

На правах рукописи



Слюсарева Елена Сергеевна

**Маркеры системного оксидативного и нитрозативного стресса
у детей с атопическим дерматитом**

14.01.08 – Педиатрия

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент

Кудрявцева Ася Валерьевна

доктор медицинских наук, профессор

Дудникова Элеонора Васильевна

Официальные оппоненты:

Ревякина Вера Афанасьевна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологий и безопасности пищи», отделение аллергологии и диетотерапии, заведующий отделением

Деягин Василий Михайлович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт онкологии, радиологии и ядерной медицины, отдел междисциплинарной онкологии, ведущий научный сотрудник; кафедра педиатрии и организации здравоохранения, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «12» сентября 2022г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.09 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119435, Москва, ул. Большая Пироговская, д.19

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. 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 «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук, доцент

Чебышева Светлана Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Атопический дерматит (АтД) – распространенное воспалительное заболевание кожи, часто дебютирующее в раннем возрасте. Рост заболеваемости, рецидивирующее течение, нарушение качества жизни пациентов и членов их семей определяют социальную значимость АтД (Ревякина В.А. и соавт., 2016; Мурашкин Н.Н. и соавт., 2018; Смолкин Ю.С. и соавт., 2020; Кубанов А.А. и соавт., 2021).

В основе патогенеза АтД лежат: генетическая предрасположенность, повреждение эпидермального барьера и комплекс иммунных и биохимических процессов, обеспечивающих реакцию воспаления (Мурашкин Н.Н. и соавт., 2018; Мигачева Н.Б., 2019).

Метаболическая активность организма в норме сопровождается появлением активных форм кислорода (АФК), при АД происходит чрезмерное накопление АФК, развивается окислительный стресс, в условиях которого повреждаются клеточные структуры и дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) (Щелчкова Н.А. и соавт., 2013; Drake D.M. et al., 2019).

Самым окисляемым основанием, в структуре ДНК является гуанин, 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин (8-OHdG) – побочный продукт его повреждения.

Эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS) – фермент, синтезирующий оксид азота (NO) в низких концентрациях и участвующий в процессах репарации кожи (Смирнова И.Ю., 2009).

Работы отечественных (Копытова Т.В. и соавт., 2012; Щелчкова Н.А. и соавт., 2013) и зарубежных авторов (Sivaranjani N. et al., 2013; Indraprasta S. et al., 2017) посвящены роли АФК в патогенезе АтД, однако исследований, отражающих комплексный подход с изучением интегрального показателя окислительного стресса, продуктов повреждения ДНК, полиморфизмов гена eNOS у детей в зависимости от тяжести течения АтД, клинической формы заболевания с целью формирования более полного представления о данной патологии и прогнозирования развития тяжелых форм, в доступной литературе нет, что и определило актуальность настоящего исследования.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на большое количество исследований, посвященных изучению патогенеза заболевания, в настоящее время нет четких представлений о факторах риска формирования клиничко-морфологических форм прогрессирующего течения АтД у детей в возрасте от 1 года до

3-х лет, не выявлены особенности показателей адаптивного и гуморального иммунитета у детей с тяжелым прогрессирующим течением АД данной возрастной группы, не определены изменения показателей окислительного статуса (8-OHdG, циркулирующих биологических перекисей (ЦБП)) у детей этого возраста с различной тяжестью течения атопического дерматита, в зависимости от клинической формы заболевания, также не определены ассоциации распределения аллелей гена eNOS (Glu298Asp (rs1799983), C774T (rs1549758) и T786C (rs2070744)) с формированием определенных клинических форм АД у детей в возрасте с 1 -3 лет; нет разработанной модели прогнозирования прогрессирующего течения АД у детей раннего возраста.

Вышеизложенное позволило нам сформулировать цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования

Оценить роль окислительного и нитрозативного стресса в развитии прогрессирующего течения атопического дерматита у детей раннего возраста.

Задачи исследования

1. Выявить факторы риска формирования клинико-морфологических форм прогрессирующего течения атопического дерматита у детей в возрасте от года до трех лет.
2. Выявить особенности показателей адаптивного клеточного (CD3+/CD45+; CD3+CD4+/CD45+, CD3+CD8+/CD45+; CD19+/CD45+, CD16+56+/CD45+) и гуморального иммунитета (иммуноглобулин А, иммуноглобулин М, иммуноглобулин G, иммуноглобулин Е, циркулирующие иммунные комплексы)) у детей с атопическим дерматитом в возрасте от одного года до трех лет.
3. Оценить изменения показателей окислительного стресса (8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина, циркулирующих биологических перекисей) у детей в возрасте от одного года до трех лет с различной тяжестью течения атопического дерматита в зависимости от клинической формы заболевания.
4. Выявить ассоциации распределения аллелей гена эндотелиальной синтазы оксида азота (Glu298Asp (rs1799983), C774T (rs1549758) и T786C (rs2070744)) с определенной клинической формой атопического дерматита у детей в возрасте от одного года до трех лет.
5. Разработать прогностическую модель прогрессирующего течения атопического дерматита у детей раннего возраста.

Научная новизна

Впервые выявлены изменения уровней ЦБП в виде повышения в периоде обострения, снижения показателя в периоде ремиссии с сохранением более высоких показателей, чем в группе контроля у детей первых трех лет жизни с АтД.

Впервые определено, что эритематозно-сквамозная с лихенизацией (ЭРСЛ) форма АтД характеризуется наиболее высокими показателями ЦБП в периоде обострения, по сравнению с экссудативной (ЭКС) и эритематозно-сквамозной без лихенизации (ЭРС).

Впервые установлено, что дети первых трех лет жизни с ЭКС формой АтД демонстрируют наиболее низкие показатели ЦБП в периоде обострения, по сравнению с ЭРСЛ и ЭРС формами.

Впервые установлена прямая корреляционная связь между количественным содержанием 8-OHdG в сыворотке крови и оценкой выраженности клинических проявлений АтД с помощью индекса SCORAD у детей первых трех лет жизни.

Впервые продемонстрирована ассоциация гомозиготного генотипа CC в локусе -786 гена эндотелиальной синтазы оксида азота с развитием у пациентов хронической формы (ЭРСЛ) АтД.

Впервые проведена оценка риска развития тяжелого течения АтД у детей раннего возраста путем разработанной математической модели, включающей количественное содержание ЦБП, уровень 8-OHdG, иммунореактивный индекс (ИРИ), уровень иммуноглобулина А (IgA) в сыворотке крови и площадь поражения кожных покровов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Среди детей с АтД выделены варианты прогрессирующего течения заболевания на основании клинических проявлений, данных окислительного статуса (ЦБП, 8-OHdG), что позволит усовершенствовать контроль течения заболевания.

Гомозиготный генотип CC в локусе -786 гена eNOS может рассматриваться в качестве маркера риска формирования хронического течения АтД у детей.

Персонифицированная модель прогнозирования клинического течения АтД у детей раннего возраста, может быть использована для определения риска формирования определенного варианта течения заболевания у конкретного пациента.

Методология и методы исследования

Методологическая основа данного исследования спланирована согласно цели и включает последовательное применение методов научного исследования с целью решения поставленных

задач. Объектом исследования явились пациенты с АтД первых трех лет жизни (n=126) и дети группы контроля (n=39). 67 пациентам с АтД в периоде обострения, затем в периоде ремиссии было проведено лабораторное исследование с определением общего клинического анализа крови, проведением иммунологического обследования, определения показателей окислительного статуса. Экстракция ДНК и исследование на полиморфные маркеры в гене eNOS проводилась однократно 59 детям, страдающим АтД и в группе контроля. Сравнение полученных данных было проведено с использованием параметрических и непараметрических методов статистики.

