

На правах рукописи



Быстрицкая Елизавета Петровна

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

3.2.7. Иммунология

3.1.23. Дерматовенерология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Научные руководители:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук
доктор медицинских наук, профессор

Свитич Оксана Анатольевна
Мурашкин Николай Николаевич

Официальные оппоненты:

Балмасова Ирина Петровна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский медицинский стоматологический институт, лаборатория молекулярной биологии, ведущий научный сотрудник

Матушевская Елена Владиславовна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий», Академия постдипломного образования, кафедра дерматовенерологии и косметологии, профессор кафедры

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «14» июня 2024 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.34 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной научной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d. 37/1) и на сайте организации <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор


Клюжин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Атопический дерматит (АтД) – хроническое воспалительное иммуноопосредованное заболевание кожи, характеризующееся рецидивирующим течением и прогрессирующим снижением качества жизни [Кубанов и соавт., 2021; Мурашкин и соавт., 2020].

От этого заболевания во всем мире страдают до 20% детей и 8% взрослых, поэтому данная патология представляет собой серьезную социальную и экономическую проблему [Bieber et al., 2008]. АтД относится к группе атопических расстройств, характеризующихся выработкой антител IgE в ответ на аллергены. Однако только у 70–80% пациентов с АтД регистрируется повышение уровня общего или специфического IgE, в то время как у остальных не наблюдается сенсibilизации [Караулов и соавт., 2012]. Около 85% пациентов демонстрируют дебют болезни в возрасте до 5 лет [Ruun, 2015]. Более чем у 60% детей с течением времени развиваются аллергический ринит и астма. Такое явление получило название «атопический марш», где АтД в определенных группах пациентов (в частности, с генетической предрасположенностью к атопии) может стать отправной точкой для последующего развития астмы [Мурашкин и соавт., 2020]. Таким образом, знание основных звеньев патогенеза АтД, а также ключевых маркеров иммунопатогенеза будет способствовать предотвращению или модификации дальнейшего развития заболевания и атопического марша, что является многообещающей стратегией лечения в будущем. Однако для достижения этой цели необходимо получить существенные знания о сложных механизмах, лежащих в основе иммунопатогенеза АтД.

АтД принадлежит к группе многофакторных заболеваний, которое возникает в результате сложных взаимодействий между аллергическими реакциями, воспалительными реакциями в коже, влекущими за собой нарушение барьерной функции, а также влияния и взаимодействия генетических факторов, факторов окружающей среды и др. [Lebwohl et al., 2013; Горский и соавт., 2022].

Различают несколько концепций, определяющих иммунологическую составляющую патогенеза АтД: более раннюю, где основная роль отводилась гиперчувствительности I типа, и поздние, где центральное значение отводится несостоятельности кожного покрова с нарушением барьерной функции, в том числе опосредованной мутациями в генах (филагтрина, десмоглеина-1 и др.), а также дисбалансом кожной микробиоты с преобладанием условно-патогенных микроорганизмов (стафилококков, стрептококков) и присоединением бактериальных или вирусных инфекций [Silverberg et al., 2015]. Высокая распространенность кожных инфекций при АтД свидетельствует о том, что нарушаются механизмы врожденного иммунитета, инициируемые паттерн-распознающими рецепторами (PRR) [Kuo et al., 2013].

Известно, что полиморфизмы и нарушение экспрессии генов PRR связаны с патогенезом многих различных аутоиммунных и воспалительных заболеваний, включая АтД [Ярилин, 2010]. Нарушается и продукция антимикробных пептидов эпителиальными клетками, что также способствует дальнейшей сенсбилизации и поддержанию локального воспаления в коже.

Поскольку АтД является хроническим рецидивирующим воспалительным заболеванием кожи, изучается цитокиновый профиль в различные стадии проявления. Ранняя стадия заболевания экзогенного типа характеризуется превалированием Th2-клеток [Ревякина и соавт., 2021]. Под влиянием IL4 и IL13 усиливается продукция IgE плазматическими клетками. Также уделяется внимание изучению роли других субпопуляций Th-клеток, таких как Th1, Th17, Th22 и Th9 [Czarnowicki et al., 2019].

