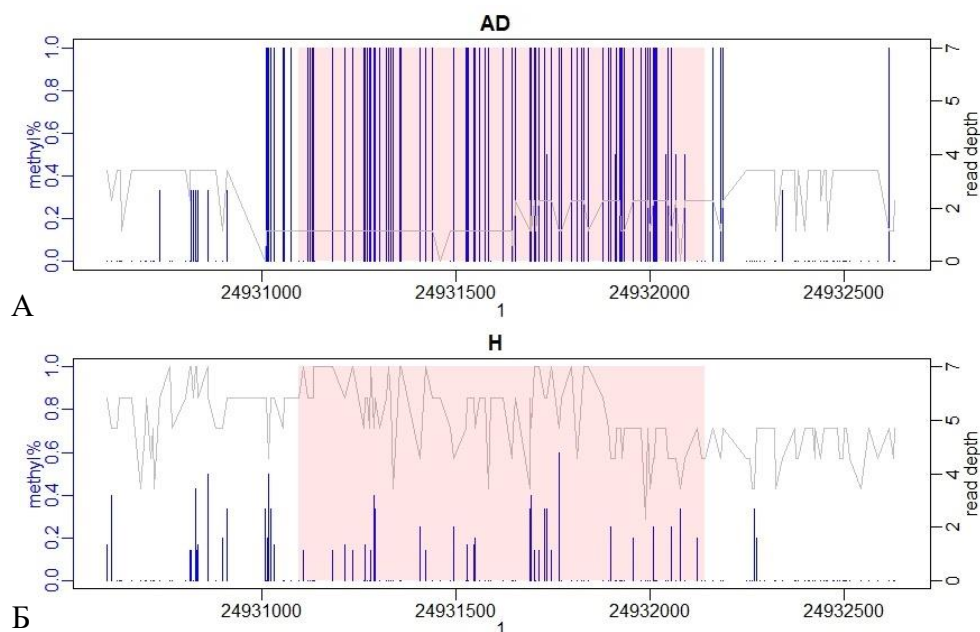


Рисунок 13 – Дифференциально метилированный участок (выделен розовым цветом) с соответствующим ему геном *RUNX3*. А – кожа с АтД, Б – здоровая кожа. Уровень метилирования (в процентах) представлен для каждого графика синим цветом. Также на обоих графиках изображена глубина прочтений описываемой области (серым цветом)

Еще один ген, ядерный фактор I (*NFI*), по полученным результатам обладал сниженной активностью в виду метилирования соответствующего ему гена. У отобранных для этого исследования пациентов с АтД ядерный фактор I не будет являться основной причиной поражения кожного барьера, поскольку именно повышенная активность субъединиц *NFI* приводит к нарушениям в процессе дифференцировки кератиноцитов посредством взаимодействия с поверхностным рецептором эпидермальных кератиноцитов *NPTNβ* [124].

Другой транскрипционный фактор, *CEBP-γ*, кодируемый геном *CEBPG*, активирует транскрипцию цитокинов *IL4*, *IL6* и *IL8*, регулируя работу их *ССААТ*-энхансеров [125]. То есть индукция *CEBPG* усиливает характерный для АтД *Th2*-иммунный ответ. Однако в данном исследовании этот ген был метилирован в группе пациентов с АтД, что указывает на снижение его активности. Метилирование в этом случае не способствует сдвигу иммунного ответа в

сторону противовоспалительного (Th2), что в целом поддерживает воспалительные реакции в пораженной коже.

Также к группе факторов, влияющих на транскрипцию, относится ген *MAPK14*, который кодирует белок p38 α . Этот белок относится к числу митоген-активируемых протеинкиназ. Его активация приводит к увеличению биосинтеза провоспалительных цитокинов при АтД, например, TNF α . При этом p38 α MAPK принимает участие и в других внутриклеточных процессах, включая аллергические реакции [126]. В этом исследовании результаты показали, что ген *MAPK14* метилирован у пациентов с АтД (Рисунок Б.1), свидетельствуя о снижении активности этого фактора, что влияет на нарушение продукции провоспалительных цитокинов. Сходные результаты показывают и эксперименты других исследований, проведенные на нокаутных мышах: в *in vivo* моделях атопического дерматита необратимая инактивация *MAPK14* приводила к снижению проявления воспалительного процесса.

В системе MAP-киназ, как правило, всегда задействовано несколько уровней MAPK [127,128]. Некоторые из них образуют димеры. В исследовании киназы, MAP2K4 и MAP2K2 обладали повышенным уровнем метилирования, а MAP2K6 и MAP3K8, наоборот, были деметилированы (Рисунки Б.2-Б.5). Подобное разнонаправленное действие поддерживает передачу сигнала на соответствующие факторы транскрипции, которые обеспечивают продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, поддерживающих патогенез АтД.

Важно отметить, что среди выявленных дифференциально метилированных областей в коже определялись такие гены, чьи функции непосредственно пересекались с сигнальными каскадами клеток врожденного или приобретенного иммунитета. В частности, с процессами транскрипции было связано два фактора. Один из них, транскрипционный фактор GATA3, вошел в список дифференциально метилированных генов и оказался деметилирован в образцах с патологией (Рисунок Б.6). Активация этого фактора необходима для дифференцировки наивных CD4⁺ клеток в Th2-лимфоциты. Помимо этого GATA3

регулирует экспрессию цитокинов *IL4*, *IL5* и *IL13*, которые являются маркерами Th2-иммунного ответа при АтД [129].

Другой транскрипционный фактор, GATA4, чей ген также был деметилирован, обладает отличной от GATA3 функцией, поскольку активация GATA4 ингибирует образование тучных клеток в соединительной ткани из гемопоэтических клеток-предшественников костного мозга, что, в свою очередь, ослабляет развитие атопического воспалительного процесса [130].

Большая группа дифференциально метилированных генов (около 120 генов) кодирует белки, которые связаны с элементами цитоскелета и участвуют в изменении их формы, что способствует активации передачи сигнала внутри кератиноцитов в измененных условиях при патологии. Ниже описаны гены, чьи белковые продукты образуют сигнальные пути в кератиноцитах и связаны с патогенезом при АтД.

Протокадерин FAT1 (FAT atypical cadherin 1), ген которого в рамках данного исследования обладал повышенной степенью метилирования у пациентов с АтД, в норме участвует в процессах поляризации и миграции клеток. Однако при подобном изменении генной регуляции происходит снижение его активности, что приводит к нарушению функций в пораженной коже. В частности, это будет сказываться на нарушении образования межклеточных контактов, что ведет к усугублению клинических проявлений при АтД. Это косвенно подтверждается и в других исследованиях: в экспериментах *in vivo* у трансгенных мышей повышенная экспрессия *FAT1* предотвращала развитие аллергических реакций [131]. У этих мышей также был подавлен Th2-иммунный ответ, что препятствовало развитию симптомов острого АтД [132].

Другой белок, кодируемый геном *XIRP2* (xin actin binding repeat containing 2), предотвращает деполимеризацию актиновых микрофиламентов, а также участвует в образовании межклеточных контактов в кератиноцитах [133]. В этом исследовании он также был метилирован и, соответственно, обладал пониженной экспрессией, что нарушало его нормальное функционирование в клетках пациентов с АтД. В одном из исследований было показано, что повышенная

заболеваемость АтД наблюдается у носителей одного из полиморфизмов *XIRP2* (rs6720763) [134].

Не все белки этой группы показали повышенный уровень метилирования генов. Так, филамин А (*FLNA*) был деметилирован у пациентов с АтД. В активированном состоянии этот белок стимулирует ортогональное ветвление актиновых филаментов, а также связывает их с мембранными гликопротеинами. Экспрессия *FLNA* способствует образованию межклеточных контактов. Напротив, ранее проведенные полногеномные исследования показали, что существенное снижение экспрессии *FLNA* в коже больных АтД связано с нарушениями барьерной функции эпидермиса [135]. Повышение активности филамина А. по сравнению с другими факторами этой группы, может являться компенсаторным механизмом в пораженной АтД коже.

Еще один фактор, нерецепторная тирозиновая протеинкиназа *FYN*, был гипометилирован в коже у пациентов с АтД. Однако этот белок относится к числу регуляторных, которые контролируют рост, выживаемость и адгезию клеток. В таком активированном состоянии *FYN* участвует в ремоделировании цитоскелета, миграции клеток и развитии воспалительного иммунного ответа в коже при АтД. От *FYN* опосредованно зависит дифференцировка активированных Т-клеток и их пролиферация. В экспериментальных мышинных моделях АтД ингибирование гена *FYN* приводит к подавлению симптомов этого заболевания: уменьшению толщины эпидермиса, снижению инфильтрации кожи тучными клетками и нормализации экспрессии Th2-цитокинов [136].

Следующая группа генов была связана с WNT-зависимым сигнальным каскадом. Участие дифференциально метилированных генов в регуляции WNT-зависимых (Wingless-type MMTV integration site family) сигнальных механизмов подразумевает, что их экспрессия частично предотвращает передачу сигнала вовнутрь кератиноцитов. В целом ингибирование WNT-зависимого сигнального пути приводит к дестабилизации транскрипционного фактора WNT и последующему снижению частоты клеточных делений кератиноцитов, что нарушает барьерную функцию кожи.

Полученные данные по ингибированию WNT-зависимого сигнального пути неоднозначны. К числу гиперметилованных генов у пациентов с АтД из представленных в списке относятся следующие гены, находящиеся в состоянии пониженной экспрессии: *TRABD2B*, *WWOX*, *TAX1BP3* и *DACT3*. Белковые продукты этих генов в активном состоянии расщепляют белки, участвующие в каскаде WNT, снижая их активную концентрацию в цитоплазме [137,138]. Поэтому в случае метилирования негативных регуляторов сигнального каскада, как показано в этом исследовании, их функция не реализуется.

Также в этой группе было выявлено пять деметилованных генов (*HIC1*, *CTNNBIP1*, *BARX1*, *TLE1* и *GRB10*). Они также относятся к негативным регуляторам WNT-зависимого пути, являясь корепрессорами транскрипции. У пациентов с АтД они находятся в состоянии повышенной активности. Поэтому можно сделать вывод, что при обострении АтД процесс деления кератиноцитов ослабляется.

Следующие две группы обнаруженных дифференциально метилированных генов кожи функционально пересекались с дендритными клетками. Так, одна из групп генов, участвующих в иммунных процессах при АтД, связана с работой малых ГТФаз (обеспечивающих передачу сигнала, активацию и регуляцию малых ГТФаз). Малые ГТФазы – это белки, участвующие в передаче сигнала внутри клетки. Связывание молекулы ГТФ переводит малую ГТФазу в активное состояние, что обеспечивает передачу сигнала между двумя участниками каскада сигнальных реакций. Для нескольких генов этого кластера показано участие в патогенезе АтД, однако в основном они экспрессируются дендритными клетками кожи. Продукт гена *DOCK2* (dedicator of cytokinesis 2) участвует в преобразованиях цитоскелета. Являясь одним из факторов обмена гуаниновых нуклеотидов, *DOCK2* активирует малые ГТФазы (*RAC1* и *RAC2*). В исследовании у пациентов с АтД этот ген имел повышенную степень метилирования. Снижение экспрессии *DOCK2*, как показано и в других исследованиях, наблюдается при увеличении уровня общего IgE при АтД (см. раздел 3.3.). По литературным

данным, снижение индукции *DOCK2* также повышает риск развития инфекций [139].

В исследовании ген белка *DOCK1* (dedicator of cytokinesis 1), в отличие от *DOCK2*, был деметилирован у пациентов с АтД. В таком индуцированном состоянии этот белок активирует малые ГТФазы RAC и RHO [140]. Активируемый при этом сигнальный путь приводит к миграции дендритных клеток к очагу воспаления и усилению процесса поглощения и представления различных патогенов клеткам иммунной системы, что также поддерживает воспаление в коже. В одном из исследований была установлена связь *DOCK1* с лечением: при применении фотохимиотерапии (PUVA) у пациентов с АтД происходило подавление гена *DOCK1*, что положительно коррелировало с величиной терапевтического эффекта у пациентов с АтД [141]. Так, по полученным данным регуляция двух сходных по функциям генов *DOCK1* и *DOCK2* отличается по степени метилирования, однако такое различие лишь способствует поддержанию патологического процесса в коже, пораженной АтД.

Ген *CCR7* кодирует рецептор С-С хемокинов 7. В отличие от *DOCK2*, в исследовании ген этого фактора деметилирован и, соответственно, индуцирован. Активируя транскрипционный фактор AP1, *CCR7* оказывает влияние на продукцию провоспалительных цитокинов (IL1, TNF α) в коже при АтД. По данным других источников активация *CCR7* ускоряет созревание дендритных клеток в коже [142].

В проведенном исследовании было показано, что несколько деметилированных генов (*SLC9A6*, *EPHB2*, *PAK2*) в образцах от пациентов с АтД участвуют в регуляции дифференцировки дендритных клеток. Находясь в активированном состоянии, ген *SLC9A6* кодирует белок-антипортер NHE6, который локализован в наружной мембране клетки [143]. NHE6 обеспечивает постоянство внутренней среды, поддерживая необходимое значение рН в клетке, а также участвует в процессе образования отростков дендритных клеток [144]. Белок EPHB2, являясь рецепторной тирозиновой киназой, обеспечивает дифференцировку дендритных клеток. По литературным данным также известно,

что при АтД активация EPNB2 способствует облегчению проникновения в кожу клеток иммунной системы, вызывая тем самым обострение воспалительного процесса [145]. Наконец, активация серин-треониновой протеинкиназы PAK2 влияет на реорганизацию цитоскелета. По данным других исследований известно, что при атопическом дерматите повышенная активность PAK2 приводит к усиленной иннервации пораженных участков кожи и повышению их раздражимости [146].

В работе также были определены отдельные гены, выполняющие важные функции в иммунных процессах при АтД, с отличной от контроля степенью метилирования. Данные по ним представлены ниже.

Было выявлено гиперметилирование гена *JAK3* (Рисунок Б.7), чей белковый продукт относится к семейству нерецепторных тирозиновых киназ – янус-киназ. Основные процессы, в которых участвует эта киназа, связаны с регуляцией продукции цитокинов в JAK/STAT-сигнальном пути, характерных для Th2-иммунного ответа (TSLP, IL4, IL13, IL22, IL31). Однако по полученным данным в виду метилирования активность этого гена в коже пациентов с АтД снижена, поэтому активация транскрипции через белки STAT ослаблена. И, хотя, в коже пациентов диагностируется воспаление, в этом случае оно не будет относиться к Th2-фенотипу (см. раздел 3.2.1.). Важно отметить, что ингибиторы JAKs применяют для лечения тяжелой формы атопического дерматита [147].

Еще один ген, *ALOX12*, показал пониженный уровень метилирования в коже пациентов по сравнению с контролем (Рисунок Б.8). Белковый продукт этого гена участвует в таких процессах, как поддержание барьерной функции кожи, регуляция потери воды кожей. Повышенная экспрессия этого гена в кератиноцитах может свидетельствовать о компенсаторной регенерации при АтД. Действительно, некоторые исследования показали, что 12-LOX и его производные проявляют свою функцию при эпителиальных воспалительных заболеваниях, участвуя в восстановлении поврежденных клеток [148].

Ген *PRSS3* кодирует трипсиноген, одну из наиболее распространенных сериновых протеаз. В исследовании этот ген был деметилирован у пациентов с

АтД. В целом, сдвиг протеолитического баланса в сторону активации протеаз считается одной из наиболее характерных особенностей процесса терминальной дифференцировки эпидермальных кератиноцитов. Возможно, активация этого гена, подобно предыдущему, несет в себе компенсаторную функцию. В одном из исследований было показано, что нокадаун *PRSS3* приводит к развитию паракератоза [149].

Ген *CARD11* по полученным данным у пациентов был гиперметилован (Рисунок Б.9). При отсутствии индукции его белкового продукта нарушается и активация универсального транскрипционного фактора NF-κB, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа (ключевых цитокинов, молекул адгезии). Это нарушает баланс про- и противовоспалительных иммунных реакций в коже при АтД [150].

Ген *VAV1* относится к семейству *VAV*, чьи белки участвуют в транскрипционных модификациях. В частности, они влияют на передачу сигнала JUN-киназного пути, в ходе которого при АтД активируются про- и противовоспалительные цитокины [151]. В исследовании этот ген был гипометилован (Рисунок Б.10), свидетельствуя о поддержании воспалительных реакций в коже пациентов с АтД.

Из приведенных данных видно, что функционально гены, даже в рамках одной группы, дополняют друг друга или, наоборот, проявляют антагонистические свойства (хотя генов, способствующих нормальному функционированию кожного барьера и при этом находящихся в состоянии активации, меньше). Поэтому при развитии патологического процесса важно рассматривать все факторы вместе. Сводные данные по описанным и классифицированным дифференциально метилированным генам представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Дифференциально метилированные гены, потенциально вовлеченные в патогенез АД. В отдельной колонке приведено значение статистического показателя areaStat, свидетельствующего об уровне метилирования в соответствующем гену регионе

Ген	Значение areaStat	Статус метилирования (метилирован / деметилирован)	Возможный сигнальный путь
Кератиноциты			
<i>Процессы транскрипции и транскрипционные модификации:</i>			
<i>FLNA</i>	-1208,77	деметилирован	регуляция актинового цитоскелета
<i>CEBPG</i>	57,04	метилирован	JAK-, PI3K/Akt-, p38 MAPK-сигнальный путь
<i>CARD11</i>	102,69	метилирован	NF-kB-сигнальный путь
<i>NFIA</i>	112,52	метилирован	дифференцировка нейробластов, кератиноцитов
<i>EHMT1</i>	143,67	метилирован	модификация хроматина
<i>MAPK14</i>	173,79	метилирован	p38 MAPK-сигнальный путь
<i>RUNX3</i>	1409,76	метилирован	Th1-, Th2-клеточная дифференцировка
<i>Процессы, связанные с работой малых ГТФаз:</i>			
<i>CCR7</i>	-98,72	деметилирован	хемокиновый сигнальный путь
<i>DOCK1</i>	-67,24	деметилирован	регуляция актинового цитоскелета
<i>DOCK2</i>	104,57	метилирован	хемокиновый сигнальный путь
<i>Поддержание целостности и нормального функционирования кожного барьера:</i>			
<i>HIC1</i>	-1173,00	деметилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>ALOX12</i>	-730,90	деметилирован	метаболический сигнальный путь
<i>PRSS3</i>	-206,14	деметилирован	PRSS3-PAR-сигнальный путь
<i>FYN</i>	-80,57	деметилирован	регуляция актинового цитоскелета
<i>CTNNBIP1</i>	-71,69	деметилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>BARX1</i>	-60,16	деметилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>TLE1</i>	-56,83	деметилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>GRB10</i>	-49,90	деметилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>TRABD2B</i>	48,52	метилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>XIRP2</i>	52,01	метилирован	регуляция актинового цитоскелета
<i>WWOX</i>	53,44	метилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>TAX1BP3</i>	60,67	метилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>FAT1</i>	66,24	метилирован	регуляция актинового цитоскелета
<i>DEFB124</i>	113,86	метилирован	MAPK-, NF-kB-сигнальный путь
<i>DACT3</i>	3633,33	метилирован	WNT-зависимый сигнальный путь

Продолжение Таблицы 5

Иммунные клетки			
<i>Процессы транскрипции и транскрипционные модификации:</i>			
<i>GATA3</i>	-298,67	деметилован	Th1-, Th2-, Th17-клеточная дифференцировка
<i>GATA4</i>	-99,13	деметилован	Ca-зависимый сигнальный путь
<i>VAV1</i>	-63,49	деметилован	хемокиновый сигнальный путь
<i>MAP3K8</i>	-61,30	деметилован	p38 MAPK-сигнальный путь
<i>MAP2K6</i>	-42,97	деметилован	p38 MAPK-сигнальный путь
<i>MAP2K4</i>	96,00	метилован	МКК/JNK-сигнальный путь
<i>MAP2K2</i>	140,56	метилован	МКК/JNK-сигнальный путь
<i>JAK3</i>	376,90	метилован	JAK-STAT сигнальный путь
<i>Регуляция дифференцировки дендритных клеток:</i>			
<i>SLC9A6</i>	-687,81	деметилован	дифференцировка дендритных клеток
<i>PAK2</i>	-116,90	деметилован	MAPK-сигнальный путь; дифференцировка дендритных клеток
<i>EPHB2</i>	-75,00	деметилован	EphrinB2-EphB2 сигнальный путь; дифференцировка дендритных клеток

Стоит отметить, что практически для каждого описанного гена и его белкового продукта не существует единственного сигнального пути, в котором он участвует. Ввиду смежных молекулярных функций, биологических процессов, локализации в различных клетках таких сигнальных каскадов может быть несколько. В таблице приведены самые распространенные варианты каскадов, описанные в литературе.

Чтобы дополнительно определить общие пути для указанных в таблице дифференциально метилированных генов, с помощью инструмента DAVID была проведена дополнительная кластеризация этих генов методом обогащения сигнальных путей, или SNEA (Subnetwork Enrichment Analysis). В ходе такой классификации были ранжированы сигнальные пути базы данных KEGG, среди которых наибольшую представленность показали пути «Сигнальный путь Toll-подобных рецепторов», «FcεRI сигнальный путь», а также «Сигнальный путь дифференцировки Th1- и Th2-клеток». Полная схема каждого сигнального каскада представлена на Рисунках 14-16.

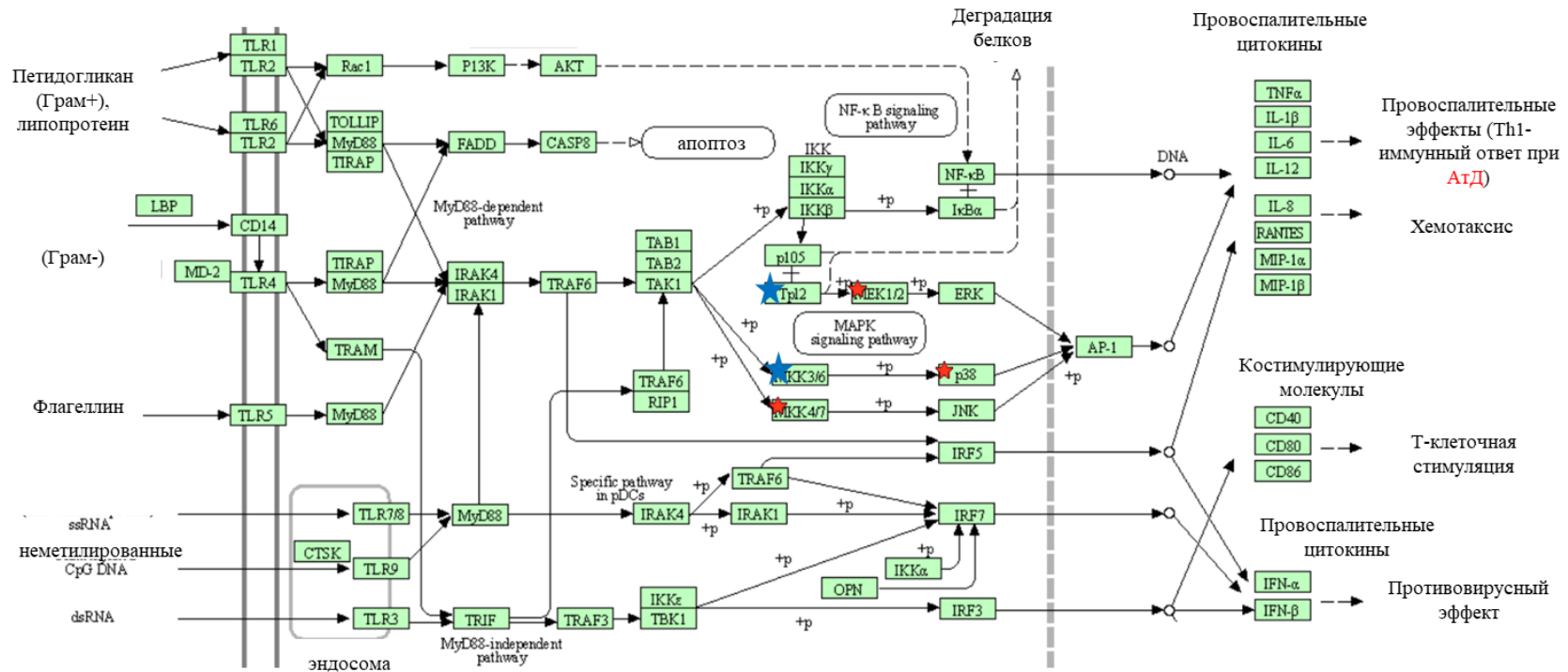


Рисунок 14 – Сигнальный путь Толл-подобных рецепторов. Отобранные метилированные гены, вошедшие в каскад, отмечены красными звездочками: *MAP2K4* (*MKK4*), *MAP2K2* (*MEK2*), *MAPK14* (*p38*); деметилированные гены отмечены синими звездочками: *MAP3K8* (*Trp2*), *MAP2K6* (*MKK6*)

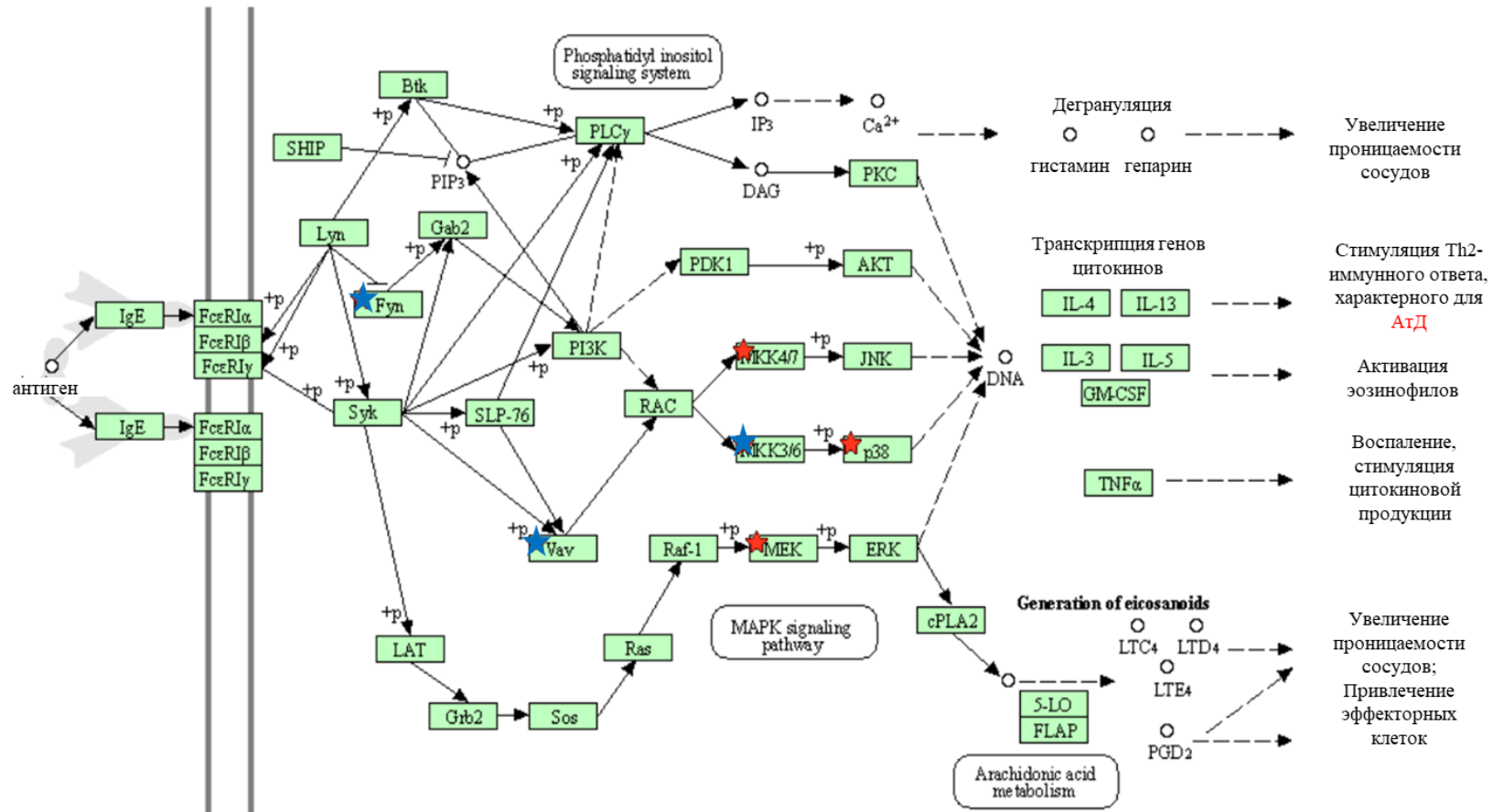


Рисунок 15 – FcεRI сигнальный путь. Отобранные метилированные гены, вошедшие в каскад, отмечены красными звездочками: *MAP2K4* (*MKK4*), *MAP2K2* (*MEK2*), *MAPK14* (*p38*); деметилированные гены отмечены синими звездочками: *FYN*, *VAV1*, *MAP2K6* (*MKK6*)

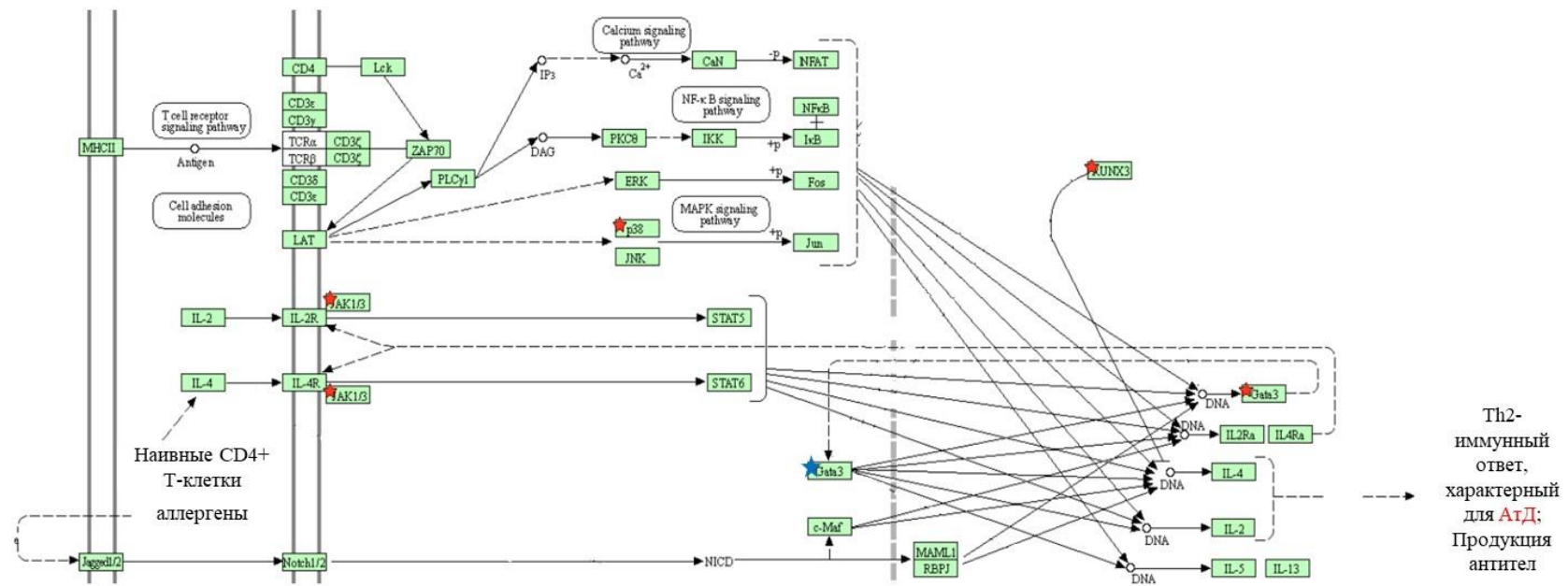


Рисунок 16 – Сигнальный путь дифференцировки Th1- и Th2-клеток. Отобранные дифференциально метилированные гены, вошедшие в каскад, отмечены красными звездочками: *JAK3*, *MAPK14* (p38), *RUNX3*; деметилированный ген отмечен синей звездочкой: *GATA3*

Важно также отметить, что дифференциальное метилирование может влиять на передачу сигнала в различных частях каскада, что, в свою очередь, оказывает влияние на изменение экспрессии генов, находящихся в начале пути передачи (например, рецепторный аппарат клеток), на промежуточном этапе, а также на конечные продукты реакции.