Основные научные положения, выносимые на защиту

1. У детей раннего возраста с АтД в периоде обострения при легком, среднетяжелом и тяжелом течении заболевания установлено достоверное снижение Т-цитотоксических клеток, низкий уровень IgA на фоне гиперпродукции общего иммуноглобулина E (IgE).
2. Показатели окислительного статуса (уровни ЦБП и 8-OHdG) у детей первых трех лет жизни изменяются при различной тяжести течения, клинической форме АтД, что позволяет рассматривать их в качестве критериев оценки и прогнозирования тяжести течения АтД.
3. Статистически значимая ассоциация гомозиготного генотипа CC в локусе -786 гена eNOS может рассматриваться в качестве фактора, повышающего риск развития ЭРСЛ формы АтД.
4. Использование в практической деятельности модели прогнозирования тяжести течения АтД у детей раннего возраста, позволяет определить предположительный вариант течения АтД у конкретного пациента в будущем.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Высокая степень достоверности результатов работы подтверждается репрезентативным объемом выборки, использованием адекватных методов исследования и применением современной математико-статистической обработки полученных данных.

Основные результаты исследования были доложены на научной конференции «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии» (2013), 67-й Итоговой научной конференции молодых ученых (г. Ростов-на-Дону, 2013), научно-практической конференции педиатров Юга России «Актуальные вопросы педиатрии», посвященной 85-летию д.м.н., профессора, Заслуженного врача Российской Федерации Г.В. Хорунжего (г. Ростов-на-Дону, 2014), международной научно-практической конференции «Проблемы медицины в современных условиях» (г. Казань, 2014), IV Съезде АДАИР (г. Москва, 2018), V Московском городском

съезде педиатров "Трудный диагноз в педиатрии (г. Москва, 2019), Конгрессах Европейской Академии аллергологии и клинической иммунологии (г. Лиссабон, Португалия, 2019; г. Краков, Польша 2021), Научно-практической конференции с международным участием «175 лет со дня рождения профессора Н.Ф. Филатова. Храним традиции и развиваем технологии» (г. Москва, 2022), Конференции кафедры детских болезней Сеченовского университета (г. Москва, 2022).

Апробация диссертации состоялась на заседании кафедры детских болезней Клинического института детского здоровья имени Н.Ф. Филатова ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (г. Москва, 12.05.2022, протокол №12).

Внедрение результатов диссертации в практику

Результаты диссертации внедрены в практику диагностической работы пульмонологического отделения Государственного бюджетного учреждения Ростовской области «Областная детская клиническая больница», амбулаторно-поликлинического отделения №4 — «Центр Детского Здоровья» Муниципального бюджетного учреждения здравоохранения «Клинико-диагностический центр «Здоровье» города Ростова-на-Дону»; в учебный процесс кафедры педиатрии и неонатологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе, обобщении и научном обосновании полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: при постановке задач, их реализации, сборе материала, статистической обработке и анализе полученных данных, обсуждении результатов в научных публикациях и докладах и их внедрении в практику.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Тема и научные положения диссертации соответствуют паспорту научных специальностей 14.01.08 – Педиатрия и 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология.

Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования данных специальностей.

Публикации

По результатам исследования автором опубликовано 5 работ, в том числе 3 научных статьи 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 кандидата наук; 1 статья в издании, индексируемом в международной базе Scopus, а также 1 обзорная статья.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Список литературы включает 208 источников, из них 99 отечественных и 109 зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 11 таблицами и 36 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на кафедре детских болезней КИДЗ имени Н.Ф. Филатова ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России. Набор пациентов проводился на клинической базе ГБУ РО «Областная детская клиническая больница» г. Ростова-на-Дону, лабораторные исследования проводились на базе НИИ вакцин и сывороток имени И.М. Мечникова, г. Москва, а также клинико-диагностического центра «Наука» г. Ростова-на-Дону.

В основную группу пациентов с АтД в возрасте до трех лет вошли 126 детей, проживавших в городе Ростове-на-Дону. Группу контроля составили 39 здоровых детей, проживавших в городе Ростове-на-Дону (Рисунок 1). Родителями всех детей подписано информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Критериями включения в группу с АтД были: типичная морфология и локализация кожных высыпаний, зуд, рецидивирующее течение АтД, а также дополнительные клинически

проявления, удовлетворяющие критериям Hanifin – Rajka (1980) для постановки диагноза, возраст ребенка до 3-х лет.

Критериями исключения из группы с АтД являлись: наличие кожных заболеваний, отличных от АтД, в том числе инфекционных, или клинических состояний, способных влиять на течение АтД; перенесенные острые заболевания в течение последних 3 месяцев; наличие сопутствующей патологии со стороны других органов и систем; возраст ребенка старше 3-х лет.

Критериями включения в группу контроля являлись: нормальное физическое развитие; отсутствие острых инфекционных или соматических заболеваний на момент обследования; возраст ребенка до 3-х лет.

Критериями исключения из группы контроля являлись перенесенные острые заболевания в течение последних 3-х месяцев; наличие кожных заболеваний, в том числе АтД; наличие острых заболеваний на момент обследования; наличие иных хронических заболеваний, способных оказывать системное действие на организм; возраст ребенка старше 3-х лет.

На первом этапе исследования в основную группу были включены 67 детей с АтД (Рисунок 1). Первично в периоде обострения пациентам с АтД (n=67) проводили общий анализ крови, исследовали показатели иммунного статуса (уровни основных иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG и IgE), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), иммуноцитогаммы (CD3+/CD45+; CD3+CD4+/CD45+, CD3+CD8+/CD45+; CD19+/CD45+, CD16+56+/CD45+, ИРИ) и окислительного статуса (ЦБП, 8–ОНdG). Повторно в периоде ремиссии пациентам с АтД (n=67) определяли уровни общего IgE и показатели окислительного статуса (ЦБП, 8–ОНdG).

В качестве группы контроля выступали 20 здоровых детей до 3-х лет (Рисунок 1). Детям группы контроля определяли показатели иммунного статуса (уровни основных иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG, IgE), ЦИК, показатели иммуноцитогаммы (CD3+/CD45+; CD3+CD4+/CD45+, CD3+CD8+/CD45+; CD19+/CD45+, CD16+56+/CD45+, ИРИ) и окислительного статуса (ЦБП, 8–ОНdG), исследования проводились однократно.

