

*На правах рукописи*



**Тюрин Юрий Александрович**

**Изменения локальной микробиоты при атопическом дерматите и аллергическом рините:  
роль иммунных и неиммунных факторов**

3.2.7. Аллергология и иммунология

1.5.11. Микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор

**Фассахов Рустэм Салахович**

**Официальные оппоненты:**

**Пампура Александр Николаевич** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации отдел аллергологии и клинической иммунологии научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева, заведующий отделом

**Феденко Елена Сергеевна** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, отделение аллергологии и иммунопатологии кожи, заведующая отделением

**Козлов Роман Сергеевич** – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ректор; Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии, директор

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «21» февраля 2023 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.25 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



**Калюжин Олег Витальевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Многочисленные эпидемиологические исследования, изучающие распространение аллергических заболеваний в Российской Федерации и в мире, отражают неуклонный рост количества больных с аллергической патологией, в том числе и среди детей (Богова А. В. и др., 2008; Genuneit J., et al., 2017; Козулина И. Е. и др., 2014; Paller A. et al., 2018). По эпидемиологическим данным, в Республике Татарстан, в частности, в г. Казани (опросник ISAAC – International Study of Asthma and Allergy in Childhood), распространенность аллергической патологии среди детей школьного возраста составила 47,77%, а в 17,33% случаев у детей школьного возраста впервые установлена манифестация 2-3-х аллергических заболеваний (АЗ) (Клыккова Т. В. и др., 2010). Наряду с высокой распространенностью аллергических заболеваний (АЗ) отмечается тенденция к увеличению количества больных с тяжелым течением АЗ, и их коморбидности с другими заболеваниями (Караулов А. В. и др., 2003; Зарипова Т. Н., 2019).

Существенное влияние на течение АЗ оказывает микробиота, определенные представители которой могут влиять на течение и патогенез аллергической патологии (Кудрявцева А. В. и др., 2003; Баранова Н. И., 2009; Bloomfield S. F., et al., 2016; Петрунин Д. Д., 2018).

Аллергические заболевания, при которых выявляется ассоциация со стафилококковой микрофлорой, составляют более половины случаев в структуре всей аллергической патологии, в том числе при аллергодерматозах, а также бронхиальной астме (БА), ринитах и риносинуситах (Костина Е. М., 2014; Елисютина О. Г. и др., 2019). Отмечено, что частота встречаемости аллергического ринита у детей, по данным ISAAC, с возрастом ребенка повышается (от 8,5% у детей 6–7 лет до 14,6% у подростков 13–14 лет), что требует в том числе оценки состояния микробиоты ВДП и возможного влияния микробного фактора на течение и прогноз этой патологии (Ant K., et al., 2009).

Состав микробиоты дыхательных путей больных разных возрастных групп был избирательно изучен в ряде исследований, касающихся неаллергической патологии человека, однако состав микробного консорциума ВДП при аллергических ринитах, особенно у детей и подростков, требует изучения, в том числе с исследованием микробиоты в разные периоды заболевания (Наумкина Е. В. и др., 2017; Gollwitzer E. S., et al., 2014).

Роль бактерий рода *Staphylococcus spp.* в развитии аллергических заболеваний человека была подтверждена многочисленными исследованиями (Баранова Н.И. и др. 2007; Шарифуллина А. А. и др., 2007; Феденко Е. С. и др., 2012; Кудрявцева А. В. и др., 2015), в которых было установлено, что при АР, а также при АтД, прежде всего в детском возрасте, формируется устойчивое бактерионосительство *S. aureus*. С учетом того, что частота бактерионосительства *S.*

*aureus* на коже и слизистых дыхательных путей и у лиц без аллергической патологии в среднем составляет от 32,2% до 60,0% (Egert M., et al., 2016), можно предположить наличие качественных различий, заселяющих кожу и дыхательные пути представителей микрофлоры, между страдающими аллергической патологией и здоровыми индивидуумами.

Необходимость определения биологических особенностей штаммов *S. aureus* с кожи и слизистых ВДП, с изучением протеома, а также состояния местного иммунитета ВДП, где происходит колонизация этими штаммами с характерными свойствами, представляет несомненный интерес для понимания феномена бактерионосительства *S. aureus*, актуального при развитии и реализации атопического фенотипа.

Выявление этих особенностей поможет в определении ключевых факторов патогенности *S. aureus* и тонких молекулярных механизмов, реализуемых на основе генотипа микроорганизма, которые могут оказывать существенное влияние на патогенез АЗ. Определение патогенного потенциала и соответствующего ему генетического профиля штаммов *S. aureus* при бактерионосительстве у пациентов с аллергической патологией позволит оптимизировать выбор лечебных мероприятий, направленных на санацию бактерионосителя с аллергическим заболеванием.

При развитии АЗ часто происходит расширение спектра аллергенов, обуславливающих сенсibilизацию, что вызывает необходимость определения возможной роли при этом процессе определенных продуктов *S. aureus* (Баранова Н. И., 2009; Елесютина О. Г. 2009; Jenul C., et al., 2018; Argemi X., et al., 2019).

На основании вышеизложенного, несомненно, актуальным является комплексное изучение роли структуры локальной микробиоты и роли факторов патогенности бактерий рода *Staphylococcus spp.* (*S. aureus*, *S. epidermidis*) в патогенезе распространенных форм аллергических заболеваний (атопического дерматита и аллергического ринита).

#### **Степень разработанности темы исследования**

Изучение взаимодействия представителей условно-патогенных бактерий, входящих в состав микробиоты слизистых и кожи человека, их влияния на состояние здоровья и отдельные стороны патогенеза соматических и аллергических заболеваний является актуальным направлением современных микробиологических исследований (Кудрявцева А. В. и др. 2003; Кудрявцева А. В. и др. 2015; Мигачёва Н. Б. и др., 2019; Fung T. C., et al., 2017).

Получены убедительные доказательства того, что состав микробиоты слизистых и кожи при развитии АЗ претерпевает существенные изменения (Zhu T. H., et al. 2018; Макарова С. Г. и др., 2019; Nance C. L., et al., 2020).

В ряде работ установлена значимость локальной микробиоты ВДП в формировании иммунных реакций на респираторные антигены вирусного и бактериального происхождения,

однако эти исследования разрознены и противоречивы (Новиков Д. К. и др., 2012; Hellings W. P. W., et al., 2013; Костина Е. М., 2014; Chung K. F., 2017).

В отдельных исследованиях, касающихся детей первых трех лет жизни с рецидивирующими приступами бронхиальной обструкции на фоне бронхиальной астмы, установлена четкая зависимость между характером микробиоты слизистых ВДП и выраженностью сенсibilизации у этих пациентов (Lynch S. V., et al. 2014 Polkowska-Pruszyńska V., et al., 2020).

Один из представителей локальной микробиоты кожи и слизистых человека – золотистый стафилококк (*S. aureus*) может вызывать большое многообразие нозологических форм инфекционно-воспалительных заболеваний человека (Turner N. A., et al., 2019). Показано, что колонизация *S. aureus* может оказывать существенное влияние на особенности течения такой распространенной аллергической патологии у детей, как АТД, что обусловлено продукцией широкого спектра токсинов (Herz U., et al., 1999; Kim J., et al., 2019).

Существенный интерес представляют и «ферменты агрессии» *S. aureus*, в частности протеиназы, способные оказывать значительное влияние на течение АТД (Voegeli R., et al., 2009; Dzoro S., et al., 2018). Описано образование специфических IgE к этим белкам, хотя роль и значение их в патогенезе АЗ изучена недостаточно (Yamada H., et al., 1996; Stentzel S., 2017).

Таким образом, изучение свойств локальной микробиоты, продуктов метаболизма ее отдельных представителей (прежде всего *Staphylococcus aureus*), раскрытие молекулярно-генетических основ снижения резистентности барьеров кожи и слизистых оболочек у больных атопической патологией представляется несомненно актуальным.

### **Цель исследования**

Изучить количественные и качественные изменения локальной микробиоты кожи и слизистых верхних дыхательных путей и механизмы их формирования при атопических заболеваниях человека (АР, АТД) и их роль в патогенезе и клиническом течении заболевания.

### **Задачи исследования**

1. Изучить особенности состояния локальной микробиоты кожи и слизистых оболочек верхних дыхательных путей у больных АТД и АР.
2. Изучить молекулярно-генетический профиль штаммов бактерий *S. aureus*, выделенных с кожи и верхних дыхательных путей больных с аллергической патологией.
3. Изучить протеолитическую и токсинообразующую активность штаммов *S. aureus* с биотопов кожи при АТД и ВДП при респираторной аллергии.
4. Исследовать наличие мутаций в генах TLR2-, TLR4-рецепторов и в гене SPINK5, и их связь с колонизацией кожи *S. aureus* у больных АТД.

5. Изучить влияние мутаций в генах TLR2-, TLR4-рецепторов и в гене SPINK5 на профиль цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-17, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4, вырабатываемых лейкоцитами у больных АтД.

6. Изучить аллергенность *SplA* протеиназы *S. aureus* у больных с респираторной аллергией, и сенсибилизацию к глутамилэндопептидазе *SspA* и энтеротоксинам *S. aureus* у больных АтД.

7. Провести сравнительный анализ гомологичных последовательностей протеиназ (*SplA*, *SspA*) *S. aureus* с распространенными респираторными аллергенами.

### Научная новизна

Выявлены количественные изменения локальной микрофлоры кожи при АтД и слизистых ВДП при АР, проявившиеся в увеличении встречаемости условно-патогенных видов – *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Enterobacter spp.*, *Moraxella catarrhalis*, и снижении комменсальных видов бактерий (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus sp.*). Впервые выявлено различие локальной микробиоты слизистых оболочек ВДП при АР в зависимости от проводимой терапии: базисной или патогенетической (АСИТ). Впервые показано увеличение продукции протеиназ и энтеротоксинов у штаммов *S. aureus*, выделяемых с локальных биотопов кожи и слизистых ВДП у больных с АтД и АР по сравнению со здоровыми бактерионосителями золотистого стафилококка. Впервые показано наличие генов эксфолиативных токсинов у штаммов *S. aureus*, выделяемых с локальных биотопов кожи при АтД и их отсутствие при АР. Впервые показано, что наличие мутаций (SNP) rs5743708, rs4986790 в генах TLR2-, TLR4-рецепторов, их преобладание при АтД, и взаимосвязь с колонизацией кожи *S. aureus*. Впервые показано, что наличие мутаций rs5743708, rs4986790 в генах TLR2-, TLR4-рецепторов сопровождается преобладанием выработки Т2 цитокинов. Впервые выявлено наличие специфических *IgE* к *SplA*-протеиназе *S. aureus* у больных АР. Впервые определена гомология первичной последовательности между аллергокомпонентами клещей домашней пыли и протеиназами (*spl*- и *ssp*-оперонов) *S. aureus*. Выявлено, что снижение врожденной иммунной резистентности в синергизме с нарушением состояния барьерных функций кожи и эпителия у больных с АЗ ассоциированы с генетическими мутациями гена SPINK5 и характеризуется высокой степенью бактериальной колонизации локальных биотопов кожи и слизистых ВДП *S.aureus*.

### Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование микробиоценоза кожи и слизистых оболочек ВДП у больных аллергическими заболеваниями позволило установить связь между качественными и количественными дисбиотическими нарушениями и иммунологическими изменениями при АБА и АР. Научно обоснована и разработана новая концепция роли *S. aureus* в патогенезе аллергических заболеваний, что позволило раскрыть ранее неизученные вопросы значимости

микробного фактора в развитии atopических заболеваний. Установлена связь между клинически значимыми мутациями генов, контролирующими формирование барьера кожи и слизистых оболочек, и бактерионосительством *S. aureus* у пациентов с аллергическим заболеванием. Выявлены генетические особенности штаммов *S. aureus*, колонизирующие кожу и слизистые ВДП у пациентов с аллергическими заболеваниями, отличающие их от штаммов, колонизирующих эти биотопы у бактерионосителей без АЗ. Отличительной генотипической особенностью штаммов *S. aureus*, колонизирующих биотопы органов-мишеней при развитии АЗ, является наличие генов, кодирующих разнообразные факторы патогенности. Получены новые данные, которые позволили констатировать, что изменение защитных свойств эпидермального и эпителиального барьеров организма обусловлено как генетическими факторами макроорганизма, способствующими экспансии *S. aureus* на пораженной коже и слизистых дыхательных путей при аллергическом заболевании, так и фенотипическими проявлениями протеолитических свойств «назальных» и «кожных» штаммов стафилококков. Открыты общие закономерности изменения структуры микробиоты кожи и слизистых ВДП при развитии АЗ, согласующиеся с принципом конкурентного вытеснения одной микрофлоры другой. Полученный рекомбинантный фермент *rSplA-Strep-tag* в его термоинактивированном состоянии может использоваться в качестве рекомбинантного аллергена *S. aureus* в лабораторных тестах *in vitro* для выявления сенсibilизации к этому белку пациентов с респираторной аллергией и АтД. Предложен способ детекции генов, кодирующих факторы патогенности бактерий *S. aureus*. Предложены способы определения Ig-протеиназной активности бактериальных ферментов, которые могут быть использованы в микробиологической практике. Предложенные способы апробированы и могут быть применимы в работе клинико-диагностических, иммунологических и микробиологических лабораторий системы Министерства здравоохранения и Роспотребнадзора. В процессе выполнения работы были предложены и запатентованы 6 изобретений Российской Федерации в области клинической лабораторной диагностики, иммунологии, биохимии и микробиологии, а также одна база данных. В ФБУН ГНЦ ПМБ в отдел «ГКПМ-Оболенск» депонированы 13 штаммов от бактерионосителей с алергодерматозами и респираторной аллергией, отличающиеся выраженной Ig-протеиназной активностью и устойчивостью к антимикробным препаратам, наличием генов (*sspA*, *splB*, *splA*, *entA*, *ssl7*) факторов, обуславливающих патогенный потенциал этих штаммов. Один штамм *S. aureus* (В-9297) депонирован как изолят, содержащий ген энтеротоксина. В GenBank NCBI депонированы 8 нуклеотидных последовательностей (МК268208, MW345525, MW345526, MW345527, MW345528, MW345529, MW345530, MW345531) генов токсинов (*ent A*, *ssl7*), протеиназ (*sspA*, *splA*, *splB*), гена белка системы адгезинов (*isdB*) *S. aureus*, выделенных с участков воспаленной кожи и слизистых ВДП, с протеиназной активностью и токсинообразованием, и устойчивых к антимикробным препаратам.

Эти участки генома могут быть использованы для разработки генно-инженерных подходов для получения рекомбинантных бактериальных аллергенов *S. aureus* для *in vitro* аллергодиагностики. В NCBI GenBank аннотирована информация о 4-х драфт геномах – штаммов *S. aureus* KZ188 (JAGGIM000000000.1), *S. aureus* KZ187 (JAIUGC000000000.1), *S. epidermidis* KZ\_197 (JAIUGO000000000.1), *S. aureus* KZ 190 (JAKXMJ000000000.1), выделенных с локальных биотопов кожи при осложненном АтД, со слизистой носа при АР и с молочной железы при мастите от матери ребёнка с АтД.

### **Методология и методы исследования**

Проведен анализ основных трудов отечественных и зарубежных ученых по вопросам, касающимся патогенеза, клинической картины и роли микробиоты и отдельных ее представителей в патогенезе аллергического ринита и атопического дерматита.