Из Рисунков 14-16 видно, что во всех представленных сигнальных путях дифференциальное метилирование так или иначе затрагивает MAP-киназный каскад, состоящий из специфичных протеин-киназ, регулирующих клеточную активность (в частности, экспрессию цитокинов при процессе воспаления) в ответ на различные внеклеточные стимулы (митогены) [128].

В ходе первого этапа исследования детектированы различные факторы, чьи гены показали дифференциальные уровни метилирования в коже пациентов с АтД [152]. Однако без анализа экспрессии генов достаточно сложно оценить их вклад в патогенез заболевания. Поэтому следующим этапом является изучение экспрессионного профиля некоторых генов, которые могут быть вовлечены в представленные сигнальные пути при АтД наряду с определенными дифференциально метилированными генами.

Для расширения анализа в сторону определения белковой и экспрессионной активности гены отобраны с учетом представленных каскадов и их роли в патогенезе АтД. Сводные данные по ним показаны в разделах 3.2.1. и 3.2.2.

3.2. Экспрессия генов *TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, *DEFB1* при атопическом дерматите у детей

Исходя из полученных данных по дифференциально метилированным генам, для экспрессионного анализа в первую очередь были отобраны гены, входящие в MyD88-зависимый сигнальный путь, в частности, запускающие внутриклеточную активацию каскада этих реакций [153]. К таким факторам относятся паттерн-распознающие рецепторы врожденного иммунитета, экспрессируемые кератиноцитами и иммунными клетками (в том числе

моноцитами) [154]. Известно, что распознавание патогенассоциированных молекулярных паттернов приводит к запуску каскада реакций, активирующих определенные про- и противовоспалительные цитокины и хемокины, интерфероны и ко-стимулирующие молекулы.

Были выбраны два гена Toll-подобных рецепторов (TLRs), *TLR2* и *TLR9*, активирующие иммунные каскады реакций при АД (Рисунок 14, раздел 3.1.). При нарушении барьерной функции кожи и утрате ее функциональных свойств продукция АМП варьируется. Она также может быть сопряжена с активностью рецепторов врожденного иммунитета (TLRs, в частности), присутствующих в клетках эпидермиса. Генами антимикробных пептидов были выбраны *DEFB1* и *CAMP*, экспрессирующиеся в различных тканях, в том числе в кератиноцитах кожи, а также в иммунных клетках (лимфоциты, макрофаги).

Следствием активации упомянутого MyD88-сигнального пути и его компонентов является продукция различных цитокинов. Были выбраны два интерлейкина, IL4 и IL13, поскольку они являются ключевыми факторами сигнальных каскадов при АД (Рисунки 15-16, раздел 3.1.). Однако может ли изменяться их активность под влиянием метилирования в разных клетках при сходных условиях, не до конца ясно.

В этом разделе представлены медианные значения относительного уровня экспрессии генов *TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, *DEFB1* в коже и в мононуклеарных клетках крови у пациентов с АД и у здоровых доноров. Развернутые данные по экспрессии всех описываемых генов представлены в обобщающих таблицах. Пациенты были разделены на подгруппы по возрасту (6-12 лет; 12-18 лет), а также по тяжести заболевания (среднетяжелое течение, SCORAD 25-50; тяжелое течение, SCORAD >50) и в зависимости от применения терапии (в динамике) в случае анализа экспрессии в МНК.

3.2.1. Экспрессия и корреляция генов иммунных факторов в пораженной коже пациентов с атопическим дерматитом

Как уже упоминалось ранее, на первом этапе была определена экспрессия генов на локальном уровне в кератиноцитах кожи. Экспрессия отобранных генов в коже пациентов оценивалась относительно группы сравнения. Сводные данные по сравнительному анализу экспрессии генов с учетом возраста пациентов приведены в Таблице 6.

Таблица 6 – Уровень экспрессии генов в коже у пациентов с АтД разных возрастных групп и в контрольной группе, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Экспрессия гена (значения $2^{-\Delta\Delta C_t}$, отн. ед.)	1 Пациенты с АтД (6-18 лет)	2 Пациенты с АтД (6-12 лет)	3 Пациенты с АтД (12-18 лет)	4 Группа сравнения (здоровые доноры)	p
<i>TLR2</i>	0,15* (0,12-0,33)	0,13* (0,10-0,29)	0,15 (0,13-0,33)	1,00 (0,84-1,14)	$p_{1/4} < 0,01$ $p_{2/4} < 0,05$
<i>TLR9</i>	0,16* (0,08-0,21)	0,33* (0,07-0,65)	0,16* (0,08-0,19)	1,82 (1,35-2,04)	$p_{1/4} < 0,0001$ $p_{2/4} < 0,05$ $p_{3/4} < 0,01$
<i>IL4</i>	0,07* (0,05-0,16)	0,16 (0,04-0,37)	0,07* (0,07-0,15)	0,85 (0,55-1,26)	$p_{1/4} < 0,0005$ $p_{3/4} < 0,01$
<i>IL13</i>	2,37 (0,86-10,59)	1,48 (0,68-2,17)	10,59 (8,49-13,13)	1,32 (1,11-1,94)	ns
<i>CAMP</i>	0,50 (0,40-0,84)	0,67 (0,40-1,05)	0,47 (0,40-0,50)	1,00 (0,71-1,16)	ns
<i>DEFB1</i>	0,69 (0,42-2,36)	1,34 (0,42-2,25)	0,69 (0,42-2,44)	1,25 (0,82-2,40)	ns

Примечание – В колонке «p» показана степень достоверности для конкретных пар групп. Синим цветом и звездочкой отмечены группы с достоверно сниженным значением экспрессии генов относительно контрольной группы. Достоверность между группами 1 и 4 оценивалась по критерию Манна-Уитни; между группами 2, 3, 4 – по критерию Краскела-Уоллиса

На Рисунке 17 представлен график уровня экспрессии гена *TLR2* в коже у пациентов с АтД по сравнению с контрольной группой.

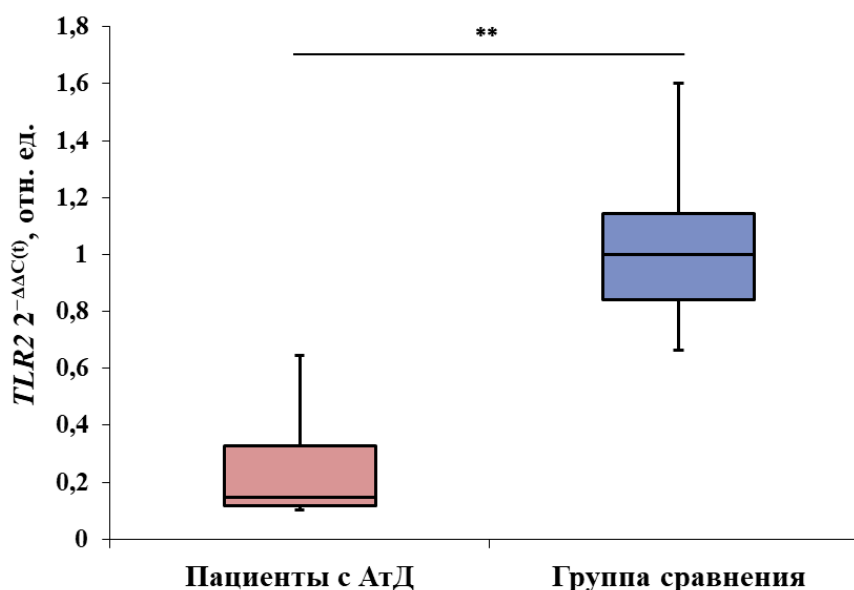


Рисунок 17 – Медианные значения уровня экспрессии гена *TLR2* (отн. ед.) в коже пациентов с АтД (6-18 лет) по сравнению с контролем. ** $p < 0,01$

Как видно из графика, экспрессия гена *TLR2* снижена у пациентов с АтД от 6 до 18 лет на локальном уровне (почти в 5 раз по сравнению с контрольной группой): медианные значения составляют 0,15 и 1,00 в группе пациентов и у здоровых детей соответственно. Достоверная разница с учетом возраста показана также для младшей группы от 6 до 12 лет ($p < 0,05$) (Рисунок В.1).

Второй выбранный рецептор, *TLR9*, представляет собой внутриклеточный TLR, экспрессируемый в различных иммунных и неиммунных клетках. При анализе данных экспрессии гена *TLR9* у пациентов с АтД по сравнению с контрольной группой можно отметить, что наблюдается сходная с геном *TLR2* динамика (Рисунки В.2, В.3). В коже уровень его экспрессии снижен более чем в 10 раз, при этом достоверная разница наблюдается как в случае разделения по возрасту пациентов, так и в общей группе (6-18 лет).

Изменения экспрессии генов антимикробных пептидов, *CAMP* и *DEFB1* не показали достоверных различий в коже. Их медианные значения имели тенденцию к снижению и отличались от значений медиан контрольных групп

примерно в два раза. Надо отметить, что на первом этапе исследования (раздел 3.1.) также была выявлена область с повышенной степенью метилирования у пациентов с АтД, относящаяся к гену семейства β -дефензина – *DEFB124* (Рисунок Б.11).

По полученным данным цитокины IL4 и IL13 на локальном уровне не обладали повышенной активностью. Экспрессия гена *IL4* в коже была достоверно снижена по сравнению с контрольной группой примерно в 12 раз в общей возрастной группе, а также в старшей группе (Рисунки В.4, В.5). Значения экспрессии гена *IL13* имели тенденцию к повышению, однако ни одного достоверного отличия с контролем зарегистрировано не было.

Данные по корреляционному анализу с применением коэффициента корреляции r-Спирмена показали высокую силу связи в коже между TLR9 и IL4 ($r = 0,73$), а также между IL4 и HBD1 ($r = 0,80$), как представлено на Рисунке 18. Сниженные экспрессионные показатели факторов врожденного иммунитета не способствуют переходу и активации адаптивного Th2-иммунного ответа на локальном уровне.

Из всех TLRs именно TLR2 распознает наиболее широкий спектр патогенов. TLR2 вовлечен в патогенез множества иммуноопосредованных заболеваний. Известно, что TLR2 участвуют в воспалительных процессах кожи. Они экспрессируются клетками врожденной (дендритные клетки, макрофаги) и адаптивной (Т- и В-клетки) иммунной системы, а также в кератиноцитах. В работе Iwamoto и соавт. было показано значительное снижение экспрессии TLR2 в клетках Лангерганса, в воспалительных дендритных клетках эпидермиса по сравнению с контрольной группой [155]. Еще в одной работе Panzer и соавт. было выявлено, что у пациентов с АтД экспрессия TLR2 в макрофагах была подавлена,

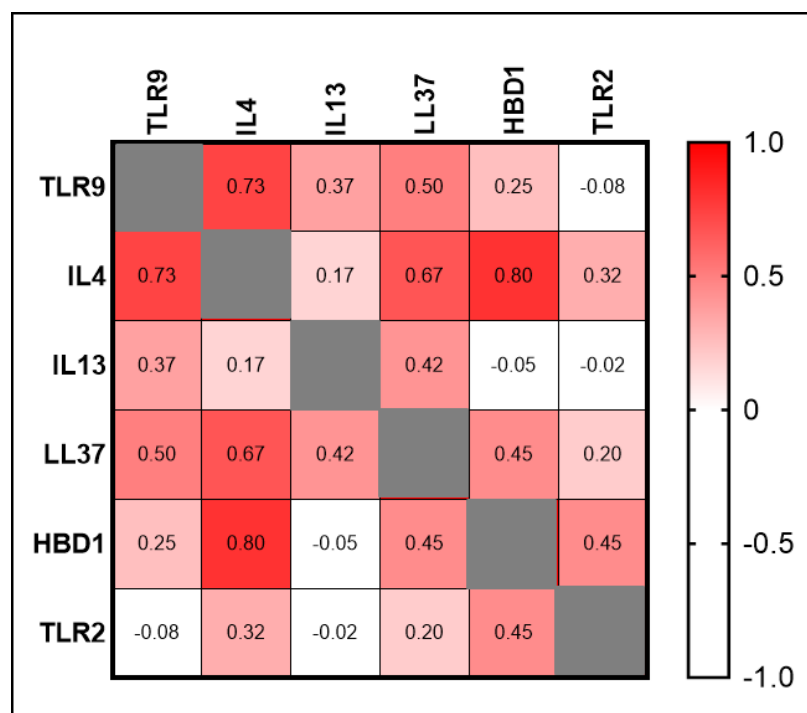


Рисунок 18 – Сила связи между переменными (значения экспрессии $2^{-\Delta\Delta C(t)}$) в коже при расчете коэффициента корреляции r-Спирмена ($p < 0,05$)

при этом уменьшения количества кератиноцитов выявлено не было [156]. Отсутствие активации TLR2 в клетках кожи при АтД, как полагают авторы, может способствовать предрасположенности к развитию кожных инфекций с преобладанием грамположительных бактерий. Это является доказательством нарушения механизма врожденного иммунного ответа в коже пациентов с АтД, при котором в целом функционирование соответствующего сигнального пути нарушается. Приведенные примеры согласовываются с нашими результатами [157].

Участие TLR9 в патогенезе АтД также связано с измененной микробиотой кожи. Данный рецептор в основном экспрессируется в эндосомах, лизосомах клеток, в частности, кератиноцитов кожи. В исследовании Moriwaki было показано, что *S. aureus* при АтД захватывался лизосомами кератиноцитов, что приводило к секреции провоспалительного цитокина IL-1 α посредством TLR9 [158]. Было также доказано, что полиморфизмы гена *TLR9* в промоторной области

со значительно повышенной активностью были связаны с развитием АтД [159]. В данном случае результаты разнятся, и TLR9 не активируется.

Нарушение функции АМП у пациентов с АтД впервые описал Ong и соавт.: было обнаружено, что при АтД снижена экспрессия кателицидина LL37 по сравнению с группой пациентов с псориазом [160]. В других исследованиях также отмечается, что при атопическом дерматите уровень АМП, в частности LL37 и HBD1, может не достигать достаточного уровня для обеспечения контроля кожной микробиоты. Цитокины при Th2-зависимом иммунном ответе, вероятно, оказывают негативное влияние на экспрессию и индукцию некоторых АМП.

В настоящее время точно установлено, что кателицидины способны модулировать иммунные реакции посредством регуляции хемотаксиса нейтрофилов и моноцитов, индукции экспрессии хемокинов, изменения поляризации макрофагов, влияния на фагоцитоз и регуляции активации TLRs. Поэтому снижение экспрессии *CAMP* или полное ее отсутствие коррелирует с повышенным риском развития инфекции [161].

Ген *DEFB1* кодирует человеческий β -дефензин 1, АМП, фактор врожденного иммунитета, обладающий широкими антимикробными свойствами [162]. Уровень АМП, в том числе дефензинов, снижается в коже пациентов с АтД. По некоторым данным однонуклеотидные замены в гене *DEFB1* могут являться предикторными маркерами развития АтД [163]. HBD1 также оказывает хемотаксическое действие на дендритные клетки. Через хемокиновый рецептор CCR6 и активацию TLRs HBD1 способен регулировать иммунный ответ при аллергии. В работе оба представленных АМП имели тенденцию к снижению уровня экспрессии, однако достоверных отличий выявлено не было.

IL4 и IL13 относятся к Th2-цитокинам. Они в значительной степени способствуют нарушению функции кожного барьера, наблюдаемой при АтД. Было показано, что они подавляют экспрессию филагтрина и лорикрина, экспрессируемых в коже, тем самым нарушая структуру кожи, ее защитные свойства, а также способность удерживать влагу [82]. IL4 и IL13 оказывают воздействие на кератиноциты эпидермиса, вызывая гиперплазию, а также

ослабленную дифференцировку, что предотвращает их полное созревание [164]. Однако в данной работе локально в пораженной коже уровень IL4 был снижен.

По причине несостоятельности кожного барьера, утрате его функций, измененной регуляции генов, ни один показатель экспрессионного анализа не достигает высокого уровня, что, в свою очередь, негативно отражается на действии местного иммунитета. Поскольку в данном исследовании выявлены пониженные уровни экспрессии факторов врожденного иммунитета, скорее всего, причина развития заболевания в таком случае не будет связана с экзогенной инфекцией. Также имеются определенные метилированные гены в сигнальном пути, влияющем на продукцию описываемых цитокинов, и можно сделать вывод о том, что локально в коже поддерживается воспалительный процесс, вероятно, не связанный с Th2-ответом. Более наглядно это показано на схеме сигнального пути NF-κB с учетом полученных данных (Рисунок 19).

MyD88 является каноническим адаптерным фактором воспалительных сигнальных путей, активирующихся посредством TLRs и рецепторов интерлейкина-1 [165]. MyD88 связывает IL1R или TLRs с IL1R-ассоциированными киназами (IRAK) посредством белок-белкового взаимодействия, а также с адаптерным белком TRAF6. Активация киназ семейства IRAK приводит к различным функциональным молекулярным изменениям, включая активацию ядерного фактора NFκB, митоген-активируемых (MAP) протеинкиназ и белка-активатора 1 (AP1), что делает MyD88 центральным звеном воспалительной реакции. На активацию и функционирование MyD88-зависимого каскада могут влиять различные стимулы.

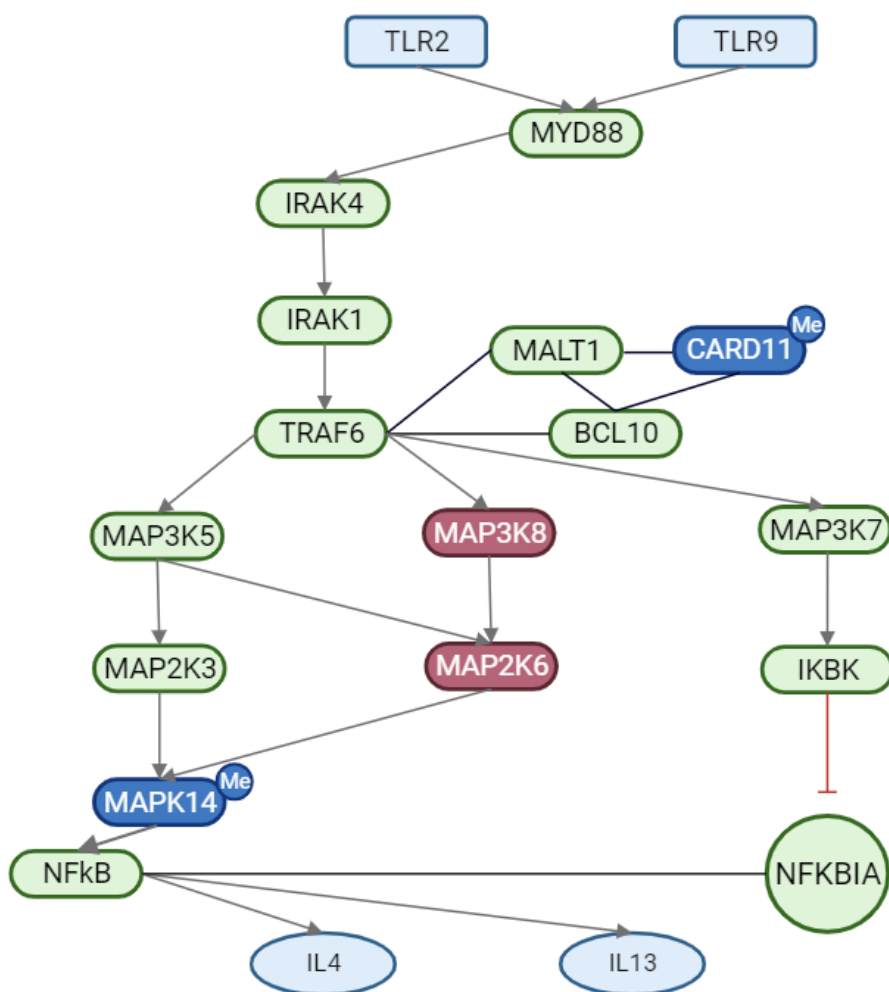


Рисунок 19 – Схема сигнального пути, реализуемого на локальном уровне в коже у пациентов с АтД. Синим цветом обозначены гены с пониженной белковой продукцией; темно-синим цветом выделены гиперметилированные гены; красным цветом – гипометилированные; «Me» соответствует метилированному гену (раздел 3.1.)

В данном случае в коже сигнальный путь NFkB не обладает повышенной активностью, в частности ввиду метилирования генов некоторых звеньев каскада: CARD11, MAP-киназы 14 (раздел 3.1). Выработка противовоспалительных цитокинов нарушается, и, учитывая клиническую картину, локальное воспаление сохраняется. Не исключен сдвиг баланса в сторону Th1-ответа.

3.2.2. Экспрессия генов врожденного и адаптивного иммунитета в мононуклеарных клетках пациентов с атопическим дерматитом

Экспрессия одних и тех же генов в разных клетках может отличаться. Анализ экспрессии отобранных генов в иммунных клетках крови, а именно в МНК пациентов, проводился аналогично анализу в коже, относительно контрольной группы. Сводные данные по сравнительному анализу экспрессии генов на системном уровне с учетом возраста пациентов, а также тяжести течения болезни и терапии приведены в Таблицах 7 и 8.

Таблица 7 – Уровень экспрессии генов в МНК у пациентов с АтД разных возрастных групп с учетом терапии и в контрольной группе, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Экспрессия гена (значения 2 ^{-ΔΔCt} , отн. ед.)	1 Пациенты с АтД до лечения (6-18 лет)		2 Пациенты с АтД после лечения (6-18 лет)		7 Группа сравнения (здоровые доноры)	p
	3 Пациенты с АтД до лечения (6-12 лет)	5 Пациенты с АтД до лечения (12-18 лет)	4 Пациенты с АтД после лечения (6-12 лет)	6 Пациенты с АтД после лечения (12-18 лет)		
<i>TLR2</i>	1 4476,77* (66,54-45633,94)		2 46,53 (5,43-2486,67)		8,25 (4,06-11,96)	p _{1/7} <0,0001 p _{5/7} <0,0001
	3 33,01 (17,63- 74,54)	5 10226,32* (526,22- 67532,89)	4 1117,44 (132,29- 2313,83)	6 18,13 (4,84- 1441,51)		
	1 945,59* (118,92-4219,38)		2 56,89* (12,82-910,17)			
3 82,71 (73,01- 227,54)	5 1478,58* (352,14- 4451,27)	4 289,21 (82,85- 785,88)	6 22,63 (10,25- 2210,45)			

Продолжение Таблицы 7

<i>IL4</i>	1		2		0,44 (0,19-1,00)	$p_{1/7} < 0,0001$ $p_{2/7} < 0,01$ $p_{5/7} < 0,0001$ $p_{6/7} < 0,05$
	634,73* (85,01-3302,18)		79,89* (18,13-580,04)			
	3	5	4	6		
	29,45 (10,70-35,51)	1717,21* (163,41-5473,17)	66,12 (22,63-455,00)	196,72* (21,53-443,69)		
<i>IL13</i>	1		2		0,34 (0,13-0,95)	$p_{1/7} < 0,0001$ $p_{2/7} < 0,01$ $p_{5/7} < 0,0001$
	281,00* (12,83-4903,25)		9,58* (4,89-164,28)			
	3	5	4	6		
	3,51 (2,00-3,97)	380,04* (79,20-5859,10)	85,13 (5,23-198,7)	9,58 (3,13-73,75)		
<i>CAMP</i>	1		2		0,30 (0,21-0,40)	$p_{1/7} < 0,0001$ $p_{2/7} < 0,05$ $p_{5/7} < 0,0005$
	11,59* (4,45-27,17)		7,52* (0,12-33,15)			
	3	5	4	6		
	11,55 (5,28-7,63)	11,71* (4,16-35,59)	7,58 (3,68-9,30)	0,29 (0,04-36,00)		
<i>DEFB1</i>	1		2		1,00 (0,33-3,57)	$p_{1/7} < 0,0001$ $p_{2/7} < 0,01$ $p_{5/7} < 0,0001$
	141,91* (46,24-461,74)		52,30* (1,94-198,7)			
	3	5	4	6		
	22,16 (9,78-47,18)	184,82* (70,67-508,77)	28,51 (10,32-392,98)	67,63 (1,79-175,55)		

Примечание – В колонке «р» показана степень достоверности для конкретных пар групп. Красным цветом и звездочкой выделены группы с достоверно повышенным значением экспрессии относительно контрольной группы. Достоверность между группами оценивалась по критерию Краскела-Уоллиса

Таблица 8 – Уровень экспрессии генов в МНК у пациентов с АтД различной степени тяжести с учетом терапии и в контрольной группе, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Экспрессия гена (значения 2 ^{-ΔΔCt(0)} , отн. ед.)	1 Пациенты с АтД до лечения, SCORAD 25-50	2 Пациенты с АтД после лечения, SCORAD 25-50	3 Пациенты с АтД до лечения, SCORAD >50	4 Пациенты с АтД после лечения, SCORAD >50	5 Группа сравнения (здоровые доноры)	p
<i>TLR2</i>	3396,89* (86,06-19495,67)	29,86 (5,43-439,59)	55492,30* (74,54-248003,34)	6648,04 (1865,45-27591,03)	8,25 (4,06-11,96)	p _{1/5} <0,0001 p _{3/5} <0,0005
<i>TLR9</i>	1305,15* (82,71-4269,94)	55,33 (12,82-855,13)	382,68* (237,21-955,43)	1791,21 (309,92-5155,39)	1,27 (0,62-5,82)	p _{1/5} <0,0001 p _{3/5} <0,05
<i>IL4</i>	475,16* (33,99-4425,73)	79,89* (18,13-261,38)	1871,53* (649,22-2656,33)	316,19 (39,61-721,05)	0,44 (0,19-1,00)	p _{1/5} <0,0001 p _{2/5} <0,05 p _{3/5} <0,0001
<i>IL13</i>	225,35* (3,86-2262,36)	7,06 (4,89-31,34)	3932,01* (50,61-14230,29)	259,03 (157,04-339,90)	0,34 (0,13-0,95)	p _{1/5} <0,0001 p _{3/5} <0,0001
<i>CAMP</i>	8,79* (4,27-19,09)	7,65 (0,07-33,15)	19,46* (10,86-122,09)	4,96 (2,10-14,64)	0,30 (0,21-0,40)	p _{1/5} <0,01 p _{3/5} <0,01
<i>DEFB1</i>	124,28* (31,89-420,83)	52,30* (1,94-198,11)	296,43* (127,12-1072,74)	79,27 (7,89-239,93)	1,00 (0,33-3,57)	p _{1/5} <0,0001 p _{2/5} <0,05 p _{3/5} <0,0001

Примечание – В колонке «p» показана степень достоверности для конкретных пар групп. Красным цветом и звездочкой выделены группы с достоверно повышенным значением экспрессии относительно контрольной группы. Достоверность между группами оценивалась по критерию Краскела-Уоллиса

Из таблиц видно, что данные по МНК сильно отличаются от локального уровня, и все детектированные изменения превышают значения контрольной группы.