Во многом тот или иной вариант иммунного ответа связан с регуляцией генов его компонентов. Одними из механизмов, способных повлиять на активность этих генов, являются эпигенетические модификации. Эпигенетические механизмы, в частности метилирование, играют одну из ключевых ролей в иммунной регуляции и находятся под влиянием разнообразных факторов окружающей среды, приводящих к модификации активности генов [Li et al., 2021]. Есть основания полагать, что изменения в процессах метилирования наблюдаются у пациентов с АтД. А также, вероятно, такие эпигенетические механизмы, участвующие в осуществлении геномной адаптации к условиям среды, способны влиять на течение и тяжесть проявлений заболеваний.

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

Степень разработанности темы исследования

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

Данных о роли эпигенетических механизмов регуляции врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе атопического дерматита недостаточно. Описаны профили метилирования некоторых генов (*DNMT1*, *FCER1G*, *TSLP*, *MICAL3*, *DEFB1*), ассоциированных с АтД [Nakamura et al., 2006; Liang et al., 2012; Luo et al., 2014; Cho et al., 2019; Noh et al., 2018]. Также существует несколько полногеномных исследований ДНК-метилирования [ENCODE

Project Consortium, 2007; Han et al., 2012; Rodriguez et al., 2014; Olisova et al., 2020]. Однако комплексное исследование роли эпигенетической регуляции механизмов иммунитета на уровне экспрессии генов и белковых молекул у пациентов детского возраста до сих пор не проводилось.

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

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

Научная новизна

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

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

Методология и методы исследования

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

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

Личный вклад

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

Положения, выносимые на защиту

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

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

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

новообразований кожи и ИППП (изучение причинно-следственных связей между генетическими, патоморфологическими, иммунологическими, биохимическими, функциональными особенностями и клиническими проявлениями заболеваний)» паспорта специальности 3.1.23. Дерматовенерология (медицинские науки).

Степень достоверности и апробация результатов исследования

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

Материалы работы доложены на конференциях с международным участием: International Student Congress of (bio)Medical Sciences (ISCOMS) (г. Гронинген, Нидерланды, 06-09 июня 2017, победа в секции «Иммунология»); Европейская академия аллергологии и клинической иммунологии (EAACI) International Symposium on Molecular Allergology (ISMA) (г. Люксембург, Люксембург, 09-11 ноября 2017); EAACI Annual Congress (г. Мюнхен, Германия, 26-30 мая 2018); XII World Congress on Asthma, COPD & Immunopathology and the I International Congress on Molecular Allergology (г. Москва, Россия, 18-21 октября 2018, первое место); International Student Congress (г. Грац, Австрия, 31 мая – 02 июня 2019); EAACI Annual Congress (г. Лиссабон, Португалия, 01-05 июня 2019); EAACI International Symposium on Molecular Allergology (ISMA) (г. Амстердам, Нидерланды, 28-30 ноября 2019); EAACI Annual Congress (г. Лондон, Великобритания, 06-08 июня 2020, онлайн); EAACI Pediatric Allergy and Asthma Meeting (РААМ) (12-13 ноября 2021, онлайн, победа в секции «2.3 Атопический и контактный дерматит»); 14th International Conference on Allergy, Immunology and Rheumatology (03 декабря 2021, онлайн); EAACI-ESCD Skin Allergy Meeting (SAM) (24-25 марта 2023, онлайн); на конгрессе European Society for Pediatric Dermatology (22nd ESPD Congress) (г. Малага, Испания, 04-06 мая 2023, онлайн); EAACI Annual Congress (г. Гамбург, Германия, 09-11 июня 2023, гибридный формат). В 2022 г. по проведенной работе была присуждена премия им. Андрея Дмитриевича Адо Российского Аллергологического Журнала в специальной номинации «Будущее науки» от генерального спонсора АО МБНПК «Цитомед».

Внедрение результатов в практику

Основные результаты и выводы работы внедрены в учебный и научный процесс кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А. А. Воробьева ИОЗ им. Ф. Ф.