На основе этих данных был разработан дизайн исследования, включающий исследования по типу «случай–контроль» на основе современных методов аллергологической диагностики и специальных методов: молекулярно-генетических, иммунологических, микробиологических, биохимических, статистических и биоинформационных способов анализа данных. Сформирован согласно критериям включения и исключения клинический материал, включающий группы больных с АтД и больных с респираторной аллергией (АР и сочетанные формы АР с АБА), а также группы контроля (условно здоровые лица) и группа сравнения (бактерионосители *Staphylococcus aureus* без АЗ и заболеваний кожи).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. У больных АЗ наблюдаются выраженные количественные изменения локальной микробиоты (кожи при АтД, слизистой носа – при АР), проявляющиеся в повышении степени бактериального обсеменения патогенными штаммами *Staphylococcus spp.*, снижении комменсальных видов коагулаза-отрицательных стафилококков, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и появлении новых сапрофитных видов *Bacillus spp.*

2. Количественные изменения локальной микробиоты ассоциируются с усилением патогенного потенциала штаммов *S. aureus*, включая повышение протеолитической активности, а также продукцию широкого спектра экзотоксинов и протеиназ. Повышение патогенного потенциала *S. aureus* свойственно определенным генотипам штаммов *S. aureus*, колонизирующих кожу у больных АтД и слизистые оболочки ВДП у больных АР и АР+АБА.

3. Повышенная колонизация биотопов кожи и слизистых оболочек у больных с АЗ ассоциируется с полиморфизмами (SNP) генов TLR2-, TLR4-рецепторов и гена SPINK5, участвующими в формировании кожно-эпителиальных защитных барьеров человека.

4. Мутации генов TLR2-, TLR4- рецепторов и гена SPINK5 ассоциируются с увеличением продукции цитокинов Т2-иммунного ответа, что может усугублять течение имеющегося аллергического заболевания и способствовать сенсibilизации к другим аллергенам.

5. Продукты жизнедеятельности штаммов *S. aureus*, заселяющих слизистые ВДП, в частности *SplA*-протеиназа, обладают аллергенными свойствами, вызывая IgE-опосредованную сенсibilизацию у больных с респираторными АЗ.

6. Аллерген *SplA S. aureus* обладает высокой степенью гомологии с аллергенами клещей домашней пыли (Der p 4, Der f 6).

#### **Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора**

Автор непосредственно участвовал в выборе темы диссертационного исследования, определении цели и формулировке решаемых задач, положений и выводов работы, планировании и выполнении экспериментальных исследований, написания рукописи диссертации и подготовке к печати основных ее положений.

Работ выполнена в рамках научных исследований Федерального бюджетного учреждения науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора. Диссертационное исследование базируется на большом объеме клинико-экспериментальных исследований и результатов с применением современного программного обеспечения для осуществления биоинформационного и статистического анализа данных. Выводы работы обоснованы и отражают цель и задачи исследования. Исследования были осуществлены на сертифицированном оборудовании, с действующими свидетельствами и аттестатами о метрологической поверке. Апробация работы проведена на заседании Ученого совета ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора (протокол № 2 от 04.02.2022).

Материалы диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях и конгрессах: Международная конференция «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций», 5-7 июня 2013 г., Санкт-Петербург; научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации», 23-25 апреля 2014, Санкт-Петербург; VI Российская научно-практическая конференция, посвященная 200-летию Казанского государственного медицинского университета, 4-5 апреля 2014, Казань; Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), 17-21 June 2017, Хельсинки, Финляндия; Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), 26-30 May 2018, Мюнхен, Германия; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: Актуальные проблемы и решения», посвящённой 100-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.

Н. Блохиной Роспотребнадзора, 11-12 сентября 2019, Нижний Новгород VI Национальный конгресс бактериологов, 14-16 сентября 2021, Казань; Российско-швейцарский вебинар «Аллергические и аутоиммунные заболевания: новые возможности через новые знания», 17 января 2022 (Казань, Россия – Цюрих, Швейцария).

### **Внедрения результатов работы в практику**

Алгоритм клинико-иммунологического и микробиологического исследования больных АЗ и способы молекулярно-генетических исследований изолятов, выделяемых от больных с atopической патологией, были внедрены в практику работы специализированной поликлиники инфекционно-аллергических заболеваний ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора (акт внедрения от 15.09.2022). Результаты исследований внедрены в образовательный процесс кафедры аллергологии и иммунологии КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (акт внедрения от 16.09.2022). Рекомендации по современным методам идентификации стафилококков, тестирования протеолитических свойств у патогенных штаммов, входящих в состав кожи и слизистых ВДП, а также молекулярно-генетические методы (ПЦР) детекции генов протеиназ *spl*-и *ssp*-оперона в геноме штаммов *S.aureus*, выделяемых у больных с АД и АР, учтены при разработке региональных методических рекомендаций, утвержденных Министерством здравоохранения Республики Татарстан (РТ) в 2020 г. и внедренных в работу системы здравоохранения РТ. По результатам работы для системы здравоохранения РТ подготовлены два информационно-методических письма «Особенности микробиоты кожи человека при аллергической патологии» и «Особенности микробного консорциума слизистых оболочек верхних дыхательных путей человека при аллергической патологии» для использования в профессиональной деятельности врачей аллергологов, педиатров, дерматовенерологов и отоларингологов (утверждены Министерством здравоохранения РТ, 2020 г).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту научных специальностей: 3.2.7. Аллергология и иммунология и 1.5.11. Микробиология (медицинские науки). Соответствие диссертации паспорту научной специальности 3.2.7. Аллергология и иммунология, определяется направлением исследования: п.1. изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний; разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов. Соответствие диссертации паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология (медицинские науки), определяется областью исследований, а именно: выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов; морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов.

## Публикации

По результатам диссертационного исследования автором опубликовано 41 работа, в том числе 9 научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук; 9 статей – в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, 8 – иных публикаций по результатам исследования, из них обзорных статей – 5, патентов – 6 и 1 база данных, 8 публикаций – в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 5 зарубежных конференций).

## Объем и структура диссертации

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

## Основное содержание работы

**В обзоре литературы** обобщены результаты анализа публикаций отечественных и зарубежных исследователей, касающихся современных аспектов распространенности АтД и АР их патогенезу, а также состояния локальной микробиоты кожи и слизистых ВДП при этих АЗ. Показана роль *S. aureus* как триггерного микробного фактора при атопическом дерматите, вызывающего развитие инфицирования и связанных с ним осложнений. Получены данные о роли белков – факторов патогенности *S. aureus* в патогенезе АЗ и воздействии на барьеры кожи и эпителия, касающиеся том числе сериновых протеиназ *S. aureus* как потенциальных факторов аллергенности у пациентов с АтД и респираторной аллергией.

## Материалы и методы исследования

В основную группу исследования были включены 840 больных АЗ, 465 человек из которых страдали АтД, а у 375 человек – респираторной аллергической патологией, включающей АР и сочетание АР с АБА. Критериями включения пациентов в основную группу с диагнозом были подтвержденный диагноз АтД. Критерии включения в основную группу пациентов с респираторной аллергией: подтвержденный диагноз аллергический ринит; сочетанные нозологии (САР+АБА) или КАР+АБА; АР+АтД.

Группа сравнения состояла из 135 человек бактерионосителей *S. aureus*, без АЗ, у которых при трехкратном исследовании носоглотки и кожи выделяли *S. aureus* с двух биотопов

одновременно (кожа и слизистые оболочки ВДП) или перманентно с одного биотопа с интервалом 3-6 месяцев.

Группа контроля состояла из условно здоровых лиц (100 человек) без аллергической патологии и отсутствия носительства на коже и слизистых ВДП *S. aureus*.

Исследовано 935 микробных консорциумов кожи и слизистых оболочек ВДП (носа и носоглотки) у пациентов с аллергическими заболеваниями и 235 – у бактерионосителей *S. aureus* без аллергической патологии и здоровых лиц.

В работе применены клинико-иммунологические, молекулярно-генетические, биохимические, протеомные, бактериологические, микологические, статистические и биоинформатические методы исследования.

### 1. Иммунологические методы

*Определение концентраций цитокинов* (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-4,  $\alpha$ -ФНО,  $\gamma$ -ИФН, ГМ-КСФ, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-5, трансформирующего фактора роста бета-1 или TGF- $\beta$ , TSLP), а также хитиназо-подобного гликопротеина YKL-40 в биообразцах (культуральные жидкости МК, сыворотка крови, назальные смывы) осуществляли иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов тест-систем (производства ЗАО «Вектор-Бест», Россия, eBioscience, Bender Med Systems, Cloud-clone corp., США, R&D Systems, MN, США, Quidel, США).

*МК периферической крови культивировали in vitro* в питательной среде RPMI 1640 с L-глутамином (Россия), в которую вносили антигены *S. aureus* и оценивали продукцию цитокинов в ответ на стимуляцию. Цитокины в КЖ определяли иммуноферментным методом (ИФА), используя коммерческие тест-системы в соответствии с методикой производителя.

*Концентрацию общего IgE* определяли в сыворотке крови с помощью реагентов компании «Хема» (Россия).

*Определение специфических IgE к протеиназе SspA S. aureus* осуществляли с использованием тест-системы «Аллерго ИФА-специфические IgE» («Алкор-Био», Россия), в качестве антигена применяли биотинилированный термоинактивированный фермент стафилококка. В качестве калибровочных проб использовали аттестованные по международному стандарту известные количества IgE (МЕ/мл).

*Определение IgE к рекомбинантной термоинактивированной SplA-протеиназе S. aureus* выполняли неконкурентным ИФА.

*Концентрацию IgE к аллергенам d1, d2 клещей ДП, полыни обыкновенной (wб), аллергокомпонентам березы (Betr v1), сои (Gly m 4), эпидермальным аллергенам домашних животных (Can f 1, Can f 2, Fel d1), плесневым грибам (Asp f3), энтеротоксинам А, В (m80, m81) S. aureus* определяли в сыворотке крови по технологии ImmunoCAP на анализаторе Immuno CAP 100, v.1 (Phadia АВ, Упсала, Швеция).

*Проточная цитофлуориметрия.* Экспрессию рецепторов дифференцировки лимфоцитов, определяли проточной цитофлуориметрией, с наборами моноклональных антител (6-color TBNK BD Multitest и IMK lymphocyte Kit) (Тюрин Ю. А., Мустафин И.Г., и др., 2012). Экспрессию CD203с методом проточной цитометрии на базофилах ПК анализировали на основе 3-х цветного проточного цитометрического протокола для мониторинга активации базофилов с использованием реагентов Allergenicity Kit (Immunotech SAS, Франция) согласно инструкции производителя на анализаторе FACSCanto II с программным обеспечением Cell Quest, Becton Dickinson.

## 2. Молекулярно-генетические методы

Генотипирование полиморфизмов TLR2 (Arg753→Gln), TLR4 (Asp299→Gly) в генах Толл-подобных рецепторов человека – осуществляли методом аллель специфической ПЦР (АС-ПЦР) с применением наборов «SNP-экспресс» НПФ «Литех» (Россия). Идентификация полиморфизма Glu420→Lys в гене SPINK5 осуществляли методом ПЦР с последующим энзиматическим расщеплением эндонуклеазой *HphI* продуктов амплификации по методу, представленному в работе Walley A. J., et al., 2001. Геномную ДНК человека выделяли из лейкоцитов периферической крови и клеток буккального эпителия, применяя наборы реагентов «ДНК-экспресс», «ДНК-экспресс кровь-плюс» НПФ «Литех» (Россия).

*Исследование генетического профиля изолятов S. aureus, выделенных с биотопов кожи и слизистых оболочек ВДП у больных atopическим дерматитом, AP и бактерионосителей без аллергического заболевания*

Выделение бактериальной ДНК из штаммов проводили с помощью стандартного набора реагентов ZR Genomic DNA II Kit<sup>TM</sup> (Zymo Research, США), ДНК-сорбент (НПФ «Литех», Россия). ПЦР-детекцию генов энтеротоксинов *S. aureus* осуществляли по Jarraud S. et al., 2002. ПЦР-детекцию генов стафилококковых суперантиген-подобных токсинов: *set8 (ssl3)*, *set12 (ssl8)* - с использованием праймеров по Smyth D. S., 2007. ПЦР-детекцию специфичных участков генов протеиназ *S. aureus* проводили по методологии (Zdzalik M., et al., 2012), специфичных участков генов гемолизинов *S. aureus*, *S. epidermidis* и генов лейкоцидинов, эксфолиативных токсинов *S. aureus* - по Jarraud S., et al., 2002; Nakaminami H., et al., 2008. Синтез и очистка всех праймеров осуществлена в ЗАО «Синтол» (Москва, Россия).

Секвенирование фрагментов ДНК *S. aureus*. Для подтверждения специфичности ген-положительные продукты амплификации ПЦР секвенировали с применением GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fishers Cientific, США), dsDNA BR Assay Kit Qubit (Invitrogen, США), NEB Next® Ultra<sup>TM</sup> DNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB), DNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Полученные библиотеки секвенировали на платформе Illumina Miseq. Секвенирование генома

(whole-genome shotgun sequencing) штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis*, выделенных с кожи и слизистых ВДП у больных АЗ, проведено на платформе Illumina Miseq.

### 3. Биохимические и протеомные методы исследования

*Биохимические свойства штаммов S. aureus, выделенных с кожи и слизистых ВДП.* Протеолитическую активность *Staphylococcus spp.* определяли по способам, представленным в работах «Высококчувствительный способ определения Ig-протеиназной активности с использованием полимерных матриц», Патент RU № 2519071; «Способ определения протеолитической модификации клеточных рецепторов на модели выделенных лимфоцитов периферической крови», Патент RU № 2510026. Энтеротоксин-продуцирующую активность штаммов *S. aureus* оценивали иммунохимическим методом с применением реагентов RIDASCREEN (R) SET A, B, C, D, E (R-Biopharm AG, Германия). Анализ белков протеома штаммов *S. aureus* проводили в двумерном геле-электрофорезе (2D-DIGE) с флуоресцентными красителями по Gygi S. P., et al., 2000.

*Получение и очистка рекомбинантной SplA-протеиназы S. aureus.* Фрагмент гена *splA* амплифицировали методом ПЦР из геномной ДНК *S. aureus* NCTC 8325 и клонировали в *E. coli* согласно протоколам. В качестве экспрессионной конструкции использовали плазмидный вектор pASG-IBA2 (IBA GmbH, Германия). Очистку рекомбинантного белка осуществляли системой Strep-tag согласно практическому руководству.

### 4. Микробиологические методы исследования кожи и слизистых оболочек ВДП

Отбор биологического материала с кожи проводили методом смыва и отпечатка, которые представлены в работах (Заборова В. А. и др., 2015; Арзуманян В. Г. и др., 2019). Назальный секрет отбирали на стерильный ватный тампон в области средней носовой раковины и переносили в жидкие транспортные среды.

Для количественной оценки обсеменённости локальных участков кожи *S. aureus*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.* и грибами *Candida albicans* полученный материал забирали методом смыва с участков кожи площадью 1 см<sup>2</sup> (Заборова В. А. и др., 2015), а количество колониеобразующих единиц на 1 см<sup>2</sup> кожи (КОЕ/см<sup>2</sup>) выражали в виде числа (N), рассчитанного как Log<sub>10</sub> КОЕ/см<sup>2</sup>.