Так, экспрессия гена *TLR2* в МНК достоверно повышена у пациентов с АтД, в частности в старшей группе от 12 до 18 лет (более чем в 1000 раз) в остром периоде до начала лечения (Рисунки В.6, В.7). После терапии, по всей видимости, происходит нормализация, и этот показатель снижается, хотя достоверные отличия в таком случае не регистрируются. Достоверная разница с учетом тяжести заболевания показана как для среднетяжелого течения (более чем в 400

раз по сравнению с контролем), так и для тяжелого течения (почти в 7000 раз) также до лечения. В этом случае аналогично после лечения показатели экспрессии снижаются в обеих группах (~ в 100 и в 8 раз соответственно) (Рисунок В.8).

Результаты по экспрессии гена *TLR9* в крови аналогичны экспрессии *TLR2*. На системном уровне регистрируются достоверные изменения в сторону повышения в общих группах до и после лечения, хотя после терапии экспрессия снижается более чем в 16 раз (Рисунок В.9). Также достоверные отличия характерны для старшей возрастной группы до лечения (разница с контролем составляет около 1100 раз), как представлено на Рисунке 20.

В отношении тяжести проявления заболевания до инициации терапии большая разница выявлена между группой среднетяжелого течения (более чем в 1000 раз) и контролем, а также в случае тяжелого течения (в 300 раз выше, чем в группе сравнения) (Рисунок В.10).

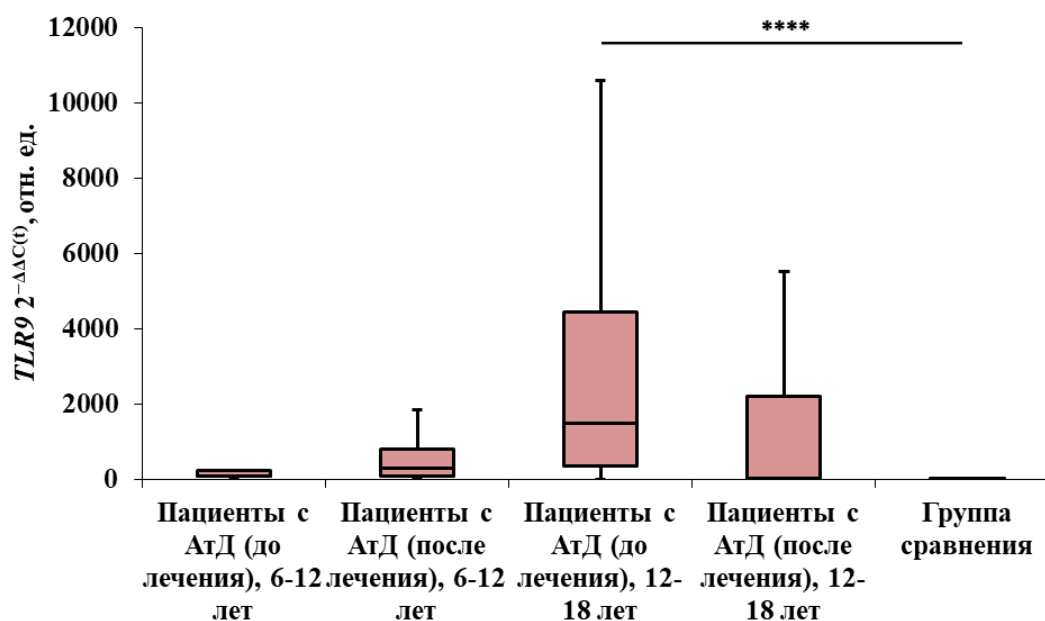


Рисунок 20 – Медианные значения уровня экспрессии гена *TLR9* (отн. ед.) в МНК пациентов с АтД разных возрастных групп до и после лечения по сравнению с контролем. **** $p < 0,0001$

В отличие от данных по коже, гены АМП *CAMP* и *DEFB1* в мононуклеарных клетках крови обладают повышенной активностью, в частности в группах до и после лечения, а также в возрастной группе от 12 до 18 лет до лечения, где разница составляет в 40 и более чем в 100 раз соответственно. С учетом SCORAD заболевания, повышенные уровни экспрессии характерны для обеих групп тяжести до лечения, а в случае *DEFB1* в группе среднетяжелого течения после лечения (*CAMP*: в 29 раз выше в группе SCORAD 25-50 до лечения, в 60 раз выше в группе SCORAD >50; *DEFB1*: в 124 и 296 раз выше в группах SCORAD 25-50 и SCORAD >50 соответственно, а также в более чем 50 раз выше в группе SCORAD 25-50 после лечения), как показано на Рисунках В.11-В.16.

В данном случае имеет место повышение экспрессии генов АМП в мононуклеарных клетках крови. Исходя из комплексных результатов по экспрессии пептидов и TLRs в крови, можно сделать вывод, что именно на системном уровне происходит активация структур врожденного иммунитета, что служит переходом к адаптивному иммунному ответу.

При проведении корреляционного анализа в МНК высокая степень связи была выявлена между показателями TLR9 и HBD1 ($r = 0,74$), как представлено на Рисунке 21. Имеет место синергизм действия факторов врожденного иммунитета и их активация как инициальных структур сигнального пути, ведущего к Th2-иммунному ответу на системном уровне.

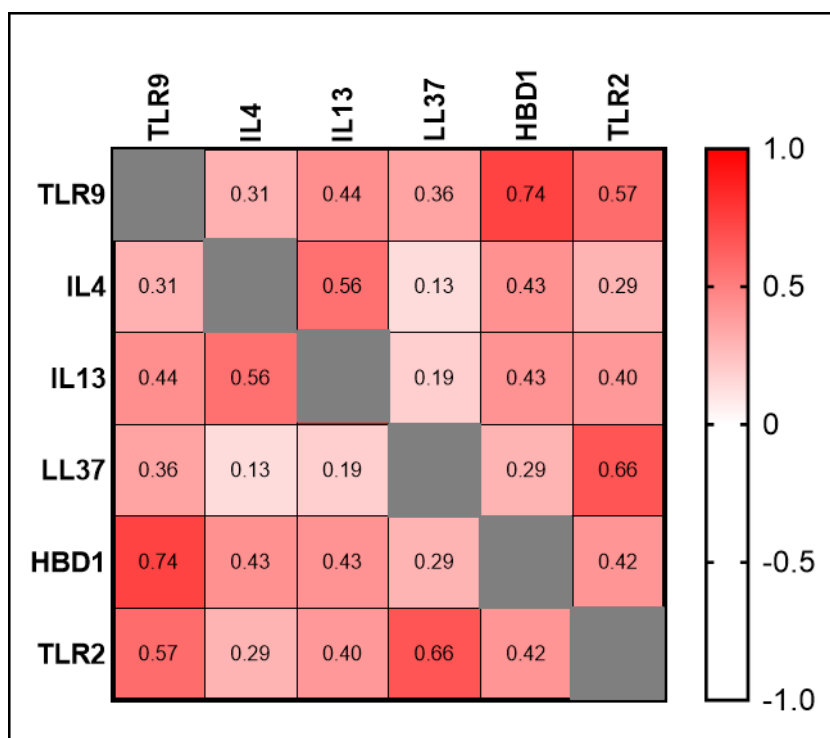


Рисунок 21 – Сила связи между переменными (значения экспрессии $2^{-\Delta\Delta C(t)}$) в МНК при расчете коэффициента корреляции r-Спирмена ($p < 0,05$)

В отношении данных по цитокинам IL4 и IL13 их экспрессия в МНК оказалась выше у пациентов по сравнению с контрольной группой. Экспрессия гена *IL4* была повышена более чем в 1000 раз в общей группе до лечения (в основном за счет старшей возрастной группы), медиана составила 634,73 (85,01-3302,18), а также в 180 раз после лечения (Me = 79,89 (18,13-580,04) отн.ед.) (Рисунки В.17, В.18). В группе пациентов с АД средней тяжести этот показатель оставался повышенным до и после терапии, однако в группе тяжелого течения до лечения медиана составил максимальное значение 1871,53 (649,22-2656,33) (Рисунок В.19). Интересно, что с учетом терапии все же наблюдается тенденция к нормализации уровней этих цитокинов. Но в случае IL13 снижение экспрессии происходит эффективнее.

Так, в общей группе до лечения медиана по IL13 составляет 281 (12,83-4903,25), а в контрольной группе 0,34 (0,13-0,95). После лечения экспрессия снижается практически в 30 раз, однако все равно остается выше, чем в контрольной группе (Me = 9,58 (4,89-164,28)). С учетом SCORAD, максимальный

уровень экспрессии приходится на группу тяжелого течения АтД до лечения, где медиана равна 3932,01 (50,61-14230,29). Но после лечения уровень IL13 в этой группе также снижается, хотя достоверного изменения между этими группами не выявлено (Рисунки В.20-В.22).

Изменение экспрессии описываемых показателей иммунитета было также проанализировано согласно типу применяемого лечения в динамике. Для этого пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от назначения системной терапии. Полученные данные представлены в Таблице 9.

Таблица 9 – Уровень экспрессии генов в МНК у пациентов с АтД в зависимости от применяемой терапии, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Экспрессия гена (значения 2 ^{-ΔΔС(0)} , отн. ед.)	1 Пациенты с АтД до лечения, топическая терапия	2 Пациенты с АтД после лечения, топическая терапия	3 Пациенты с АтД до лечения, топическая + системная терапия	4 Пациенты с АтД после лечения, топическая + системная терапия	р
<i>TLR2</i>	4476,77 (66,66-19833,37)	104,69 (18,13-10809,41)	9069,19 (168,89-173568,39)	30,33* (3,84-1968,13)	p _{1/2} – ns p _{3/4} <0,05
<i>TLR9</i>	935,76 (35,24-3467,54)	110,38 (20,17-1201,19)	955,43 (256,74-4259,49)	56,89* (7,67-910,18)	p _{1/2} – ns p _{3/4} <0,05
<i>IL4</i>	643,73 (34,99-6900,45)	66,12 (17,35-333,65)	649,22 (143,29-2136,25)	238,86* (24,93-580,04)	p _{1/2} – ns p _{3/4} <0,05
<i>IL13</i>	249,00 (6,83-2718,99)	7,06 (4,98-308,69)	380,04 (52,71-6122,90)	3,13* (0,66-13,00)	p _{1/2} – ns p _{3/4} <0,01
<i>CAMP</i>	9,19 (4,42-28,71)	19,82 (0,82-55,05)	11,63 (6,82-24,59)	1,21* (0,10-9,85)	p _{1/2} – ns p _{3/4} <0,05
<i>DEFB1</i>	149,30 (17,85-461,74)	46,53 (10,27-163,39)	131,60 (86,93-684,44)	39,50 (0,79-290,02)	p _{1/2} – ns p _{3/4} – ns

Примечание – В колонке «р» показана степень достоверности для пар групп (1 и 2; 3 и 4). Зеленым цветом и звездочкой выделены группы с достоверно пониженным значением экспрессии. Достоверность между группами оценивалась по критерию Манна-Уитни

Из представленных результатов следует, что в целом через три месяца после лечения уровень экспрессии по всем изучаемым показателям иммунитета снижался. Однако достоверное снижение экспрессии практически по всем параметрам (за исключением гена *DEFB1*) регистрируется в группе, в которой в дополнение к топическому лечению применялась системная терапия (дупилумаб). При этом индекс SCORAD после проведения лечения в среднем улучшился на 63 % и составил $17 \pm 6,0$ баллов. Так, основные цитокины IL4 и IL13, на которые направлено действие этого препарата, показали нормализацию экспрессии своих генов после лечения в 3 и 127 раз соответственно (медиана для IL4 после терапии равна 238,86 (Рисунок 22); для IL13 равна 3,13).

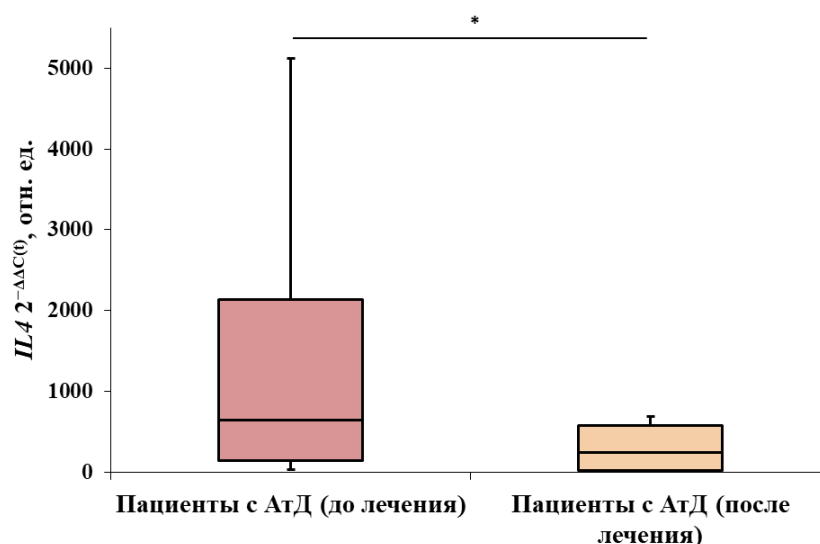


Рисунок 22 – Медианные значения уровня экспрессии гена *IL4* (отн. ед.) в МНК пациентов с АтД до и после применения системной терапии. * $p < 0,05$

Уровни экспрессии показателей врожденного иммунитета также снижались. Для TLRs наблюдалось снижение в 302 (для гена *TLR2*) и 16,7 (для гена *TLR9*) раз. Активация гена кателицидина снижалась (в 12 раз по сравнению с состоянием до лечения, $Me = 1,21$). Таким образом, системная терапия, направленная на подавление сигналов цитокинов IL4 и IL13, опосредованно приводит и к нормализации уровней экспрессии факторов врожденного иммунитета.

АтД в стадии обострения имеет свой уникальный иммунологический профиль, который характеризуется активацией экспрессии генов *TLR2* и *TLR9* в иммунологических клетках крови [166]. Это, по всей видимости, обеспечивает в организме системную защиту, являясь компенсаторным механизмом, способствующим продукции широкого спектра цитокинов, хемокинов, антимикробных пептидов и костимулирующих факторов [167].

В исследовании Tsybikov и соавт. было выявлено, что в циркулирующих моноцитах крови (CD14+ HLA-DR+) экспрессия рецептора TLR2 повышена по сравнению с контролем, что согласовывается с нашими данными [168]. Авторы считают, что это один из признаков искажения иммунного ответа во время обострения заболевания, опосредованного Th2- или Th17-хелперными клетками. Еще в одной работе, проведенной Salim и соавт., индуцировали экспрессию TLR2 на моноцитах пациентов с АтД *in vitro* посредством воздействия стафилококковым энтеротоксином типа В [169]. В ответ на стимуляцию именно в крови экспрессия этого рецептора повышалась по сравнению с контрольной группой.

При патологии взаимодействие между митохондриальной ДНК и TLR9 запускает каскад провоспалительных и аутоиммунных реакций. Данных по экспрессии гена *TLR9* при АтД в крови нет. Другие исследования показали, что полиморфизм промоторной области гена *TLR9*, ингибирующего адаптерного белка в сигнальном пути TLR, связан с atopическим дерматитом [170]. В совокупности полиморфизмы TLR (в особенности TLR2 и TLR9) или молекул их сигнальных путей могут приводить к функциональному дисбалансу иммунного ответа у пациентов с atopическим дерматитом.

В настоящий момент данных по поводу функционального значения антимикробных пептидов HBD1 и LL37 в крови при АтД не так много [171]. Помимо антибактериальной, противогрибковой и противовирусной активности, эти белки участвуют в хемотаксисе клеток, индукции иммунных медиаторов и регуляции воспалительного ответа. Активация кателицидинов может усиливаться вследствие работы ряда TLRs в ответ на патогенассоциированные молекулярные

паттерны. Есть данные, что HBDs и LL37 также стимулируют выработку провоспалительных цитокинов в тучных клетках и улучшают проницаемость сосудов [172].

Существует множество данных, что IL4 и IL13 цитокины играют центральную роль в поддержании воспаления при АД и являются мишенями для препарата дупилумаба, при применении которого происходит подавление молекул, участвующих в воспалительной реакции, следующей по Th2-типу. Было показано, что IL4 инициирует Th2-иммунный ответ, тогда как IL13 отвечает за его длительное поддержание [57]. Оба цитокина оказывают влияние на синтез IgE, также участвующего в патогенезе атопического дерматита. Кроме того, полиморфизмы генов *IL4* и *IL13* в промоторных областях связаны с предрасположенностью к развитию АД как у детей, так и у взрослых.

Для того чтобы установить, описать и обобщить особенности протекания воспалительного процесса при АД, в разделе 3.3. будет представлен анализ белковой продукции некоторых цитокинов.

3.3. Продукция цитокинов и IgE в периферической крови детей с атопическим дерматитом и в группе сравнения

На следующем этапе проводилась оценка цитокинового профиля в крови у детей с АД по сравнению с контролем. Ниже в Таблице 10 представлены результаты по продукции цитокинов, достоверно отличающиеся в группе пациентов. Ввиду того, что различий среди групп, разделенных по возрасту или по тяжести заболевания, обнаружено не было, данные представлены для общей выборки пациентов.

Представленные факторы (IL18, IL3, CXCL9, CXCL10 и IFN- γ) относятся к Th1-группе провоспалительных цитокинов. Данные по концентрациям указывают на достоверное снижение продукции всех этих цитокинов в крови пациентов с АД по сравнению с контролем. Результаты по группе противовоспалительных

цитокинов (например, IL4, IL9, IL17) не показали достоверной разницы с контрольной группой, поэтому в данном разделе представлены не будут.

Таблица 10 – Уровень продукции цитокинов и IgE в сыворотке крови у пациентов с АтД и в контрольной группе, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Концентрация цитокинов и IgE в сыворотке крови	Пациенты с АтД (6-18 лет)	Группа сравнения (здоровые дети)	p
IFN- γ [пг/мл]	25,68* (23,27-28,11)	48,34 (35,1-177,2)	p<0,01
IL18 [пг/мл]	72,46* (51,6-72,46)	163,3 (103,54-186,55)	p<0,01
IL3 [пг/мл]	1,35* (1,26-1,41)	2,12 (1,88-3,0)	p<0,01
CXCL9 [пг/мл]	134,03* (107,5-175,3)	1162,5 (654,66-1683,24)	p<0,01
CXCL10 [пг/мл]	164,76* (157,58-213,57)	714,94 (599,96-1736,8)	p<0,01
IgE [нг/мл]	804,18* (609,23-1276,95)	110,67 (34,52-110,68)	p<0,0001

Примечание – Цветом и звездочкой выделены группы с достоверно измененным значением концентрации относительно контрольной группы

Так, уровень IFN- γ в сыворотке пациентов был достоверно снижен примерно в 2 раза (Me равны 25,68 (23,27-28,11) и 48,34 (35,1-177,2) пг/мл), как представлено на Рисунке 23. Поэтому этот цитокин в стадии обострения

заболевания неактивен и на системном уровне не поддерживает воспалительный процесс.

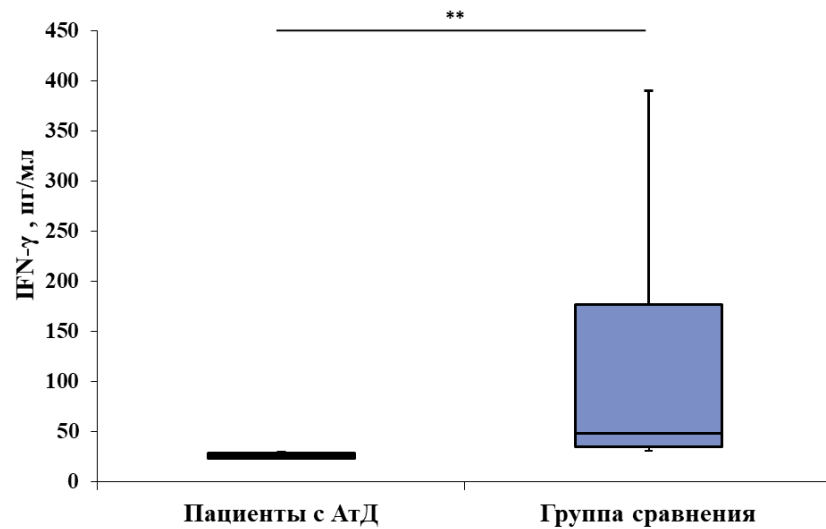


Рисунок 23 – Медианные значения концентрации IFN-γ [пг/мл] в сыворотке крови пациентов с АтД по сравнению с контролем. ** $p < 0,01$

Уровень концентрации другого цитокина, IL18, у детей с АтД представлен на Рисунке 24.

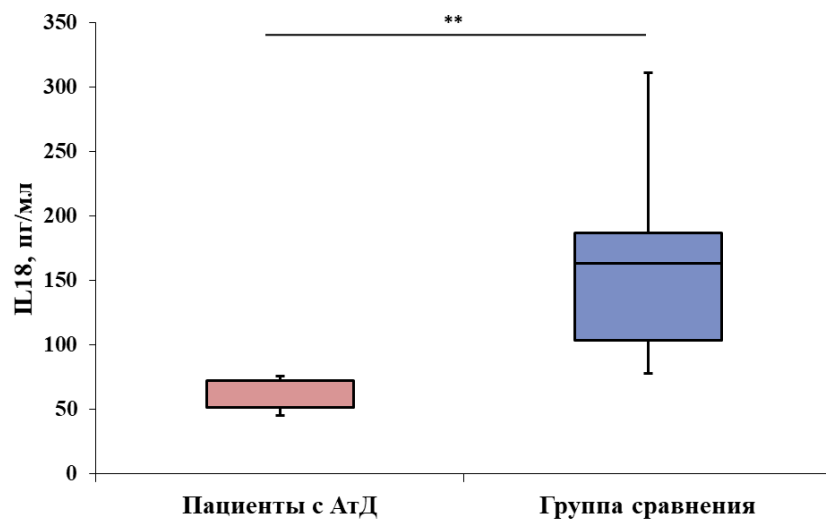


Рисунок 24 – Медианные значения концентрации IL18 [пг/мл] в сыворотке крови пациентов с АтД по сравнению с контролем. ** $p < 0,01$

Из графика видно, что концентрация IL18 в группе пациентов снижена по сравнению с контролем подобно показателю IFN- γ примерно в 2 раза (Me (группа пациентов с АД) = 72,46 (51,6-72,46) пг/мл). Это вновь свидетельствует о том, что при данной клинике обострения заболевания переключения дифференцировки Т-клеток в сторону Th1 происходить не будет.

Надо отметить, что IL3 проявляет со направленное действие с IL18. В данном исследовании уровень IL3 в сыворотке крови пациентов также был снижен в полтора раза (Me = 1,36 (1,26-1,41) пг/мл, $p < 0,01$), как представлено на Рисунке 25. Это подтверждает взаимосвязь с Th1-цитокином IL18 и отсутствие их активации у данной группы пациентов с АД.

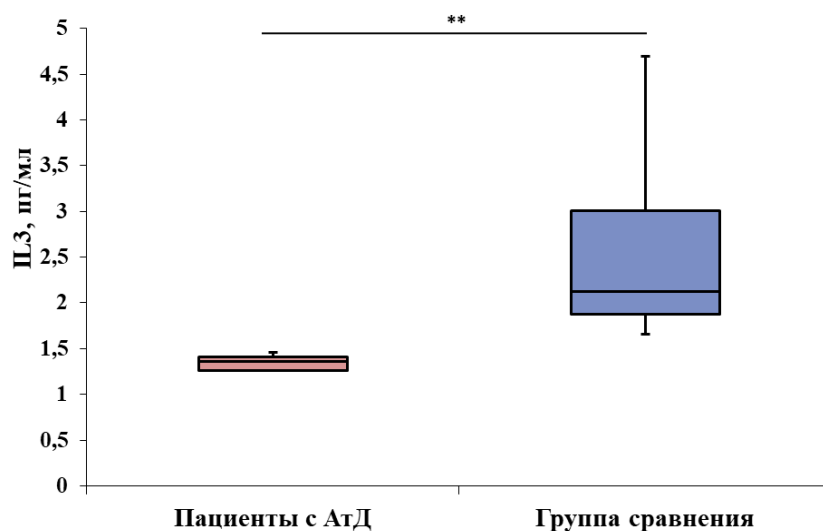


Рисунок 25 – Медианные значения концентрации IL3 [пг/мл] в сыворотке крови пациентов с АД по сравнению с контролем. ** $p < 0,01$

Активация различных сигнальных путей при атопическом дерматите как на локальном, так и на системном уровне возможна при вовлечении в каскад определенных типов хемокинов, которые также регулируют миграцию иммунных клеток к очагу воспаления. В данном исследовании результаты по двум хемокинам, CXCL9 и CXCL10, показали достоверные различия, как представлено на Рисунках 26 и 27 соответственно.

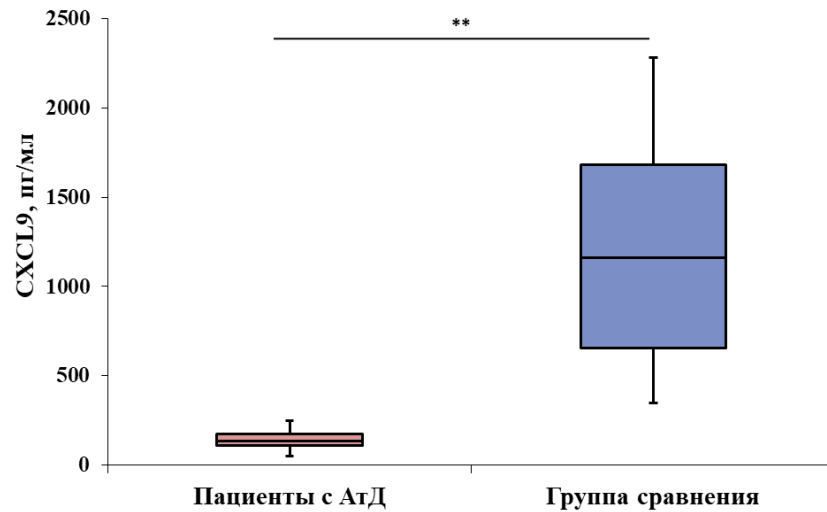


Рисунок 26 – Медианные значения концентрации CXCL9 [пг/мл] в сыворотке крови пациентов с АтД по сравнению с контролем. ** $p < 0,01$

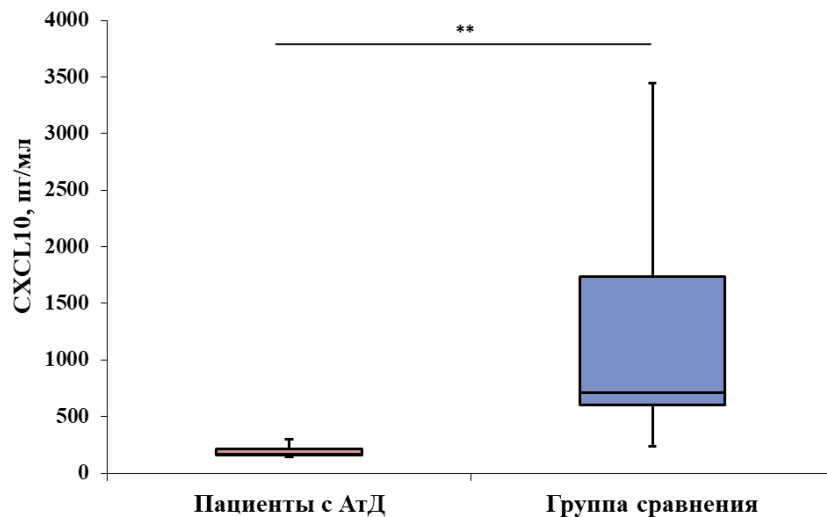


Рисунок 27 – Медианные значения концентрации CXCL10 [пг/мл] в сыворотке крови пациентов с АтД по сравнению с контролем. ** $p < 0,01$

На графиках видно, что концентрация обоих хемокинов снижена в 8,5 и 4,3 раза соответственно, $p < 0,01$. Ме (CXCL9) равна 134,03 (107,5-175,3), Ме (CXCL10) = 164,76 (157,58-213,57) пг/мл. Интересно, что при проведении

корреляционного анализа по Спирмену в группе цитокинов только эти два фактора показали очень высокую силу связи: $r = 1$ ($p = 0,017$). Это может свидетельствовать об их синергетическом действии у пациентов с АтД детского возраста, однако, опять же, проявляющемся не в стадии обострения или манифестации заболевания.