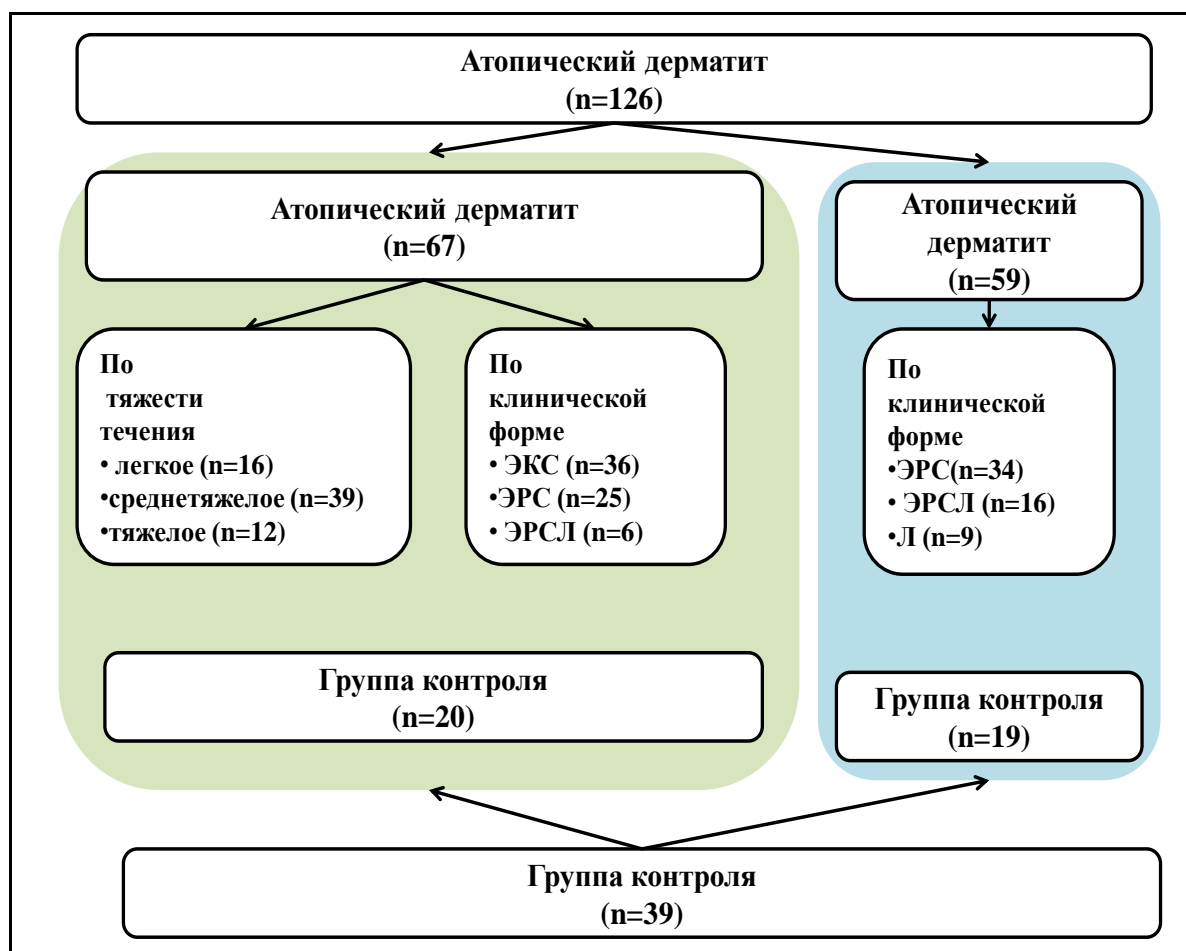


Рисунок 1 – Распределение по группам детей, включенных в исследование

Дети с АтД (n=67) были разделены на группы в зависимости от тяжести течения заболевания на легкое (n=16), среднетяжелое (n=39), тяжелое течение (n=12); в зависимости от клинической формы заболевания на ЭКС (n=36), ЭрС (n=25), ЭрСЛ (n=6) формы (Рисунок 1).

На втором этапе исследования 59 детям с АтД и 19 детям контрольной группы (Рисунок 1) проводили экстракцию ДНК и исследование на полиморфные маркеры (Glu298Asp (rs1799983), C774T (rs1549758) и T786C (rs2070744)) в гене eNOS.

Дети с АтД (n=59) были разделены на группы в зависимости от клинической формы заболевания: на ЭрС (n=34), ЭрСЛ (n=16) и лихеноидную (Л) (n = 9) формы (Рисунок 1).

Клинико-anamnestическая характеристика. Анализ анамнестических данных проводили с использованием индивидуальной регистрационной карты пациента, специально разработанной для исследования, и дополнительных сведений, сообщенных родителями пациентов.

Индивидуальная регистрационная карта пациента включала в себя жалобы на момент осмотра, данные генеалогического анамнеза, аллергоанамнеза, анамнеза заболевания и жизни (течение пре- и постнатального периодов развития ребенка), длительность и частоту обострений,

длительность ремиссий, характер вскармливания ребенка на первом году жизни, информацию о перенесенных заболеваниях, травмах и операциях.

Объективное обследование осуществлялось по общепринятой методике. При постановке диагноза АТД опирались на диагностические критерии J. Hanifin и G. Rajka (1980). Тяжесть течения АТД определяли в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению атопического дерматита, 2020. Тяжесть обострения оценивали с помощью индекса SCORAD. АТД легкой степени тяжести соответствовал значению SCORAD < 25. АТД средней степени тяжести соответствовал значению SCORAD от 25 до 50. Тяжелое течение АТД соответствовало значению SCORAD > 50.

В зависимости от клинико-морфологической формы АТД дети были разделены на следующие группы: больные с экссудативной, эритематосквамозной, эритематосквамозной с лихенизацией и лихеноидной формами заболевания.

Иммунологическое обследование. Иммунофенотипирование крови было проведено по следующим параметрам: Т-лимфоциты (общие) (CD3+/CD45+); субпопуляции Т-лимфоцитов: Т-хелперы (CD3+CD4+/CD45+), Т-цитотоксические клетки (CD3+CD8+/CD45+); В-лимфоциты (CD19+/CD45+), NK-клетки (CD16+56+/CD45+). Исследование выполнено на проточном цитофлуориметре BDFACS Callibur (Becton Dickinson, США).

Сбор и анализ данных проводили с помощью программы Multiset. Работа прибора основана на принципе проточной цитометрии. Клеточная суспензия, предварительная меченная флуоресцентными красителями (или флуоресцирующими моноклональными антителами, попадала в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку). Условия были подобраны таким образом, что клетки выстраивались друг за другом за счет гидродинамического фокусирования струя в струе. В момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксировали: прямое светорассеяние (используется для определения размеров клеток); боковое светорассеяние (позволяет судить о неоднородности и гранулярности клеток); интенсивность флуоресценции по 3-м каналам флуоресценции.

Количественное определение содержания секреторного иммуноглобулина А, М, G, Е в сыворотке крови проводилось с использованием «сендвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов: «IgA секреторный – ИФА – БЕСТ» (Россия), «IgM общий – ИФА – БЕСТ» (Россия), «IgG общий – ИФА – БЕСТ» (Россия), «IgE общий – ИФА – БЕСТ» (Россия).

Исследование показателей окислительного статуса. Для количественного определения ЦБП в образцах с этилендиаминтетрауксусной кислотой - сыворотки колориметрическим методом в микропланшетном формате использовали набор Biomedica OxyStat (Австрия) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию ЦБП определяли с использованием

реакции биологической перекиси с пероксидазой. Затем в ячейки вносили ферментный тетраметилбензидиновый субстрат. Интенсивность развившейся окраски, после добавления стоп-раствора, измеряли фотометрически с помощью микропланшетного ридера при 450 нм. Калибратор использовали для расчета концентрации ЦБП в образце (калибровка по одной точке). Разница между значениями, полученными при 1-м и при 2-м измерениях пропорциональна концентрации ЦБП в образцах.

Специфическое определение и измерение уровня 8-OHdG в сыворотке крови в работе проводили методом «конкурентного» иммуноферментного анализа на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Alisei» (Италия) с помощью набора Assay Designs' DNA Damage ELISA в соответствии с инструкциями производителя. Принцип метода основан на быстром и чувствительном «конкурентном» иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения 8-OHdG в образцах сыворотки крови. В методе Assay Designs' DNA Damage ELISA использовались моноклональные антитела к 8-OHdG, для связывания на конкурентной основе с 8-OHdG из образца, стандарта, или предварительно нанесенного в лунки 96 - луночного планшета. Анти-8-OHdG, связавшиеся с 8-OHdG образца или стандарта, удалялись при промывке, тогда как антитела, захваченные иммобилизованным 8-OHdG выявлялись вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. В методе использовался тетраметилбензидиновый субстрат, и абсорбция измерялась на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм. Интенсивность желтого окрашивания была обратно пропорциональна концентрации 8-OHdG. Для определения концентраций 8-OHdG, использовали таблицу расчета результатов на веб-странице: <http://www.assaydesigns.com/> (с помощью MS Excel) в соответствии с указаниями и инструкциями на странице.

Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты и исследование на полиморфные маркеры (Glu298Asp (rs1799983), C774T (rs1549758), T786C (rs2070744)) в гене эндотелиальной синтазы оксида азота. Для экстракции ДНК был использован комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «Ампли Прайм РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ). Далее полученный материал был исследован на следующие полиморфные маркеры: Glu298Asp (rs1799983), C774T (rs1549758) и T786C (rs2070744) в гене eNOS. Анализ полиморфных маркеров осуществлялся методом полимеразной цепной реакции в реальном времени при помощи соответствующих коммерческих наборов фирмы Синтол (РФ) и амплификаторов DТprime 4 и DТprime 5 (ДНК технология, РФ). В качестве материала для исследования использовали венозную кровь или соскобы со слизистой оболочки ротоглотки.

Статистические методы анализа. Нормальность распределения оценивали на основании критерия Колмогорова-Смирнова при $n > 50$ и Шапиро-Вилка при $n < 50$, а также данных эксцессов

и асимметрии. Количественные показатели были представлены в виде выборочного среднего и среднеквадратичного отклонения при нормальном распределении, при распределении, отличном от нормального данные были представлены в виде медианы и квартилей. Достоверность различий средних величин независимых выборок оценивали с критерия Стьюдента, Манна-Уитни, Краскелла-Уоллиса. При проверке гипотез на различия средних в периоде обострения и ремиссии использовали параметрический критерий Стьюдента и непараметрический критерий Вилкоксона. Статистическое сравнение долей с оценкой достоверности различий выполняли с использованием критерия Пирсона χ^2 и Фишера. Критический уровень значимости принимался равным 0,05. Оценка взаимосвязей между различными показателями осуществлялась с помощью корреляционного и дисперсионного анализа. Многофакторную модель строили на основе метода множественной регрессии с учетом доверительного интервала 95%. Диагностическую значимость модели оценивали по критерию F и доверительной вероятности.

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoftInc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0), программы Microsoft Excel пакета Microsoft Office 2010, R (версия 3.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Стремясь реализовать комплексный подход к исследованию, мы изучали клинические особенности течения АтД и особенности иммунного статуса, интегрального показателя окислительного стресса, продуктов повреждения ДНК, полиморфизмов гена eNOS у детей в зависимости от тяжести течения, клинической формы АтД с целью формирования более полного представления о данной патологии и прогнозирования развития тяжелых форм заболевания.

Для реализации цели и задач исследования были отобраны 126 пациентов от 1 года до 3-х лет с АтД и 39 здоровых детей, составивших контрольную группу, проживающих в г. Ростове-на-Дону.

Для анализа клинико-anamnestических данных, дети с АтД (n=126) были разделены на группы по тяжести течения: легкое (n=32; 25%), среднетяжелое (n=61; 49%), тяжелое (n=33; 26%) и в зависимости от клинической формы заболевания: ЭКС (n=36; 29%), ЭРС (n=59; 47%), ЭРСЛ (n=22; 17%), Л (n=9; 7%).

Тяжелое течение АтД было представлено преимущественно пациентами с ЭРСЛ формой (40%, n=13; p= <0,0001). Дети с ЭРСЛ и Л формами АтД демонстрировали наибольшие значения индекса SCORAD (56 [38,25;71] баллов, 56 [38,22; 72] баллов; p <0,0001) и в их составе преобладали пациенты с частыми обострениями 59% (n=13) (p <0,0001). Дети с редкими обострениями при ЭРСЛ форме были представлены в меньшинстве 9% (n=2), а при Л отсутствовали (p <0,0001). Перечисленные данные являются подтверждением тяжелого

прогрессирующего характера течения заболевания в группах с ЭРСЛ и Л формами АтД (Рисунок 2).

Наследственная отягощенность по материнской линии (61%; n=20) и со стороны сиблингов 42% (n=14) встречалась существенно чаще у детей с тяжелым и среднетяжелым течением, относительно легкого ($p=0,001$; $p=0,026$). Дубровина Л.Н. и соавт. (2009) в своих исследованиях отмечали связь отягощенности наследственного аллергоанамнеза и тяжести течения АтД у детей, при этом в их работах не отмечалось лидирующей роли материнского аллергоанамнеза. Мы не наблюдали статистически достоверного влияния, отягощенного аллергоанамнеза у обоих родителей на тяжесть течения АтД у детей ($p=0,08$).

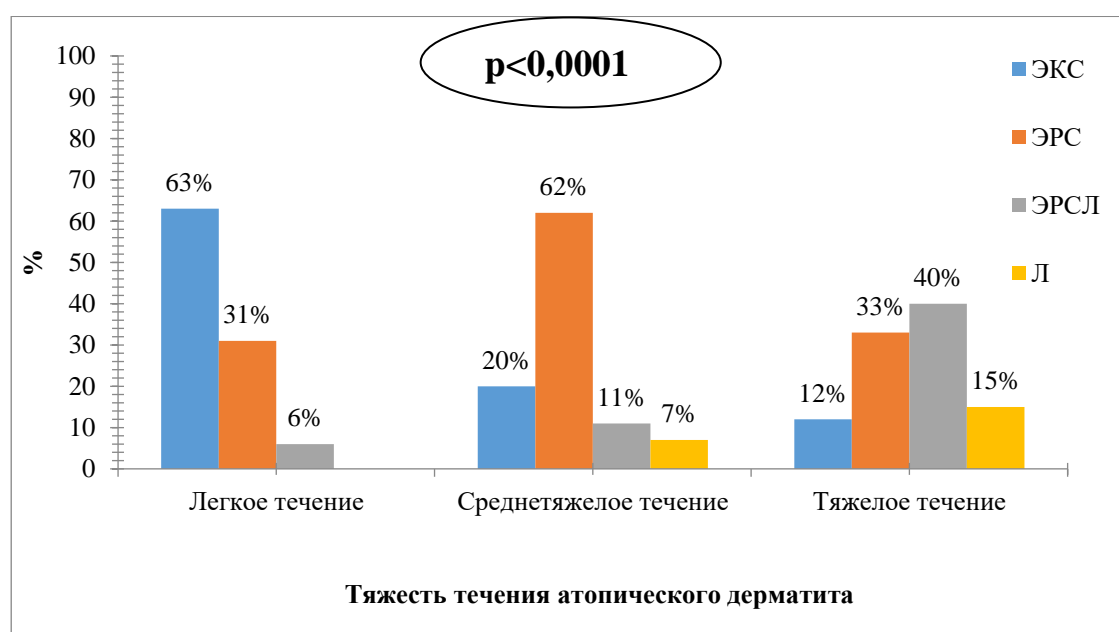


Рисунок 2 – Особенности распределения больных с различными клиническими формами атопического дерматита в зависимости от тяжести течения заболевания

Доля матерей (49%; n=16), имеющих бытовые вредности (такие, как сырость, плесень в помещении; использование лакокрасочных покрытий; использование агрессивной бытовой химии без средств защиты) во время беременности была значительно выше в группе детей с тяжелым течением АтД, по сравнению с детьми с легким и среднетяжелым течением болезни ($p=0,007$). Эрднеева Н.В., Даутов Ф.Ф. (2012) в своих работах также отмечали, что у матерей, имеющих подобные вредности дети раньше дебютировали симптомами АтД и заболевание протекало тяжелее, чем у сверстников без влияния на течение болезни указанных факторов.

У детей с тяжелым течением АтД достоверно чаще, чем при среднетяжелом и легком течении заболевания в семье отмечалось курение со стороны матери ($p=0,003$), отца ($p=0,003$), или сочетание вредной привычки у обоих родителей ($p=0,002$). Вострикова С.А. и соавт. (2020) также наблюдали, что среди детей с тяжелым течением АтД показатель курения в семьях был

значительно выше, чем у детей группы сравнения. Связи между курением родителей, воздействием бытовых вредностей и формированием клинических форм АтД у детей нам проследить не удалось ($p=0,66$; $p=0,14$).