Эрисмана ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И. М. Сеченова при изучении дисциплин микробиологии и иммунологии, читаемых студентам по направлениям подготовки «Лечебное дело», «Стоматология», «Медико-профилактическое дело», «Фармация», «Педиатрия».

Публикации по теме диссертации

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

Объем и структура диссертации

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

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

Все пациенты получали препараты наружного применения (местные глюкокортикостероиды средней и высокой активности, топические ингибиторы кальциневрина). 20 пациентов основной группы дополнительно получали системную терапию

генно-инженерным биологическим препаратом дупилумаб. Препарат вводился подкожно в соответствии с инструкцией.

Тяжесть АД оценивали с применением метода SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis) [Карамова и соавт., 2022]. Среднетяжелая форма АД коррелировала с показателями индекса от 25 до 50; тяжелая форма – более 50.

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

Материалом для исследования являлись биоптаты пораженных участков кожи, образцы цельной крови и сывороток. При проведении биопсии использовали метод панч-биопсии с применением циркулярного ножа диаметром 2 мм (Dermo Punch, Sterylab, Италия). Манипуляцию осуществляли с применением местной анестезии с 2% раствором лидокаина до начала лечения. Свежие образцы помещали в пробирки эппендорф (1,5 мл) со стабилизационным раствором «RNA later» (Invitrogen, США) в объеме 1 мл с целью транспортировки в лабораторию и хранения при температуре минус 80 °С. Забор образцов цельной крови в объеме 6 мл осуществляли в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой, а образцов сывороток в объеме 2 мл – в пробирки с гелем и активатором свертывания (Vacuette, Greiner Bio-One, Австрия). Образцы крови собирали как до, так и после лечения (через 3 месяца) и не подвергали замораживанию. Пробирки с сыворотками центрифугировали 10 мин при 2500 g после чего сыворотки переливали в пробирки эппендорф объемом 2 мл и хранили при температуре минус 80 °С.

Методы. Выделение ДНК из биоптатов кожи. Для того чтобы провести полногеномное исследование метилома, были взяты образцы биоптатов от трех пациентов с АД и трех здоровых доноров. Из биоптатов выделяли геномную ДНК согласно инструкции к набору «Monarch Genomic DNA purification kit» (New England Biolabs, США) методом экстракции нуклеиновой кислоты на спин-колонках.

Исследование паттернов метилирования методом глубокого (высокоэффективного) секвенирования. Для проведения секвенирования использовали секвенатор III поколения MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) с проточными ячейками SpotON Flow

Cell (R9.4.1) [Wang et al., 2021]. В ходе работы применяли протокол лигирования ДНК (№SQK-LSK109).

Биоинформатический анализ данных. Проведение биоинформатического анализа проводилось совместно с научным сотрудником кафедры генетики биологического факультета МГУ им. И. М. Ломоносова Наумовой Е. А. Схема этапов анализа представлена на Рисунке 1.

При анализе паттернов метилирования использовали статистический показатель *areaStat* (сумму значений t-тестов для каждого сайта дифференциального метилирования в последовательности гена или на выбранном интервале ДНК) [Feng et al., 2019]. Разница уровней метилирования у пациентов с АтД и здоровых добровольцев считалась тем больше, чем больше значение *areaStat*, и наоборот. Для предварительной систематизации выявленных дифференциально метилированных генов был проведен их онтологический анализ с использованием электронных ресурсов DAVID, Enrichr, UCSC Genome browser.