IFN- γ – это продукт Th1-клеток. Он относится к семейству интерферонов 2 типа, секретируется как факторами врожденного, так и приобретенного иммунитета, преимущественно лимфоидными клетками. Многие факторы, участвующие в реализации Th1-иммунного ответа, будут прямо или опосредованно способствовать выработке этого цитокина [11]. Так, например, IL18 в большей степени может усиливать продукцию IFN- γ .

Провоспалительный плейотропный цитокин IL18 также называют фактором индукции интерферона гамма. При патологических условиях в основном он вырабатывается макрофагами и дендритными клетками, а также кератиноцитами. Хотя существуют сведения, что при АтД IL18 способен увеличивать продукцию IL4, IL13 и гистамина посредством активации тучных клеток и базофилов, то есть IgE-независимым образом [173]. Однако в этом исследовании это неприменимо. По другим данным активация тучных клеток лишь усиливается в присутствии IL3 – цитокина, активирующегося посредством кальциневрина на ранних стадиях развития АтД (ссылка). Описанные интерлейкины по литературным данным обладали повышенной активностью в случае Th1-опосредованного воспаления, то есть в стадию хронического воспаления. Клиническая картина пациентов этого исследования не позволяет предполагать стадию хронизации процесса, поэтому закономерно в сыворотке крови эти факторы оказались супрессированы.

По литературным данным информация о хемокинах носит разнонаправленный характер [174]. В одном из исследований молекулярных паттернов в случае легкого течения атопического дерматита была показана важная роль CXCL9 в качестве индуктора воспаления кожи и его связь с генами, осуществляющими пролиферацию иммунных клеток [175]. Однако в этом исследовании описываются среднетяжелое и тяжелое течение АтД, поэтому

профиль цитокинов отличается. В другом исследовании проводили оценку сразу нескольких типов хемокинов, при этом обнаружилось, что именно в младшей возрастной группе было выявлено снижение концентрации CXCL9, CXCL10, что также коррелирует с полученными в данной работе результатами по пациентам детского возраста [176].

В работе также был проведен анализ уровня общего сывороточного IgE – иммуноглобулина, свидетельствующего о развитии аллергического дерматита. Его концентрация оказалась повышена практически в 8 раз у пациентов с АтД по сравнению с контролем (медианы по двум группам соответственно равны 804,18 (609,23-1276,95) нг/мл и 110,68 (34,52-184,8) нг/мл, $p < 0,0001$). График представлен на Рисунке 28.

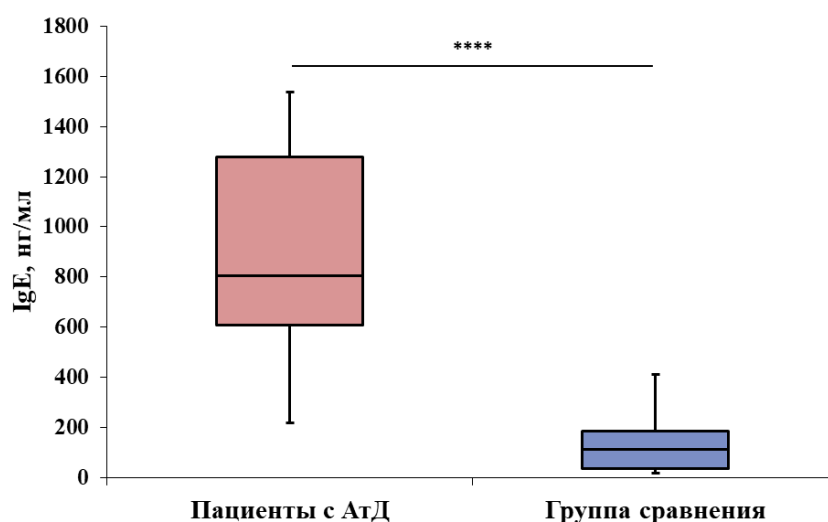


Рисунок 28 – Медианные значения концентрации IgE [нг/мл] в сыворотке крови пациентов с АтД по сравнению с контролем. **** $p < 0,0001$

Фенотип АтД пациентов данного исследования можно отнести именно к IgE-ассоциированному заболеванию. Как отмечалось ранее, экзогенный фенотип, или аллергический, составляющий ~ 70-80 % случаев заболевания характеризуется высокими уровнями продукции общего и/или аллерген-специфических IgE [13].

Как упоминалось ранее, Th1-иммунный ответ характерен для хронической стадии АтД. По другим данным, сдвиг баланса в сторону Th1-лимфоцитов наблюдается у пациентов с эндогенным типом АтД [13]. Описанные факторы IL18, IL3, CXCL9, CXCL10 и IFN- γ , действуя скоординировано, создают так называемую «цитокиновую сеть», действующую в противовес IgE-опосредованному механизму, то есть, проявляя антагонистический тип взаимодействия с Th2-цитокинами. По данным описываемого исследования поляризация иммунного ответа у детей с обострением АтД на системном уровне происходит по классическому пути в сторону Th2, поскольку общий сывороточный IgE повышен, экспрессия противовоспалительных цитокинов в иммунных клетках крови повышена (раздел 3.2.2.), а Th1-факторы супрессированы.

Для точного определения фенотипа заболевания важно учитывать системные изменения факторов иммунитета. По данным этого подраздела были получены результаты, свидетельствующие об отсутствии активации Th1-опосредованного иммунного ответа. Анализ полученных данных (экспрессионных данные в МНК и белковой продукции цитокинов и IgE в крови) в исследуемой группе пациентов с АтД на системном уровне показал развитие иммунного ответа по типу Th2, что характерно для экзогенного варианта заболевания.

Исходя из полученных данных по экспрессии в МНК (раздел 3.2.2.), а также по данным белкового анализа, был визуализирован сигнальный путь иммунных процессов, происходящих на системном уровне у детей и подростков в стадии обострения АтД и индуцированных повышенной продукцией IgE (Рисунок 29).

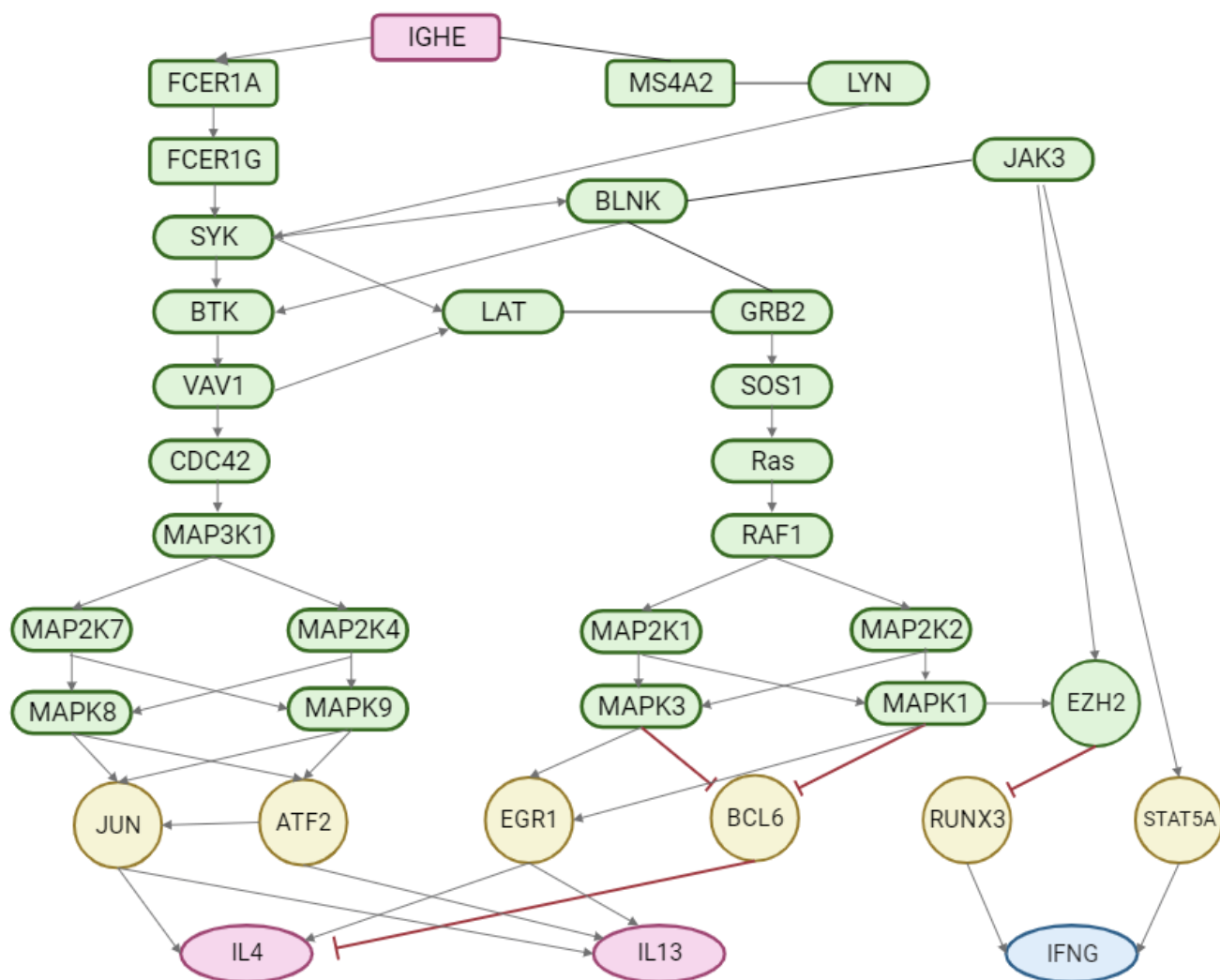


Рисунок 29 – Схема сигнального пути, реализуемого на системном уровне у пациентов с АД. Красным цветом обозначены гены с повышенной белковой продукцией, синим цветом – с пониженной белковой продукцией (разделы 3.2.2. и 3.3.). Транскрипционные факторы обозначены желтым цветом

Из Рисунка 29 видно, что транскрипционные факторы находятся в активированном состоянии и оказывают положительный эффект на экспрессию цитокинов IL4, IL13. Дальнейшее развитие иммунного ответа будет связано с В-клеточной активацией и реализацией Th2-иммунных реакций. Нельзя не отметить, что ряд генов приведенного каскада совпадает с дифференциально метилированными генами, выявленными в коже (раздел 3.1.), а именно *VAV1*, *MAP2K2*, *MAP2K4*.

По полученным данным IFN- γ находился в неактивном состоянии и его уровень был снижен. Из схемы видно, что еще несколько генов пересекаются с дифференциально метилированными генами, определенными в разделе 3.1.: *JAK3*, *RUNX3*. Не исключено, что их паттерн метилирования в иммунных клетках крови может совпадать с данными по коже.

Таким образом, получены и сопоставлены данные о молекулярных изменениях факторов иммунитета у пациентов с атопическим дерматитом детского возраста среднетяжелого и тяжелого течения на нескольких уровнях: на локальном, то есть в пораженной коже с учетом влияния метилирования на патологический процесс, а также на системном уровне, в иммунологических клетках крови и сыворотке, с учетом лечения в динамике, возраста пациентов и тяжести заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Атопический дерматит является актуальной проблемой современной аллергологии и дерматологии [3,8]. В виду того, что патогенез этого заболевания определяет множество взаимосвязанных факторов, а именно нарушение нормальной барьерной функции и воспаление, иммунологические реакции и их регуляция, генетика, дисбаланс микробиоты, то и подход к его изучению должен быть комплексный. Немаловажным является тот факт, что эндотип зависит от течения заболевания, возраста пациента и его принадлежности к определенной этнической группе [13].

Знание об основных звеньях иммунопатогенеза АД с целью предотвращения или модификации осложненного течения является многообещающим подходом к лечению в будущем. Однако для достижения этой цели необходимо дополнить знания о сложных молекулярных механизмах, лежащих в основе развития АД. Поэтому целью исследования являлось проведение комплексного анализа механизмов иммунитета (метилование, экспрессионный профиль генов *TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, *DEFB1* и анализ цитокиновой продукции) на локальном и системном уровнях при атопическом дерматите среднетяжелого и тяжелого течения у детей с учетом терапии.

Так, метилирование, один из механизмов эпигенетической модификации ДНК, позволяет регулировать экспрессию генов, в том числе иммунологических факторов, вовлеченных в патогенез АД [14].

Паттерны метилирования меняются в патологических условиях, в том числе при аллергических заболеваниях. Как отмечалось ранее, было проведено несколько полногеномных исследований метилирования [20–24]. Во всех случаях, найденные авторами и достоверно отличающиеся от контрольной группы гены были связаны с нарушением функции кератиноцитов, а также с нарушениями в механизмах иммунных реакций, влияющих на ключевые эффекторные молекулы, а также на проявление фенотипа заболевания в целом. Те же категории генов

определены и в данной работе, однако проведение подобного анализа на материале от пациентов детского возраста представлено впервые.

В исследовании представлен подход комплексной оценки показателей иммунитета у детей и подростков с обострением заболевания. На первом этапе проводилось полногеномное исследование метилома при помощи высокоэффективного секвенирования и анализ дифференциально метилированных генов, связанных с нарушением барьерной функции кератиноцитов и иммунологических факторов. В ходе этого этапа были определены основные группы генов, белковые продукты которых участвуют в иммунных сигнальных путях заболевания. В основном они были связаны с факторами транскрипции и транскрипционными модификациями, с передачей сигнала в клетках, поддержанием или нарушением дифференцировки кератиноцитов и дендритных клеток кожи. Степень их метилирования или деметилирования определяла, насколько тот или иной фактор влияет на нарушение нормальных физиологических процессов в коже.

Знание об основных генах-мишенях, которые могут обладать дифференциальной степенью метилирования, опосредующей развитие заболевания у пациента, поможет осуществить персонализированный подход к ведению и прогнозированию дальнейшего развития болезни. В теме метилирования как эпигенетической модификации невозможно не упомянуть про существующие лекарственные препараты, направленные на этот механизм. Одним из таких соединений является 5-азацитидин. Механизм его действия заключается в гипометилировании при связывании с ДНК-метилтрансферазой 1, ферментом, присоединяющим метильную группу к C₅ атому цитозина, который расположен в CpG димерах. При применении в малых дозах 5-азацитидин способствует восстановлению транскрипционной активности ранее метилированных генов [177]. На сегодняшний день препарат применяется в основном в целях комплексной терапии злокачественных заболеваний крови. Однако проводились экспериментальные исследования применения этого

соединения *in vitro* при дерматитах, в частности, при АтД в отношении некоторых генов [17,178].

В этом исследовании предложены метилированные гены-кандидаты для будущего изучения изменения их активности посредством деметилирующих агентов и влияния на течение атопического дерматита.

На втором этапе работы, основываясь на данных по дифференциально метилированным областям и наиболее вовлеченным в патологический процесс иммунным сигнальным каскадам, были отобраны гены (*TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, *DEFB1*) для определения их активности в коже у детей разных возрастных групп, а также для сопоставления этих данных с уровнем метилирования. Также проводился корреляционный анализ по исследуемым параметрам в коже. По полученным данным был представлен сигнальный путь, включающий в себя пониженные уровни экспрессии активаторов каскада и его конечных продуктов (*TLR2*, *TLR9*, *IL4*).

Данные по экспрессии в МНК отличались от результатов по локальному уровню, поскольку все изученные факторы имели повышенный уровень относительной экспрессии у пациентов с АтД. При разделении на группы более выраженные изменения касались старшей возрастной группы (12-18 лет); во всех случаях сходные изменения проявлялись как при среднетяжелом, так и при тяжелом течении АтД. При разделении клинических групп по варианту терапии нормализация уровня экспрессии показателей иммунитета наблюдалась после назначения курса дупилумаба. Это свидетельствует о том, что при тяжелом течении АтД требуется системное лечение.

Для точного определения фенотипа заболевания важно учитывать системные изменения факторов иммунитета. По данным этого исследования фенотип иммунного ответа на системном уровне характеризовался как Th2-зависимый.

В подтверждение этому были приведены данные анализа продукции ряда цитокинов и концентрации IgE. Все изученные цитокины Th1-типа (*IL18*, *IL3*, *CXCL9*, *CXCL10* и *IFN-γ*) обладали сниженной концентрацией в группе

пациентов с АтД по сравнению с контролем. Концентрация общего сывороточного IgE, напротив, была повышена.

Касаемо фенотипических особенностей иммунитета на системном уровне в литературе описаны различные данные. Так, в одном из исследований в детской популяции, а именно у новорожденных с диагнозом АтД, был показан низкий уровень факторов Th1 и высокий уровень факторов Th2 в пуповинной крови [179]. Как отмечают авторы, такой иммунологический профиль может быть опосредован, в том числе, различными эпигенетическими факторами [180]. В группах детей младшего возраста также регистрировалось преобладание Th2-лимфоцитов в крови [179,181]. Результаты проточной цитометрии в крови показали подавление Th1-ответа у детей с АтД по сравнению с группой взрослых пациентов с АтД и контрольной группой здоровых людей [182]. В работе Czarnowicki и соавт., помимо активации Th2-ответа в крови у детей с ранней манифестацией АтД, были также показаны изменения в субпопуляциях В-клеток и IgE-сенсibilизация, которая с возрастом лишь усиливается, что говорит о значимости IgE при раннем начале заболевания [56]. Одновременная активация высокоаффинного рецептора FcεRI, а также TLRs, способствовала сенсibilизации и инициации АтД, при этом активация FcεRI была на порядки выше у детей по сравнению с взрослыми пациентами [183].

Модифицированные в виду метилирования функции ряда генов в коже (например, *CEBPG*, *CCR7*, *JAK3*, *VAV1*), вопреки общепринятой концепции локального воспаления в период обострения по типу Th2, способствовали сдвигу баланса к Th1-типу воспаления. Нарушение выработки противовоспалительных цитокинов в видимо пораженной коже пациентов можно считать своего рода патологическим механизмом, в ходе которого не реализуется адекватное иммунное реагирование на уровне кератиноцитов. Однако в то же время переключение в сторону противовоспалительных реакций происходит на системном уровне, что свидетельствует о неоднозначности локальных иммунных процессов в виду метилирования и компенсаторном переключении фенотипов.

На молекулярном уровне опосредованное определение терапевтического эффекта от лечения отобранных пациентов при повторном анализе экспрессии на системном уровне имело тенденцию к нормализации по всем факторам, однако достоверных отличий между группами зарегистрировано не было. Такие результаты могут объясняться исходной разнонаправленностью иммунных реакций.

Достоверное снижение экспрессии практически по всем параметрам (за исключением гена *DEFB1*) регистрируется в группе, в которой в дополнение к топическому лечению применялась системная терапия (дупилумаб).

Таким образом, на основании полученных в ходе исследования обобщенных данных роль иммунных факторов в патогенезе АтД у детей и подростков характеризуется как разнонаправленная, как представлено на Рисунке 30. С одной стороны, происходит нарушение противовоспалительного ответа в пораженной коже, что усугубляет течение и длительность заболевания, по всей видимости из-за измененной степени метилирования генов кератиноцитов и нарушенной (сниженной) экспрессии генов *TLR2*, *TLR9* и *IL4*, что поддерживает локальное воспаление. С другой стороны, на системном уровне доминируют противовоспалительные факторы и активируются структуры врожденного иммунитета, обеспечивая регуляцию острого системного воспалительного процесса и повышения общей сенсibilизации организма. Об этом свидетельствует повышение уровня экспрессии *TLR2*, *TLR9*, *CAMP*, *DEFB1*, *IL4*, *IL13*, а также увеличение концентрации IgE и снижение провоспалительных Th1-цитокинов.

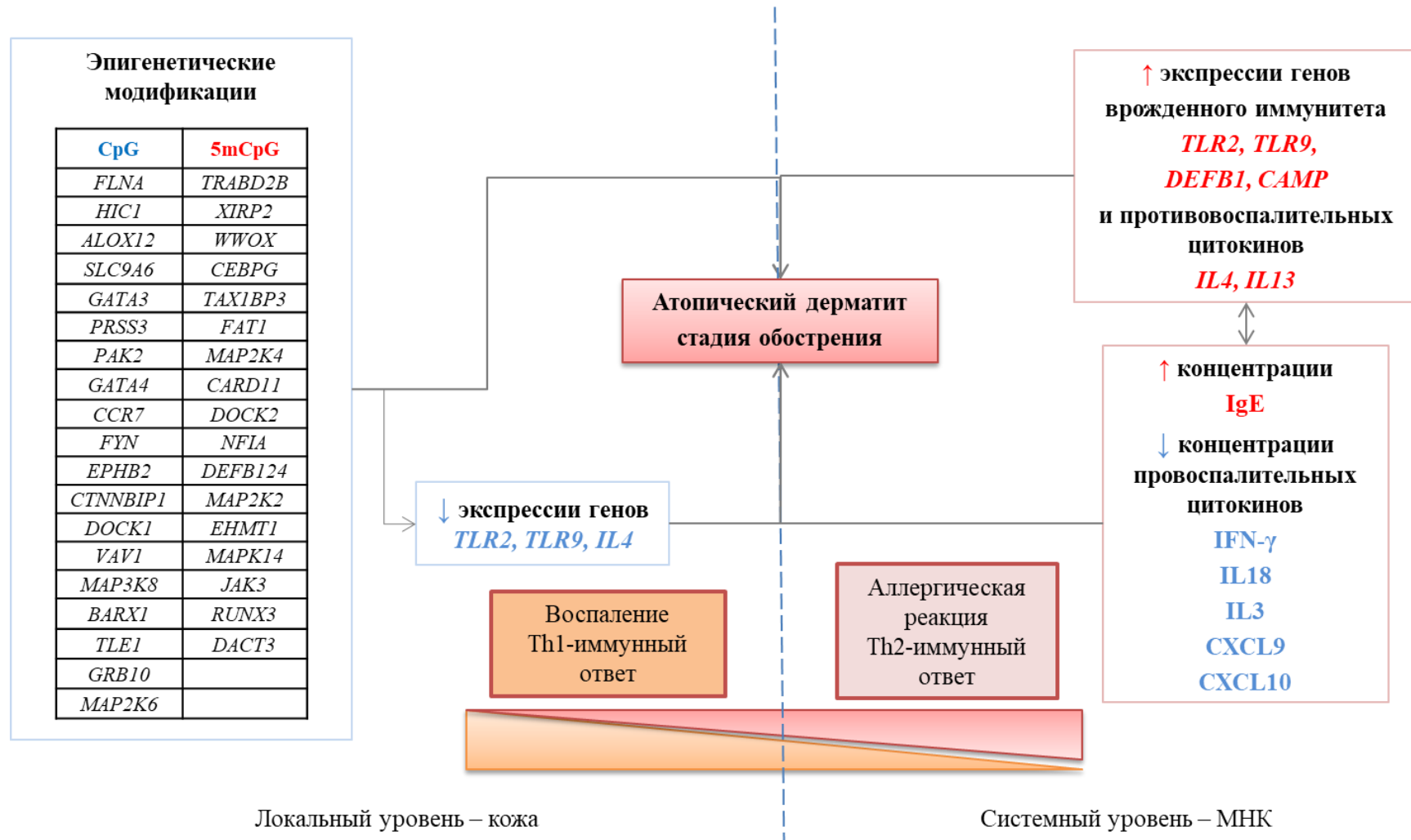


Рисунок 30 – Обобщенная схема полученных в исследовании данных для среднетяжелого и тяжелого АтД у детей и подростков на локальном и системном уровне в период обострения заболевания

Ввиду неоднородности результатов изученные цитокины могут служить диагностическими маркерами только с учетом ткани. Данные по метилированию, уровню продукции иммунных факторов наряду с корреляционным анализом позволяют сделать заключение, что при нарушении барьерной функции кожи при АтД тяжелой степени у пациентов детского возраста (от 12 до 18 лет) в кератиноцитах может наблюдаться сопряженная пониженная активность генов TLR9 и IL4 (в случае, если при уточнении диагноза целесообразно исследование биоптатов кожи). В крови, напротив, регистрируется повышенная иммунная активность показателей иммунитета. Опираясь на сведения об экспрессионных уровнях указанных факторов иммунитета (TLR2, TLR9, CAMP, IL4, IL13) до и после лечения, в дополнение к определению концентрации общего IgE, возможно контролировать эффект от проводимой терапии в динамике.

Изучение регуляции молекулярно-генетических механизмов иммунитета, вовлеченных в процессы воспалительных реакций при АтД, способствует уточнению иммунопатогенеза этого заболевания, определению диагностических маркеров и мишеней для таргетной лекарственной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Определены дифференциально метилированные гены в биоптатах кожи пациентов детского возраста с атопическим дерматитом тяжелой степени, белковые продукты которых связаны с нарушением барьерной функции кератиноцитов. В группе процессов, связанных с транскрипцией и транскрипционными модификациями в кератиноцитах, определены гиперметилированные *EHMT1*, *RUNX3*, *CEPBG*, *MAPK14*, *CARD11* и деметилированные гены; в группе процессов, связанных с работой малых ГТФаз при передаче сигналов в клетке, определен метилированный ген *DOCK2* и деметилированные гены *DOCK1*, *CCR7*; в группе, связанной с поддержанием целостности и нормального функционирования кожного барьера, определены метилированные *FAT1*, *XIRP2* и деметилированный ген *FYN*, а также деметилированные гены WNT-зависимого сигнального пути (*HIC1*, *CTNNBIP1*, *BARX1*, *TLE1* и *GRB10*).

2. Выявлены дифференциально метилированные гены иммунологических факторов, способствующие развитию АтД: группа деметилированных генов, отвечающая за дифференцировку дендритных клеток (*SLC9A6*, *EPHB2*, *PAK2*), а также гены, связанные с процессами транскрипции в иммунных клетках – гиперметилированные *MAP2K4*, *MAP2K2*, *JAK3* и деметилированные *GATA3*, *GATA4*, *VAV1*, *MAP2K6*, *MAP3K8*.

3. У детей с АтД определено снижение уровня экспрессии на локальном уровне (в кератиноцитах кожи) следующих генов: *TLR2* (в 6,7 раз), *TLR9* (в 11,4 раза), *IL4* (в 12 раз) по сравнению с контрольной группой. В зависимости от возраста экспрессия менялась по-разному. Так, в младшей возрастной группе пациентов от 6 до 12 лет зарегистрировано снижение экспрессии генов *TLR2*, *TLR9*. В старшей группе от 12 до 18 лет наблюдается снижение экспрессии генов *TLR9* и *IL4*.

4. В мононуклеарных клетках крови показано изменение уровня экспрессии генов паттерн-распознающих рецепторов по сравнению с контрольной

группой: у пациентов с АтД регистрируется повышение экспрессии генов *TLR2* (в 540 раз), *TLR9* (в 740 раз). Для генов Th2-цитокинов регистрируется повышение экспрессии генов *IL4* (в 1400 раз) и *IL13* (в 800 раз). В отношении генов АМП также выявлено усиление их экспрессии (в 140 раз) для *DEFB1* и (в 40 раз) для *SAMP*. Изменения уровня экспрессии генов в МНК наблюдаются в группах при разделении пациентов по возрасту (более выраженные изменения выявляются в группе 12-18 лет) и тяжести заболевания (подобные изменения проявляются как при среднетяжелом, так и при тяжелом течении).

5. После лечения экспрессия большинства генов в МНК снижалась. По сравнению с контрольной группой разница в 45 раз зарегистрирована для *TLR9*; в 180 и 30 раз для *IL4* и *IL13* соответственно; а также в 25 и 50 раз для *DEFB1* и *SAMP*. Нормализация показателей иммунитета (*IL4*, *IL13*, *TLR2*, *TLR9*, *SAMP*) после лечения наблюдалась в случае применения системной терапии дупилумабом.