В нашем исследовании не наблюдалось статистически достоверной связи способа родоразрешения матерей и развития тяжелого течения или определенной клинической формы АтД у детей ($p=0,42$, $p=0,12$), в то время, как данные литературы свидетельствуют о роли оперативного родоразрешения в качестве фактора риска развития пищевой аллергии в раннем детском возрасте, предположительно, из-за отсутствия воздействия на эпителиальные барьеры сапрофитных вагинальных и перианальных бактерий.

Пациенты с тяжелым течением демонстрировали первые симптомы АтД достоверно раньше, чем при легком и среднетяжелом течении - большинство - в первые четыре месяца жизни ($p < 0,0001$) (Рисунок 3).

Ранний дебют был характерен для детей с ЭРСЛ (82%; $n=18$) и Л формой заболевания достоверно чаще, чем для ЭКС формы (12%; $n=8$) ($p < 0,0001$). Файзуллина Р.М. и соавт. (2020) также показали в своих работах увеличение риска тяжелого течения заболевания у детей с ранней манифестацией симптомов АтД.

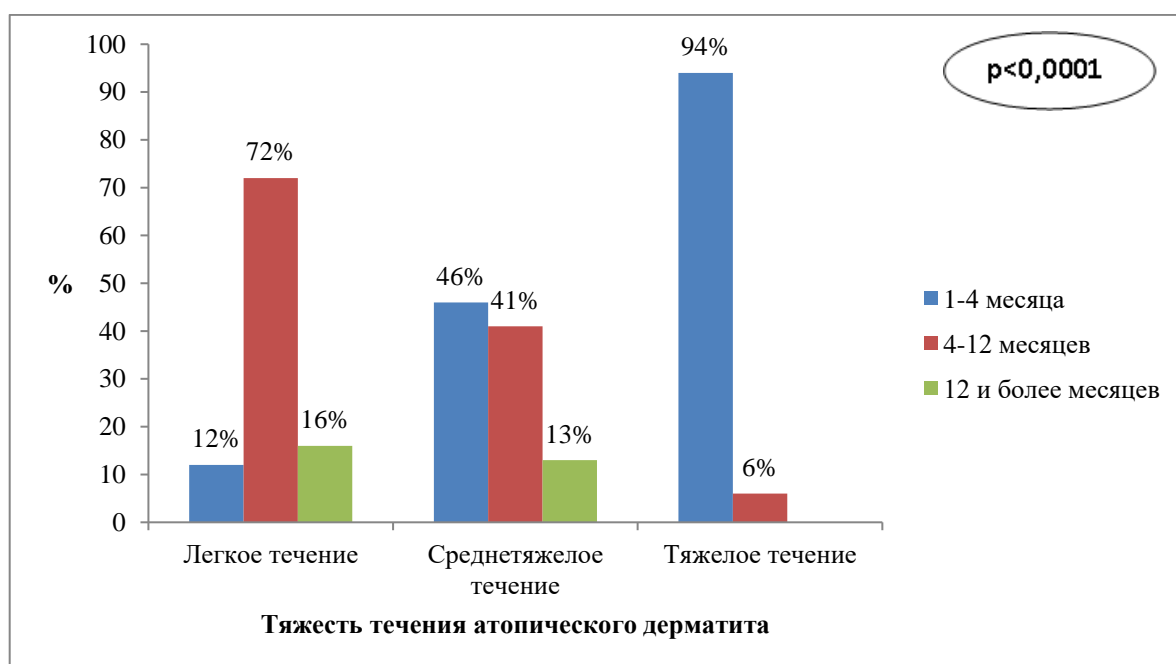


Рисунок 3 – Сроки дебюта атопического дерматита у детей с различной тяжестью заболевания

На момент дебюта АтД большинство детей, вне зависимости от тяжести течения болезни, получали материнское молоко ($p=0,56$). В группах с легким и среднетяжелым течением АтД большинство детей (66% ($n=21$) и 56% ($n=34$)) получали молоко матери более года ($p < 0,0001$).

В группе с тяжелым течением заболевания длительность грудного вскармливания (ГВ) была существенно ниже, чем при легком и среднетяжелом течении и составляла в 79% (n= 26) наблюдений 4—6 месяцев, в 15% (n=5) 0-3 месяца ($p < 0,0001$). Закономерность такой картины можно объяснить протективными свойствами ГВ относительно развития тяжелых вариантов АтД.

Среди причин дебюта у детей с тяжелым течением АтД ведущую роль играло употребление в пищу матерью облигатных аллергенов (82%, n = 27) ($p < 0,0001$), только у 5 женщин данная ситуация явилась причиной отказа от ГВ в пользу кормления ребенка лечебной молочной смесью. Матерям детей с АтД, находящихся на ГВ можно сохранять кормление грудью путем исключения из рациона матери причинно значимых аллергенов (Nuzzi G. et al., 2021).

Уровень образования родителей не оказывал существенного влияния на тяжесть течения АтД у детей ($p = 0,297$, $p = 0,396$).

В результате анализа данных, в соответствии с поставленной задачей, мы выявили факторы риска формирования клинико-морфологических форм прогрессирующего течения АтД у детей в возрасте от 1—3 лет. В число факторов риска вошли: отягощенный аллергоанамнез со стороны матери, сиблингов, влияние бытовых вредностей во время беременности, курение родителей ребенка, ранний дебют заболевания (в первые 4 месяца жизни), небольшая продолжительность ГВ (первые 4—6 месяцев жизни).

67 детям с АтД в периоде обострения заболевания проводили исследование показателей иммунного статуса, включающего в себя определение уровней основных иммуноглобулинов (IgA, IgM, иммуноглобулинов G (IgG), IgE), ЦИК, иммуноцитограмму (CD3+/CD45+; CD3+CD4+/CD45+, CD3+CD8+/CD45+; CD19+/CD45+, CD16+56+/CD45+), ИРИ.

В качестве группы контроля выступали 20 здоровых детей 1-3-х лет. Детям группы контроля определение показателей иммунного статуса (уровни основных иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG, IgE), ЦИК, иммуноцитограмма (CD3+/CD45+; CD3+CD4+/CD45+, CD3+CD8+/CD45+; CD19+/CD45+, CD16+56+/CD45+, ИРИ) проводили однократно.

Дети с АтД (n=67) были разделены на группы в зависимости от тяжести течения заболевания (легкое (n=16), среднетяжелое (n=39), тяжелое течение (n=12)) и в зависимости от клинической формы заболевания на ЭКС (n=36), ЭпС (n=25), ЭпСЛ (n=6).

Исследование показателей иммунологического профиля показало, что у детей с различными клиническими формами и различной тяжестью течения АтД наблюдался общий вектор изменений в виде снижения Т-цитотоксических клеток, изменения показателей гуморального звена иммунитета в виде снижения IgA и гиперпродукции IgE.

При этом, в отличие от более легких вариантов течения АтД, при прогрессировании болезни отмечалось повышение абсолютного числа лейкоцитов, снижение уровня лимфоцитов и

изменение соотношения Т-хелперов/Т-цитотоксических клеток, влекущее за собой повышение ИРИ.

Данные литературы в большинстве своем не показывали стандартной картины изменения показателей иммунного статуса при АтД, но прослеживалась общая тенденция, в траекторию которой вписывались результаты, полученные при нашем исследовании (Жигачева И.В., Васильева С.В., 2018; Дементьева Е.А. и соавт., 2019; Мамедова С.М., 2019).