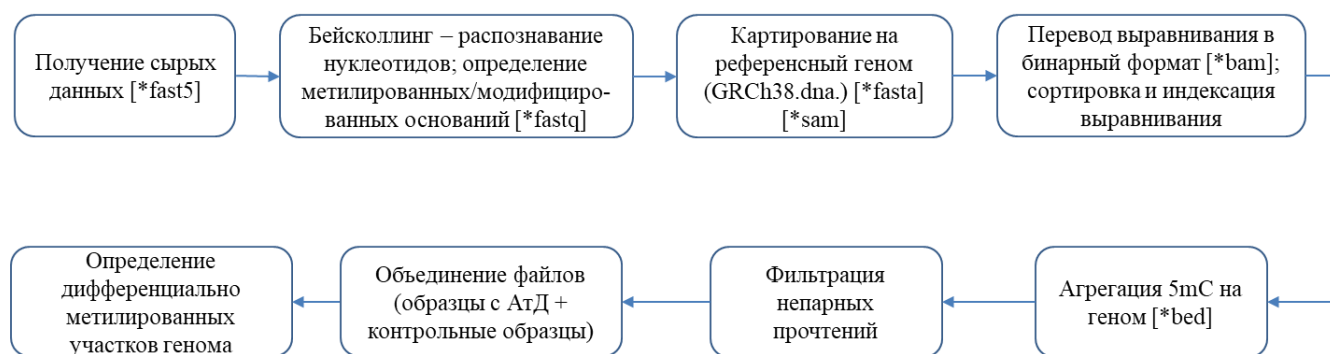


Рисунок 1 – Схема этапов биоинформатического анализа полученных результатов по полногеномному метилированию. Представлено выполнение пошаговой обработки данных

Выделение МНК. Выделение МНК проводили методом седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фикола ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$). Кровь из пробирок с ЭДТА наслаивали на 7 мл фикола (ПанЭко, Россия) и далее проводили процедуру согласно протоколу выделения МНК [Ковальчук и соавт., 2010].

Выделение РНК. Выделение РНК из МНК и биоптатов кожи проводили при помощи реагента «Extract RNA» (Евроген, Россия) в соответствии с прилагаемым протоколом.

Реакция обратной транскрипции. Выделенную РНК из клинического материала пациентов с АтД и здоровых людей использовали для проведения реакции обратной транскрипции (набор «ОТ-1», Синтол, Россия) строго при прилагаемому протоколу. Для реакции в работу брали образцы тотальной РНК массой $\sim 1 \text{ мкг}$. Полученную кДНК далее использовали для проведения полимеразной цепной реакции.

ПЦР-РВ. Комплементарная ДНК (кДНК), полученная в ходе реакции обратной транскрипции, использовалась для определения экспрессии выбранных генов (*TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, *DEFB1*) методом ПЦР-РВ. Для проведения реакции использовали «Набор

реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» (Синтол, Россия) в соответствии с прилагаемой методикой. Условия проведения ПЦР: прогрев (95 °С – 5 мин); отжиг и элонгация (40 циклов 95 °С – 15 с, 60 (58) °С – 50 с); плавление. Обработка полученных данных (C_t) осуществлялась методом $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства β -актина (*ACTB*) [Livak et al., 2001].

Иммуноферментный анализ. Определение уровня концентрации цитокинов в сыворотке крови проводили с использованием системы мультиплексного анализа MAGPIX (Bio-Rad, США). Для измерения использовали набор реактивов Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel (Bio-Rad). Также определяли уровень общего IgE с помощью наборов реагентов (Вектор-Бест, Россия) методом твердофазного иммуноферментного анализа.

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

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

В случае анализа экспрессии генов были посчитаны медианы значений $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ для каждого ряда данных с учетом группы, типа клинического материала, периода забора клинического материала. В случае мультиплексного ИФА были посчитаны медианы значений концентраций по каждому параметру. На основании этих данных были построены графики медианных значений.

Статистическая достоверность между двумя группами данных была рассчитана при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни. В случае сравнения трех и более групп данных использовали непараметрический H-критерий Краскела-Уоллиса. Оценку корреляционной зависимости для непараметрических ранговых величин проводили по методу Спирмена [Гланц, 1998].

Результаты исследования

Сравнение профилей метилирования кожи пациентов с атопическим дерматитом и здоровых детей. В данном исследовании описаны ключевые изменения паттерна метилирования при АД, поскольку это может способствовать более детальному пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе заболевания, а также определению его специфичных биомаркеров. Сводные данные по описанным и классифицированным дифференциально метилированным генам представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Дифференциально метилированные гены, потенциально вовлеченные в патогенез АтД