6. Выявлено снижение уровня продукции Th1-цитокинов: *IFN-γ* (в 1,9 раз), *IL18* (в 2,3 раза), *IL3* (в 1,5 раза), *CXCL9* (в 8,5 раз), *CXCL10* (в 4,3 раза). В то же время общий уровень *IgE* в сыворотке крови пациентов повышен (в 7 раз), свидетельствуя о преобладании Th2-иммунного ответа у пациентов с АтД.

7. Определена высокая сила корреляционной связи по экспрессионным данным в коже между *TLR9* и *IL4* ($r = 0,73$), а также между *IL4* и *HBD1* ($r = 0,80$); в мононуклеарных клетках крови – между показателями *TLR9* и *HBD1* ($r = 0,74$). Выявлена высокая сила корреляционной связи по данным белкового анализа в сыворотке крови между *CXCL9* и *CXCL10* ($r = 1,00$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Сведения, полученные по полногеномному исследованию метилирования, а также анализу экспрессии генов в коже среди пациентов с тяжелым течением АД, могут служить основой для исследований в области фармакогеномики с целью обеспечения персонализированного подхода в разработке и применении новых лекарственных средств (чей механизм, в частности, связан с влиянием на процессы метилирования/деметиляции).
2. Полученные данные по полногеномному метилированию, а также по экспрессионному анализу могут использоваться для разработки диагностических систем.
3. Комплексный подход, включающий изучение экспрессии генов и цитокиновой продукции в крови, позволяет судить об иммунофенотипе заболевания, что определяет выбор дальнейшей тактики ведения пациента.
4. Атопический дерматит тяжелого течения требует применения системной терапии. С помощью показателей иммунитета (TLR2, TLR9, CAMP, IL4, IL13) возможно контролировать достижение терапевтического эффекта и его удержания на фоне проводимого лечения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМП – антимикробный пептид

АтД – атопический дерматит

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНК-МТ – ДНК-метилтрансфераза

кДНК – комплементарная ДНК

МНК – моноклеарные клетки

РНК – рибонуклеиновая кислота

CAMP (LL37) – cathelicidin antimicrobial peptide

CD – cluster of differentiation

CLA – cutaneous lymphocyte-associated antigen

CXCL – chemokine (C-X-C motif) ligand

DMR – differentially methylated region

EASI – Eczema Area and Severity Index

FcεR – Fc receptors for IgE

HBD – human β-defensin

IDEC – inflammatory dendritic epidermal cells

IFN – interferon

Ig – immunoglobulin

IL – interleukin

JAK – Janus kinase

MAPK – mitogen activated kinase-like protein

MRSA – methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MSSA – methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*

MyD88 – myeloid differentiation primary response gene (88)

PAMP – pathogen-associated molecular pattern

PRR – pattern recognition receptors

SCORAD – Scoring of Atopic Dermatitis

SE – super-enhancers

Th – T helper

TLR – Toll-like receptors

TNF – tumor necrosis factor

TSLP – thymic stromal lymphopoietin

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атопический дерматит. Клинические рекомендации / А. А. Кубанов, Л. С. Намазова-Баранова, Р. М. Хаитов [и др.] // Российский аллергологический журнал. – 2021. – Т. 18. – № 3. – С. 44-92.
2. Биологическая терапия среднетяжелых и тяжелых форм атопического дерматита в детском возрасте / Н. Н. Мурашкин, Л. С. Намазова-Баранова, Л. А. Опрятин [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2020. – Т. 19. – № 6. – С. 432-443.
3. Bieber, T. Atopic dermatitis / T. Bieber // N Engl J Med. – 2008. – Vol. 358. - № 14. – P. 1483-1494.
4. Караулов, А. В. Иммунология, микробиология и иммунопатология кожи / А. В. Караулов, С. А. Быков, А. С. Быков. – Москва : Издательство БИНОМ, 2012. – 328 с. – ISBN 978-5-9518-0463-1. – Текст : непосредственный.
5. Pyun, B.Y. Natural history and risk factors of atopic dermatitis in children / B. Y. Pyun // Allergy Asthma Immunol Res. – 2015. – Vol. 7. – № 2. – P. 101-105.
6. Современные представления о возможностях вторичной профилактики «атопического марша» у детей с атопическим дерматитом / Н. Н. Мурашкин, Л. С. Намазова-Баранова, Р. А. Иванов [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2020. – Т. 19. – № 6. – С. 514-519.
7. Pathways to managing atopic dermatitis: consensus from the experts / M. G. Lebwohl, J. Q. Del Rosso, W. Abramovits, [et al.] // J Clin Aesthet Dermatol. – 2013. – Vol. 6. – № 7 Suppl. – P. S2-S18.
8. Горский, В. С. Современные представления о патогенезе атопического дерматита / В. С. Горский, В. А. Блюмина // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2022. – № 3. – С. 70-76.
9. Silverberg, N.B. Inside out or outside in: does atopic dermatitis disrupt barrier function or does disruption of barrier function trigger atopic dermatitis? / N. B. Silverberg, J. I. Silverberg. // Cutis. – 2015. – Vol. 96. – № 6. – P. 359-361.

10. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis / I. H. Kuo, T. Yoshida, A. De Benedetto, L. A. Beck, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2013. – Vol. 131. – № 2. – P. 266-278.
11. Ярилин, А. А. Иммунология. / А. А. Ярилин ; – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.: ил.; ISBN 978-5-9704-1319-7. – Текст : непосредственный.
12. Биологические препараты в терапии атопического дерматита и бронхиальной астмы: фокус на дупилумаб / В.А. Ревякина, Н.А. Геппе, А.Б. Малахов [и др.] // *Педиатрия. Consilium Medicum.* – 2021. – № 2. – С. 129-137.
13. Atopic dermatitis endotypes and implications for targeted therapeutics / T. Czarnowicki, H. He, J. G. Krueger, [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2019. – Vol. 143. – № 1. – P. 1-11.
14. Insights Into the Role of DNA Methylation in Immune Cell Development and Autoimmune Disease / J. Li, L. Li, Y. Wang, [et al.] // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – Vol. 9. – P. 757318.
15. Expression of DNMT-1 in patients with atopic dermatitis / T. Nakamura, I. Sekigawa, H. Ogasawara, [et al.] // *Arch Dermatol Res.* – 2006. – Vol. 298. – № 5. – P. 253-256.
16. Demethylation of the FCER1G promoter leads to FcεRI overexpression on monocytes of patients with atopic dermatitis / Y. Liang, P. Wang, M. Zhao, [et al.] // *Allergy.* – 2012. – Vol. 67. – № 3. – P. 424-430.
17. Promoter demethylation contributes to TSLP overexpression in skin lesions of patients with atopic dermatitis / Y. Luo, B. Zhou, M. Zhao, [et al.] // *Clin Exp Dermatol.* – 2014. – Vol. 39. – № 1. – P. 48-53.
18. Prenatal 25-hydroxyvitamin D deficiency affects development of atopic dermatitis via DNA methylation / H. J. Cho, Y. H. Sheen, M. J. Kang, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2019. – Vol. 143. – № 3. – P. 1215-1218.
19. Promoter DNA methylation contributes to human β-defensin-1 deficiency in atopic dermatitis / Y. H. Noh, J. Lee, S. J. Seo, [et al.] // *Anim Cells Syst (Seoul).* – 2018. – Vol. 22. – № 3. – P. 172-177.

20. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project / ENCODE Project Consortium, E. Birney, J. A. Stamatoyannopoulos, [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 447. – № 7146. – P. 799-816.
21. The characteristics of genome-wide DNA methylation in naïve CD4⁺ T cells of patients with psoriasis or atopic dermatitis / J. Han, S. G. Park, J. B. Bae, [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2012. – Vol. 422. – № 1. – P. 157-163.
22. An integrated epigenetic and transcriptomic analysis reveals distinct tissue-specific patterns of DNA methylation associated with atopic dermatitis / E. Rodríguez , H. Baurecht, A. F. Wahn, [et al.] // *J Invest Dermatol*. – 2014. – Vol. 134. – № 7. – P. 1873-1883.
23. Skin DNA methylation profile in atopic dermatitis patients: A case-control study / O. Y. Olisova, N. G. Kochergin, L. N. Kayumova, [et al.] // *Exp Dermatol*. – 2020. – Vol. 29. – № 2. – P. 184-189.
24. Replicated methylation changes associated with eczema herpeticum and allergic response / M. P. Boorgula, M. A. Taub, N. Rafaels, [et al.] // *Clin Epigenetics*. – 2019. – Vol. 11. – № 1. – P. 122.
25. Клинические рекомендации «Атопический дерматит». Утверждены Минздравом РФ (26.08.2021) / Общероссийская общественная организация «Российское общество дерматовенерологов и косметологов», Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов, Союз педиатров России. – 2021. – https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/265_2. (дата обращения: 14.09.2023)
26. Langan, S.M. Atopic dermatitis / S. M. Langan, A. D. Irvine, S. Weidinger // *Lancet*. – 2020. – Vol. 396. – № 10247. – P. 345-360.
27. Nutten, S. Atopic Dermatitis: Global Epidemiology and Risk Factors / S. Nutten // *Ann Nutr Metab*. – 2015. – Vol. 66. – № Suppl. 1. – P. 8-16.
28. Understanding and Managing Atopic Dermatitis in Adult Patients / C. N. Ellis, A. J. Mancini, A. S. Paller, [et al.] // *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. – 2012. – Vol. 31. – № 3. – P. S18-S22.

29. Кожные и венерические болезни : учебник для студентов мед. вузов / О. Л. Иванов, В. А. Молочков, Ю. С. Бутов, С. С. Кряжева ; под редакцией О. Л. Иванова. – Москва : Шико, 2006. – 480 с.: ил.; ISBN 5-900758-33-8. – Текст : непосредственный.
30. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma / S. Illi, E. von Mutius, S. Lau, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2004. – Vol. 113. – № 5. – P. 925-931.
31. Silvestre Salvador, J. Atopic Dermatitis in Adults: A Diagnostic Challenge / J. Silvestre Salvador, D. Romero-Pérez, B. Encabo-Durán // *J Investig Allergol Clin Immunol.* – 2017. – Vol. 27. – № 2. – P. 78-88.
32. Тамразова, О. Б. Ксероз кожи: симптом, синдром или болезнь? / О. Б. Тамразова // *Клиническая дерматология и венерология.* – 2019. – Т. 18. – № 2. – С. 193-202.
33. Atopic Dermatitis in Children and Adults—Diagnosis and Treatment / A. Wollenberg, T. Werfel, J. Ring, [et al.] // *Dtsch Arztebl Int.* – 2023. – Vol. 120. – № 13. – P. 224-234.
34. Зуд при атопическом дерматите: от этиологических особенностей к терапевтической тактике / Н. Н. Мурашкин, Л. А. Опрятин, Р. В. Епишев [и др.] // *Вопросы современной педиатрии.* – 2020. – Т. 19. – № 6. – С. 468-476.
35. 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.
36. Pruritus Characteristics in Severe Atopic Dermatitis in Adult Patients / A. K. Jaworek, K. Szafraniec, Z. Doniec, [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2021. – Vol. 1289. – P. 71-77.
37. The role of bacterial skin infections in atopic dermatitis: expert statement and review from the International Eczema Council Skin Infection Group / H. Alexander, A. S. Paller, C. Traidl-Hoffmann, [et al.] // *Br J Dermatol.* – 2020. – Vol. 182. – № 6. – P. 1331-1342.

38. Ramírez-Marín, H.A. Differences between pediatric and adult atopic dermatitis / H. A. Ramírez-Marín, J. I. Silverberg // *Pediatr Dermatol.* – 2022. – Vol. 39. – № 3. – P. 345-353.
39. Phenotypical Differences of Childhood- and Adult-Onset Atopic Dermatitis / J. I. Silverberg, P. P. Vakharia, R. Chopra, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol Pract.* – 2018. – Vol. 6. – № 4. – P. 1306-1312.
40. Оценка степени тяжести атопического дерматита — стандартизованные индексы тяжести SCORAD и EASI / А. Э. Карамова, В. В. Чикин, Л. Ф. Знаменская, К. М. Аулова // *Вестник дерматологии и венерологии.* – 2022. – Т. 98. – № 3. – С. 53-60.
41. Characterization of different courses of atopic dermatitis in adolescent and adult patients / D. Garmhausen, T. Hagemann, T. Bieber, [et al.] // *Allergy.* – 2013. – Vol. 68. – № 4. – P. 498-506.
42. Hanifin, J.M. Diagnostic Features of Atopic Dermatitis / J. M. Hanifin, G. Rajka // *Acta Derm Venereol.* – 1980. – Vol. 60. – P. 44-47.
43. Mehta, Y. Relationship Between Atopic Dermatitis and Food Allergy in Children / Y. Mehta, D. G. Fulmali // *Cureus.* – 2022. – Vol. 14. – № 12. – P. e33160.
44. Детская аллергология / [А. А. Баранов и др.] ; под ред. А. А. Баранова, И. И. Балаболкина. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 687 с. – ISBN 5-9704-0173-0. – Текст : непосредственный.
45. Bantz, S.K. The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma / S. K. Bantz, Z. Zhu, T. Zheng // *J Clin Cell Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – № 2. – P. 202.
46. Contact Dermatitis in Atopic Dermatitis Children-Past, Present, and Future / J. Borok, C. Matiz, A. Goldenberg, [et al.] // *Clin Rev Allergy Immunol.* – 2019. – Vol. 56. – № 1. – P. 86-98.
47. Conlon, E.G. A Comparison of Two Chronic Skin Conditions: Atopic Dermatitis and Psoriasis / E. G. Conlon, K. T. Wright // *J Spec Oper Med.* – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 125-127.

48. Atopic dermatitis and risk of hypertension, type 2 diabetes, myocardial infarction and stroke in a cross-sectional analysis from the Canadian Partnership for Tomorrow Project / A. M. Drucker, A. A. Qureshi, T. J. B. Dummer, [et al.] // *Br J Dermatol.* – 2017. – Vol. 177. – № 4. – P. 1043-1051.
49. An Integrated Model of Atopic Dermatitis Biomarkers Highlights the Systemic Nature of the Disease / B. Ungar, S. Garcet, J. Gonzalez, [et al.] // *J Invest Dermatol.* – 2017. – Vol. 137. – № 3. – P. 603-613.
50. Baker, B.S. The role of microorganisms in atopic dermatitis / B. S. Baker // *Clin Exp Immunol.* – 2006. – Vol. 144. – № 1. – P. 1-9.
51. Кудрявцева, А.В. Современные аспекты патогенеза атопического дерматита у детей / А.В. Кудрявцева // *Российский аллергологический журнал.* – 2010. – № 5. – С. 48-57.
52. Кудрявцева, А.В. Нарушение кожного барьера как ведущий фактор формирования местного воспалительного процесса при атопическом дерматите / А.В. Кудрявцева // *Вестник дерматологии и венерологии.* – 2017. – № 4. – С. 82-89.
53. Атопический дерматит. Междисциплинарный подход к диагностике и лечению : руководство для врачей / [Д. В. Заславский и др.] ; под редакцией Д. В. Заславского, О. А. Свитич, А. В. Кудрявцевой. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2023. – 288 с. – ISBN 978-5-9704-7812-7. – Текст : непосредственный.
54. Severe skin inflammation and filaggrin mutation similarly alter the skin barrier in patients with atopic dermatitis / G. Mócsai, K. Gáspár, G. Nagy, [et al.] // *Br J Dermatol.* – 2014. – Vol. 170. – № 3. – P. 617-624.
55. Ji, H. Oxidative Stress in Atopic Dermatitis / H. Ji, X.-K. Li // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 1-8.
56. Alterations in B-cell subsets in pediatric patients with early atopic dermatitis / T. Czarnowicki, H. Esaki, J. Gonzalez, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2017. – Vol. 140. – № 1. – P. 134-144.e9.
57. Severe atopic dermatitis is characterized by selective expansion of circulating TH2/TC2 and TH22/TC22, but not TH17/TC17, cells within the skin-homing T-cell

- population / T. Czarnowicki, J. Gonzalez, A. Shemer, [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2015. – Vol. 136. – № 1. – P. 104-115.e7.
58. Association of the NOS3 Gene Polymorphisms with the Risk of Atopic Dermatitis in Children / O. A. Svitich, A. V. Kudryavtseva, E. S. Slyusareva, E. O. Kravtsova, E. A. Meremianina, E. P. Bystritskaya, V. V. Sobolev, A. I. Ryabtsev, A. B. Potapova, V. V. Zverev // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2020. – Vol. 170. – № 12. – P. 787-790.
59. Генетические аспекты иммунопатогенеза атопического дерматита / О. Г. Елисютина, Е. С. Феденко, М. Н. Болдырева, Г. О. Гудима // *Иммунология*. – 2015. – Т. 36 – № 2. – С. 122-128.
60. Locus 1q21 Gene expression changes in atopic dermatitis skin lesions: deregulation of small proline-rich region 1A / J. Jarzab, B. Filipowska, J. Zebracka, [et al.] // *Int Arch Allergy Immunol*. – 2010. – Vol. 151. – № 1. – P. 28-37.
61. Predicting risk for early infantile atopic dermatitis by hereditary and environmental factors / H. J. Wen, P. C. Chen, T. L. Chiang, [et al.] // *Br J Dermatol*. 2009. – Vol. 161. – № 5. – P. 1166-1172.
62. Орлова, Е. А. Роль филагтрина в развитии атопического дерматита / Е. А. Орлова, Ю. А. Кандрашкина, Е. М. Костина // *Практическая аллергология*. – 2021. – № 2. – С. 96-100.
63. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations / S. Weidinger, T. Illig, H. Baurecht, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol*. – 2006. – Vol. 118. – № 1. – P. 214-219.
64. Targeted Resequencing and Functional Testing Identifies Low-Frequency Missense Variants in the Gene Encoding GARP as Significant Contributors to Atopic Dermatitis Risk / J. Manz, E. Rodríguez, A. ElSharawy, [et al.] // *J Invest Dermatol*. – 2016. – Vol. 136. – № 12. – P. 2380-2386.
65. Egawa, G. Barrier dysfunction in the skin allergy / G. Egawa, K. Kabashima // *Allergol Int*. – 2018. – Vol. 67. – № 1. – P. 3-11.

66. Genome-wide comparative analysis of atopic dermatitis and psoriasis gives insight into opposing genetic mechanisms / H. Baurecht, M. Hotze, S. Brand, [et al.] // *Am J Hum Genet.* – 2015. – Vol. 96. – № 1. – P. 104-120.
67. Особенности микробиома кожи у детей с атопическим дерматитом и новые возможности для патогенетической терапии / Н. Н. Мурашкин, А. И. Материкин, Л. А. Опрятин [и др.] // *Педиатрическая фармакология.* – 2020. – Т. 16. – № 5. – С. 304-309.
68. Skin microbiome before development of atopic dermatitis: Early colonization with commensal staphylococci at 2 months is associated with a lower risk of atopic dermatitis at 1 year / E. A. Kennedy, J. Connolly, J. O. Hourihane, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2017. – Vol. 139. – № 1. – P. 166-172.
69. The role of *Staphylococcus* spp. and antimicrobial peptides in atopic dermatitis / O. Svitich, A. Kudryavtseva, K. Neskorodova, E. Bystritskaia // *Allergy.* – 2018. – Vol. 73. – № S105. – P. 88-89.
70. A diversity profile of the human skin microbiota / E. A. Grice, H. H. Kong, G. Renaud, [et al.] // *Genome Res.* – 2008. – Vol. 18. – № 7. – P. 1043-1050.
71. Основы микробиологии и иммунологии : учебник / М. Н. Бойченко, Е. В. Буданова, А. С. Быков [и др.] ; под редакцией В. В. Зверева, Е. В. Будановой. – Москва : Академия, 2018. – 319 с. – ISBN 978-5-4468-3981-0. – Текст : непосредственный.
72. Инновации в терапии атопического дерматита, осложненного вторичной инфекцией / Н. Н. Мурашкин, А. И. Материкин, Э. Т. Амбарчян [и др.] // *Педиатрическая фармакология.* – 2018. – Т. 15. – № 4. – С. 318-323.
73. Ong, P.Y. The infectious aspects of atopic dermatitis / P.Y. Ong, D.Y.M. Leung // *Immunol Allergy Clin North Am.* – 2010. – Vol. 30. – № 3. – P. 309-321.
74. “Eczema Coxsackium” and Unusual Cutaneous Findings in an Enterovirus Outbreak / E. F. Mathes, V. Oza, I. J. Frieden, [et al.] // *Pediatrics.* – 2013. – Vol. 132. – № 1. – P. e149-e157.

75. Fungal protein MGL_1304 in sweat is an allergen for atopic dermatitis patients / T. Hiragun, K. Ishii, M. Hiragun, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2013. – Vol. 132. – № 3. – P. 608-615.e4.
76. Early-onset pediatric atopic dermatitis is TH2 but also TH17 polarized in skin / H. Esaki, P. M. Brunner, Y. Renert-Yuval, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2016. – Vol. 138. – № 6. – P. 1639-1651.
77. Incomplete KLK7 Secretion and Upregulated LEKTI Expression Underlie Hyperkeratotic Stratum Corneum in Atopic Dermatitis / S. Igawa, M. Kishibe, M. Minami-Hori, [et al.] // *J Invest Dermatol.* – 2017. – Vol. 137. – № 2. – P. 449-456.
78. Atopic dermatitis / S. Weidinger, L. A. Beck, T. Bieber, [et al.] // *Nat Rev Dis Primers.* – 2018. – Vol. 4. – № 1. – P. 1.
79. Особенности иммунного ответа и роль некоторых цитокинов при атопическом дерматите / О. Г. Елисютина, Е. С. Феденко, М. Н. Болдырева, Г. О. Гудима // *Российский аллергологический журнал.* – 2015. – Т. 12 – № 1. – С. 3-14.
80. Novak, N. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis / N. Novak // *J Allergy Clin Immunol.* – 2012. – Vol. 129. – № 4. – P. 879-886.
81. The pruritus- and TH2-associated cytokine IL-31 promotes growth of sensory nerves / M. Feld, R. Garcia, J. Buddenkotte, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2016. – Vol. 138. – № 2. – P. 500-508.e24.
82. Brunner, P.M. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies / P.M. Brunner, E. Guttman-Yassky, D.Y.M. Leung // *J Allergy Clin Immunol.* – 2017. – Vol. 139. – № 4S. – P. S65-S76.
83. Клинические особенности различных фенотипов атопического дерматита / О. Г. Елисютина, А. О. Литовкина, Е. В. Смольников [и др.] // *Российский аллергологический журнал.* – 2019. – Т. 16. – № 4. – С. 30-41.
84. Akdis, C.A. Immunological differences between intrinsic and extrinsic types of atopic dermatitis / C. A. Akdis, M. Akdis // *Clin Exp Allergy.* – 2003. – Vol. 33. – № 12. – P. 1618-1621.

85. Патрушев, Л. И. Экспрессия генов. / Л. И. Патрушев ; – Москва : Наука, 2000. - 526 с.: ил.; ISBN 5-02-001890-2. – Текст : непосредственный.
86. Hamidi, T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases / T. Hamidi, A.K. Singh, T. Chen // *Epigenomics*. – 2015. – Vol. 7. – № 2. – P. 247-265.
87. Genetics and Epigenetics of Atopic Dermatitis: An Updated Systematic Review / M. J. Martin, M. Estravís, A. García-Sánchez, [et al.] // *Genes (Basel)*. – 2020. – Vol. 11. – № 4. – P. E442.
88. Harb, H. Update on epigenetics in allergic disease / H. Harb, H. Renz // *J Allergy Clin Immunol*. – 2015. – Vol. 135. – № 1. – P. 15-24.
89. Rebane, A. MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation / A. Rebane, C. A. Akdis // *J Allergy Clin Immunol*. – 2013. – Vol. 132. – № 1. – P. 15-26.
90. MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 / E. Sonkoly, P. Janson, M. L. Majuri, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol*. – 2010. – Vol. 126. – № 3. – P. 581-589.e1-20.
91. Guibert, S. Functions of DNA methylation and hydroxymethylation in mammalian development / S. Guibert, M. Weber // *Curr Top Dev Biol*. – 2013. – Vol. 104. – P. 47-83.
92. Mattei, A. L. DNA methylation: a historical perspective / A.L. Mattei, N. Bailly, A. Meissner // *Trends Genet*. – 2022. – Vol. 38. – № 7. – P. 676-707.
93. Genetic and Epigenetic Aspects of Atopic Dermatitis / B. Nedoszytko, E. Reszka, D. Gutowska-Owsiak, [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21. – № 18. – P. E6484.
94. Differentially Methylated Super-Enhancers Regulate Target Gene Expression in Human Cancer / E. L. Flam, L. Danilova, D. Z. Kelley, [et al.] // *Sci Rep*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 15034.
95. Methylation: An Ineluctable Biochemical and Physiological Process Essential to the Transmission of Life / Y. Menezes, P. Clement, A. Clement, [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2020. Vol. 21. – № 23. – P. 9311.

96. Skvortsova, K. The DNA methylation landscape in cancer / K. Skvortsova, C. Stirzaker, P. Taberlay // *Essays Biochem.* – 2019. – Vol. 63. – № 6. – P. 797-811.
97. Methylation and expression of TLR2 and TLR4 and their role in asthma / O. A. Svitich, E. P. Bystritskaya, V. A. Gankovskii [et al.] // *Allergy.* – 2019. – Vol. 74. – № S106. – P. 367.
98. Козлов, В. А. Метилирование ДНК клетки и патология организма / В. А. Козлов // *Медицинская иммунология.* – 2014. – Т. 10. – № 4–5. – С. 307.
99. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3 / J. D. Fontenot, J. P. Rasmussen, L. M. Williams, [et al.] // *Immunity.* – 2005. – Vol. 22. – № 3. – P. 329-341.
100. DNA methylation controls Foxp3 gene expression / J. K. Polansky, K. Kretschmer, J. Freyer, [et al.] // *Eur J Immunol.* – 2008. – Vol. 38. – № 6. – P. 1654-1663.
101. Prenatal smoke exposure, DNA methylation, and childhood atopic dermatitis / I. J. Wang, S. L. Chen, T. P. Lu, [et al.] // *Clin Exp Allergy.* – 2013. – Vol. 43. – № 5. – P. 535-543.
102. Epigenetic Studies of Atopic Dermatitis / Sobolev V., Bystritskaya E., Svitich O. // *Atopic Dermatitis - Essential Issues* / ed. C. Pereira. – IntechOpen. – 2021. – P. 35-48. ISBN 978-1-83962-723-1.
103. Анализ метилирования ДНК в пораженной и непораженной коже у взрослых пациентов с атопическим дерматитом / О. Ю. Смолкина, Е. П. Быстрицкая, О. А. Свитич [и др.] // *Молекулярная медицина.* – 2021. – Т. 19. – № 1. – С. 53-64.
104. Атопический дерматит, современная стратегия в терапии / В. А. Ревякина, А. В. Таганов, Е. Д. Кувшинова [и др.] // *Лечащий врач.* – 2019. – № 5. – С. 32.
105. Феденко, Е. С. Тяжелый атопический дерматит: трудности лечения / Е С Феденко, О. Г. Елисютина, О. В. Штырбул // *Российский аллергологический журнал.* – 2012. – Т. 9. – №4. – С. 33-38.
106. Практические вопросы применения эмоленов, содержащих модуляторы филагрина, в ведении пациентов с атопическим дерматитом и ксерозом:

резолуция Совета экспертов / Е. Р. Аравийская, А. Л. Бакулев, А. Г. Гаджигороева [и др.] // Российский аллергологический журнал. – 2022. – Т. 19. – № 2. – С. 245-258.

107. Кочергин, Н. Г. Комбинированная наружная терапия при атопическом дерматите / Н. Г. Кочергин, О. Ю. Олисова // Фарматека. – 2017. – № s4-17. – С. 44-49.

108. The translational revolution in atopic dermatitis: the paradigm shift from pathogenesis to treatment / P. Facheris, J. Jeffery, E. Del Duca, [et al.] // Cell Mol Immunol. – 2023. – Vol. 20. – № 5. – P. 448-474.

109. Балаболкин, И. И. Атопический дерматит у детей: иммунологические аспекты патогенеза и терапии / И. И. Балаболкин, В. А. Булгакова, Т. И. Елисеева // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2017. – Т. 96. – № 2. – С. 128-135.

110. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications / Y. Wang, Y. Zhao, A. Bollas, [et al.] // Nat Biotechnol. – 2021. – Vol. 39. – № 11. – P. 1348-1365.

111. GitHub.com : веб-сервис для хостинга IT-проектов : сайт. - URL: <https://github.com/nanoporetech/remora> (дата обращения: 22.11.2023).

112. Feng, H., Wu H. Differential methylation analysis for bisulfite sequencing using DSS / H. Feng, H. Wu // Quant Biol. – 2019. – Vol. 7. – № 4. – P. 327-334.