Для выделения *St spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Moraxella sp.*, *Haemophilus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Lactobacillus sp.* *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.* применяли твердые и жидкие селективные питательные среды: ЖСА, «Стафилококагар», «Коринебакагар», шоколадный агар с ростовыми добавками, 5% КА, «Columbia agar Base» (Conda, Испания) с добавлением 5% бараньей крови, «Лактобакагар» и среду МРС (жидкую и агаризованную), цетримидный агар (ФБУН и ГНЦ ПМБ, п. Оболенск, Россия), а также среду Кинг А, ЖСА с полимиксином и соответствующие условия культивирования (37°C, в течение 24–48 часов), для выделения

энтеробактерий - агар Мосселя, среду Эндо- ГРМ, Гисса-ГРМ, Криглера-ГРМ (ФБУН и ГНЦ ПМБ, п. Оболенск, Россия).

Для выделения *Candida sp.* применяли селективный агар Сабуро, для *Malassezia sp.* – модифицированную среду Диксона с твинами и оливковым маслом (Арзуманян В. Г., 2002). Идентификацию микроорганизмов осуществляли по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам методом MALDI-TOF MS на масс-спектрометре MALDI Biotyper Systems, серии FLEX™ (Bruker Daltonics, Германия).

5. Биоинформатический анализ. Поиск линейных В-клеточных эпитопов в антигенах *S.aureus* выполнен *in silico* на ресурсе IEDB (<http://www.iedb.org>) с применением алгоритма VeriPred-2.0 при значении average: 0,50–0,530 (Jespersen M. C., et al., 2017). Идентификационный поиск гомологичных структур известных алергокомпонентов осуществлен с помощью ресурса Allermatchtm (<http://allermatch.org>), который позволил осуществить прогнозирование потенциальной аллергенности белков.

#### 6. Статистические методы

В работе применены программа для статистического анализа и визуализации данных Prism v.8.3.0. Использовали методы параметрической и непараметрической статистики анализа данных (Юнкеров В. И. и др., 2011). Распределение генотипов на соответствие закону Харди – Вайнберга – Кастла выполнено по критерию  $\chi^2$ , значимость различий по частоте аллелей и генотипов между группами определяли по критерию  $\chi^2$ , для выявления ассоциации генотипов и аллелей с факторами были рассчитаны отношения шансов (ОШ) с 95%-м ДИ.

### **Результаты исследования и их обсуждения**

В главе 3 изложены результаты исследования локальной микробиоты кожи и слизистых ВДП у больных с АтД и респираторной аллергией.

#### *Изменения локальной микробиоты кожи у больных с АтД*

Выявлены значимые изменения как видового спектра, так и частоты выделения представителей филума *Firmicutes* на пораженных участках кожи больных с АтД. Так, у детей с АтД в возрасте до 2-х лет отмечено значительное увеличение встречаемости *S. aureus* (Таблица 1). Выявлены видовые отличия в частоте встречаемости коагулазо-отрицательных видов стафилококков: у детей при развитии АтД на участках кожи не встречались *S. haemolyticus* и *S. saprophyticus*, а у здоровых детей этого возрастной группы они встречались в 14,5-16,0% случаев. Характерной особенностью явилось снижение выделения *S. epidermidis* у детей с АтД на всех участках кожи почти на 20,7% (Таблица 1).

Таблица 1 – Среднее значение Me (Q1;Q3) частот встречаемости микрофлоры на локальных участках кожи у больных АтД детей до 2-х лет и в группе контроля и сравнения (в %)

Таксономическая группа (вид)	Дети с АтД		Группа сравнения n=25	Контрольная группа n=25	P
	Стадия обострения n=100	Стадия ремиссии n=80			
	1	2			
<i>S. aureus</i>	49,6 14,9;68,5	18,7 12;25,0	5,6 2,5;6,0	н/о	p <sub>1-3</sub> <0,05 p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>2-3</sub> <0,05
<i>S. epidermidis</i>	25,6 4,5;30,0	38,5 11,5;30,5	46,3 10,5;53,0	67,8 25,7;74,0	p <sub>1-3</sub> <0,05 p <sub>2-3</sub> >0,05 p <sub>1-4</sub> <0,05
<i>S. haemolyticus</i>	н/о	н/о	14,5 7,0;20	16,0 5,5;19,5	p <sub>3-4</sub> >0,05
<i>S. saprophyticus</i>	н/о	н/о	28,9 9,0;31,0	32,2 8,5;42,0	p <sub>3-4</sub> >0,05
<i>Bacillus spp.</i>	18,0 8,5;25,0	3,0 1,9;9,5	н/о	н/о	p <sub>1-2</sub> <0,05
<i>Corynebacterium spp</i>	34,5 8,5;45,5	41,6 11,5;36,5	37,8 9,5;54,5	54,0 10,5;63,7	p <sub>1-3</sub> <0,05 p <sub>2-3</sub> <0,05 p <sub>3-4</sub> >0,05
<i>Lactobacillus spp</i>	12,8 8,5;21,5	6,7 2,5;8,5	29,0 16,8;53,5	36,0 16,8;68,7	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>2-3</sub> <0,05 p <sub>3-4</sub> <0,05 p <sub>1-4</sub> <0,05 p <sub>2-4</sub> <0,05
<i>Pseudomonas spp.</i>	13,8 3,4;22,5	4,5 2,5;7,8	н/о	н/о	p <sub>1-2</sub> <0,05
<i>Candida albicans</i>	36,4 16,8;58,5	15,3 4,8;23,6	н/о	н/о	p <sub>1-2</sub> <0,05
<i>Candida azyma</i>	8,0 2,7;10,5	6,0 2,6;9,7	6,8 2,5;13,5	15,0 7,1;25,5	p <sub>2-3</sub> <0,05 p <sub>3-4</sub> <0,05 p <sub>1-3</sub> <0,05 p <sub>1-4</sub> <0,05
<i>M. caprae</i>	15,4 4,6;28,9	6,3 2,7;9,5	20,6 9,8;35,8	20,6 8,5;37,5	p <sub>2-3</sub> <0,05 p <sub>2-4</sub> <0,05
<i>M. globosa</i>	4,5 1,8;6,8	9,0 2,5;6,8	н/о	н/о	p <sub>1-2</sub> <0,05

Примечание: н/о – не определялся; различия между группами оценивали по U-критерию Манна-Уитни, статистическая значимость при p<0,05.

У больных АтД детей этой возрастной группы выявлены существенные различия в частоте встречаемости *Corynebacterium spp.*, значимо снижена встречаемость *Lactobacillus spp.* Отмечено также снижение показателей микробного обсеменения пограничных с пораженной кожей участков представителями *Lactobacillus spp.* Показатель микробного обсеменения кожи *Lactobacillus spp.* при АтД детей составил  $2,4 \pm 1,7 \text{ Log}_{10} \text{ КОЕ/см}^2$  ( $250,0 \pm 50,0 \text{ КОЕ/см}^2$ ), а у

здоровых детей контрольной группы - в 10 раз выше ( $3,5 \pm 0,7 \text{ Log}_{10} \text{ КОЕ/см}^2$  или  $3,0 \times 10^3 \pm 5,0 \text{ КОЕ/см}^2$ ). Снижение встречаемости комменсального вида *S. epidermidis* и повышение *S. aureus* у детей раннего возраста с АД как в стадию обострения, так и в стадию ремиссии может существенно изменять иммунологическую реактивность кожи и снижать ее защитные свойства, связанные с воздействием комменсалов на иммунные клетки дермы. Известно, что *Corynebacterium spp.* способна ингибировать рост патогенных видов стрептококков и стафилококков путем активной продукции липаз. Выявленное снижение встречаемости этих комменсалов при обострении АД, а также в стадию ремиссии заболевания неблагоприятно влияют на этот механизм колонизационной резистентности.

Значимо различались по частоте встречаемости в составе микобиоты кожи у больных АД и представители грибов семейств *Sacharomycetalis*, *Malasseziaceae* и *Tremellaceae*. Так, дрожжеподобные грибы *Candida spp.* прежде всего *Candida albicans*, у детей в стадии обострения выделялись на 36,4% чаще, чем у здоровых бактерионосителей и группы контроля, что согласуется с данными Арзумян В. Г, 2002 г. В группе сравнения отмечено выделение грибов рода *Candida spp.* в основном *Candida азума*. У больных АД как в период ремиссии, так и стадии обострения отмечалось значимое снижение встречаемости *Malassezia capre* (Таблица 1). *Malassezia globosa* выделялся только у больных АД.

*Особенности локальной микробиоты слизистой ВДП у больных с респираторной аллергией.* В стадии обострения у больных сезонным АР: возрастала частота выделения *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Enterobacter spp.*, *Moraxella catarrhalis*, снижалась частота встречаемости *S. epidermidis* и других КОС (*S. homonis*) на фоне снижения встречаемости комменсалов (*Corynebacterium spp.*). В стадии ремиссии после проведения базисной терапии состав микробиоты слизистой носа существенно не изменялся: доминировали потенциально патогенные стафилококки *S. aureus*, *S. haemolyticus*, возрастала частота выделения *Moraxella catarrhalis* на фоне снижения комменсалов *S. epidermidis*, *S. homonis*, *Corynebacterium spp.* У пациентов в стадии ремиссии САР на фоне АСИТ, в отличие от пациентов, получивших базисную фармакотерапию, отмечена тенденция восстановления состава микробиоты, наблюдалось увеличение встречаемости комменсальных видов стафилококков (*S. epidermidis*), *Corynebacterium spp.* Аналогичные закономерности отмечены нами и у пациентов с КАР, что отражает общую тенденцию изменения локальной микробиоты при развитии аллергического воспаления слизистых оболочек ВДП. У лиц, не страдающих АЗ, в составе локальной микробиоты преобладали *S. epidermidis*, *S. homonis*, а также представители *Corynebacterium spp.*, отмечены также сезонные колебания в составе выделяемых бактериальных видов назальной микробиоты, особенно при переходе от одного сезона года к другому (весна–осень, лето–зима (Таблица 2). Нами установлено, что в острую стадию заболевания у детей и подростков с АР

отмечено увеличение частоты колонизации слизистой ВДП грамотрицательными бактериями, относящимися к *Enterobacter spp.*, *Moraxella spp.*, а также гемофильными бактериями *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus haemolyticus*. Встречаемость назального носительства *S. pneumoniae* у детей с АР в возрасте от 6 до 14 лет составила 18,1% (Q1-9,5; Q3-28,5), что не отличалось от группы сравнения без АР (Таблица 2). Однако нами установлено, что в группе детей с АР в стадии ремиссии заболевания после проведения АСИТ этот показатель снижался на 6,0% ( $p < 0,05$ )

Таблица 2 – Среднее значение Ме (Q1; Q3) частот встречаемости культивируемых бактериальных представителей филума *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* в составе локальной микробиоты ВДП у детей и подростков в возрасте 6–14 лет с АР и в группе сравнения (в %)

Таксономическая группа (вид)	АР		Стадия ремиссии (АСИТ) n=34	Группа сравнения, n=37	p
	Стадия обострения n=160	Стадия ремиссии (базисная терапия) n=135			
	1	2			
<i>Corynebacterium spp</i>	5,6 1,8; 9,5	8,8 2,4; 11,8	20,6 8,9; 31,5	21,6 (9,7; 36,5) <sup>1</sup> 24,3 (9,0; 42,5) <sup>2</sup>	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$
<i>Enterobacter spp</i>	42,5 23,9; 50,5	16,2 7,1; 23,5	н/о	н/о	$p_{1-2} < 0,05$
<i>S. pneumoniae</i>	18,0 9,5; 28,5	17,8 7,2; 24,8	12,0 6,5; 14,5	18,9 (6,4; 25,8) <sup>1</sup> 21,6 (10,7; 27,8) <sup>2</sup>	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$ $p_{1-4} > 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$
<i>Moraxella spp.</i>	45,0 13,9; 56,5	29,0 11,9; 45,5	5,9 2,5; 8,5	5,9 (2,0; 7,5) <sup>1</sup> 8,1 (4,4; 10,5) <sup>2</sup>	$p_{1-4} < 0,05$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$

Продолжение Таблицы 2

<i>Neisseria flavescens</i>	10,0 4,4; 15,8	17,7 7,2; 25,0	16,0 7,3; 28,5	22,0 (11,8;35,7) <sup>1</sup>	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>1-3</sub> <0,05 p <sub>2-3</sub> >0,05 p <sub>1-4</sub> <0,05
<i>Neisseria subflava</i>	н/о	н/о	17,8 7,6; 20,5	15,0 (6,5; 21,5) <sup>1</sup>	p <sub>3-4</sub> >0,05
<i>Haemophilus influenzae</i>	5,0 1,7; 6,9	н/о	н/о	5,4 (2,7; 7,5) <sup>1</sup> (н/о) <sup>2</sup>	p <sub>1-4</sub> >0,05
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	16,0 4,9; 25,5	18,0 8,3; 26,8	н/о	17,5 (6,2; 31,8) <sup>1</sup>	p <sub>1-2</sub> >0,05 p <sub>2-4</sub> >0,05 p <sub>1-4</sub> >0,05
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	22,0 3,3; 28,5	16,0 3,1; 25,7	7,0 2,4; 10,8	н/о	p <sub>1-3</sub> <0,05 p <sub>2-3</sub> <0,05

Примечание: Частота встречаемости микроорганизмов рассчитаны на основе анализа данных в период осенне-зимнего<sup>1</sup> и весенне-летнего сезонов<sup>2</sup>; н/о – не определялся; статистическую значимость между группами оценивали по U-критерию Манна-Уитни, p<0,05.

Полученные нами данные о состоянии локальной микробиоты слизистой носа в соответствии с классификацией (Liu С. М. и др., 2015) соответствуют формированию первого типа микробного сообщества (CST1) с доминированием *S. aureus* при развитии АР, в то время как у здоровых лиц формируются микробные сообщества третьего (CST3), четвертого (CST4) или пятого типа (CST5) с преобладанием *S. epidermidis*, *Corynebacterium spp.* соответственно.

В главе 4 отражены результаты исследования, демонстрирующие связь между количественными изменениями микробиоты кожи, слизистых ВДП у больных с АтД и респираторной аллергией и усилением патогенного потенциала *S. aureus*, включая повышение протеолитической активности, а также продукцию широкого спектра экзотоксинов и протеиназ. Изменение защитных свойств эпидермального кожного барьера обусловлено как генетическими факторами, способствующими экспансии *S. aureus*, так и способностью к продукции штаммов, колонизирующих кожу и слизистые оболочки ВДП протеолитических ферментов.

При выполнении работы была разработана методология определения Ig-расщепляющей активности супернатантов КЖ штаммов бактерий *Staphylococcus spp.* Установлено, что выраженная протеолитическая активность выявлялась в 52,0±2,5% – 88,0±3,4% всех выделенных у больных АЗ штаммов *S. aureus*, а встречаемость протеолитически активных штаммов *S. aureus*,

выделенных с кожи здоровых лиц, не превышала  $35,0 \pm 2,7\%$ . Протеолитическая активность среди КОС (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*) с кожи больных АД в стадию ремиссии, была почти в 5 раз меньше, чем среди изолятов *S. aureus*, выделенных от этих пациентов в стадию обострения заболевания. Среди КОС (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*), выделяемых с кожи пациентов, встречаемость протеолитически активных изолятов была почти в 3 раза меньше, чем среди изолятов *S. aureus*, выделенных с кожи здоровых лиц контрольной группы (Рисунок 1).