Ген	Значение areaStat	Статус метилирования	Возможный сигнальный путь
Кератиноциты			
<i>Процессы транскрипции и транскрипционные модификации:</i>			
<i>FLNA</i>	-1208,77	деметилирован	регуляция актинового цитоскелета
<i>CEBPG</i>	57,04	метилирован	JAK-, PI3K/Akt-, p38 MAPK-сигнальный путь
<i>CARD11</i>	102,69	метилирован	NF-kB-сигнальный путь
<i>NFIA</i>	112,52	метилирован	дифференцировка нейробластов, кератиноцитов
<i>EHMT1</i>	143,67	метилирован	модификация хроматина
<i>MAPK14</i>	173,79	метилирован	p38 MAPK-сигнальный путь
<i>RUNX3</i>	1409,76	метилирован	Th1-, Th2-клеточная дифференцировка
<i>Процессы, связанные с работой малых ГТФаз:</i>			
<i>CCR7</i>	-98,72	деметилирован	хемокиновый сигнальный путь
<i>DOCK1</i>	-67,24	деметилирован	регуляция актинового цитоскелета
<i>DOCK2</i>	104,57	метилирован	хемокиновый сигнальный путь
<i>Поддержание целостности и нормального функционирования кожного барьера:</i>			
<i>HIC1</i>	-1173,00	деметилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>ALOX12</i>	-730,90	деметилирован	метаболический сигнальный путь
<i>PRSS3</i>	-206,14	деметилирован	PRSS3-PAR-сигнальный путь
<i>FYN</i>	-80,57	деметилирован	регуляция актинового цитоскелета
<i>CTNNBIP1</i>	-71,69	деметилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>BARX1</i>	-60,16	деметилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>TLE1</i>	-56,83	деметилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>GRB10</i>	-49,90	деметилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>TRABD2B</i>	48,52	метилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>XIRP2</i>	52,01	метилирован	регуляция актинового цитоскелета
<i>WWOX</i>	53,44	метилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>TAX1BP3</i>	60,67	метилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
<i>FAT1</i>	66,24	метилирован	регуляция актинового цитоскелета
<i>DEFB124</i>	113,86	метилирован	MAPK-, NF-kB-сигнальный путь
<i>DACT3</i>	3633,33	метилирован	WNT-зависимый сигнальный путь
Иммунные клетки			
<i>Процессы транскрипции и транскрипционные модификации:</i>			
<i>GATA3</i>	-298,67	деметилирован	Th1-, Th2-, Th17-клеточная дифференцировка
<i>GATA4</i>	-99,13	деметилирован	Ca-зависимый сигнальный путь
<i>VAV1</i>	-63,49	деметилирован	хемокиновый сигнальный путь
<i>MAP3K8</i>	-61,30	деметилирован	p38 MAPK-сигнальный путь
<i>MAP2K6</i>	-42,97	деметилирован	p38 MAPK-сигнальный путь
<i>MAP2K4</i>	96,00	метилирован	MKK/JNK-сигнальный путь
<i>MAP2K2</i>	140,56	метилирован	MKK/JNK-сигнальный путь
<i>JAK3</i>	376,90	метилирован	JAK-STAT сигнальный путь
<i>Регуляция дифференцировки дендритных клеток:</i>			
<i>SLC9A6</i>	-687,81	деметилирован	дифференцировка дендритных клеток
<i>PAK2</i>	-116,90	деметилирован	MAPK-сигнальный путь; дифференцировка дендритных клеток
<i>EPHB2</i>	-75,00	деметилирован	EphrinB2- сигнальный путь; дифференцировка дендритных клеток

При сравнении образцов от пациентов с АтД и здоровых детей были показаны изменения в метилировании 2364 областей геномной ДНК с соответствующими им конкретными генами. Среди выявленных генов отбирались те, которые имеют отношение к процессам, связанным с патогенезом АтД. Для предварительной систематизации выявленных дифференциально метилированных генов был проведен их онтологический анализ с использованием электронного ресурса DAVID. Это позволило выделить несколько кластеров генов, белковые продукты которых участвовали в сигнальных путях, характерных для АтД.

Функционально гены, даже в рамках одной группы, дополняют друг друга или, наоборот, проявляют антагонистические свойства (хотя генов, способствующих нормальному функционированию кожного барьера и при этом находящихся в состоянии активации, меньше). Поэтому при развитии патологического процесса важно рассматривать все факторы вместе.