113. Подколотный, Н. Л. Онтологии в биоинформатике и системной биологии / Н. Л. Подколотный, О. А. Подколотная // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 19. – № 6. – С. 652-660.

114. The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery : сайт. - URL: <https://david.ncifcrf.gov> (дата обращения: 22.11.2023).

115. Enrichr : сайт. - URL: <https://maayanlab.cloud/Enrichr/> (дата обращения: 22.11.2023).

116. UCSC Genome Browser : сайт. - URL: <https://genome.ucsc.edu/> (дата обращения: 22.11.2023).

117. Иммунология. Практикум. Учебное пособие / [Л. В. Ковальчук и др.] ; под редакцией Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатъевой, Л. В. Ганковской. – Москва :

ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 174 с. – ISBN 978-5-9704-3506-9. – Текст : непосредственный.

118. Primer-BLAST, National Center for Biotechnology Information : сайт. - URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (дата обращения: 22.11.2023).

119. Livak, K.J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method / K. J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – Vol. 25. – № 4. – P. 402-408.

120. Гланц, С. Медико-биологическая статистика : перевод с англ. / С. Гланц ; – Москва : Практика, 1998. – 459 с.; ISBN 5-89816-009-4. – Текст : непосредственный.

121. Bhattacharya, N. Transcriptional control and transcriptomic analysis of lipid metabolism in skin barrier formation and atopic dermatitis (AD) / N. Bhattacharya, G. Ganguli-Indra, A. K. Indra // *Expert Rev Proteomics*. – 2019. – Vol. 16. – № 8. – P. 627-645.

122. Eight novel susceptibility loci and putative causal variants in atopic dermatitis / N. Tanaka, M. Koido, A. Suzuki, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol*. – 2021. – Vol. 148. – № 5. – P. 1293-1306.

123. A functional IL-6 receptor (IL6R) variant is a risk factor for persistent atopic dermatitis / J. Esparza-Gordillo, H. Schaarschmidt, L. Liang, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol*. – 2013. – Vol. 132. – № 2. – P. 371-377.

124. Neuroplastin- β mediates S100A8/A9-induced lung cancer disseminative progression / I. W. Sumardika, Y. Chen, N. Tomonobu, [et al.] // *Mol Carcinog*. – 2019. – Vol. 58. – № 6. – P. 980-995.

125. Renfro, Z. CCAAT enhancer binding protein gamma (C/EBP- γ): An understudied transcription factor / Z. Renfro, B. E. White, K. E. Stephens // *Adv Biol Regul*. – 2022. – Vol. 84. – P. 100861.

126. The Developmental Transcription Factor p63 Is Redeployed to Drive Allergic Skin Inflammation through Phosphorylation by p38 α / Y. Jiménez-Andrade, K. R. Hilette, T. Yoshida, [et al.] // *J Immunol*. – 2022. – Vol. 208. – № 12. – P. 2613-2621.

127. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis / Y. J. Guo, W. W. Pan, S. B. Liu // *Exp Ther Med.* – 2020. – Vol. 19. – № 3. – P. 1997-2007.
128. Роль MAP-киназных механизмов в регуляции клеточного роста (обзор литературы) / И. А. Шурыгина, М. Г. Шурыгин, Н. В. Зеленин, Г. Б. Гранина // *Сибирский медицинский журнал.* – 2009. – № 6. – С. 36-40.
129. Barnes, P. J. Role of GATA-3 in allergic diseases / P. J. Barnes // *Curr Mol Med.* – 2008. – Vol. 8. – № 5. – P. 330-334.
130. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses mast cell maturation involved in allergic diseases / M. Tachibana, K. Wada, K. Katayama, [et al.] // *Allergy.* – 2008. – Vol. 63. – № 9. – P. 1136-1147.
131. Effects of n-3 PUFA on the CD4⁺ type 2 helper T-cell-mediated immune responses in Fat-1 mice / H. Y. Jang, K. Lim, S. M. Lee, [et al.] // *Mol Nutr Food Res.* – 2014. – Vol. 58. – № 2. – P. 365-375.
132. Atopic dermatitis-like skin lesions are suppressed in fat-1 transgenic mice through the inhibition of inflammasomes / H. Y. Jang, J. H. Koo, S. M. Lee, [et al.] // *Exp Mol Med.* – 2018. – Vol. 50. – № 6. – P. 1-9.
133. Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity / J. Reisinger, F. Horak, G. Pauli, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2005. – Vol. 116. – № 2. – P. 347-354.
134. A genome-wide association study reveals 2 new susceptibility loci for atopic dermatitis / H. Schaarschmidt, D. Ellinghaus, E. Rodríguez, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2015. – Vol. 136. – № 3. – P. 802-806.
135. Comparative proteomic analysis of peripheral blood mononuclear cells from atopic dermatitis patients and healthy donors / W. K. Kim, H. J. Cho, S. I. Ryu, [et al.] // *BMB Rep.* – 2008. – Vol. 41. – № 8. – P. 597-603.
136. Caffeoyl-Prolyl-Histidine Amide Inhibits Fyn and Alleviates Atopic Dermatitis-Like Phenotypes via Suppression of NF- κ B Activation / H. Jeong, J. Y. Shin, K. Lee, [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21. – № 19. – P. 7160.

137. Inhibition of the Wnt/beta-catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein / N. Bouteille, K. Driouch, P. E. Hage, [et al.] // *Oncogene*. – 2009. – Vol. 28. № 28. – P. 2569-2580.
138. DACT3 has a tumor-inhibiting role in acute myeloid leukemia via the suppression of Wnt/ β -catenin signaling by DVL2 / Q. Gao, L. Hou, H. Wang, [et al.] // *J Biochem Mol Toxicol*. – 2022. – Vol. 36. – № 5. – P. e23014.
139. Dimitrova, D. Current Status of Dedicator of Cytokinesis-Associated Immunodeficiency: DOCK8 and DOCK2 / D. Dimitrova, A.F. Freeman // *Dermatol Clin*. – 2017. – Vol. 35. – № 1. – P. 11-19.
140. DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane / H. Hasegawa, E. Kiyokawa, S. Tanaka, [et al.] // *Mol Cell Biol*. – 1996. – Vol. 16. – № 4. – P. 1770-1776.
141. Evaluation of Biological Effects and Transcriptome Changes Induced by LED-Based Narrow-Band UVB Phototherapy / X. Liu, H. Chen, Z. Li, [et al.] // *Photochem Photobiol*. – 2022. – Vol. 98. – № 6. – P. 1379-1389.
142. New Insights of CCR7 Signaling in Dendritic Cell Migration and Inflammatory Diseases / W. Hong, B. Yang, Q. He, [et al.] // *Front. Pharmacol*. – 2022. – Vol. 13. – P. 841687.
143. Sodium-hydrogen exchanger 6 (NHE6) deficiency leads to hearing loss, via reduced endosomal signalling through the BDNF/Trk pathway / K. Kucharava, Y. Brand, G. Albano, [et al.] // *Sci Rep*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 3609.
144. Christianson syndrome protein NHE6 modulates TrkB endosomal signaling required for neuronal circuit development / Q. Ouyang, S. B. Lizarraga, M. Schmidt, [et al.] // *Neuron*. – 2013. – Vol. 80. – № 1. – P. 97-112.
145. Liu H. et al. EphrinB-mediated reverse signalling controls junctional integrity and pro-inflammatory differentiation of endothelial cells / H. Liu, K. Devraj, K. Möller, [et al.] // *Thromb Haemost*. – 2014. – Vol. 112. – № 1. – P. 151-163.
146. Prenylated quinolinecarboxylic acid compound-18 prevents sensory nerve fiber outgrowth through inhibition of the interleukin-31 pathway / M. Ogura, K. Endo, T. Suzuki, [et al.] // *PLoS One*. – 2021. – Vol. 16. – № 2. – P. e0246630.

147. The Janus kinases (Jaks) / K. Yamaoka, P. Saharinen, M. Pesu, [et al.] // *Genome Biol.* – 2004. – Vol. 5. – № 12. – P. 253.
148. WFDC12-overexpressing contributes to the development of atopic dermatitis via accelerating ALOX12/15 metabolism and PAF accumulation / G. Li, L. Gu, F. Zhao, [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2023. – Vol. 14. – № 3. – P. 185.
149. Multiple pathways are involved in DNA degradation during keratinocyte terminal differentiation / M. Yamamoto-Tanaka, T. Makino, A. Motoyama, [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2014. – Vol. 5 – № 4. – P. e1181.
150. Blockade of Experimental Atopic Dermatitis via Topical NF- κ B Decoy Oligonucleotide / M. Dajee, T. Muchamuel, B. Schryver, [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology.* – 2006. – Vol. 126. – № 8. – P. 1792-1803.
151. Vav-Rac1-mediated activation of the c-Jun N-terminal kinase/c-Jun/AP-1 pathway plays a major role in stimulation of the distal NFAT site in the interleukin-2 gene promoter / O. Kaminuma, M. Deckert, C. Elly, [et al.] // *Mol Cell Biol.* – 2001. – Vol. 21 – № 9. – P. 3126-3136.
152. Atopic dermatitis: molecular and epigenetic mechanisms of immunopathogenesis in children / N. Murashkin, O. Svitich, E. Bystritskaya [et al.] // *Pediatric dermatology.* – 2023. – Vol. 40. – P. 86.
153. Epigenetics of toll-like receptors and their role in allergy / E. Bystritskaia, L. Gankovskaya, L. Namazova-Baranova [et al.] // *Clinical & Translational Allergy.* – 2018. – Vol. 8. – № S1. – P. 17.
154. Methylation of TLRs in atopic dermatitis: Epigenetic regulation / E. Bystritskaia, A. Kudryavtseva, V. Sobolev, O. Svitich // *Allergy.* – 2020. – Vol. 75. – № S109. – P. 466-467.
155. Langerhans and inflammatory dendritic epidermal cells in atopic dermatitis are tolerized toward TLR2 activation / K. Iwamoto, T. J. Nümm, S. Koch, [et al.] // *Allergy.* – 2018. – Vol. 73. – № 11. – P. 2205-2213.
156. TLR 2 and TLR 4 expression in atopic dermatitis, contact dermatitis and psoriasis / R. Panzer, C. Blobel, R. Fölster-Holst, [et al.] // *Experimental Dermatology.* – 2014. – Vol. 23. – № 5. – P. 364-366.

157. Полногеномный профиль метилирования ДНК и экспрессия генов TLR2, TLR9, IL4, IL13 при атопическом дерматите у детей и подростков / Е. П. Быстрицкая, Н. Н. Мурашкин, А. И. Материкин [и др.] // Иммунология. – 2022. – Т. 43. – № 3. – С. 255-265.
158. *Staphylococcus aureus* from atopic dermatitis skin accumulates in the lysosomes of keratinocytes with induction of IL-1 α secretion via TLR9 / M. Moriwaki, K. Iwamoto, Y. Niitsu, [et al.] // Allergy. – 2019. – Vol. 74. – № 3. – P. 560-571.
159. Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema: TLR9 polymorphisms and atopic eczema / N. Novak, C. F. Yu, C. Bussmann, [et al.] // Allergy. – 2007. – Vol. 62. – № 7. – P. 766-772.
160. Endogenous Antimicrobial Peptides and Skin Infections in Atopic Dermatitis / P. Y. Ong, T. Ohtake, C. Brandt, [et al.] // N Engl J Med. – 2002. – Vol. 347 – № 15. – P. 1151-1160.
161. Cathelicidins Modulate TLR-Activation and Inflammation / M. R. Scheenstra, R. M. van Harten, E. J. A. Veldhuizen, [et al.] // Front. Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 1137.
162. Исследование роли β -дефенсина-2 в грудном молоке при атопическом дерматите у детей / Ю. А. Бунина (Богуславская), А. В. Кудрявцева, Е. П. Быстрицкая [и др.] // Врач. – 2020. – Т. 31. – № 5. – С. 85-87.
163. Chieosilapatham, P. Current insights into the role of human β -defensins in atopic dermatitis / P. Chieosilapatham, H. Ogawa, F. Niyonsaba, [et al.] // Clin Exp Immunol. – 2017. – Vol. 190. – № 2. – P. 155-166.
164. Kim, K. An 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, [et al.] // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23. – № 4. – P. 2116.
165. Kawai, T. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // Trends in Molecular Medicine. – 2007. – Vol. 13. – № 11. – P. 460-469.
166. Профили экспрессии генов факторов врожденного иммунитета у пациентов с атопическим дерматитом / Е. П. Быстрицкая, Н. Н. Мурашкин, О. Ю. Олисова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2023. – Т. 25. – № 5. – С. 1037-1042.

167. Enhancement of Chemokine mRNA Expression by Toll-Like Receptor 2 Stimulation in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Atopic Dermatitis / Y. Yu, D. Lin, X. Cai, [et al.] // *BioMed Research International*. – 2020. – Vol. 2020. – P. 1-7.
168. Expression of TLR2 and TLR4 on peripheral blood monocytes during exacerbation of atopic dermatitis / N. N. Tsybikov, I. Petrisheva I, E. V. Fefelova, [et al.] // *Allergy asthma proc.* – 2015. – Vol. 36. – № 6. – P. 140-145.
169. Increased Expression of Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR6 on Peripheral Blood Monocytes by Induction of Staphylococcal Enterotoxin B During Exacerbation of Atopic Dermatitis Patients / F. Salim, H. Gunawan, O. Suwarsa, [et al.] // *Clin Cosmet Investig Dermatol.* – 2023. – Vol. 16. – P. 301-307.
170. Miller, L. S. Toll-like receptors in skin / L. S. Miller // *Adv Dermatol.* – 2008. – Vol. 24. – P. 71-87.
171. Экспрессия генов HBD1 и LL37 при атопическом дерматите у детей и подростков / Е. П. Быстрицкая, Н. Н. Мурашкин, А. И. Материкин [и др.] // *Российский иммунологический журнал.* – 2022. – Т. 25. – № 4. – С. 405-410.
172. Role of Antimicrobial Peptides in Skin Barrier Repair in Individuals with Atopic Dermatitis / H. L. T. Nguyen, J. V. Trujillo-Paez, Y. Umehara, [et al.] // *IJMS.* – 2020. – Vol. 21. – № 20. – P. 7607.
173. Interleukin-18 and IL-18BP in inflammatory dermatological diseases / X. Wang, L. Wang, X. Wen, [et al.] // *Front Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 955369.
174. Дрождина М. Б. Иммунный ответ при атопическом дерматите. Основные патогенетические механизмы и корреляции стадийности в возрастном аспекте. Взаимосвязь с системными процессами дерматологического и недерматологического профиля / М. Б. Дрождина, Е. В. Сусллова // *Медицинская иммунология.* – 2021. – Т. 23. – № 2. – С. 237-244.
175. Yin, H. Identification of Molecular Signatures in Mild Intrinsic Atopic Dermatitis by Bioinformatics Analysis / H. Yin, S. Wang, C. Gu // *Ann Dermatol.* – 2020. – Vol. 32. – № 2. – P. 130.

176. The imbalance in serum concentration of Th-1- and Th-2-derived chemokines as one of the factors involved in pathogenesis of atopic dermatitis / J. Narbutt, A. Lesiak, A. Sysa-Jedrzejowska, [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2009. – Vol. 2009. – P. 269541.
177. Sprangers, B. Conventional chemotherapy / B. Sprangers, L. Cosmai, C. Porta // *Onco-Nephrology*. Elsevier. – 2020. – P. 127-153.e11.
178. Social defeat stress exacerbates atopic dermatitis through downregulation of DNA methyltransferase 1 and upregulation of C-C motif chemokine receptor 7 in skin dendritic cells / Y. Yoshida, K. Hayakawa, M. Fujishiro, [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2020. – Vol. 529. – № 4. – P. 1073-1079.
179. Reduced IFN-gamma- and enhanced IL-4-producing CD4+ cord blood T cells are associated with a higher risk for atopic dermatitis during the first 2 yr of life / G. Herberth, J. Heinrich, S. Röder, [et al.] // *Pediatr Allergy Immunol.* – 2010. – Vol. 21. – № 1 Pt 1. – P. 5–13.
180. The role of PKC ζ in cord blood T-cell maturation towards Th1 cytokine profile and its epigenetic regulation by fish oil / H. Harb, J. Irvine, M. Amarasekera, [et al.] // *Biosci Rep.* – 2017. – Vol. 37. – № 2. – P. BSR20160485.
181. Age-related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children / N. Kawamoto, H. Kaneko, M. Takemura, [et al.] // *Pediatr Allergy Immunol.* – 2006. – Vol. 17. – № 2. – P. 125-133.
182. Accelerated T-cell activation and differentiation of polar subsets characterizes early atopic dermatitis development / H. Esaki, T. Czarnowicki, J. Gonzalez, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2016. – Vol. 138. – № 5. – P. 1473-1477.e5.
183. Czarnowicki, T. Novel concepts of prevention and treatment of atopic dermatitis through barrier and immune manipulations with implications for the atopic march / T. Czarnowicki, J.G. Krueger, E. Guttman-Yassky // *J Allergy Clin Immunol.* – 2017. – Vol. 139. – № 6. – P. 1723-1734.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Классификация дифференциально метилированных генов по их участию в биологических процессах и по наличию у них определенных молекулярных функций

Таблица А.1 - Наиболее встречающиеся биологические процессы среди генов с дифференциальным уровнем метилирования в пораженной коже при АД

Номер процесса	Название процесса	Количество генов	Вероятность (p)	Частота встречаемости	Поправка Бонферрони	Поправка Бенжамини	FDR
GO:0000122	подавление транскрипции с промотора РНК-полимеразы II	123	1.49E-09	1.74	7.41E-06	6.72E-06	6.66E-06
GO:0051056	передача сигнала малыми ГТФазами	30	2.7E-09	3.56	1.34E-05	6.72E-06	6.66E-06
GO:0016477	миграция клеток	49	7.21E-09	2.49	3.59E-05	1.2E-05	1.19E-05
GO:0045944	усиление транскрипции с промотора РНК-полимеразы II	142	1.02E-08	1.61	5.08E-05	1.27E-05	1.26E-05
GO:0030036	организация актинового цитоскелета	35	2.64E-07	2.66	0.0013	2.63 E-04	2.61E-04
GO:0090630	активация активности ГТФазы	28	4.1E-07	3.01	0.002	3.41 E-04	3.38 E-04
GO:0043087	регуляция активности ГТФазы	22	1.69E-06	3.32	0.0083	0.0011	0.0011
GO:0008360	изменение формы клеток	26	1,22 E-04	2.32	0.45	0.030	0.03
GO:0007010	организация цитоскелета	25	1.35 E-04	2.35	0.49	0.031	0.03
GO:0009952	поляризация клеток	19	1.47 E-04	2.75	0.52	0.031	0.03
GO:0007015	организация актиновых филаментов	24	1.50 E-04	2.39	0.53	0.031	0.03
GO:0032147	активация протеинкиназ	17	1.76 E-04	2.92	0.58	0.035	0.034
GO:0030178	негативная регуляция сигнального пути Wnt	13	2.30 E-04	3.50	0.68	0.044	0.043
GO:0060996	дифференцировка дендритных клеток	7	2,63 E-04	6.88	0.73	0.049	0.048

Таблица А.2 – Наиболее встречающиеся молекулярные функции среди генов с дифференциальным уровнем метилирования в пораженной коже при АД

Номер процесса	Название процесса	Количество генов	Вероятность (p)	Частота встречаемости	Поправка Бонферрони	Поправка Бенжамини	FDR
GO:0051015	связывание актиновых филаментов	45	4.69E-09	2.64	6.13E-06	6.13E-06	5.98E-06
GO:0005096	активаторы ГТФазы	51	1.64E-08	2.37	2.15E-05	7.16E-06	6.98E-06
GO:0005509	связывание ионов кальция	93	2.46E-06	1.64	0.003	5.45E-04	5.32E-04
GO:0008134	связывание фактора транскрипции	37	2.50E-06	2.35	0.003	5.45E-04	5.32E-04
GO:0003779	связывание актина	51	3.72E-06	1.99	0.005	6.44E-04	6.28E-04
GO:0031267	связывание малой ГТФазы	43	2.24E-05	2.00	0.03	0.002	0.002
GO:0001227	репрессор транскрипции, специфичное связывание в регуляторной области транскрипции РНК-полимеразы II	47	4.83E-05	1.87	0.06	0.004	0.004
GO:0050839	связывание молекул клеточной адгезии	16	1.87E-04	3.03	0.21	0.014	0.014
GO:0001228	активатор транскрипции, специфичное связывание регуляторной области транскрипции РНК-полимеразы II	58	3.86E-04	1.61	0.39	0.028	0.027
GO:0004672	протеинкиназы	48	5.16E-04	1.68	0.499	0.035	0.035
GO:0004713	протеинтирозинкиназы	20	7.62E-04	2.35	0.63	0.047	0.046

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Визуализация дифференциально метилированных генов

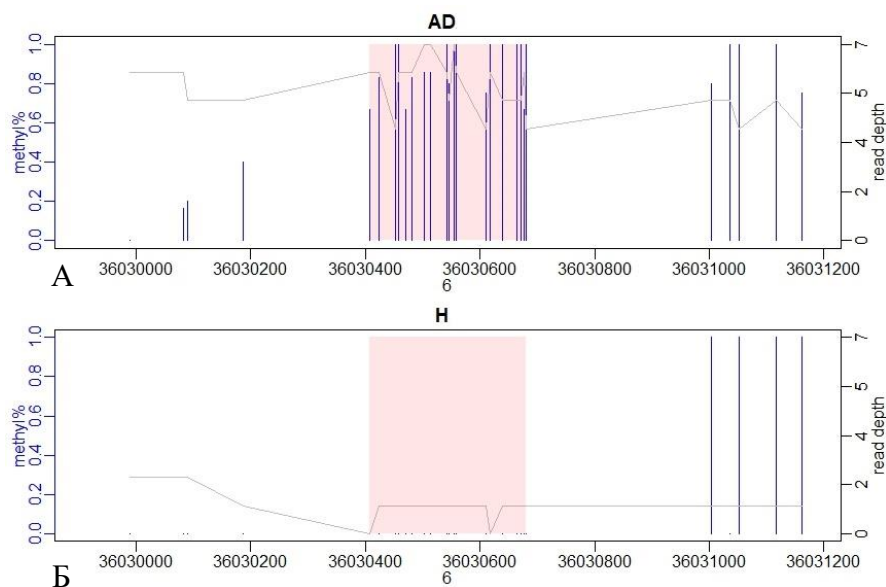


Рисунок Б.1 – Дифференциально метилированный участок (выделен розовым цветом) с соответствующим ему геном *MAPK14*. А – кожа с АД, Б – здоровая кожа. Уровень метилирования (в процентах) представлен для каждого графика синим цветом

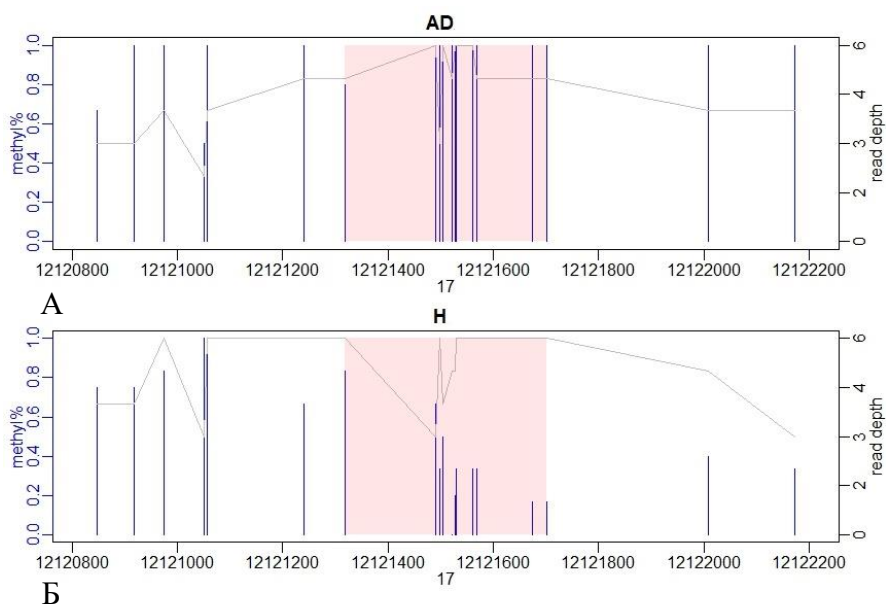


Рисунок Б.2 – Дифференциально метилированный участок (выделен розовым цветом) с соответствующим ему геном *MAP2K4*. А – кожа с АД, Б – здоровая кожа. Уровень метилирования (в процентах) представлен для каждого графика синим цветом

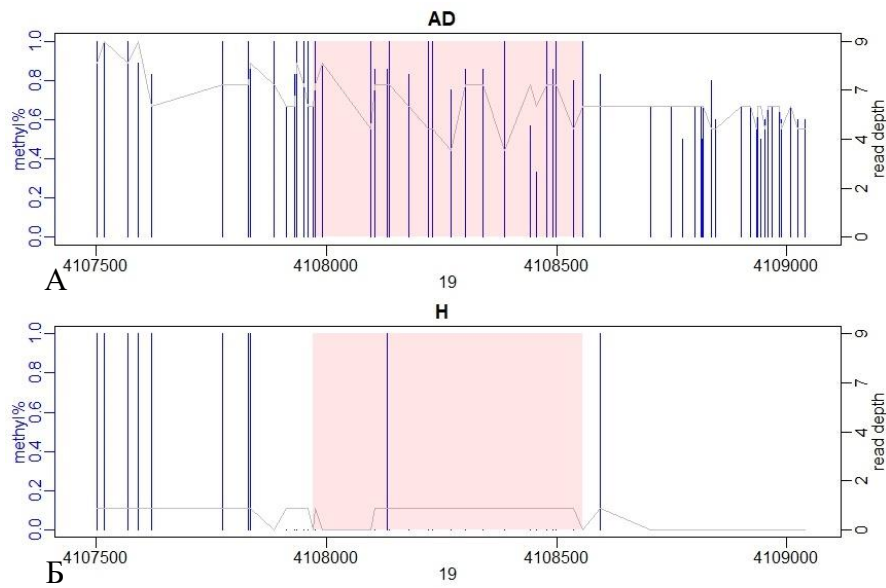


Рисунок Б.3 – Дифференциально метилированный участок (выделен розовым цветом) с соответствующим ему геном *MAP2K2*. А – кожа с АтД, Б – здоровая кожа. Уровень метилирования (в процентах) представлен для каждого графика синим цветом

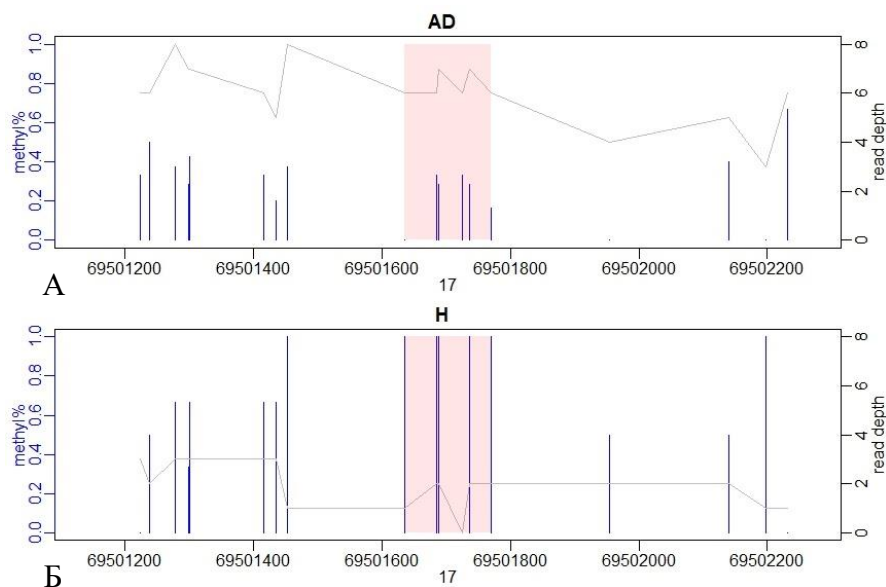


Рисунок Б.4 – Дифференциально метилированный участок (выделен розовым цветом) с соответствующим ему геном *MAP2K6*. А – кожа с АтД, Б – здоровая кожа. Уровень метилирования (в процентах) представлен для каждого графика синим цветом