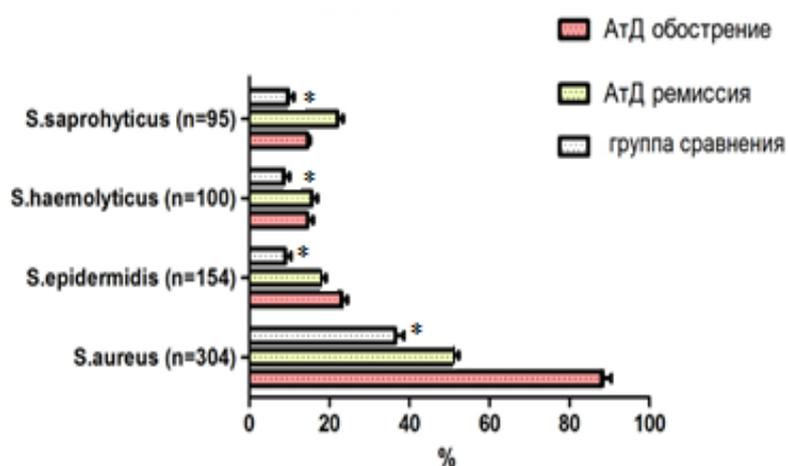


Рисунок 1 – Частота встречаемости протеиназоактивных (Ig-расщепляющих) изолятов штаммов *Staphylococcus spp.* (протеолитическая активность при pH 7,4, субстрат IgG), выделенных с кожи пациентов с АД и здоровых бактерионосителей контрольной группы, где n – количество исследованных штаммов *Staphylococcus spp.* Ошибка ( $m_p$ ) относительной величины частоты встречаемости показана интервалами; \* –  $p < 0,05$

При определении удельной протеолитической активности штаммов нами установлены следующие закономерности: при pH 7,4 Ig-расщепляющая активность у исследованных штаммов снижалась в ряду от вида *S. aureus* → *S. epidermidis* → *S. haemolyticus* → *S. saprophyticus*; иммуноглобулин-расщепляющая активность у кожных штаммов *S. saprophyticus* была в 9,0–10,0 раз ниже, чем у *S. aureus*; иммуноглобулин-расщепляющая активность штаммов, выделенных в стадию обострения АД для видов *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, была в 1,3–2,0 раза выше, чем в стадии ремиссии ( $p < 0,05$ ). Учитывая полученные данные, можно предположить значимое влияние протеиназ заселяющих кожу штаммов *S. aureus*, а также некоторых видов КОС на состояние эпидермального барьера кожи, вызванное воздействием этих ферментов и токсинов.

Исследована также встречаемость Ig-расщепляющей активности у *Staphylococcus spp.*, выделенных со слизистой носоглотки, у бактерионосителей группы сравнения пациентов и

больных АР (Рисунок 2). Установлена видовая дифференциация штаммов по способности расщеплять н IgA человека.

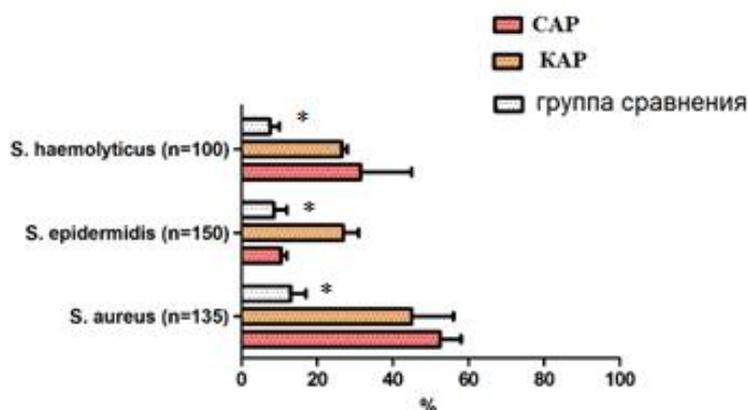


Рисунок 2 – Частота встречаемости протеиназоактивных изолятов штаммов *Staphylococcus spp.* (при pH 7,4, субстрат IgA человека), выделенных с ВДП (носа) пациентов с АР (КАР и САР) и бактерионосителей без АЗ (группа сравнения);  $n$  – общее количество исследованных штаммов. Ошибка ( $m_p$ ) относительной величины частоты встречаемости показана интервалами; \* –  $p < 0,05$

Показано, что более половины ( $52,5 \pm 2,5\%$ ) исследованных назальных изолятов *S. aureus*, выделенных от пациентов с КАР, способны расщеплять IgA человека, тогда как у здоровых лиц группы сравнения (транзиторные бактерионосители) такие изоляты встречались в 4,0 раза реже (не более  $13,0 \pm 2,1\%$ ),  $p < 0,05$ , Рисунок 2. Нами показано, что у пациентов с АР выделяется в 3 раза больше IgA-протеолитически активных изолятов *Staphylococcus spp.*, чем у здоровых бактерионосителей. 70,0–75,0% протеолитической активности КЖ выделенных штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* блокировалось специфическим ингибитором сериновых протеиназ. В экспериментах с лимфоцитами ПК было установлено, что КЖ стафилококков способна воздействовать на те рецепторы лимфоцитов, у которых внеклеточная область молекулы состоит из Ig-подобных доменов (CD4, CD8, CD16) (Таблица 3).

Таблица 3 – Экспрессия кластеров дифференцировки CD3, CD4, CD19, CD8, CD16 на донорских лимфоцитах после инкубации с супернатантами КЖ штаммов *S. aureus*

Супернатанты штаммов КЖ	Экспрессия кластеров дифференцировки на донорских лимфоцитах, в % (M±m)				
	CD3	CD19	CD4	CD8	CD16
	1	2	3	4	5
Эталонный штамм АТСС 29213 (К+)	74,7±0,2	8,7±0,2	2,9±0,4 <sup>b</sup>	3,7±0,6 <sup>b</sup>	5,4±0,3 <sup>a</sup>
Изоляты носа (n=11)	74,40±0,15	8,41±0,10	2,06±0,70 <sup>b</sup>	6,4±0,9 <sup>b</sup>	6,5±0,3 <sup>a</sup>
Изоляты зева (n=12)	74,50±0,24	8,30±0,13	3,07±0,80 <sup>a</sup>	5,4±0,6 <sup>b</sup>	6,5±0,5 <sup>a</sup>
Изоляты кожи (n=12)	74,60±0,23	8,10±0,09	1,02±0,20 <sup>b</sup>	0,60±0,06 <sup>b</sup>	6,6±0,2 <sup>a</sup>
Протеазонеактивные изоляты (n=10)	74,60±0,32	8,2±0,1	13,70±0,16	36,5±0,2	9,10±0,13
Контроль (К-)	75,4±0,5	8,9±0,3	13,1±0,2	35,8±0,2	9,40±0,15

Примечание: (К-) – отрицательный контроль, (К+) – положительный; <sup>a</sup>p<0,05, <sup>b</sup>p<0,01 по сравнению с отрицательным контролем и группой протеазонеактивных изолятов

Протеолитические ферменты КЖ *S. aureus* способны воздействовать и на другие гликопротеины, в частности на CD14 рецепторы на моноцитах и макрофагах (Таблица 4).

При инкубации супернатантов КЖ, полученных при культивировании изолятов *S. aureus*, выделенных с кожи пациентов с АтД, с мононуклеарами ПК регистрировалось достоверное снижение экспрессии CD14 в опытных образцах, по сравнению с контролем.

Таблица 4 – Экспрессия кластеров дифференцировки на мононуклеарах крови (CD14<sup>pos</sup>) человека после инкубации с бесклеточными супернатантами штаммов *S. aureus*, выделенных с кожи

Штаммы	1-й эксперимент		2-й эксперимент	
	Активность (супернатант+ Tris HCl буфер, pH 7,4) (1:1), Усл. ед. × 10 <sup>-5</sup> M(SD)	Экспрессия кластера CD14, в % M(SD)	Активность (супернатант+ Tris HCl буфер, pH 7,4) (1:2), Усл. ед. × 10 <sup>-5</sup> M(SD)	Экспрессия кластера CD14, в % M(SD)
Протеазоактивные штаммы				
<i>S. aureus</i> KZ 12-32 (B 9286)	0,61 (0,05)	70,0(3,0)	0,3(0,05)	40,0(2,7) <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> KZ 12-46(B-9289)	0,68(0,07)	65,0(5,0)	0,3(0,05)	31,5(3,1) <sup>b</sup>

Продолжение Таблицы 4

<i>S. aureus</i> KZ 188 (B-9297)	0,72(0,04)	56,0(4,0)	0,32(0,05)	33,0(3,0) <sup>c</sup>
<i>S. aureus</i> KZ 03 (B-9285)	0,75(0,05)	80,0(5,0)	0,31(0,05)	43,0(3,5) <sup>d</sup>
Протеазонеактивные штаммы				
<i>S. aureus</i> № 43	0	96,7(0,6)*	0	96,0(0,7)**
<i>S. aureus</i> № 44	0	98,6(0,7)*	0	97,5(0,8)**
<i>S. aureus</i> № 28	0	95,8(0,6)*	0	97,0(0,7)**
Контроль отрицательный (К-)	0	98,3(0,7)*	0	99,0(0,8)**

Примечание. К – стерильная питательная среда, МПБ; \* различия статистически значимы по сравнению с протеазоактивными штаммами,  $p < 0,05$ ; \*\* различия статистически значимы по сравнению с протеазоактивными штаммами и отрицательным контролем во 2-м эксперименте,  $p < 0,05$ ,  $t = 2,4$ ; <sup>a,b,c,d</sup> – различия между экспрессией CD14 в 1-м эксперименте и 2-м эксперименте статистически значимы,  $p < 0,01$ ,  $t = 2,45$ .

Протеолитическая модификация стафилококковыми ферментами данного типа рецептора на клетках моноцитарного ряда может подавлять реакции как адаптивного, так и врожденного иммунного ответа слизистых ВДП и кожи, направленные на бактериальные и вирусные антигены. На цитофлюорограммах показано изменение экспрессии рецепторов (CD3, CD19, CD4, CD8, CD16) на лимфоцитах периферической крови после инкубации с протеолитически активным супернатантом КЖ эталонного штамма *S. aureus* ATCC 29213 (положительный контроль), стерильным мясоептонным бульоном (отрицательный контроль) (Рисунок 3).

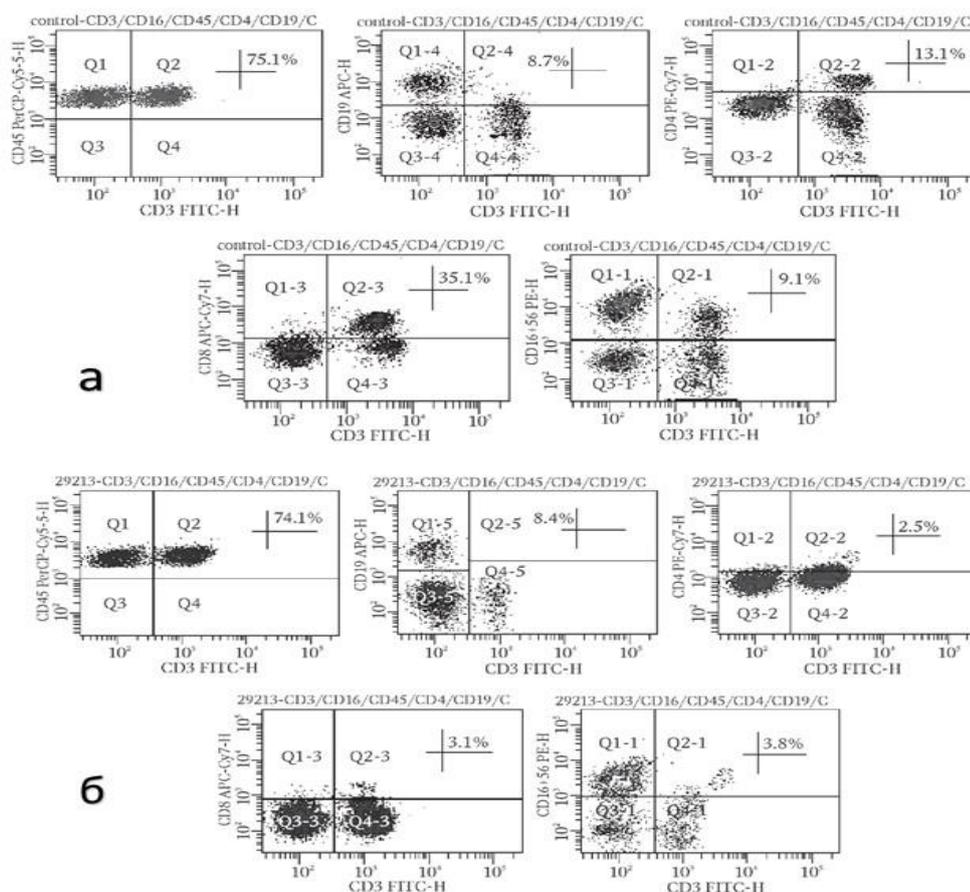


Рисунок 3 – Цитофлюорограмма экспрессии кластеров дифференцировки CD3, CD19, CD4, CD8, CD16 на лимфоцитах ПК человека после инкубации с супернатантом КЖ:

- а) – отрицательный контроль – стерильная жидкая питательная среда (1,5 % пептон);  
 б) – положительный контроль – супернатант питательной среды культивирования *S. aureus* ATCC 29213

*Энтеротоксин-продуцирующая способность S. aureus с кожи и слизистых ВДП у здоровых бактерионосителей и пациентов с АЗ*

Способность образовывать энтеротоксины (*SEA, B, C, D, E*) среди высеянных с кожи детей и подростков с АтД штаммов *S. aureus* проявлялась в среднем в 6,0 раз чаще, а у взрослых больных – в 4,7 раза чаще, чем у штаммов, полученных от лиц группы сравнения (бактерионосители без АЗ), Рисунок 4. Отмечена высокая распространенность продукции энтеротоксинов (*SEA, SEB, SEC, SED, SEE*) среди штаммов *S. aureus*, выделенных со слизистой ВДП у пациентов с АР, где почти каждый пятый изолят продуцировал энтеротоксины (при КАР –  $20,4 \pm 1,5\%$  у детей и подростков; а при САР у взрослых  $18,9 \pm 1,6\%$ ). Необходимо отметить, что энтеротоксины *S. aureus* могут вызывать развитие резистентности к топическим ГКС, которые применяются в терапии АЗ (АтД, АР) (Hauk P. J., et al., 2000).