При оценке показателей окислительного стресса у детей с 1-3 лет с АтД было выявлено резкое повышение концентрации ЦБП в периоде обострения при среднетяжелом и тяжелом течении АтД ($p = <0,0001$; $p=0,003$). В периоде ремиссии показатели снижались, стремясь к нормальным значениям, но все же оставались на более высоком уровне, чем в группе контроля ($p=0,0005$; $p=0,003$) (Рисунок 4).

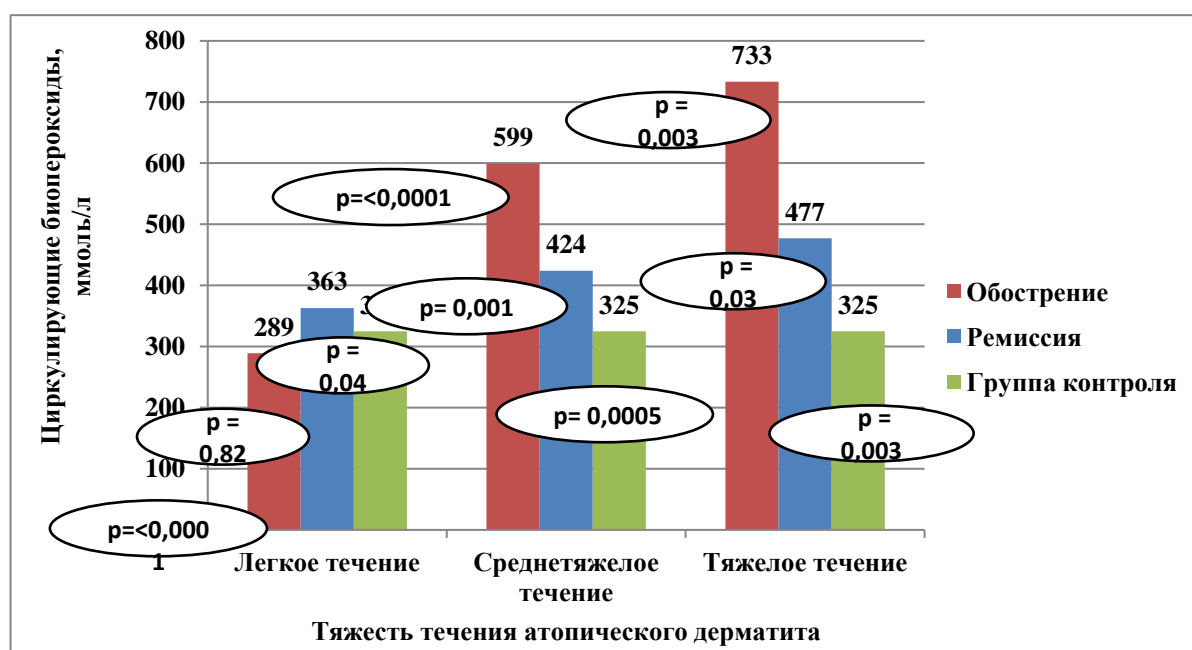


Рисунок 4 – Динамика изменений циркулирующих биопероксидов у детей с атопическим дерматитом в зависимости от тяжести заболевания

Концентрация ЦБП отличалась в зависимости от клинической формы болезни в периоде обострения, при этом ЭРСЛ вариант течения АтД характеризовался наибольшими показателями окислительного стресса, а ЭКС форма – наименьшими ($p=0,02$) (Рисунок 5).

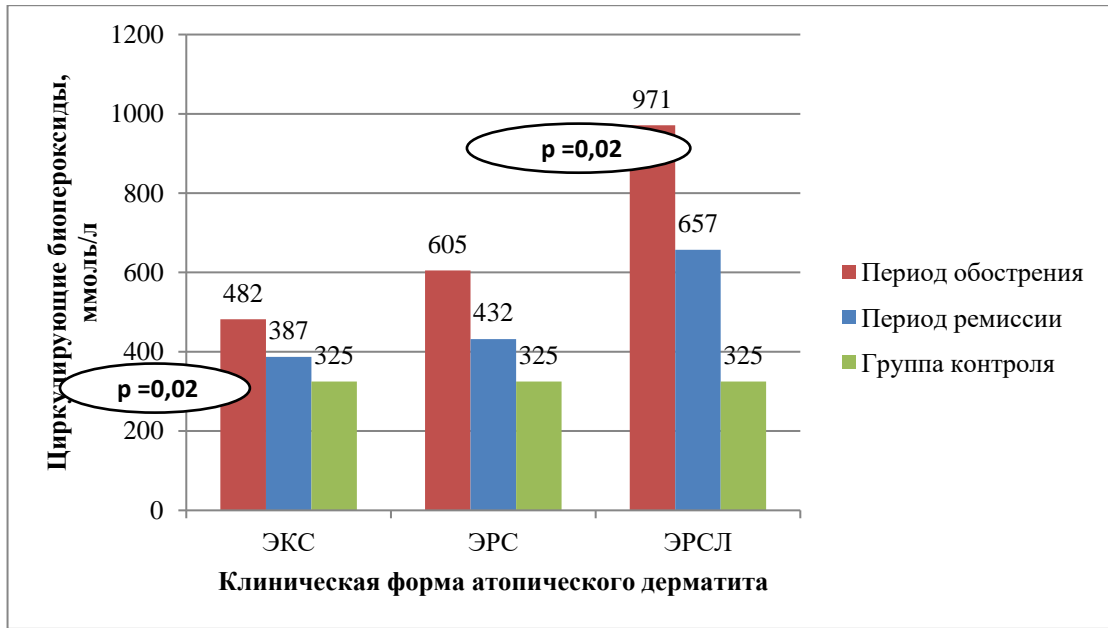


Рисунок 5 – Динамика изменений циркулирующих биопероксидов у детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинической формы заболевания

Уровни 8-OHdG, изменялись, находясь в зависимости от интенсивности клинических проявлений, оцененных с помощью индекса SCORAD ($r=0,63$; $p=0,0001$) и оставались ниже контрольных значений при любой тяжести течения заболевания (Рисунок 6, Рисунок 7).