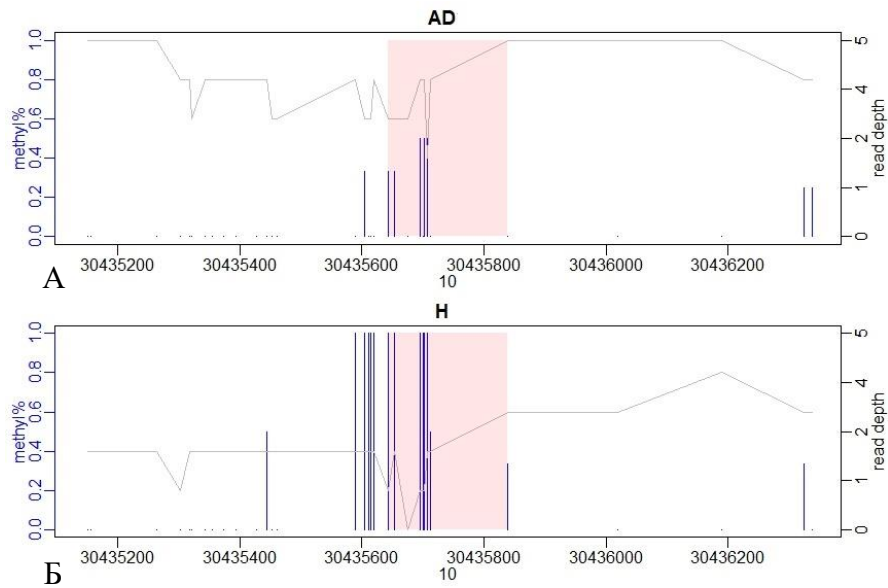


Рисунок Б.5 – Дифференциально метилированный участок (выделен розовым цветом) с соответствующим ему геном *MAP3K8*. А – кожа с АтД, Б – здоровая кожа. Уровень метилирования (в процентах) представлен для каждого графика синим цветом

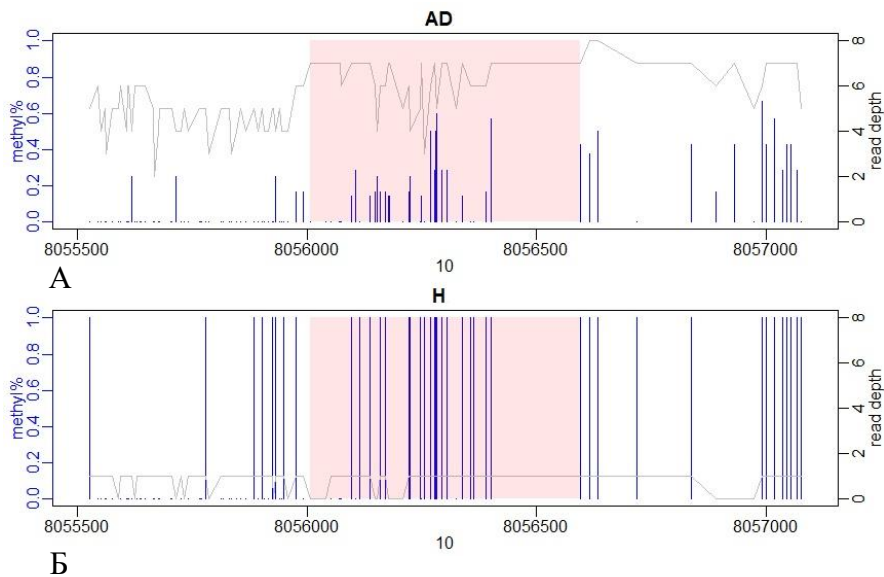


Рисунок Б.6 – Дифференциально метилированный участок (выделен розовым цветом) с соответствующим ему геном *GATA3*. А – кожа с АтД, Б – здоровая кожа. Уровень метилирования (в процентах) представлен для каждого графика синим цветом

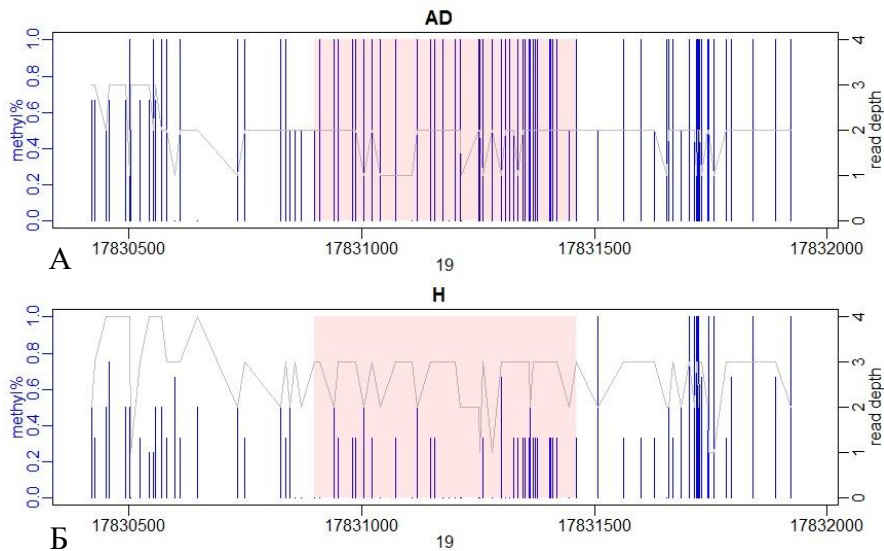


Рисунок Б.7 – Дифференциально метилированный участок (выделен розовым цветом) с соответствующим ему геном *ЖАКЗ*. А – кожа с АтД, Б – здоровая кожа. Уровень метилирования (в процентах) представлен для каждого графика синим цветом

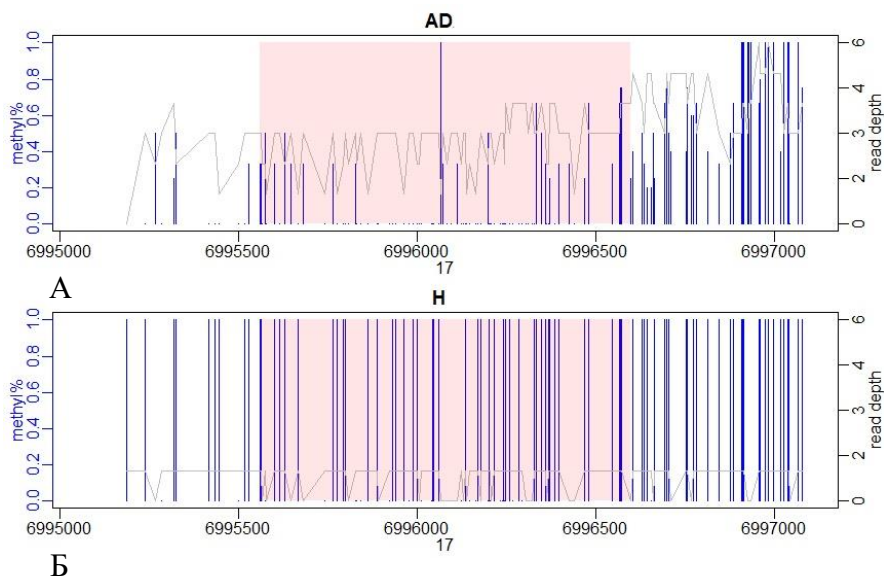


Рисунок Б.8 – Дифференциально метилированный участок (выделен розовым цветом) с соответствующим ему геном *АЛОХ12*. А – кожа с АтД, Б – здоровая кожа. Уровень метилирования (в процентах) представлен для каждого графика синим цветом

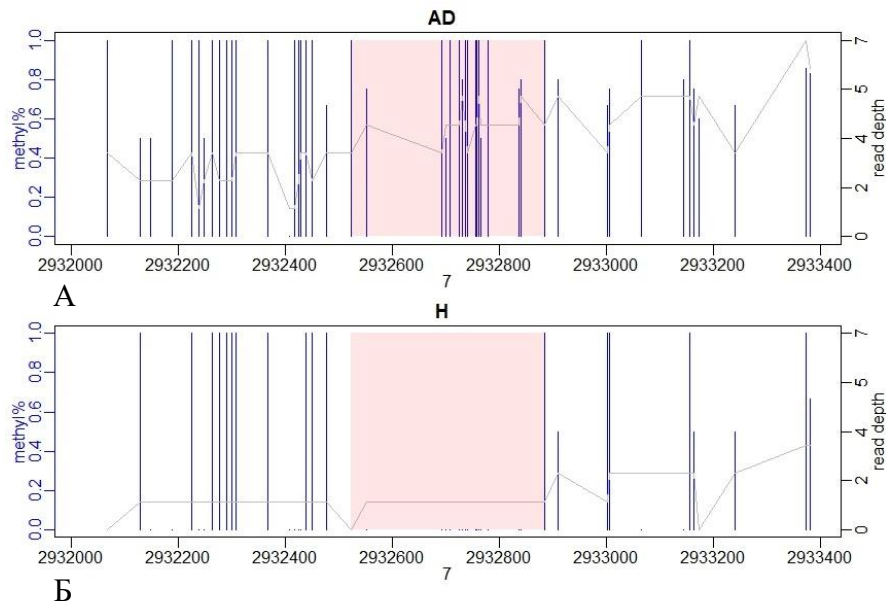


Рисунок Б.9 – Дифференциально метилированный участок (выделен розовым цветом) с соответствующим ему геном *CARD11*. А – кожа с АтД, Б – здоровая кожа. Уровень метилирования (в процентах) представлен для каждого графика синим цветом

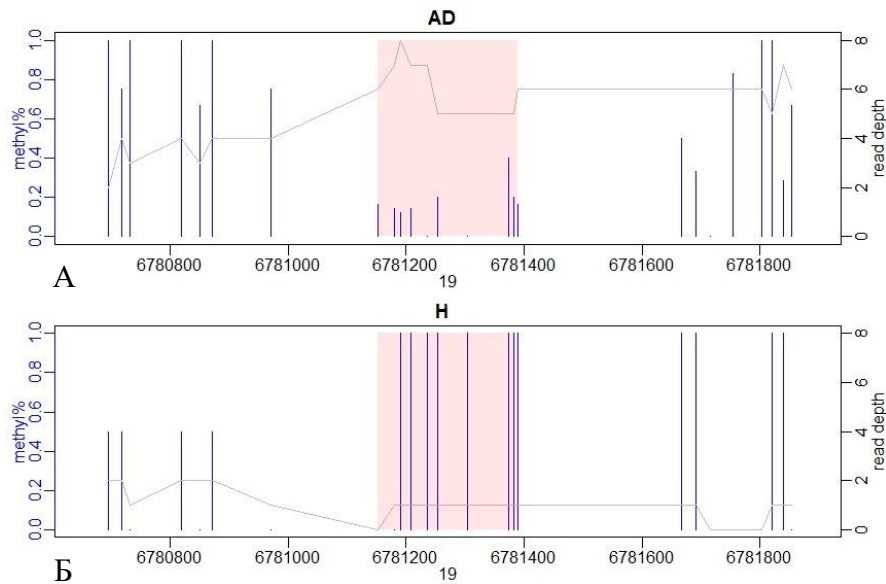


Рисунок Б.10 – Дифференциально метилированный участок (выделен розовым цветом) с соответствующим ему геном *VAV1*. А – кожа с АтД, Б – здоровая кожа. Уровень метилирования (в процентах) представлен для каждого графика синим цветом

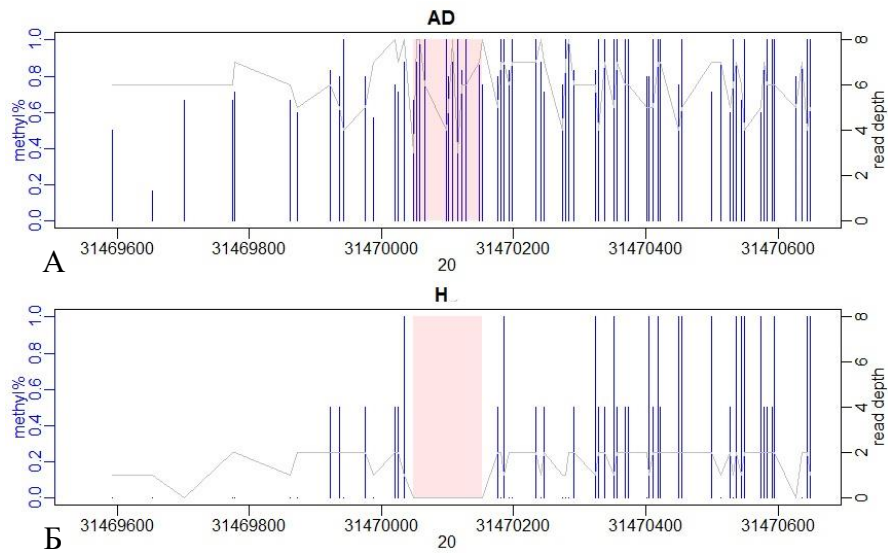


Рисунок Б.11 – Дифференциально метилированный участок (выделен розовым цветом) с соответствующим ему геном *DEFB124*. А – кожа с АтД, Б – здоровая кожа. Уровень метилирования (в процентах) представлен для каждого графика синим цветом

**ПРИЛОЖЕНИЕ В. Графики экспрессии генов *TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*,
DEFB1 в коже и мононуклеарных клетках крови**

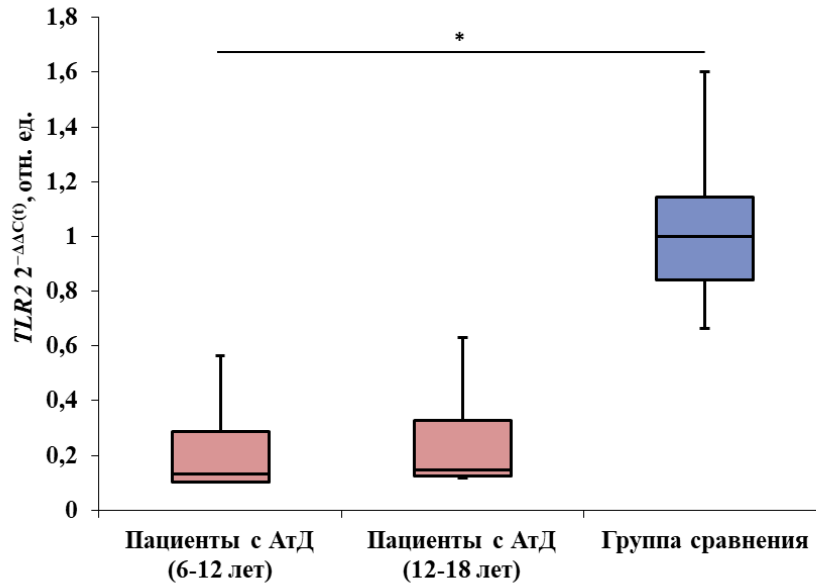


Рисунок В.1 – Медианные значения уровня экспрессии гена *TLR2* (отн. ед.) в коже пациентов с АД разных возрастных групп (6-12, 12-18 лет) по сравнению с контролем. * $< 0,05$

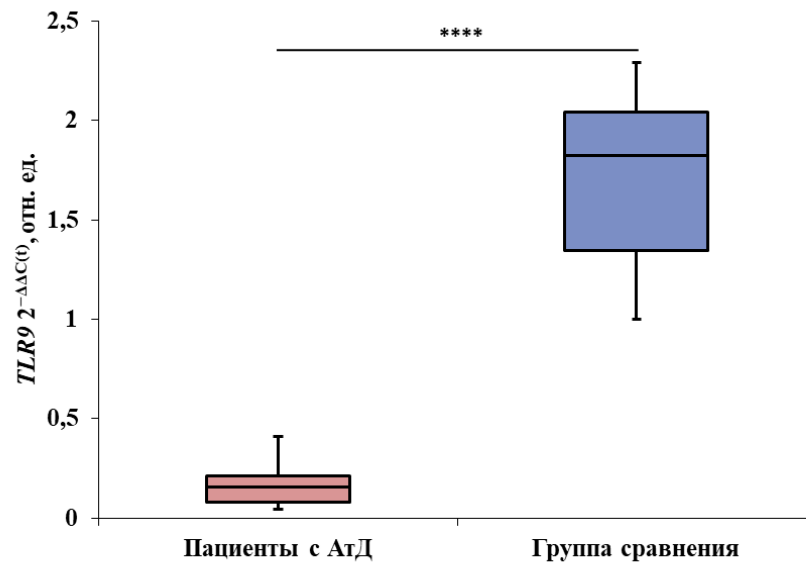


Рисунок В.2 – Медианные значения уровня экспрессии гена *TLR9* (отн. ед.) в коже пациентов с АД (6-18 лет) по сравнению с контролем. **** $< 0,0001$

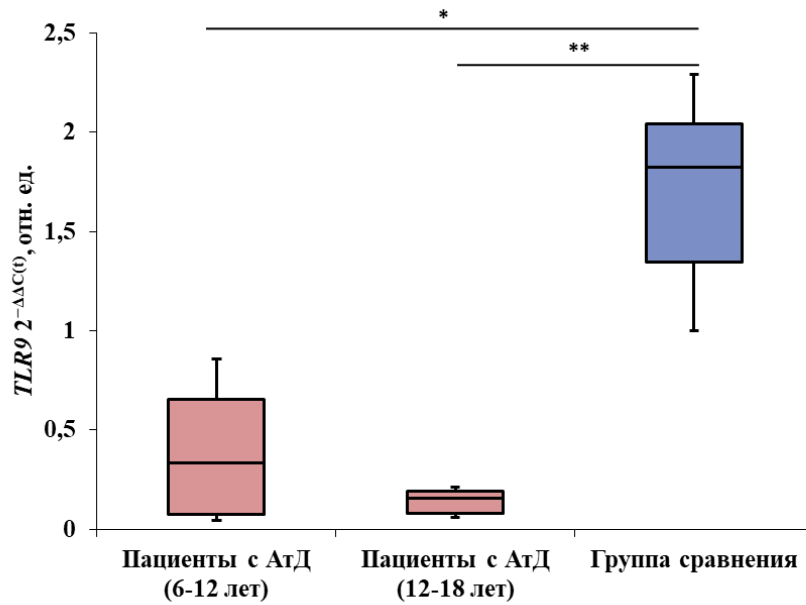


Рисунок В.3 – Медианные значения уровня экспрессии гена *TLR9* (отн. ед.) в коже пациентов с АД разных возрастных групп (6-12, 12-18 лет) по сравнению с контролем. * $< 0,05$, ** $< 0,01$

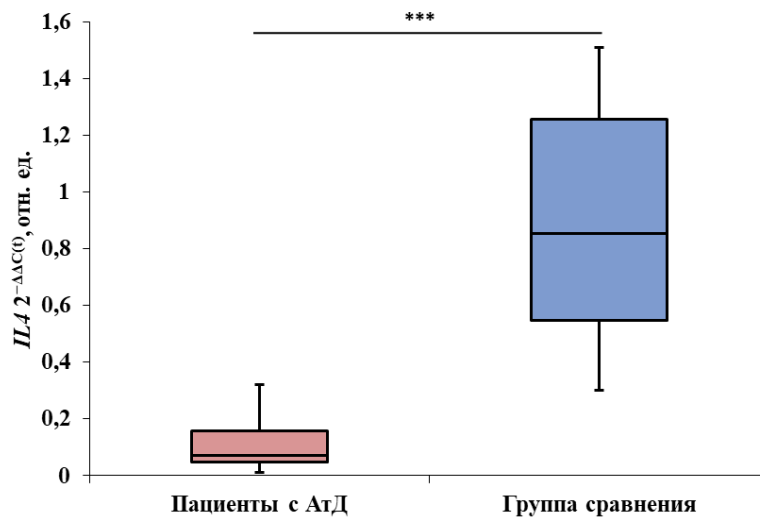


Рисунок В.4 – Медианные значения уровня экспрессии гена *IL4* (отн. ед.) в коже пациентов с АД (6-18 лет) по сравнению с контролем. *** $< 0,0005$

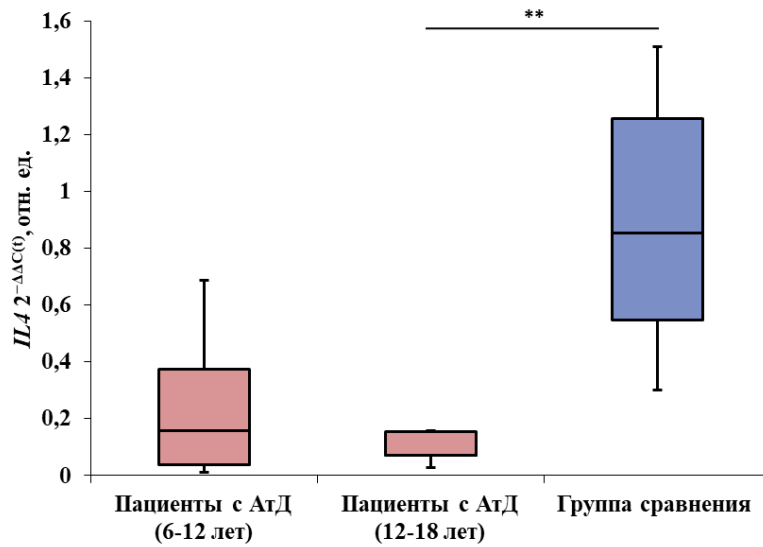


Рисунок В.5 – Медианные значения уровня экспрессии гена *IL4* (отн. ед.) в коже пациентов с АД разных возрастных групп (6-12, 12-18 лет) по сравнению с контролем. **< 0,01

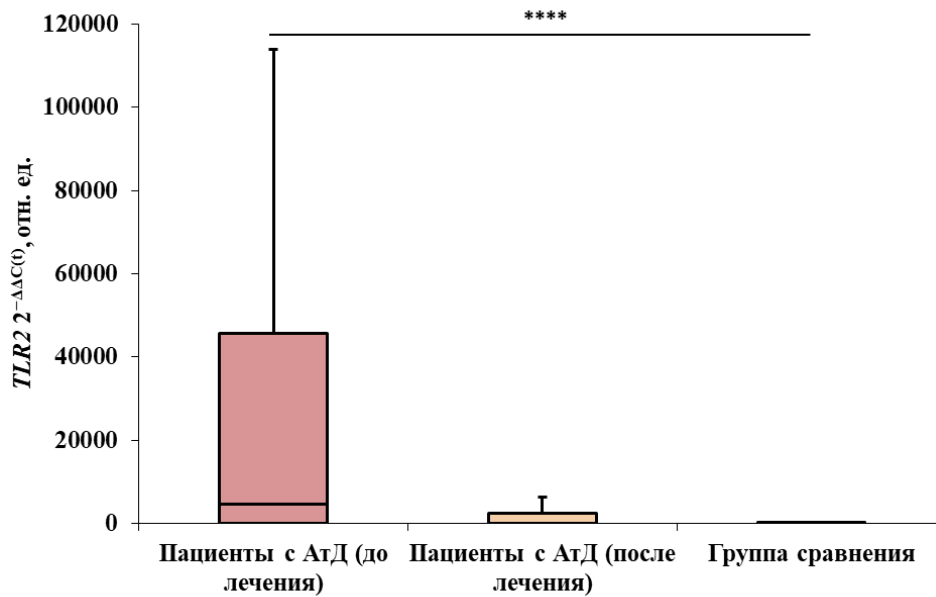


Рисунок В.6 – Медианные значения уровня экспрессии гена *TLR2* (отн. ед.) в МНК пациентов с АД до и после лечения по сравнению с контролем. ****< 0,0001

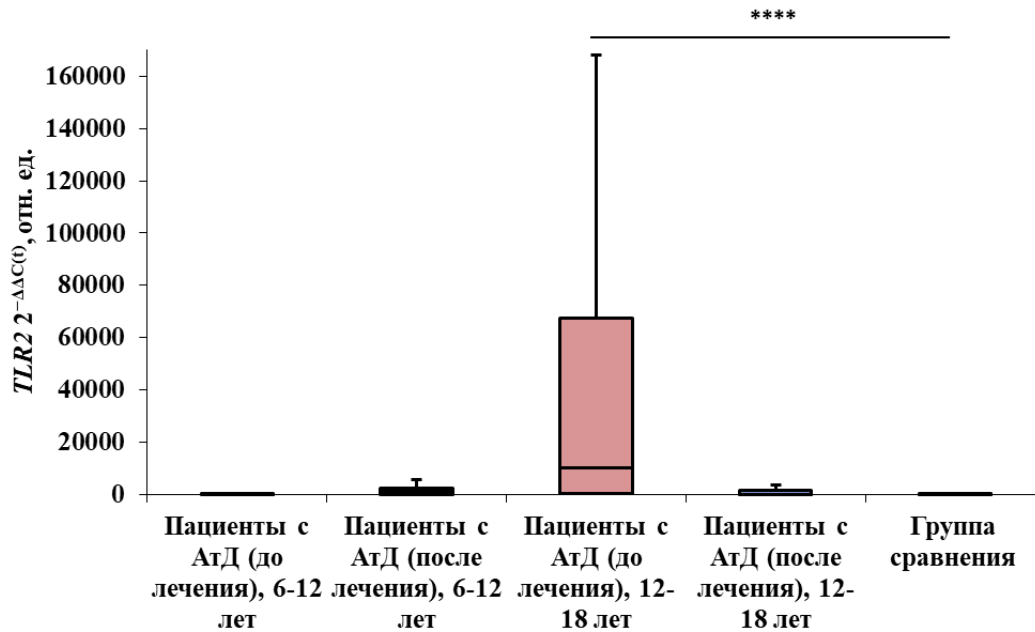


Рисунок В.7 – Медианные значения уровня экспрессии гена *TLR2* (отн. ед.) в МНК пациентов с АтД разных возрастных групп до и после лечения по сравнению с контролем. **** $< 0,0001$

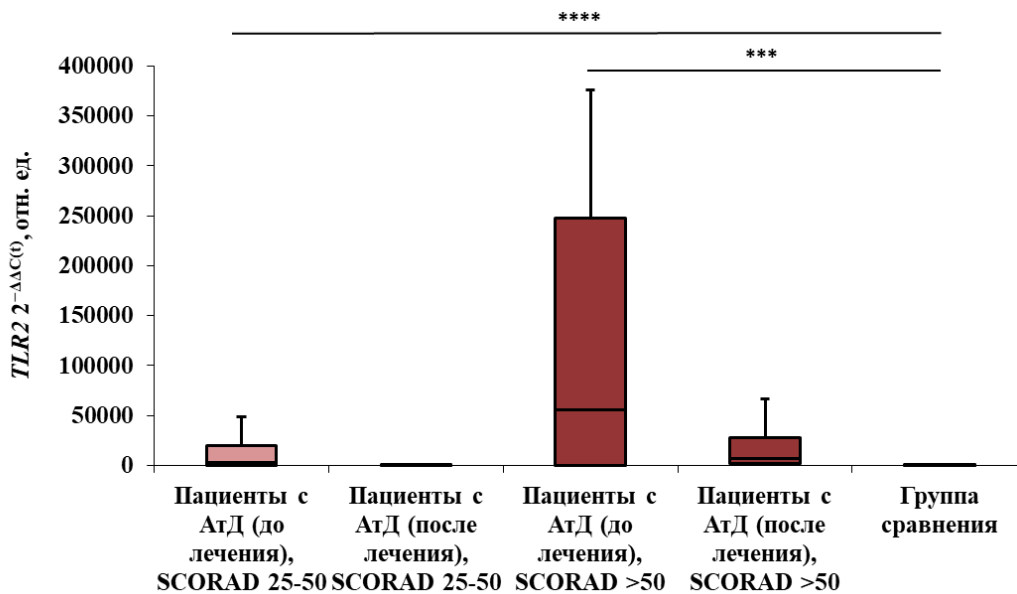


Рисунок В.8 – Медианные значения уровня экспрессии гена *TLR2* (отн. ед.) в МНК пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением АтД до и после лечения по сравнению с контролем. *** $< 0,0005$, **** $< 0,0001$

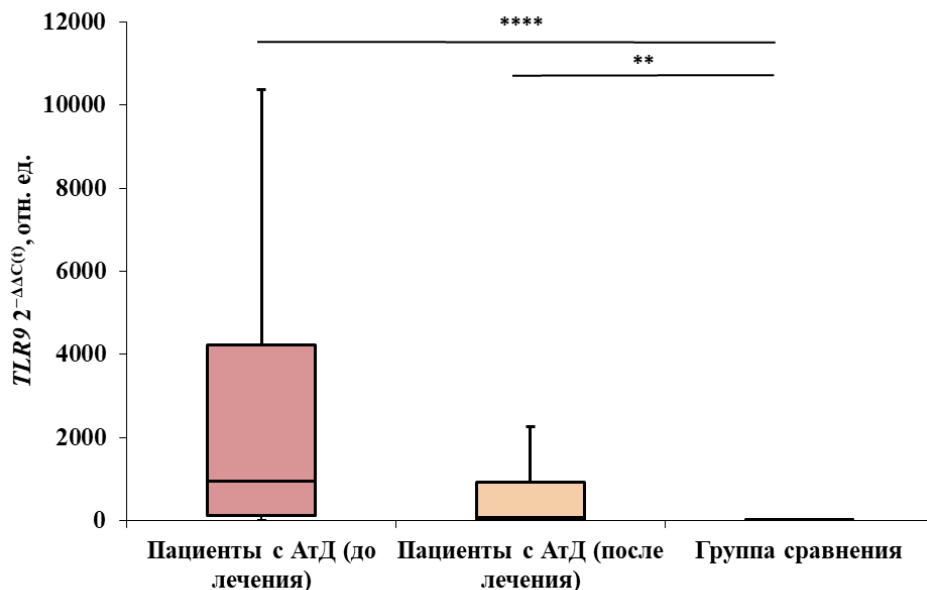


Рисунок В.9 – Медианные значения уровня экспрессии гена *TLR9* (отн. ед.) в МНК пациентов с АтД до и после лечения по сравнению с контролем. **<0,01, ****<0,0001