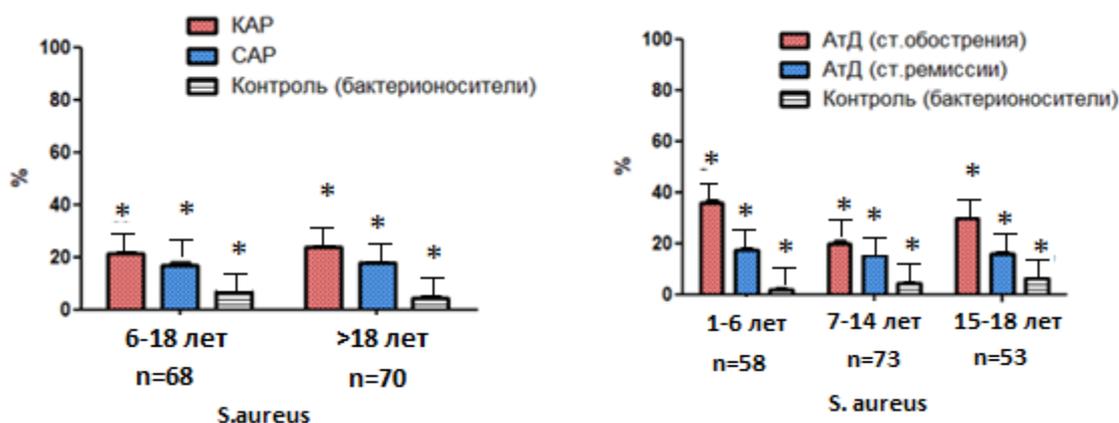


Рисунок 4 – Частота выделения продуцирующих энтеротоксины штаммов *S. aureus*, выделенных от больных разного возраста с АтД и АР

\* – различия между группами пациентов в стадии обострения заболевания и бактерионосителей без аллергической патологии, а также пациентов в стадии ремиссии статистически значимы по t-критерию Стьюдента при применении переменной Фишера,  $p < 0,05$ . Ошибка ( $m_p$ ) относительной величины частоты встречаемости показана интервалами

*Отличия в секретоме штаммов S. aureus, выделенных из состава микробиоты кожи и слизистых ВДП у больных с АтД и АР*

Исследование протеомного профиля белков секретомы штаммов *S. aureus* показало статистически значимые различия (превышение в 3,0 раза и более) экспрессии белков между штаммами, выделенными от пациентов с АЗ, и от бактерионосителей без аллергической патологии. Были установлены различия по следующим группам белков: 1) секретируемые белки: гидролитические ферменты – *SplA*, *SplE*, *SspA*, *Aur*-протеиназы, *Lip*, *Nuc*, трансгликозилаза; 2) токсины: *SSL7*, *SSL5* – суперантиген-подобные токсины, *Hla*, *Hlb* – гемолизины; 3) белки антигены *IsaA* – антиген А стафилококка; 4) белки, связанные с клеточной оболочкой бактериальной клетки: *Efb*, *SdrD*; 5) цитозольные белки бактериальной клетки: ферменты *AdhE* – *Fe*-зависимая ацетальдегидрогеназа, *PurL* лигаза, *ClpB*. Различия в экспрессии этих белков может отражать разный метаболический и патогенный потенциал штаммов *S. aureus*, колонизирующих локальные биотопы кожи и слизистых ВДП бактерионосителей и больных АЗ.

**В главе 5** представлены результаты исследования генетического профиля штаммов *S. aureus*, которые лежат в основе высокого патогенного потенциала у больных с АтД и АР.

Полученные данные продемонстрировали, что встречаемость штаммов, содержащих гены эксфолиативных токсинов, зависела от тяжести АтД: при тяжелом течении АтД –  $25,0 \pm 1,6\%$  изолятов *S. aureus* содержали гены *etb*, *edin-C* токсинов, при среднетяжелом –  $6,5 \pm 1,4\%$ , при легком изоляты *S. aureus* не содержали этих генов, независимо от степени тяжести АтД от

5,0±0,9% до 7,0±0,8% всех выделенных изолятов *S. aureus* содержали ген *etb*, а сами изоляты относились к MRSA штаммам с генотипом *mecA+SCCmec I*. При тестировании изолятов *S. aureus* со слизистой носа (ВДП) от больных с АР штаммов, содержащих гены эксфолиативных токсинов, не выявлено. Таким образом, гены эксфолиативных токсинов были выявлены только у штаммов *S. aureus*, выделяемых с кожи пациентов с АтД.

Гены *aur* (металлзависимая протеиназа – ауреолизин), *sspA* (сериновая протеиназа), *scpA* и *sspB* (тиоловые протеиназы – стафопаины А, В) выявлялись практически у всех тестируемых изолятов (встречаемость составила от 90,0±9,8% до 98,0±8,6%), а значимых различий в частоте встречаемости штаммов, содержащих гены этих протеаз и их комбинаций между изолятами, выделенными от больных АтД и здоровых лиц, не установлено.

При изучении профиля генов этих протеиназ в изолятах *S. aureus*, выделенных со слизистой носа у больных АР, показано, что гены *aur* (металлзависимая протеиназа – ауреолизин), *sspA* (сериновая протеиназа), *scpA* и *sspB* обнаруживались у большей части исследованных изолятов (от 89,0±8,7% до 86,0±5,7%). Значимые различия были выявлены при изучении встречаемости генов *scpA*, *scpB* (кодирующих стафопаины) в назальных штаммах *S. aureus*: так, у пациентов с АР встречаемость штаммов с этим профилем составила 88,0±9,0%, что в 1,5 раза выше, у выделенных от бактерионосителей без АЗ ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, можно констатировать, что гены *aur*, *sspA*, *scpA* и *sspB* встречаются фактически у большей части штаммов *S. aureus*, колонизирующих кожу и слизистые ВДП.

Нами выявлены характерные генотипы, встречающиеся у пациентов с АЗ и, как правило, редко выделяемые от бактерионосителей без АЗ, такие как *aur+sspB+splA*, *splA+splD+*, *splB+splC+splE+splF+*, *splA+splF+splC+splB+*, а также *splE+splD+*. Показано, что гены *spl*-оперона в изолятах *S. aureus* от пациентов с АтД в стадии обострения, встречаются в 2–3 раза чаще, чем в изолятах, выделенных в стадии ремиссии.

Изоляты *S. aureus* с профилем *aur+sspB+splA+* и *splE+splD+* выделялись от пациентов с КАР в 11,6 раз, а при САР – почти в 4,5 раза чаще, чем от бактерионосителей группы сравнения.

*Изучена распространенность генов, кодирующих токсины стафилококка.* Гены лейкоцидинов и TSST-1 токсина были детектированы в геноме изолятов, выделенных как с кожи больных АтД разной степени тяжести, так и со слизистой носа при АР. Показано, что выделение штаммов *S. aureus*, содержащих гены лейкоцидинов, увеличивается в зависимости от тяжести АтД: если при АтД легкой тяжести их выделяется не более 7,0±1,8%, то при среднетяжелой больше в 3,6 раза (до 25,5±3,8%), а при тяжелой – в 5,5 раз (до 39,0±2,8%),  $p < 0,05$ .

При легкой степени тяжести АтД гены PVL лейкоцидина у штаммов *S. aureus* выявлены только в 3,0±0,8% изолятов. Таким образом, при тяжелых формах АтД выявлено больше

штаммов *S. aureus*, содержащих гены лейкоцидинов, с пораженных участков кожи, со слизистой ВДП (носа), а также только у больных с КАР.

Изучено наличие в геноме штаммов *S. aureus* суперантиген-подобных белков (SSL). Основной мишенью которых являются компоненты врожденного и адаптивного иммунного ответа, такие как белки системы комплемента, Fc-рецепторы нейтрофилов, иммуноглобулины и иммунокомпетентные клетки (Ramsland P. A, et al., 2007; Laursen N. S, et al., 2010; Hermans S. J, et al., 2012). Установлено, что при развитии КАР встречаемость штаммов *S. aureus*, содержащих в геноме кластеры или «островки» генов (Рисунки 5 и 6), кодирующих суперантигено-подобные белки (SSL), достоверно выше, чем при САР с меньшей длительностью симптомов заболевания.

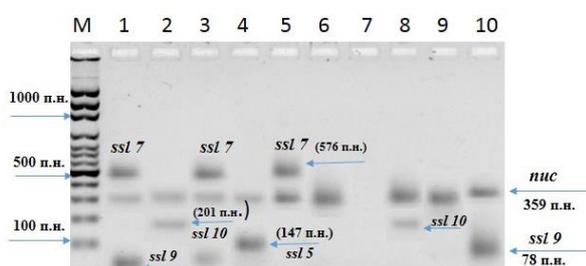


Рисунок 5 – Электрофорез в 2,0% агарозном геле продуктов амплификации М-ПЦР, 1-й этап (фото негатив). **М** – ДНК GelPilot 100 bp Plus Ladder (Qiagen, Германия); дорожки **1, 3** – штаммы *S. aureus*, позитивные на гены *ssl 7* (set1) 576 п.н., *ssl 9* (78 п.н.) при КАР; дорожка **7** – отрицательный контроль ПЦР-смесь; **2** – штаммы *S. aureus* со слизистой ВДП от пациентов с АР, позитивные на ген *ssl 10* (set 4) 201 п.н.; **4** – штаммы *S. aureus* с кожи детей с АтД, позитивные на ген *ssl 5* (set 3) 147 п.н.; **5** – штамм *S. aureus* с кожи при АтД, позитивный на ген *ssl 7* (set1) 576 п.н; дорожка **8** – штамм *S. aureus* с кожи при АтД, позитивный на ген *ssl 10* (set 4) 201 п.н.; **9** – штамм *S. aureus* с кожи здорового бактерионосителя, негативный по генам экзотоксинов; дорожка **10** – штамм *S. aureus* – позитивный по гену *ssl9* (78 п.н.), *nuc* (359 п.н.) ген термонуклеазы, *TNase* (КФ 3.1.31.1) *S. aureus* (контроль качества выделения и специфичности бактериальной ДНК).

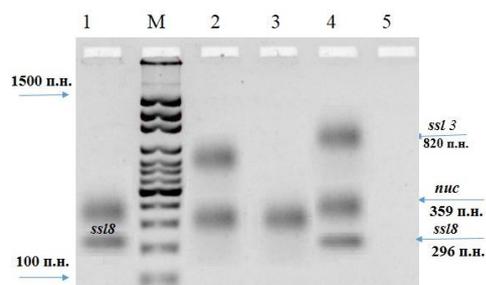


Рисунок 6 – Электрофореза в 2% агарозном геле продуктов амплификации М-ПЦР, 2-й этап (фото негатив). М – ДНК GelPilot 100 bp Plus Ladder (Qiagen, Германия); дорожка 1 – штаммы *S. aureus* со слизистой ВДП от пациентов с КАР, позитивные на гены *ssl 8* (296 п.н.); 5 – отрицательный контроль ПЦР-смесь; а 2 – штаммы *S. aureus* со слизистой ВДП от пациентов с САР, позитивные на ген *ssl 3* (820 п.н.); 3 – штаммы *S. aureus* с кожи, негативные на гены *ssl 3* и *ssl 8*; 4 – штамм *S. aureus* с кожи при АтД, позитивный на гены *ssl 3* (820 п.н) и *ssl 8* (296 п.н.); *nuc* (359 п.н.) ген термонуклеазы, *TNase* (КФ 3.1.31.1) *S. aureus* (контроля качества бактериальной ДНК)

Встречаемость штаммов *S. aureus*, содержащих от 3 до 4 генов SSL при КАР составила  $70,0 \pm 2,5\%$ , тогда как при САР – в 2 раза реже ( $35,0 \pm 2,8\%$ ). При САР нами не выявлено штаммов, содержащих «усеченное» количество генов (2 гена) SSL белков и изолятов, содержащих в своем геноме комбинации генов SSL белков и энтеротоксинов, в отличие от штаммов, выделенных от пациентов с КАР. Только при КАР были выделены изоляты *S. aureus*, в геноме которых были определены комбинации генов SSL в сочетании с геном энтеротоксина А (*sea*), а также гена *tst*; таких штаммов было до  $30,0 \pm 2,9\%$ . Анализ встречаемости генов, кодирующих SSL белки и комбинации этих генов с генами энтеротоксинов у *S. aureus*, выделенных в контрольной группе, показал, что таких штаммов выделяется в зависимости от сезона исследования, что в среднем почти в 5–7 раз меньше, чем у пациентов с респираторной аллергией и в 3–8 раз меньше, чем у пациентов с АтД как в стадии ремиссии, так и в стадии обострения.

*Особенности драфт генома штамма S. aureus KZ 188, выделенного с локального биотопа кожи ребенка при atopическом дерматите*

Полученная сборка драфт генома штамма *S. aureus* KZ 188, выделенного с кожи больного АтД, состояла из 3 977982 п.н. в 76 контигах с ожидаемым охватом 427,56x (по эталону *Staphylococcus aureus* ER02243.3; CP030479.1), N50 – 1408563 п.н., процент G+C составил 32,93% (NCBI GenBank: JAGGIM000000000.1). Аннотация сборки WGS выявила всего 2758 кодирующих последовательностей (CDS), 19 генов рРНК, 59 – тРНК, 4 – нкРНК. Мультилокусное типирование последовательностей полученного генома с использованием

SRST2 v.0.1.4.6 позволило отнести выделенный нами штамм к ST7-типу. Показано, что штаммы *S. aureus* данного сиквенс типа ST7 ответственны за развитие мастита и инфекции кожи, а также могут вызывать инфекционно-воспалительные процессы у сельскохозяйственных молочно-продуктивных животных (Boss R., et al., 2016). Прогнозирование патогенного потенциала с помощью PathogenFinder v.1.1 и VFDB, позволило детектировать гены фибриноген-связывающих белков – *sdrA*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *sdrF* и *sdrG*, факторов адгезии *clfA*, *clfC*, ген *eno* – стрептококковой енолазы, а также ген *tuf* – фактор элонгации микоплазмы. Из протеолитических ферментов в геноме выявлены ген *splA* – протеиназы, из токсинов гены энтеротоксина (*entP*), гемолизинов, лейкоцидинов. Прогнозирование лекарственной устойчивости к антимикробным препаратам, проведенное с помощью ResFinder v.4.1 и RGI v.5.2.0 – pyhdfd78af\_0 против CARD v.3.1.4 определило детерминанты таких генов устойчивости, как *mgrA*, *norA*, *arlRS*, *LmrS*, *mepAR*, компоненты системы эффлюкса *tet*, два гена  $\beta$ -лактамаз – *blaZ*, модификатор-мишени фторхинолона – *parC*. В связи с этим выделенный штамм *S. aureus* KZ 188 можно охарактеризовать как несомненный патогенный вариант с множественной лекарственной устойчивостью, утяжеляющий течение АтД.

В главе 6 представлены результаты исследования по выявлению мутаций (SNP) генов TLR2-, TLR4-рецепторов и гена SPINK5 у больных с АтД и АР.

Нами показано, что распространенность мутаций (SNP) TLR2-рецептора у больных АтД существенно превышала таковую в сравнении с контрольной группой ( $\chi^2=4,9$ ,  $p=0,03$ , ОШ=3,9 95% ДИ (1,0–14,0),  $p<0,05$ ) (Рисунок 7).