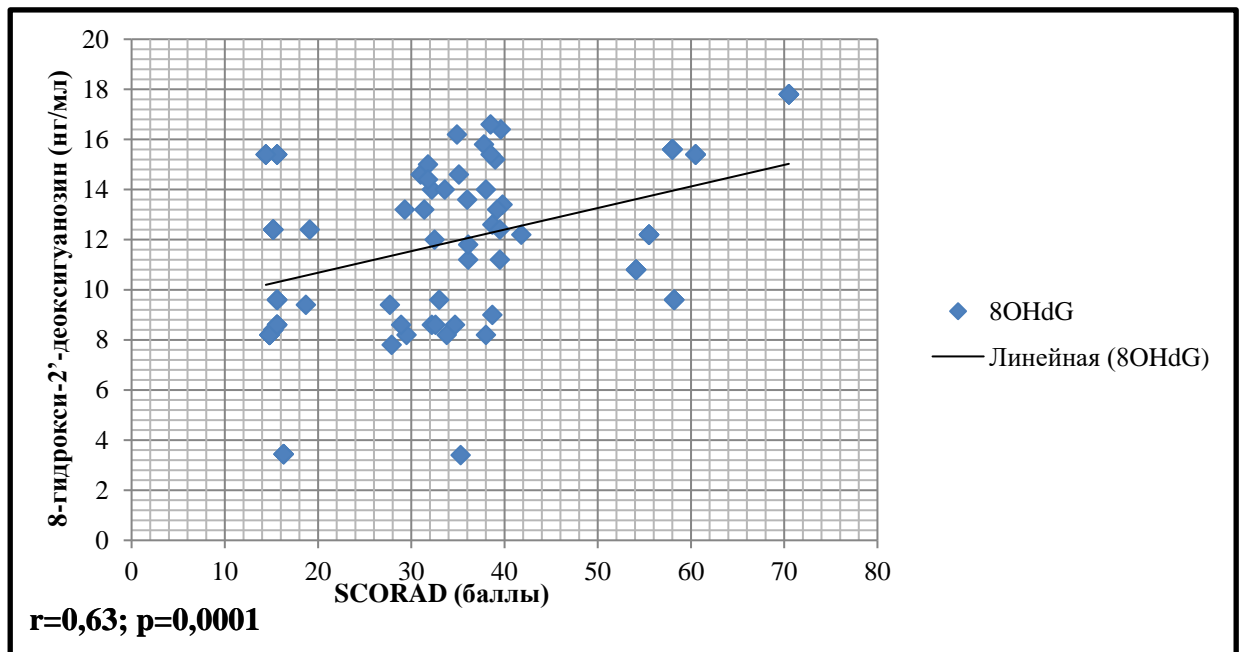


Рисунок 6 – Связь между количественным содержанием 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина в сыворотке крови у детей с атопическим дерматитом и тяжестью заболевания

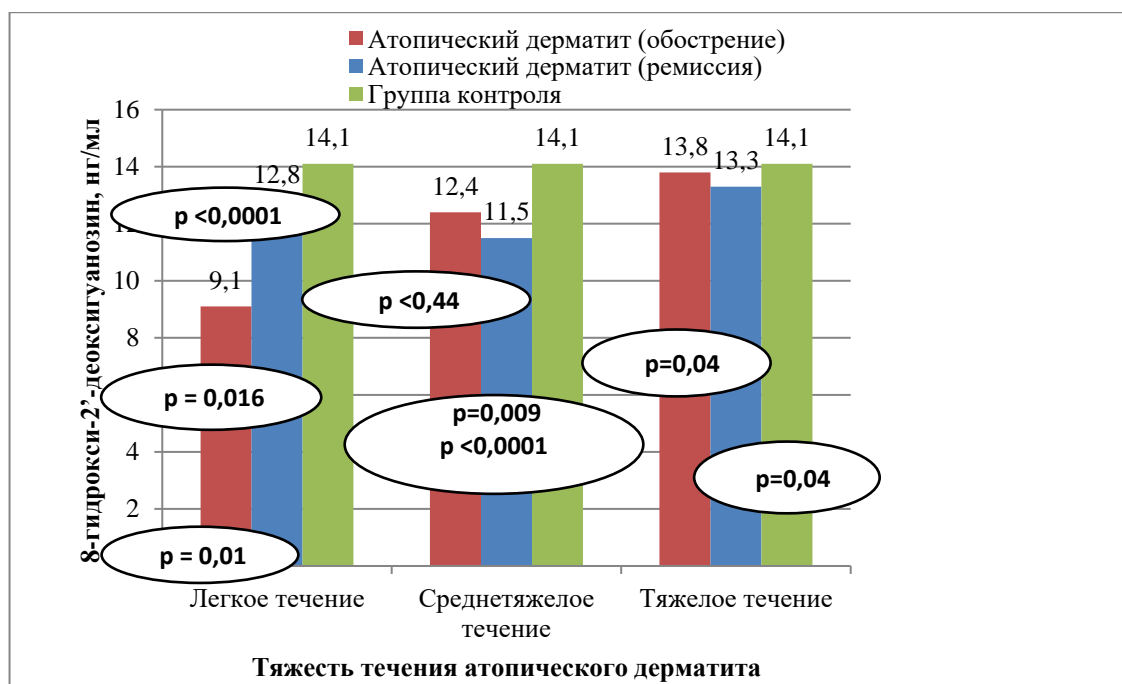


Рисунок 7 – Динамика изменений 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина у детей с атопическим дерматитом в зависимости от тяжести заболевания

Мы расценили полученные данные, как явление срочного этапа адаптационной реакции, действующей в условиях аллергического воспаления и направленной на мобилизацию ресурсов, защищающих органические структуры, в том числе ДНК, от повреждения. Важнейшая особенность данного этапа состоит в том, что деятельность организма протекает на пределе его физиологических возможностей при почти полной мобилизации функционального резерва, при этом, не в полной мере обеспечивая необходимый адаптационный эффект. В доступных литературных источниках нам встретилось описание однонаправленного изменения содержания 8-OHdG и клинических проявлений АД, но в преимущественном большинстве работ наблюдалось повышение показателя в периоде обострения (Omata N. et al., 2001; Tsukahara H. et al., 2003; Indraprasta S. et al., 2017; Choi M.W. et al., 2019), при этом, показатель измеряли в моче у респондентов возрастной группы, отличной от нашей.

Основываясь на полученных данных, можно сделать заключение о том, что ЦБП и 8-OHdG могут служить биологическими показателем интенсивности клинических изменений при АД.

Для определения ассоциаций распределения аллелей гена eNOS (Glu298Asp (rs1799983), C774T (rs1549758) и T786C (rs2070744)) с клиническими формами АД у детей в возрасте до трех лет, 59 детям с 1 года до 3 лет с АД и 19 детям контрольной группы проводили экстракцию ДНК и исследование на полиморфные маркеры (Glu298Asp (rs1799983), C774T (rs1549758) и T786C (rs2070744)) в гене eNOS. Дети с АД (n=59) были разделены на следующие группы: ЭрС (n=34), ЭрСЛ (n=16) и Л (n=9) формы заболевания.

При исследовании полиморфного маркера Glu298Asp (rs1799983) в гене eNOS наблюдалась тенденция к увеличению встречаемости аллеля Т и снижению встречаемости генотипа GG у детей с ЭРС формой АтД по сравнению с группой контроля, при этом данные по распределению частот генотипов и аллелей не имели статистической значимости ($p > 0,05$). Сравнительный анализ полиморфных маркеров C774T (rs1549758) и T786C в гене eNOS у пациентов с ЭРС формой АтД и представителей контроля не показал существенных различий. Изучение полиморфного маркера T768C (rs2070744) в гене eNOS у детей с ЭРСЛ формой АтД показало статистически значимое повышение риска развития ЭРСЛ формы АтД у носителей генотипа CC ($\chi^2 = 4,439$, $p < 0,05$), чем у детей контрольной группы ($p < 0,05$), также в этой группе наблюдалась тенденция к снижению риска развития ЭРСЛ формы относительно группы контроля у носителей генотипа TC ($\chi^2 = 3,569$, $p > 0,05$). Анализ аллелей и генотипов полиморфных маркеров Glu298Asp (rs1799983), C774T (rs1549758) и T786C (rs2070744) в гене eNOS у пациентов с Л формой и у совокупности выборок с АтД не показал существенных различий. В результате исследования мы выявили достоверную ассоциацию гомозиготного генотипа CC в локусе -786 (rs2070744) гена eNOS с развитием у пациентов хронической непрерывно рецидивирующей ЭРСЛ формы АтД.

Ранее в исследованиях *in vitro* было показано, что замена тимина на цитозин в положении -786 примерно на 50% снижает транскрипционную активность гена (Nakayama M. et al., 1999). Вероятно, этот эффект возникает из-за того, что репликационный белок A1 (RPA1), который действует как репрессор, имеет большее сродство к цитозину, нежели к тимину (Miyamoto Y. et al., 2000). Можно было предположить, что у пациентов, не имеющих аллеля Т (то есть гомозиготных CC) снижена экспрессия eNOS, которая обеспечивает базальную секрецию NO (Pechkovsky D.V. et al., 2002) осуществляющего регуляторную и сигнальную функции в организме. Таким образом, недостаток NO приводит к повышенному риску развития ЭРСЛ формы АтД по сравнению с пациентами, несущими аллель Т, что позволяет рассматривать гомозиготный генотип CC в качестве фактора, повышающего риск развития у детей раннего возраста хронического воспаления кожи – лихенизации.