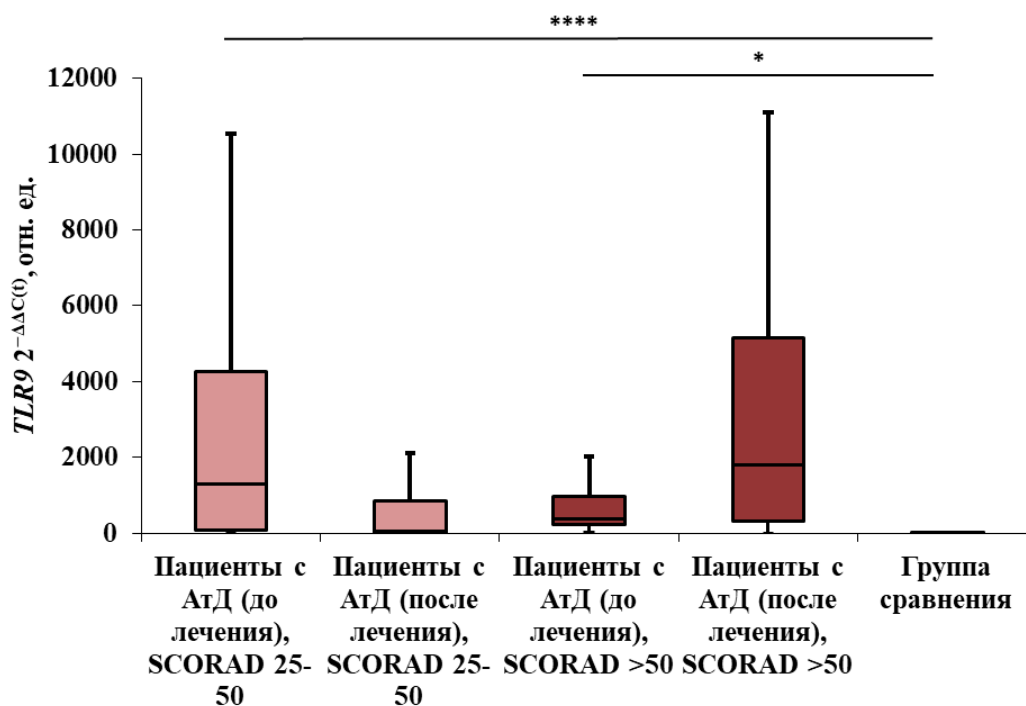


Рисунок В.10 – Медианные значения уровня экспрессии гена *TLR9* (отн. ед.) в МНК пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением АтД до и после лечения по сравнению с контролем. *< 0,05, ****< 0,0001

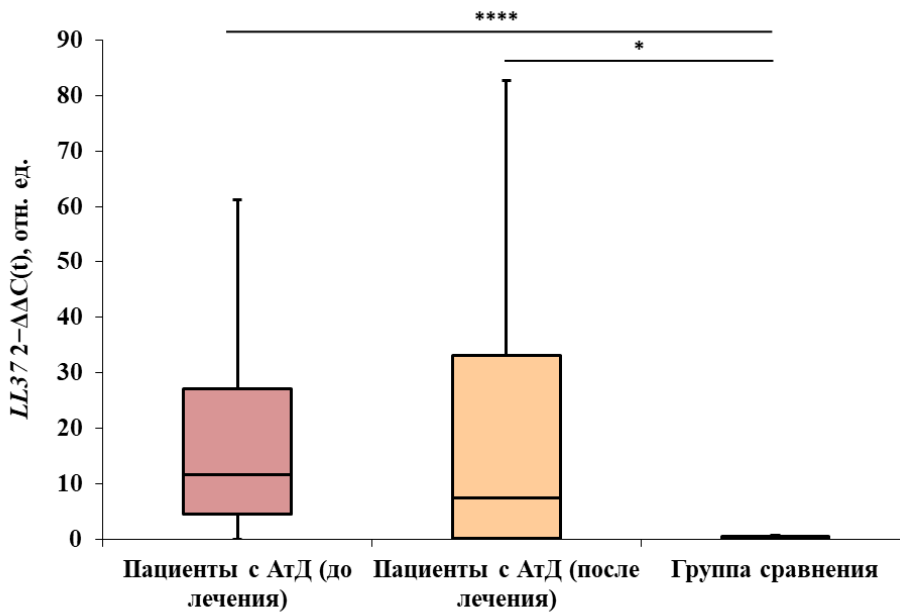


Рисунок В.11 – Медианные значения уровня экспрессии гена *CAMP* (отн. ед.) в МНК пациентов с АтД до и после лечения по сравнению с контролем. * $<0,05$, **** $<0,0001$

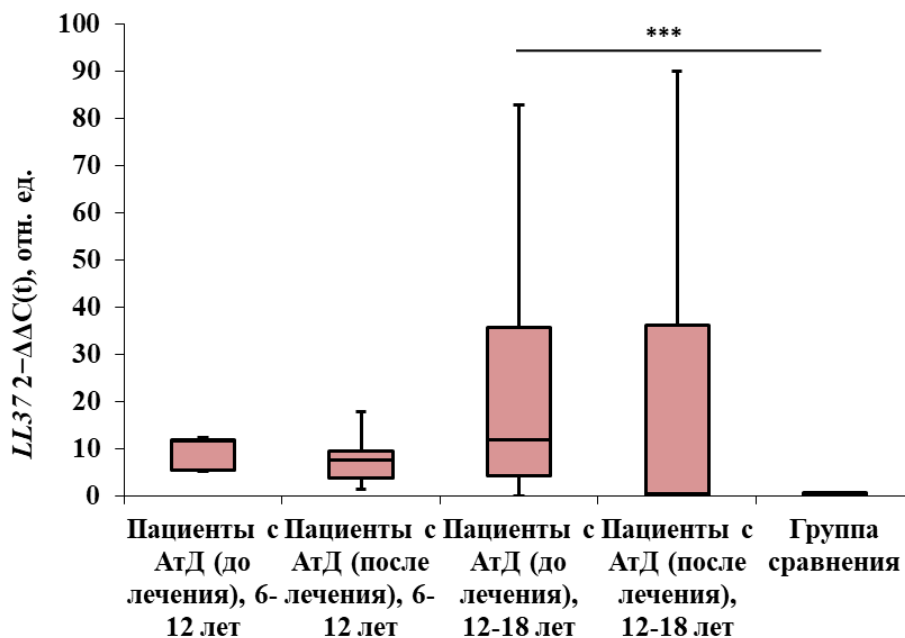


Рисунок В.12 – Медианные значения уровня экспрессии гена *CAMP* (отн. ед.) в МНК пациентов с АтД разных возрастных групп до и после лечения по сравнению с контролем. *** $<0,0005$

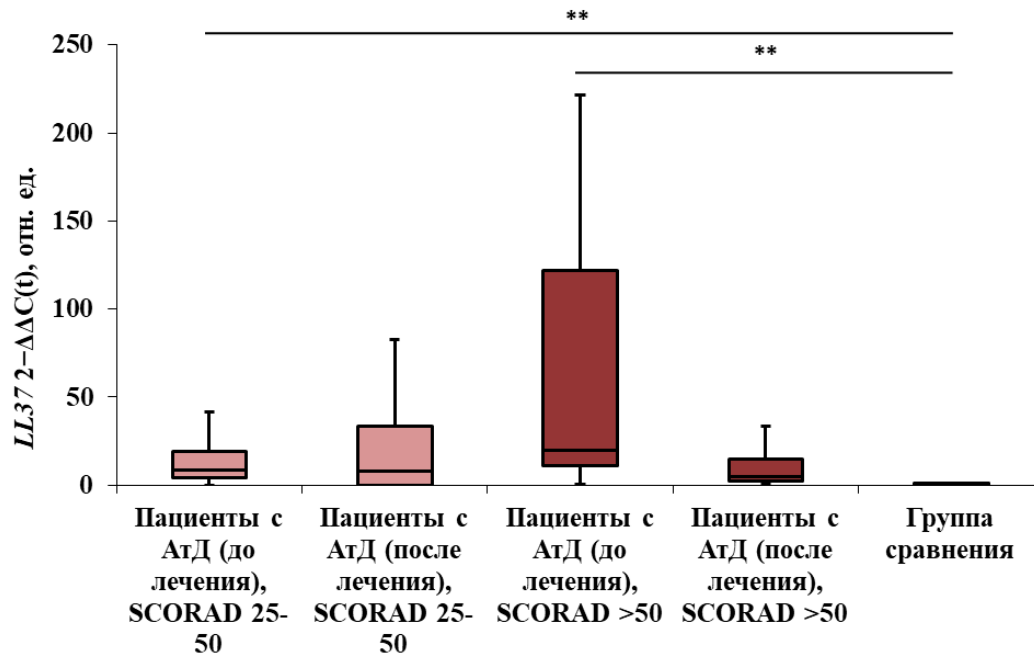


Рисунок В.13 – Медианные значения уровня экспрессии гена *CAMP* (отн. ед.) в МНК пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением АтД до и после лечения по сравнению с контролем. $** < 0,01$

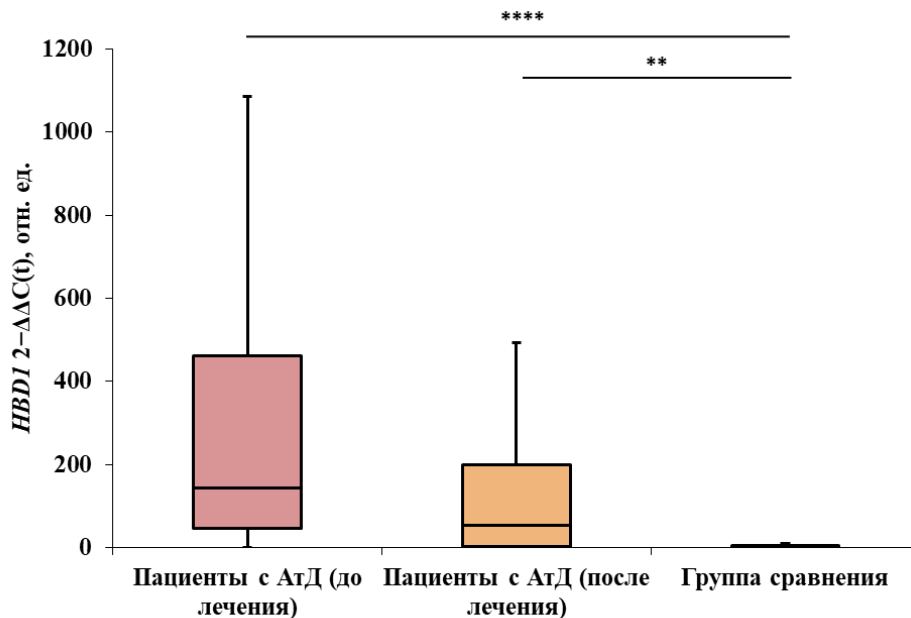


Рисунок В.14 – Медианные значения уровня экспрессии гена *DEFB* (отн. ед.) в МНК пациентов с АтД до и после лечения по сравнению с контролем. $** < 0,01$, $**** < 0,0001$

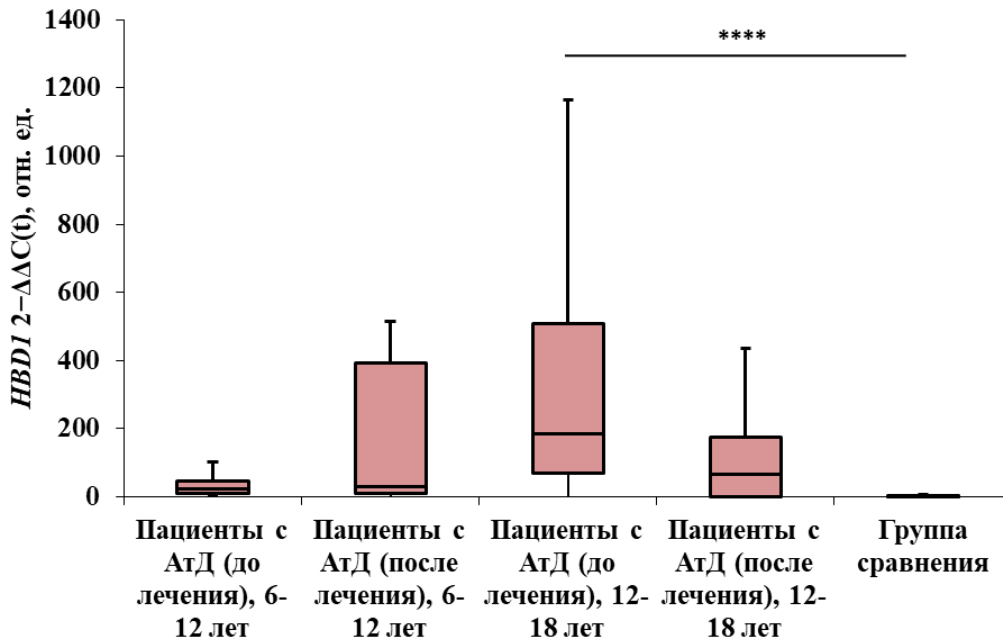


Рисунок В.15 – Медианные значения уровня экспрессии гена *DEFB* (отн. ед.) в МНК пациентов с АД разных возрастных групп до и после лечения по сравнению с контролем. **** $< 0,0001$

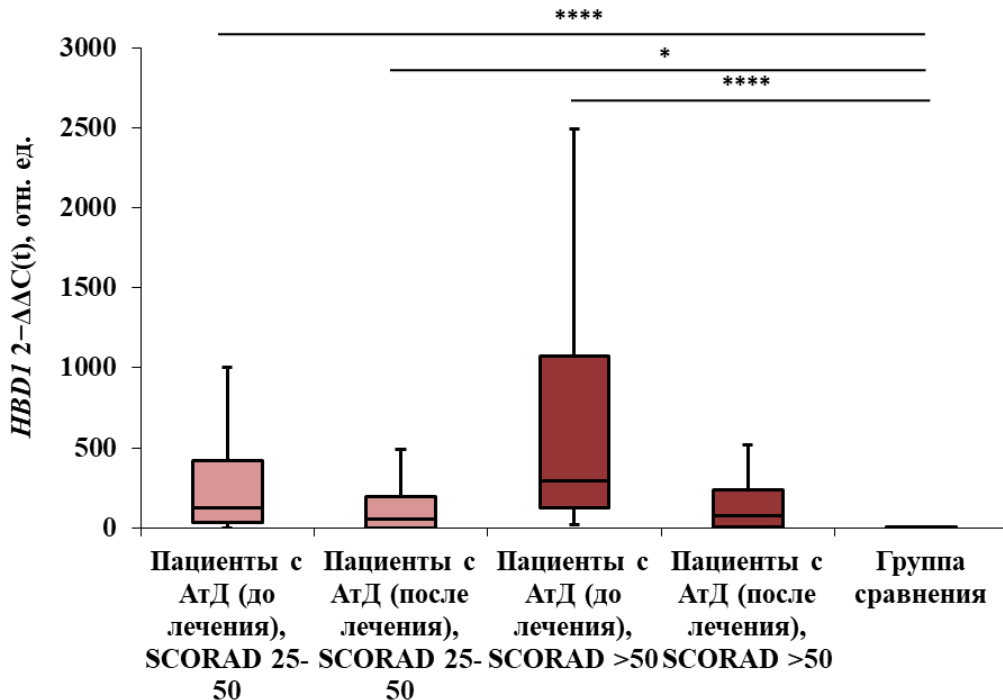


Рисунок В.16 – Медианные значения уровня экспрессии гена *DEFB* (отн. ед.) в МНК пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением АД до и после лечения по сравнению с контролем. * $< 0,01$, **** $< 0,0001$

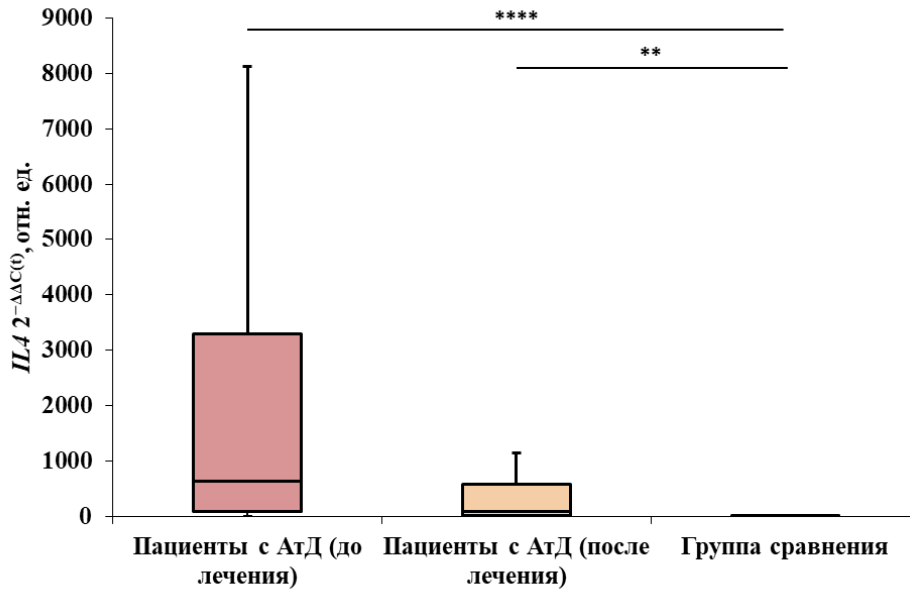


Рисунок В.17 – Медианные значения уровня экспрессии гена *IL4* (отн. ед.) в МНК пациентов с АД до и после лечения по сравнению с контролем. **<0,01, ****<0,0001

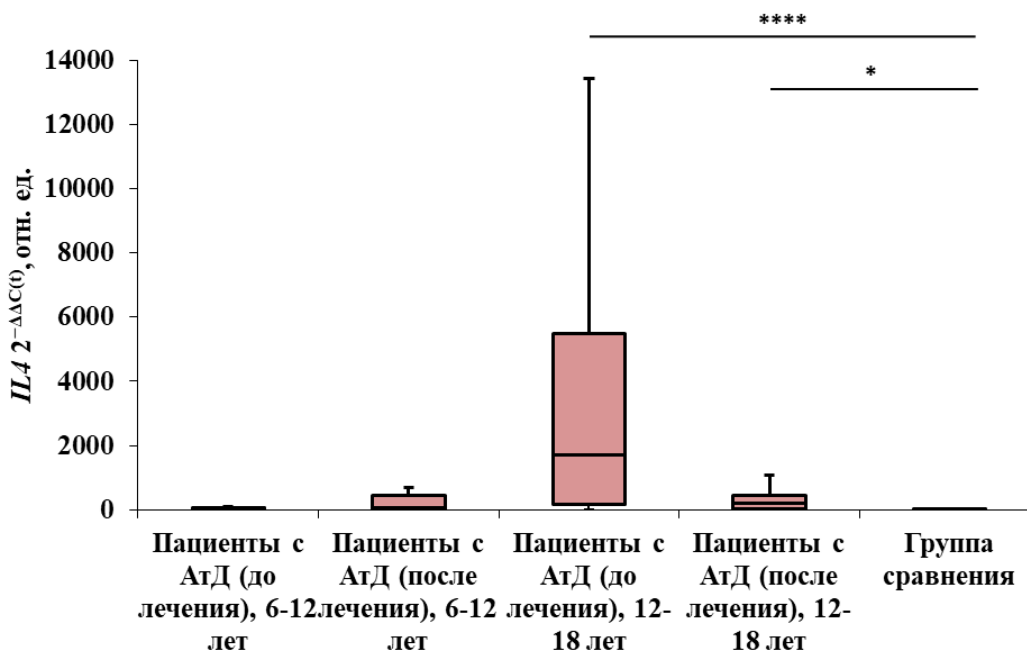


Рисунок В.18 – Медианные значения уровня экспрессии гена *IL4* (отн. ед.) в МНК пациентов с АД разных возрастных групп до и после лечения по сравнению с контролем. *< 0,05, ****< 0,0001

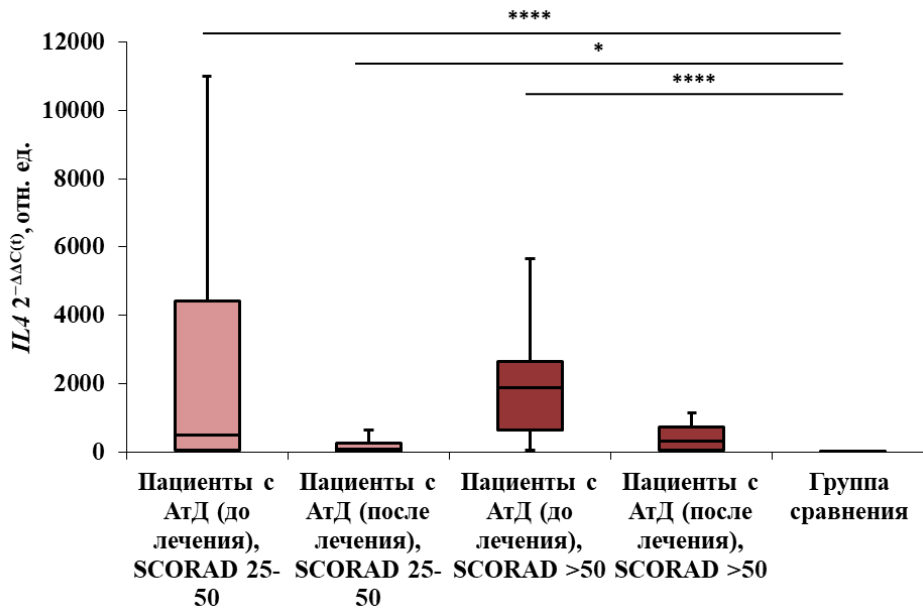


Рисунок В.19 – Медианные значения уровня экспрессии гена *IL4* (отн. ед.) в МНК пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением АтД до и после лечения по сравнению с контролем. * $< 0,05$, **** $< 0,0001$

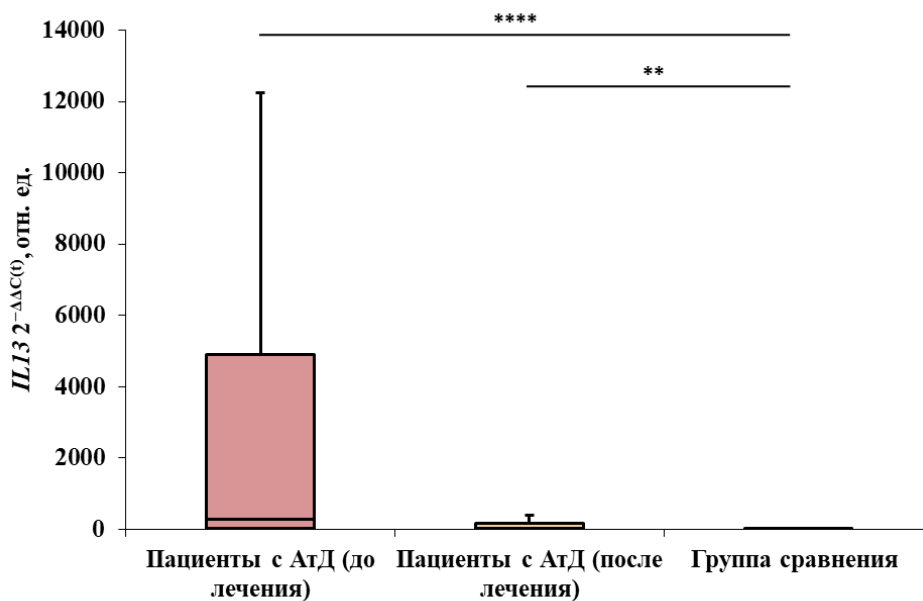


Рисунок В.20 – Медианные значения уровня экспрессии гена *IL13* (отн. ед.) в МНК пациентов с АтД до и после лечения по сравнению с контролем. ** $< 0,01$, **** $< 0,0001$

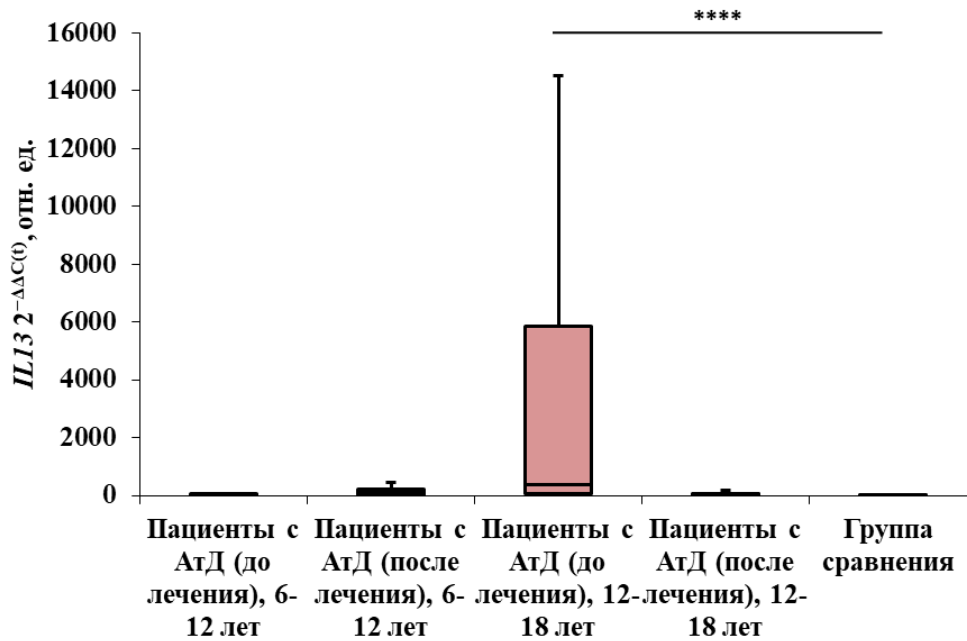


Рисунок В.21 – Медианные значения уровня экспрессии гена *IL13* (отн. ед.) в МНК пациентов с АтД разных возрастных групп до и после лечения по сравнению с контролем. **** $< 0,0001$

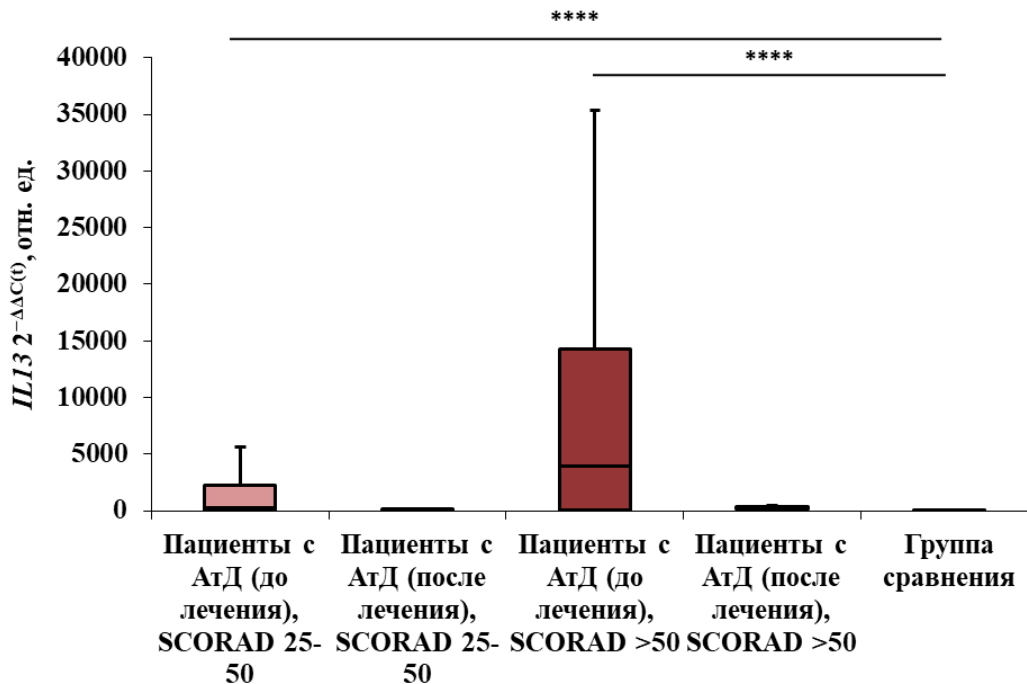


Рисунок В.22 – Медианные значения уровня экспрессии гена *IL13* (отн. ед.) в МНК пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением АтД до и после лечения по сравнению с контролем. **** $< 0,0001$