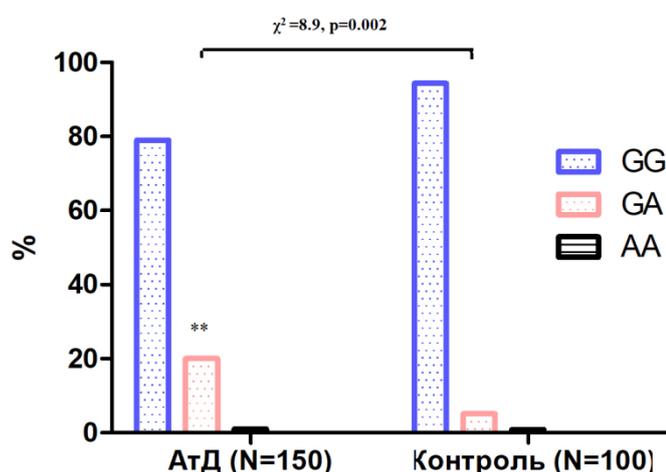
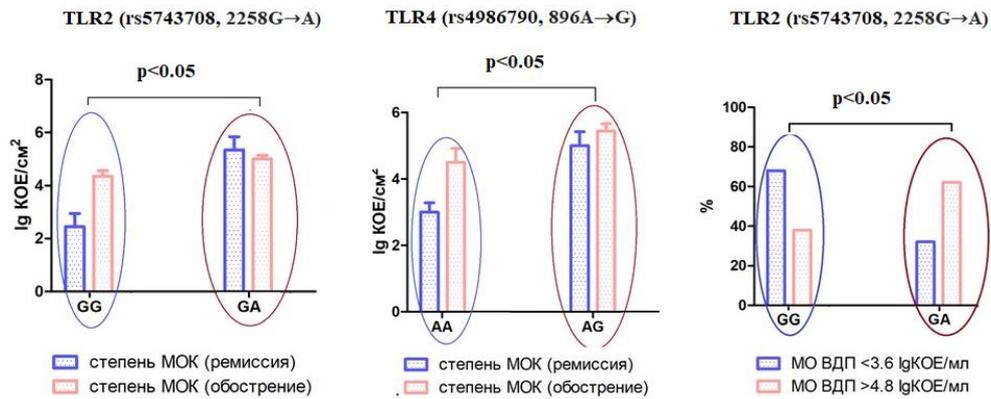


Рисунок 7 – Частоты генотипов полиморфного варианта (rs5743708, 2258G→A, Arg753→Gln) гена TLR2 рецептора у больных АтД и здоровых лиц контрольной группы (контроль)

Кроме того, установлено, что у больных АтД и респираторной аллергией с полиморфизмом (rs5743708, 2258G→A) TLR2-рецептора и генотипом (GA), вне зависимости от возрастной группы, степень микробного обсеменения локальных биотопов кожи и слизистых ВДП *S. aureus* выше, чем у больных с АЗ с генотипом GG ( $p<0,05$ ). Такая же закономерность установлена у больных с АтД с полиморфизмом TLR4-рецептора (rs4986790, 896A→G),  $p<0,05$  (Рисунок 8).



### Атопический дерматит

### Аллергический ринит

Рисунок 8 – Показатели микробной обсемененности кожи (МОК) *S. aureus* у больных АтД с полиморфными генотипами TLR2 (rs 5743708, 2258G→A) и TLR4 (rs 4986790, 896A→G) и распределение генотипов полиморфизма TLR2 (rs5743708, 2258G→A) у больных с АР в зависимости от степени микробной обсемененности ВДП *S. aureus*

При исследовании клинически значимых мутаций гена *SPINK5*, кодирующего белковый лимфоэпителиальный ингибитор сериновых протеаз типа *Kazal-5 (LEKTI)* и участвующего в формировании эпидермального барьера кожи и слизистых, противовоспалительной и антимикробной защите через механизм ингибирования протеиназ эпидермиса и интерлейкин-независимом контроле дифференцировки Th2-лимфоцитов, было показано, что при полиморфном варианте rs2303067 (Glu420→Lys) уровень активности гена *SPINK5* в коже снижается. Наличие гомозиготного генотипа полиморфизма rs2303067 (Glu420→Lys) гена *SPINK5* почти на 40,0% повышает риск выраженной бактериальной колонизации кожи больных АтД штаммами *S. aureus*, тогда как при гетерозиготном генотипе (Glu420→Lys) гена *SPINK5* влияния на выраженность степени обсемененности кожи *S. aureus* у пациентов с АтД не выявлено. Также нами выявлена высокая степень бактериальной обсемененности  $\geq 4,6 \pm 0,6 \text{ Log}_{10} \text{ КОЕ/см}^2$  ( $>10^5 \text{ КОЕ/см}^2$ ) и частоты встречаемости (на 39,1%) штаммов *S. aureus* на определенных

участках кожи у пациентов АтД с полиморфными генотипами GA, AA гена SPINK5, чем отмечена у пациентов с отсутствием в геноме полиморфного аллеля A и генотипом GG.

В группе носителей гетерозиготных полиморфных генотипов генов, кодирующих TLR2- и TLR4-рецепторы, установлены статистически значимые низкие концентрации сывороточного ИФН- $\gamma$  у пациентов с АтД при выраженной колонизации кожи *S. aureus*, по сравнению с группой здоровых лиц. Снижение продукции ИФН- $\gamma$  у больных с АтД оказывает негативное влияние на функцию фагоцитов, что может повышать вероятность инфицирования кожи стафилококками, способствуя развитию тяжелых форм АтД. Наряду со снижением степени микробного обсеменения локальных биотопов кожи у пациентов с АтД с генетическими полиморфизмами TLR2- (rs5743708, Arg753→Gln) и TLR4- (rs4986790, Asp299→Gly) рецепторов выявлены высокие уровни цитокинов иммунного ответа второго типа (ИЛ-4, ИЛ-10). Выявленная дисрегуляция продукции цитокинов у больных АтД с полиморфными гетерозиготными генотипами TLR2- и TLR4-рецептора отражает дисбаланс Th1/Th2/Th17-лимфоцитов в регуляции иммунного ответа, что, во-первых, способствует нарушению состава локальной микробиоты кожи и выявленному нами повышению колонизации ее *S. aureus* и грибами *Candida albicans*, а во-вторых, может утяжелять течение имеющихся атопических заболеваний, а также способствовать расширению спектра сенсибилизации к новым аллергенам.

В главе 7 представлены результаты, отражающие исследования аллергенных свойств продуктов жизнедеятельности штаммов *S. aureus*, колонизирующих ВДП и кожу, которые вызывают IgE-опосредованную сенсибилизацию у больных с респираторными АЗ. В качестве таких продуктов нами исследован один из стафилококковых белков, обладающий функцией сериновых протеиназ и относящийся к т.н. группе *Spl*-протеиназ *S. aureus*, для которых показаны потенциальные аллергенные свойства, т.е. способность индуцировать синтез IgE и продукцию цитокинов иммунного ответа второго типа (Th2-цитокинов), в том числе активированными Т-лимфоцитами здоровых доноров (Stec-Niemczyk J., et al., 2009; Stentzel S., et al., 2017). Данные белки образуются штаммами *S. aureus* в процессе своей жизнедеятельности.

По нашим данным, при тестировании сыворотки крови, полученной от пациентов с респираторной аллергией (КАР и САР), было выявлено специфическое связывание IgE в иммуноблоте с белками секрета *S. aureus*, идентифицированных как *Spl*-протеиназы *S. aureus*.

Для изучения влияния сенсибилизации к *SplA*-протеиназе у больных с респираторной аллергией нами были разработаны и получены генетические конструкции на основе экспрессионной кассеты плазмиды *pASG-IBA23*, позволившей осуществить экспрессию рекомбинантной формы *SplA*-протеиназы *S. aureus* с С-концевой *Strep-tag* меткой в штаммах *E. coli*, гомогенные препараты которой сохранили свою каталитическую активность и были

использованы в тестах с культурой мононуклеаров крови.

Титр специфических IgE к рекомбинантной *rSplA*-протеиназе *S. aureus* при CAP возрастал в 4,3 раза у детей старше 7 лет и взрослых, по сравнению с детьми в возрастной группе до 7 лет. У детей с АР в возрасте от 6 до 7 лет титр IgE к этому белку составил  $2,9 \pm 0,32$  МЕ/мл, а у детей и подростков в возрасте от 8 до 18 лет, а также у взрослых титр возрастал до  $12,4 \pm 0,4$  МЕ/мл, что свидетельствует о значимости этого бактериального белка в сенсibilизации при респираторной аллергии. У пациентов с КАР выявлено постепенное нарастание титров IgE антител к рекомбинантной *rSplA*-протеиназе *S. aureus* с возрастом. У детей 6–7 лет уровень был ниже, чем у детей старше 7 лет и взрослых, и составил в среднем  $5,2 \pm 0,32$  МЕ/мл. У взрослых лиц с этой формой ринита титр IgE в сыворотке крови к данному ферменту составлял  $18,7 \pm 0,42$  МЕ/мл, что свидетельствует о выраженной сенсibilизации к этому бактериальному белку среди пациентов с КАР.

С использованием программного ресурса I-TASSER нами были созданы 3D-модели мономеров аутентичной *SplA*-протеиназы и полученной рекомбинантной *SplA*-протеиназы *S. aureus* с C-концевой Strep-тэг меткой (Рисунок 9).

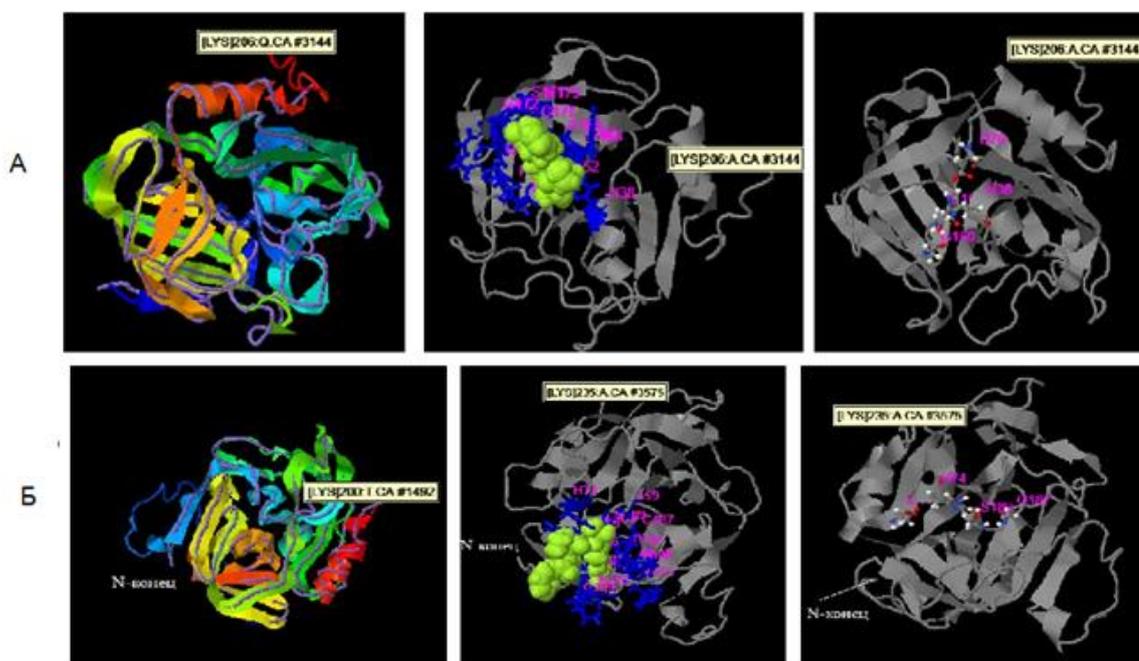


Рисунок 9 – 3D-модели *SplA*-протеиназы *Staphylococcus aureus*: А) рекомбинантная *SplA*-протеиназа (сбалансированная модель, модель с сайтами, связывающими лиганды, и модель с каталитической триадой); Б) аутентичная *SplA*-протеиназа (сбалансированная модель, модель с сайтами, связывающими лиганды, и модель с каталитической триадой).

Модели выполнены с помощью программного ресурса I-TASSER

*Изучение активации базофилов крови термоинактивированной SplA-протеиназой S. aureus по интенсивности экспрессии CD203c на базофилах крови*

В тесте с клетками ПК нами был выявлен дозозависимый эффект рекомбинантной термоинактивированной *SplA*-протеиназы *S. aureus* на экспрессию CD203c на активированных базофилах крови пациентов с аллергическим ринитом и сочетанной формой респираторной аллергии (Рисунок 10).

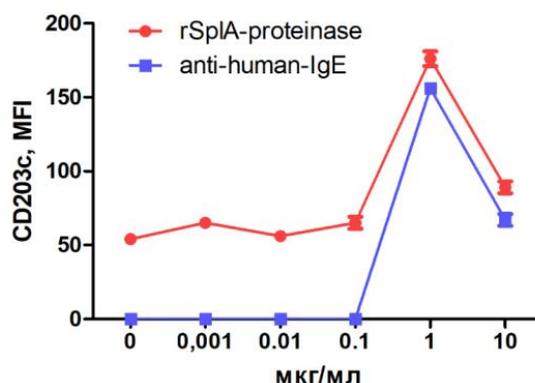


Рисунок 10 – Дозозависимый эффект рекомбинантной термоинактивированной протеиназы *S.aureus* (*rSplA*-протеиназа) на экспрессию CD203c базофилов ПК у пациентов с респираторной аллергией; клетки ПК инкубировали в серии разведений *rSplA*-протеиназы *S.aureus* (с концентрацией от 0,001 мкг/мл до 10 мкг/мл) при 37<sup>0</sup>С в течение 15 минут

У пациентов с АР и сочетанной респираторной аллергией (АР+АБА) воздействие на базофилы ПК рекомбинантной *rSplA*-протеиназой *S. aureus* приводило к значимой активации экспрессии CD203c по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) (Таблица 5).

Таблица 5 – Значение индекса активации CD203c базофилов крови при действии термоинактивированной *rSplA*-протеиназы *S. aureus* у пациентов с респираторной аллергией (АР+АБА)

Группы	Индекс активации базофилов (ИА), M±SD		Уровень IgE к <i>rSplA</i> - протеиназе МЕ/мл (ELISA)
	<i>rSplA</i> -протеиназе	anti-human-IgE	
Аллергический ринит:			
1) САР (n=15)	2,3±0,3*	3,3±0,3	<5,6
2) САР (n=17)	2,4±0,4*	3,1±0,3	5,7 до 7,0
3) САР (n=18)	3,4±0,3* <sup>a</sup>	3,2±0,3	>7,1
4) КАР (n=18)	2,1±0,4* <sup>a</sup>	3,2±0,3	<5,6
5) КАР (n=19)	2,4±0,3* <sup>a</sup>	3,4±0,3	5,7-6,9
6) КАР (n=15)	3,1±0,3* <sup>a</sup>	3,5±0,3	>7,0
Сочетанная респираторная аллергическая патология			
7) КАР+АБА (n=15)	2,3±0,4*	3,1±0,2	<5,6
8) КАР+АБА (n=14)	2,8±0,2* <sup>a</sup>	3,1±0,3	>7,0
9) САР+АБА (n=18)	2,6±0,2*	3,3±0,2	<5,6
10) САР+АБА (n=15)	2,6±0,3*	3,1±0,3	5,7 до 7,0
11) САР+АБА (n=18)	3,1±0,3* <sup>a</sup>	3,2±0,2	>7,0
Контрольная группа (здоровые добровольцы)			
12) Дети 7-8 лет (n=15)	1,1±0,1	3,5±0,4	<0,35
13) Взрослые >18 лет n=16)	1,1±0,1	3,6±0,5	<0,50

Примечание: клетки крови базофилы инкубировали при 37°C в течение 15 минут с *rSplA*-протеиназой (1,0 мкг/мл) и anti-human-IgE (1,0 мкг/мл) в питательной среде и анализировали экспрессию CD203c методом проточной цитофлоуметрии. Индекс активации (ИА) рассчитывали, как отношение MFI<sub>стим</sub> / MFI<sub>контроль</sub>. \* статистическую значимость между группами контроля и пациентов с респираторной аллергией с сенсibilизацией к *rSplA*-proteinase *S. aureus* определяли по U-критерию Манна-Уитни, p<0,05; <sup>a</sup> – статистическую значимость внутри групп (САР, КАР, САР+АБА, КАР+АБА) у пациентов с респираторной аллергией определяли по U-критерию Манна-Уитни, p<0,05

У пациентов с респираторной аллергией (САР, КАР, САР+АБА) с титром IgE к *rSplA*-протеиназе более 7,0 МЕ/мл индекс активации (ИА) базофилов был в 3,0 раза выше, чем у несенсибилизированных здоровых бактерионосителей контрольной группы. Инкубация базофилов с *rSplA*-протеиназой *S. aureus* (1 мкг/мл) приводила к значительной активации CD203c (ИА≥2,0) у всех пациентов с АР и сочетанной респираторной аллергией (АР+АБА) с значимым уровнем IgE (более 5,0 МЕ/мл) к протеиназе по сравнению со здоровыми лицами контрольной группы (бактерионосители) *S. aureus*.