На основании собственных исследований мы разработали прогностическую модель прогрессирующего течения АтД у детей раннего возраста, которая позволяет при использовании результатов объективного и лабораторного исследования определить прогноз АтД. В нашу модель вошли следующие показатели: количественное содержание ЦБП в сыворотке крови, уровень 8-OHdG, площадь поражения кожи, ИРИ и уровень сывороточного IgA.

С помощью метода множественной регрессии были определены значения основных коэффициентов в уравнении модели для расчета коэффициента прогнозирования тяжести течения АтД и модель приобрела вид математического выражения:

$$\text{КПТТ} = -0,05 + 0,04 * \text{ИРИ} - 0,066 * \text{IgA} + 0,0001 * \text{ЦБП} + 0,014 * \text{S} + 0,02 * 8\text{OHdG}.$$

Индивидуальный показатель КПТТ необходимо интерпретировать следующим образом:

КПТТ >0,5 – высокий риск тяжелого течения АтД;

КПТТ <0,5 – низкие значения риска тяжелого течения АтД.

Использование данной модели применимо в практическом здравоохранении. Диагностическая чувствительной математической модели прогнозирования тяжести течения АтД составила 85,7%, диагностическая специфичность – 76,5%, диагностическая точность – 80,6%. Предложенная модель с высокой степенью достоверности позволяет разделять пациентов с АтД, определяя группы высокого риска тяжелого течения заболевания, оказывая помощь врачу-педиатру в выборе оптимальной тактики ведения и лечения пациента.

Однако многочисленные математические действия требуют от врача дополнительных навыков и отнимают массу времени, что недопустимо для специалиста, работающего в условиях поликлинического приема и стационара. Поэтому для оптимизации работы практикующего специалиста на базе электронных таблиц Excel, входящих в набор стандартных программ Microsoft Office была создана компьютерная программа, позволяющая после внесения индивидуальных показателей больного автоматически рассчитать значение КПТТ за считанные минуты.

Использование в практической деятельности модели прогнозирования тяжести течения АтД, может оказать существенную помощь врачу в выборе оптимальной тактики ведения пациентов с данным заболеванием.

ВЫВОДЫ

1. Отягощенный аллергоанамнез со стороны матери, сиблингов, влияние бытовых вредностей во время беременности, курение родителей ребенка, ранний дебют заболевания (в первые 4 месяца жизни), небольшая продолжительность грудного вскармливания (первые 4—6 месяцев жизни) можно рассматривать в качестве факторов, предрасполагающих к развитию тяжелого прогрессирующего течения атопического дерматита.

2. У детей с различными клиническими формами и различной тяжестью течения атопического дерматита наблюдалась общая тенденция в изменении показателей иммунограммы в виде снижения Т-цитотоксических клеток, снижения иммуноглобулинов класса А и гиперпродукции иммуноглобулинов класса Е.

3. Среднетяжелое и тяжелое течение атопического дерматита в периоде обострения сопровождалось резким повышением концентрации циркулирующих биологических

пероксидов, которая в периоде ремиссии снижалась, стремясь к нормальным значениям, при этом, сохраняла достоверно более высокий уровень относительно контрольной группы. Концентрация циркулирующих биологических пероксидов изменялась в зависимости от клинической формы атопического дерматита в периоде обострения, эритематозно-сквамозная с лихенизацией форма характеризовалась наибольшими показателями окислительного стресса, экссудативная – наименьшими. Уровни 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина изменялись в зависимости от интенсивности клинических проявлений, оцененных с помощью индекса SCORAD ($r=0,63$; $p=0,0001$) и оставались ниже контрольных значений при любой тяжести течения заболевания.

4. Выявлена ассоциация гомозиготного генотипа CC в локусе -786 (rs2070744) гена eNOS с развитием у пациентов тяжелой хронической формы атопического дерматита – эритематозно-сквамозной с лихенизацией.

5. Разработана модель прогнозирования тяжести течения атопического дерматита у детей: так, при полученном значении прогностического коэффициента тяжести течения атопического дерматита более 0,5 необходимо отнести данного ребенка в группу риска, с целью подбора оптимальной тактики ведения для предупреждения тяжелого течения заболевания.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение показателей окислительного статуса (циркулирующих биологических перекисей, 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина) может быть использовано в качестве факторов контроля течения и разработке методов терапии атопического дерматита.

2. Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты и исследование на полиморфный маркер T786C (rs2070744) в гене эндотелиальной синтазы оксида азота с определением гомозиготного генотипа CC в локусе -786 гена эндотелиальной синтазы оксида азота позволяет прогнозировать развитие хронических форм атопического дерматита.

3. Модель прогнозирования клинического течения атопического дерматита у детей раннего возраста, позволяет рассчитать предположительный вариант течения заболевания у данного пациента в будущем: при полученном значении более 0,5 необходимо отнести данного ребенка в группу риска, с целью подбора оптимальной тактики ведения пациента для предупреждения тяжелого течения атопического дерматита.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дудникова Э.В. Современный взгляд на профилактику атопического дерматита у детей раннего возраста (**обзор**) / Э.В. Дудникова, Н.Н. Кобзева, **Е.С. Приходская(Е.С. Слюсарева)** // **Медицинский вестник Юга России.** – 2013. – №3. – С.8-11.
2. Дудникова Э.В. Особенности течения атопического дерматита у детей раннего возраста / Э.В. Дудникова, Н.Н. Кобзева, **Е.С. Приходская(Е.С. Слюсарева)**, Е.А. Беседина, Е.Г. Педченко // **Медицинский вестник Юга России.** – 2013. – №3. – С.44-47.
3. Моргуль Е.В. Перспективы профилактики повреждений ДНК при аллергических заболеваниях у детей с помощью пробиотических препаратов / Е.В. Моргуль, В.А. Чистяков, Н.Н. Кобзева, **Е.С. Слюсарева** // **Валеология.** – 2013. – №2. – С. 20-26.
4. **Слюсарева Е.С.** Динамика изменения концентрации биопероксидов в крови при атопическом дерматите у детей раннего возраста / **Е.С. Слюсарева**, Э.В. Дудникова, А.Ю. Нуртазина, А.В. Кудрявцева // **Аллергология и иммунология в педиатрии.** – 2019. – № 4 (59). – С. 14-21.
5. Свитич О.А. Ассоциация полиморфизма гена NOS3 с риском развития атопического дерматита у детей / О.А. Свитич, А.В. Кудрявцева, **Е.С. Слюсарева**, Е.О. Кравцова, Е.А. Меремьянина, Е.П. Быстрицкая, В.В. Соболев, А.И. Рябцев, А.Б. Потапова, В.В. Зверев // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2020. – Т.170. – №12. – С. 778-782. doi: 10.47056/0365-9615-2020-170-12-778-782 [**Scopus**]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АтД	атопический дерматит
АФК	активные формы кислорода
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
8-ОНdG	8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин
eNOS	эндотелиальная синтаза оксида азота
NO	оксид азота
ЦБП	циркулирующие биологические перекиси
ЭРСЛ	эритематозно-сквамозная с лихенизацией
ЭКС	экссудативная
ЭРС	эритематозно-сквамозная
ИРИ	иммунореактивный индекс
IgA	иммуноглобулины класса А
IgE	иммуноглобулины класса Е
ЦИК	циркулирующие иммунные комплексы
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ГВ	грудное вскармливание
IgM	иммуноглобулины класса М
КПТТ	коэффициент прогнозирования тяжести течения атопического дерматита
IgG	иммуноглобулины класса G