*Изучение цитокинового профиля культур мононуклеаров периферической крови пациентов с АР при активации стимулированных рекомбинантной SplA-протеиназой S. aureus*

В ответ на стимуляцию белком А *S. aureus* культуры МК периферической крови здоровых лиц происходило значимое нарастание продукции Th1/Th17 цитокинов (ИФН- $\gamma$ , ТНФ, ИЛ-17) по сравнению со стимуляцией рекомбинантной *SplA*-протеиназой *S. aureus* (Рисунок 11).

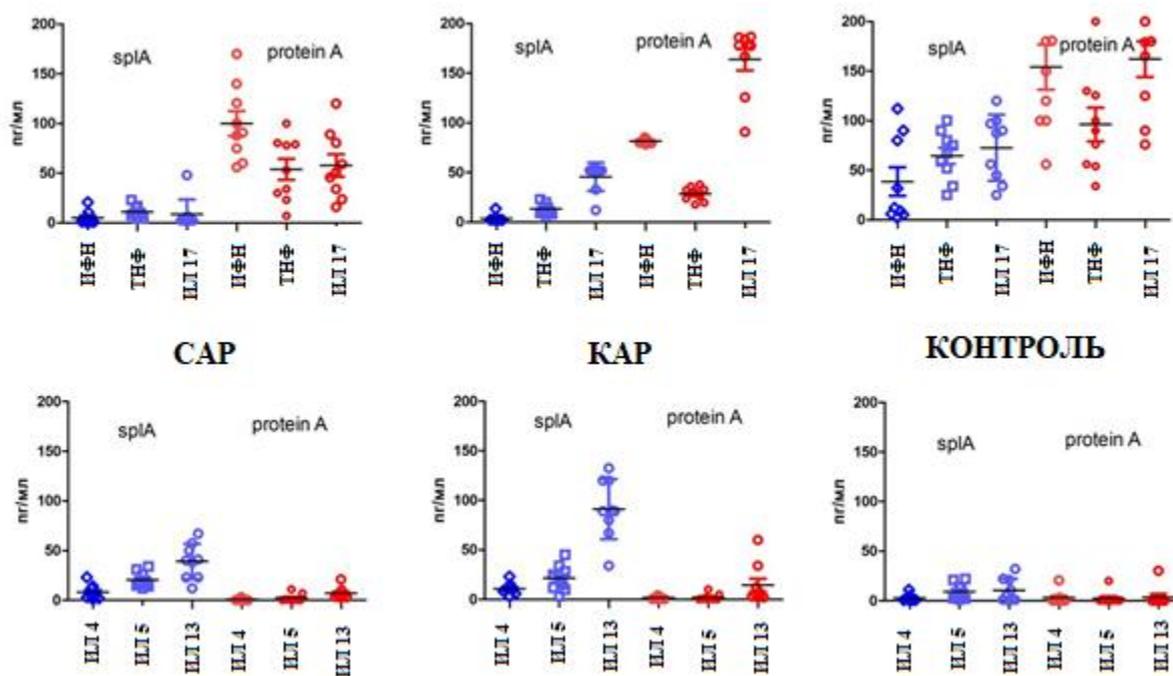


Рисунок 11 – Цитокиновый профиль при стимуляции мононуклеаров ПК *rSplA*-протеиназой и белком А (protein A) *S. aureus*. *Верхний ряд*: профиль цитокинов Th1/Th17-типа (ИФН- $\gamma$ , ТНФ- $\alpha$ , ИЛ-17) при стимуляции мононуклеаров *rSplA*-протеиназой и белком А (protein A) *S. aureus* на 3-и сутки культивирования клеток. *Нижний ряд*: показан профиль цитокинов Th2-типа (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13) при стимуляции мононуклеаров *rSplA*-протеиназой и белком А *S. aureus* на 3-и сутки культивирования клеток; CAP – мононуклеары ПК пациентов с CAP (n=10); CAP – мононуклеары ПК пациентов с CAP (n=10); контроль – мононуклеары ПК здоровых лиц (n=10)

В тесте с культурой МК периферической крови здоровых лиц контрольной группы *rSplA*-протеиназа *S. aureus*, в отличие от белка А *S. aureus*, менее активно стимулировала продукцию Th1/Th17 цитокинов, чем белок А, при этом продукцию Т2-цитокинов (ИЛ-5, ИЛ-13) она активировала более активно. При стимуляции культуры МК периферической крови, полученной от больных с АР, *rSplA*-протеиназой установлена продукция преимущественно Т2-цитокинов

(ИЛ-13, ИЛ-5, ИЛ-4), в отличие от стимуляции этих клеток белком А *S. aureus*. Полученные нами данные подтверждают, что *spl*-протеазы *S. aureus* способны вызывать у больных АР и БА формирование иммунного ответа по Th2 типу и образование *SplA*-специфических IgE, тогда как естественный адаптивный иммунный ответ к известным антигенам стафилококков, в частности к белку А, в основном имеет Th 1/Th17 направленность (Zielinski C., et al., 2012; Kolata J. B., et al., 2015).

При определении сенсibilизации больных детей с АтД с детской формой заболевания или младенческой формой АтД, когда колонизация кожи *S. aureus* высокая, нами были установлены высокие титры специфических IgE к *SspA*-протеиназе *S. aureus*, а также показано, что после назначения противовоспалительной, антимикотической и антимикробной терапии в конце 3-й неделе лечения происходит снижение уровня специфических антител к *SspA*-протеиназе *S. aureus*, что возможно отражает процесс элиминации штаммов *S. aureus*. Так, титр специфических IgE к *SspA*-протеиназе *S. aureus* у детей с младенческой (экссудативной) формой АтД в возрасте до 1 года после 2–3 недель терапии снижался в 2,3 раза (с  $5,7 \pm 0,8$  до  $2,5 \pm 0,84$  МЕ/мл), у детей в возрасте от 1,5 лет до 2,5 лет – в 5,3 раза, в возрастной группе детей 3–5 лет – в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ).

В главе 8 представлены данные исследований по изучению первичной структуры аллергенов *S. aureus* с аллергенами клещей ДП. Результаты показали высокую степень гомологии между бактериальной *SplA* протеиназой *S. aureus* и аллергокомпонентами (Der p 4 или  $\alpha$ -амилаза) из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* и Der f 6 (химотрипсин) *Dermatophagoides farinae*, что может обуславливать формирование перекрестных реакций между ними (Рисунок 11).

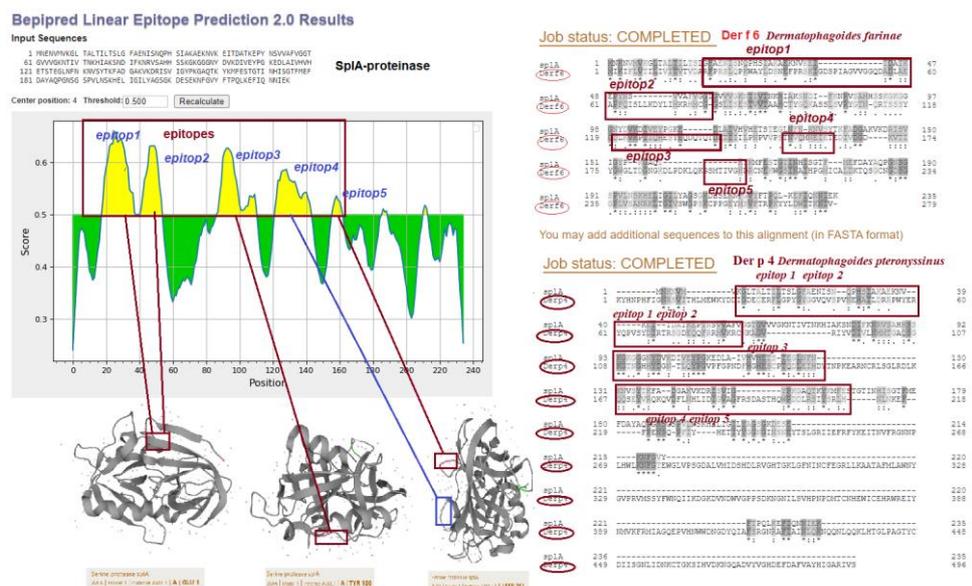


Рисунок 11 – Гомологичные *SplA*-протеиназе *S. aureus* аллергокомпоненты клещей ДП

Нами идентифицированы еще два фермента, имеющие гомологию с *SplA*-протеиназой *S.aureus*, – это сериновая протеиназа из плесневого гриба *Aspergillus flavus* (Asp fl3) и химотрипсин из клеща домашней пыли *Dermatophagoides farinae*, известный как аллерген Der f6. При анализе аллергокомпонентов гомологичных *SspA*-протеиназе *S. aureus* идентифицировано пять значимых аллергенов с высокой степенью гомологии (51,0–68,0%) с этим ферментом *S. aureus*. Необходимо отметить, что в ряду из пяти известных гомологичных аллергокомпонентов большей гомологией с *SspA*-протеиназой *S. aureus* характеризовался Der f 23 из клещей ДП *Dermatophagoides farinae* (перитрофин-подобный протеин). Для аллергена Der p 23 при проведенном нами анализе гомология с *SspA*-протеиназой *S.aureus* составила 56,6%. Из гомологичных *SspA*-протеиназе *S. aureus* пыльцевых аллергенов необходимо отметить мажорный аллерген березы Bet v 1 и аллерген амброзии Amb a 11. Аллерген амброзии Amb a 11 относится к цистеиновым протеиназам и характеризуется 51,0% гомологией с *SspA*-протеиназой *S. aureus* в области, включающей 185 а.о.

### Заключение

Результаты проведенных нами исследований представляют собой новые данные о комплексном характере взаимодействия количественных и качественных изменений локальной микрофлоры и факторов резистентности организма в патогенезе и клинических проявлениях наиболее распространенных аллергических заболеваний, включая атопический дерматит и аллергический ринит. Полученные результаты будут способствовать совершенствованию персонализированной диагностики и терапии больных с атопическим дерматитом и аллергическим ринитом, направленной, наряду с традиционными подходами, на коррекцию изменений локальной микробиоты.

### ВЫВОДЫ

1. У больных аллергическим ринитом и атопическим дерматитом выявлены изменения локальной микробиоты кожи и слизистых верхних дыхательных путей, характеризующиеся увеличением колонизации *S. aureus*, а также снижением комменсальных видов бактерий (коагулаза-отрицательных стафилококков, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus sp.*) и появлением не свойственной этим биотопам сапрофитной микрофлоры (*Bacillus sp.*).

2. Для штаммов *S. aureus*, выделяемых с локальных биотопов кожи и слизистых верхних дыхательных путей у больных с аллергическим ринитом и атопическим дерматитом, характерно появление в геноме «островков патогенности», кодирующих факторы вирулентности (гемолизины, эксфоликативные токсины, энтеротоксины, лейкоцидины, супераниген-подобные

белки (*SSL*) и токсин *EDIN-C*), а также секретируемые протеиназы *spl*- и *scp*-оперона, что проявляется в повышенной продукции *Ig*-расщепляющих протеиназ и токсинов.

3. Особенностью штаммов *S. aureus*, полученных от больных с АЗ, является высокая экспрессия гидролитических ферментов (*SplA*, *SspA*, *Aur*, *Lip*, *Nuc*), суперантиген-подобных белков (*SSL7*, *SSL5*), *SdrD*-белка и гемолизинов (*Hlg*, *Hlb*, *Hla*).

4. У больных с АтД выявлена большая частота встречаемости полиморфного генотипа GA (rs5743708, 2258G→A, Arg753→Gln) TLR2-рецептора по сравнению с группой здоровых лиц без аллергической патологии.

5. Выявленные нами мутации в генах TLR2- и TLR4-рецепторов, а также гена SPINK-5 снижают их способность к участию в реакциях врожденного и адаптивного антибактериального иммунитета, что способствует экспансии *S. aureus* на коже и слизистых у больных с АтД и АР.

6. Мутации в генах TLR2- и TLR4-рецепторов, а также гена SPINK-5 ассоциируются с преобладанием продукции иммунокомпетентными клетками цитокинов Т2-иммунного ответа, что, наряду с неблагоприятным влиянием на течение основного заболевания, может приводить к расширению спектра сенсibilизации, в т.ч. к микробным аллергенам.

7. У больных АтД и АР выявлена сенсibilизация к протеиназам *spl*-оперона, что подтверждается обнаружением специфических IgE к *SplA* в сыворотке крови, стимуляцией базофилов ПК протеиназой, а также продукцией мононуклеарами ПК при стимуляции *SplA* цитокинов преимущественно Th2 профиля (ИЛ-13, ИЛ-5, ИЛ-4).

8. При сравнении первичной структуры протеиназ (*SplA*, *SspA*) *S. aureus* выявлена высокая степень гомологии с аллергенами клещей домашней пыли, пыльцевыми аллергенами, а также аллергенами плесневых грибов (*Aspergillus sp.*), что может приводить к развитию перекрестных реакций.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предложен к применению алгоритм выявления дисбиотических нарушений у больных АтД с включением культуральных, биохимических, масс-спектрометрических и количественных методов исследования микрофлоры участков кожи, получаемой на разных стадиях заболевания и после проведенной топической терапии.

2. При АР предложен к применению алгоритм выявления локального дисбиоза слизистых ВДП с включением культуральных, масс-спектрометрических методов исследования назальной микрофлоры на разных стадиях заболевания, а также после проведения базисной и аллерген-специфической иммунотерапии с целью коррекции выявленных нарушений назальной микрофлоры.

3. Для больных с тяжелым резистентным к терапии АтД и АР с выраженными

показателями бактериальной обсеменённости *S. aureus* предложено проведение скрининга на наличие генетических мутаций (полиморфизмов) в генах TLR2, TLR4 и SPINK5 – для коррекции антимикробной терапии.

4. У больных с АД и АР с подтвержденной колонизацией *S. aureus* с целью оптимизации терапии рекомендовано определять уровень специфических IgE к *SplA*-, *SspA*-протеиназам.

### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тюрин, Ю. А. Роль факторов патогенности *S. aureus* в развитии атопического дерматита / Ю. А. Тюрин, Д. А. Долбин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 4. – С. 105-110.

2. Куликов, С. Н. Хитин и хитиназы при аллергических реакциях / С. Н. Куликов, Ю. А. Тюрин, Д. А. Долбин, Р. С. Фассахов // Российский аллергологический журнал. – 2009. – № 1. – С. 18-23.

3. Патент № 2373538 РФ. Способ определения IgG-протеиназной активности. Тюрин Ю. А., Куликов С. Н., Фассахов Р. С., [и др.]. Опубликовано 20.11.2009, Бюлл. № 32. – 5 с.

4. Тюрин Ю. А. Бактериальные протеазы и устойчивость бактерий к факторам естественного иммунитета человека / Ю. А. Тюрин, И. Г. Мустафин, Р. С. Фассахов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 2. – С. 105-111.

5. Патент № 2426126 РФ. Способ определения IgA-протеиназной активности. Тюрин Ю. А., Фассахов Р. С., Мустафин И. Г., [и др.]. Опубликовано 10.08.2011, Бюлл. № 22. – 6 с.

6. Патент № 2423707 РФ. Способ определения хитиназо-подобного белка YKL-40 в биоптатах и экскретах человека. Куликов С. Н., Тюрин Ю. А., Фассахов Р.С. Опубликовано: 10.07.2011, Бюлл. № 19. – 5 с.

7. Tyurin, Y. Increased production of YKL-40 in the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis / Y. Tyurin, S. Kulikov, E. Sukmanskaya, I. Reshetnikova, R. Fassakhov // Allergy. – 2011. – Vol. 66, Suppl. 94. – P. 482-642.

8. Тюрин, Ю. А. Клинические и бактериологические критерии эффективности препарата «Скин-кап» при местной терапии атопического дерматита / Ю. А. Тюрин, А.Ф. Шамсутдинов, О.Ф. Тюпкина, И.Д. Решетникова и др. // **Практическая медицина**. – 2012. – № 6 (61). – С. 76-78.

9. Тюрин, Ю. А. Хитиназоподобный белок YKL-40 назального секрета как потенциальный биомаркер при персистирующем аллергическом рините / Ю.А. Тюрин, Е.О.

Сукманская, С.Н. Куликов, Р.С. Фассахов // **Российский аллергологический журнал.** – 2012. – № 4. – С. 13-17.

10. **Тюрин, Ю. А.** Действие супернатантов штаммов *Staphylococcus aureus* на поверхностные рецепторы лимфоцитов человека / Ю. А. Тюрин, И. Г. Мустафин, Р. С. Фассахов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2012. – Т. 154. – № 12. – С. 733-736. [Scopus, Wos, Springer]

11. Kulikov S. Novel method for detection allergic biomarker – chitinase-like protein / S. Kulikov, Y. Tyurin, I. Reshetnikova, R. Fassakhov // *Allergy.* – 2012. – Vol. 67, Suppl. 96. – P. 531-531.

12. Fassakhov R. Staphylococcus aureus enterotoxin genes colonising skin of patients with atopic dermatitis / R. Fassakhov, Y. Tyurin, A. Shamsutdinov, L. Bayazitova // *Allergy.* – 2012. – Vol. 67. – Suppl. 96. – P. 436-436

13. **Тюрин, Ю. А.** Содержание эпителиоцитов, экспрессирующих TLR-2, и состояние бактериоценоза слизистой носа при различных формах аллергического ринита / Ю. А. Тюрин, А. А. Шарифуллина, И. Г. Мустафин, Р. С. Фассахов // **Российский аллергологический журнал.** – 2013. – Т. 10. – № 6. – С. 20-24.

14. **Тюрин, Ю. А.** SCCmec-типирование метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных от госпитализированных и амбулаторных пациентов в Казани / Ю. А. Тюрин, Л.Т. Баязитова, О.Ф. Тюпкина, Р.С. Фассахов // **Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.** – 2013. – Т. 15. – № 1. – С. 66-71.

15. **Тюрин, Ю. А.** Особенности мукозального иммунитета и состояния бактериоценоза при различных формах аллергического ринита / Ю. А. Тюрин, Е. И. Шапкина, И. Г. Мустафин, Р. С. Фассахов // **Казанский медицинский журнал.** – 2013. – Т. 94. – № 5. – С. 766-770.

16. **Тюрин, Ю. А.** Действие протеаз клинических изолятов *Candida albicans* на поверхностные рецепторы лимфоцитов человека / Ю. А. Тюрин, Т. В. Григорьева // **Проблемы медицинской микологии.** – 2013. – Т. 15. – № 1. – С. 64-66.

17. Решетникова, И. Д. Вирулентные свойства грибов рода *Candida* у пациентов с персистирующей бронхиальной астмой, длительно применяющих ингаляционные стероиды / И. Д. Решетникова, **Ю. А. Тюрин**, [и др.] // **Пульмонология.** – 2014. – № 3. – С. 73-77.

18. **Tyurin, J. A.** A study of single nucleotide polymorphism fragments of the *aur* gene metalloprotease strains of *Staphylococcus aureus* isolated from the skin of patients with atopic dermatitis / J. A. Tyurin, A. F. Shamsutdinov, R. S. Fassahov // **Molecular Genetics, Microbiology and Virology.** – 2014. – Vol. 29. – P. 4-7. – <https://doi.org/10.3103/S0891416814010078>. [Scopus, Wos]

19. Шамсутдинов, А. Ф. Распространённость мобильных генетических элементов SCC тес-типа у штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных с кожи и слизистых пациентов с аллергической патологией / А. Ф. Шамсутдинов, А. А. Тойменцева, Ю. А. Тюрин, Л. Т. Баязитова // **Гены и Клетки**. – 2014. – Т. 9. – № 3. – С. 284-288. [Scopus]
20. Шамсутдинов, А. Ф. Белковые токсины *Staphylococcus aureus* / А. Ф. Шамсутдинов, Ю. А. Тюрин // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии**. – 2014. – № 2. – С. 113-120.
21. Патент № 2532225 РФ. Способ идентификации генов стафилококковых экзотоксинов, с высокой структурной гомологией с суперантигенами, методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления. Тюрин Ю. А., Фассахов Р. С. Опубликовано 27.10.2014, Бюлл. № 30. – 5 с.
22. Патент № 2510026 РФ. Способ определения протеолитической модификации клеточных рецепторов на модели выделенных лимфоцитов периферической крови. Тюрин Ю. А., Мустафин И. Г., Фассахов Р. С. Опубликовано 20.03.2014, Бюл. № 8. – 6 с.
23. Патент № 2519071 РФ. Высокочувствительный способ определения иммуноглобулин-протеиназной активности с использованием полимерных матриц. Куликов С. Н., Долбин Д. А., Тюрин Ю. А., [и др.]. Опубликовано: 10.06.2014, Бюл. № 16. – 8 с.
24. Тюрин, Ю. А. Масс-спектрометрическая идентификация стафилококковых пептид-гидролаз / Ю. А. Тюрин, Р. З. Хайруллин, И. И. Салафутдинов // **Вестник технологического университета**. – 2015. – Т. 18. – № 16. – С. 287-290.
25. Тюрин, Ю. А. Микробный состав различных участков кожи при развитии атопического дерматита по данным метода MALDI-TOF масс-спектрометрической идентификации / Ю. А. Тюрин, Р. С. Фассахов, Т. В. Григорьева, И. Г. Мустафин // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии**. – 2016. – № 2. – С. 30-36. [Scopus, WoS]
26. Шамсутдинов, А. Ф. Распространённость токсигенных штаммов *Staphylococcus aureus* при атопическом дерматите / А. Ф. Шамсутдинов, Ю. А. Тюрин, Л. Т. Баязитова, [и др.] // **Практическая медицина**. – 2016. – № 3 (95). – С. 68-72.
27. Баязитова, Л. Т. Фенотипические особенности антибиотикорезистентности амбулаторных и госпитальный штаммов *Staphylococcus aureus* / Л. Т. Баязитова, О. Ф. Тюпкина, Т. А. Чазова, Ю. А. Тюрин, [и др.] // **Практическая медицина**. – 2016. – № 5(97). – С. 25-29.
28. Reshetnikova, I. Characteristics of antibiotic resistance nasopharyngeal strains of *Streptococcus pneumoniae* in children suffering from respiratory pathologies / I. Reshetnikova, L. Bayazitova, O. Tupkina, Y. Tyurin, [et al.] // **BioNanoScience**. – 2017. – vol. 7. – P. 182–185. – <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0324-8>. [Scopus, PubMed]

29. **Tyurin, Yu. A.** Association of toll-like cell receptors TLR2 (p.Arg753GLN) and TLR4 (p.Asp299GLY) polymorphisms with indicators of general and local immunity in patients with atopic dermatitis [Электронный ресурс] / Yu. A. Tyurin, A. F. Shamsutdinov, N. N. Kalinin, [et al.] // **Hindawi; J Immunology Research**. – 2017 – Режим доступа: DOI: 10.1155/2017/8493545. Epub 2017 May 16.

30. **Tyurin, Y.A.** Cytokine profile of patients with allergic rhinitis caused by pollen, mite, and microbial allergen sensitization [Электронный ресурс] / Y. A. Tyurin, S. A. Lissovskaya, R. S. Fassahov, [et al.] // **Hindawi; J Immunology Research**. – 2017 – Режим доступа: DOI: 10.1155/2017/3054217. – Epub 2017 Oct 4. [Scopus, PubMed, WoS]

31. Fassakhov, R. Polymorphism of TLR2 and TLR4 cell receptors and cytokine levels in patients with atopic dermatitis / R. Fassakhov, Y. Tjurin, I. Reshetnicova, E. Agafonova, et al. // *Allergy*. – 2017. – Vol. 72 (Suppl. 103). – P. 444-445.

32. **Tyurin, Yu. A.** Nucleotide polymorphism in the iron utilization system gene *isdB* neat domain affects heme binding ability of IsdB protein in various human strains of *Staphylococcus aureus* [электронный ресурс] / Yu. A. Tyurin, S. A. Lysovskaya, S. N. Kulikov, [et al.] // **BioNanoScience**. – 2018. – vol. 8. – P. 390-393. – <https://doi.org/10.1007/s12668-018-0501-z>. [Scopus, PubMed]

33. Тюрин, Ю. А. Клинико-иммунологические особенности пациентов с различными формами аллергических ринитов при сенсибилизации микробными, бытовыми и пыльцевыми аллергенами / Ю. А. Тюрин, И. Д. Решетникова, А. А. Шарифуллина, [и др.] // *Практическая медицина*. – 2018. – Т. 16. – № 6. – С. 211-217.

34. Reshetnikova I. Innate and adaptive immunity cytokines in nasal mucosa and blood serum of allergic rhinitis patients / I. Reshetnikova, Y. Tyurin, S. Kulikov, R. Fassakhov, et al. // *Allergy*. – 2018. – Vol.73, Is. – S 105. – P.772-772.

35. Зарипова, А. З. IgA-протеазная активность клеточных ферментов различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей-бактерионосителей / А. З. Зарипова, Ю. А. Тюрин, Л. Т. Баязитова, [и др.]. // **Инфекция и иммунитет**. – 2019. – Т. 9. – № 5-6. – С. 680-686. – DOI: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-680-686. [Scopus]

36. Тюрин, Ю. А., Микрофлора поражённой кожи у больных атопическим дерматитом с сенсибилизацией к консервативным эпитопам стафилококкового энтеротоксина А (SEA) / Ю. А. Тюрин, Г. Ш. Исаева, Т. В. Григорьева, А. А. Ризванов // *Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения : сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. – Н. Новгород : Ремедиум Приволжье, 2019. – С. 273-276.

37. **Тюрин, Ю. А.** Стимулирующая роль Sp1A-протеиназы *Staphylococcus aureus* в развитии аллергического типа иммунных реакций у бактерионосителей с аллергическим

ринитом / Ю. А. Тюрин, Г. Ш. Исаева, Р. З. Хайруллин, [и др.] // **Астраханский медицинский журнал.** – 2020. – Т. 15. – № 4. – С. 89-97.

38. **База данных** клинико-лабораторных характеристик пациентов с атопическим дерматитом бактерионосителей *Staphylococcus aureus* Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2021623211. / Ю. А. Тюрин; дата гос. регистрации и публикации в реестре баз данных 27.12.2021 г. // Бюл. № 1– 1 с.

39. Баязитова, Л. Т. Эпидемиологические и микробиологические аспекты назофарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae* / Л. Т. Баязитова, А. З. Зарипова, О. Ф. Тюпкина, Т. А. Чазова, **Ю.А. Тюрин**, [и др.] // **Астраханский медицинский журнал.** 2022. – Т. 17. – № 1. – С. 23-29.

40. Тюрин, Ю. А. Роль полиморфизмов (SNP) гена SPINK5 у больных с атопическим дерматитом в экспансии золотистым стафилококком локальных биотопов кожи / Ю. А. Тюрин, Р. С. Фассахов, А. А. Шарифуллина, Р. З. Хайруллин, С. Н. Куликов // Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2022 : сборник материалов конгресса с международным участием (Москва, 27–28 апреля 2022 г.) / – М. : ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. – С. 222-224.

41. Тюрин, Ю. А. Проект генома штамма *Staphylococcus aureus*, ассоциированного с дерматитом и маститом, выделенного с локального биотопа кожи ребенка с отягощённым аллергологическим анамнезом / Ю. А. Тюрин, И. Ю. Васильев, Л. Т. Баязитова, Р. С. Фассахов // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы : сборник трудов XIV Всероссийского конгресса по инфекционным болезням имени академика В. И. Покровского, Москва, 28–30 марта 2022 года. – М. : Медицинское маркетинговое агентство, 2022. – С. 166.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**АЗ** – аллергические (атопические) заболевания

**САР** – сезонный аллергический ринит

**АтД** – атопический дерматит

**КАР** – круглогодичный аллергический ринит

**АБА** – атопическая бронхиальная астма

**АР** – аллергический ринит

**ВДП** – верхние дыхательные пути

**ГКПМ** – государственная коллекция патогенных микроорганизмов п. Оболенск (Россия)

**МК** – клетки мононуклеары крови (моноциты, лимфоциты)

**МРС** – питательная среда для выделения лактобактерий

**ДП** – домашняя пыль

**КЖ** – культуральная жидкость

**ИФА** – иммуноферментный анализ

**ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота

**ДИ** – достоверный интервал значений, при P=95%

**ЖСА** – питательная среда желточно-солевой агар для выделения стафилококков

**ТНФ** – цитокин – тумор некротический фактор

**ИФН** – цитокин – интерферон

**ПК** – периферическая кровь

**ИЛ** – интерлейкин

**ИА** – индекса активации базофилов крови по CD203c

**SNP** – однонуклеотидный полиморфизм

**TLR2** – Толл-подобный рецептор второго типа

**TLR4** – Толл-подобный рецептор четвертого типа

**MFI** – среднее значение интенсивности флуоресценции (Mean Fluorescent Intensity)

**SPINK5** – ген 5 хромосомы человека, кодирующий лимфоэпителиальный ингибитор сериновых протеиназ типа Kazal-5 (LEKTI)