Чтобы дополнительно определить общие пути для указанных в таблице дифференциально метилированных генов, с помощью инструмента DAVID была проведена дополнительная кластеризация этих генов методом обогащения сигнальных путей, или SNEA (Subnetwork Enrichment Analysis). В ходе такой классификации были ранжированы сигнальные пути базы данных KEGG, среди которых наибольшую представленность показали пути «Сигнальный путь Toll-подобных рецепторов», «FcεRI сигнальный путь», а также «Сигнальный путь дифференцировки Th1- и Th2-клеток». Исходя из полученных данных по дифференциально метилированным генам, для экспрессионного анализа были отобраны гены, входящие в MyD88-зависимый сигнальный путь (*TLR2*, *TLR9*; *IL4*, *IL13*), а также гены АМП (*DEFB1*, *CAMP*).

Экспрессия генов *TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, *DEFB1* при атопическом дерматите у детей. Представлены медианные значения относительного уровня экспрессии генов *TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, *DEFB1* в коже и в мононуклеарных клетках крови у пациентов с АтД и у здоровых доноров. Пациенты были разделены на подгруппы по возрасту (6-12 лет; 12-18 лет), а также по тяжести заболевания (среднетяжелое течение, SCORAD 25-50; тяжелое течение, SCORAD >50) и в зависимости от применения терапии (в динамике) в случае анализа экспрессии в МНК.

Экспрессия отобранных генов в кератиноцитах кожи пациентов оценивалась относительно группы сравнения. Так, экспрессия гена *TLR2* снижена у пациентов с АтД от 6 до 18 лет на локальном уровне (почти в 5 раз по сравнению с контрольной группой), как представлено на Рисунке 2: медианные значения составляют 0,15 и 1,00 в группе пациентов и у здоровых детей соответственно. Достоверная разница с учетом возраста показана также для младшей группы от 6 до 12 лет ($p < 0,05$).

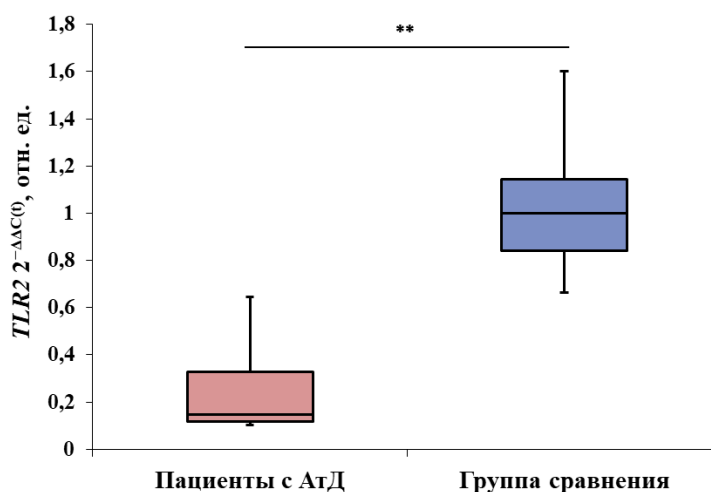


Рисунок 2 – Медианные значения уровня экспрессии гена *TLR2* (отн. ед.) в коже пациентов с АД (6-18 лет) по сравнению с контролем. $** < 0,01$

При анализе данных экспрессии гена *TLR9* у пациентов с АД по сравнению с контрольной группой можно отметить, что наблюдается сходная с геном *TLR2* динамика. В коже уровень его экспрессии снижен более чем в 10 раз, при этом достоверная разница наблюдается как в случае разделения по возрасту пациентов, так и в общей группе (6-18 лет).

Изменения экспрессии генов антимикробных пептидов, *CAMP* и *DEFB1* не показали достоверных различий в коже. Их медианные значения имели тенденцию к снижению и отличались от значений медиан контрольных групп примерно в два раза. Надо отметить, что на первом этапе исследования также была выявлена область с повышенной степенью метилирования у пациентов с АД, относящаяся к гену семейства β-дефензина – *DEFB124*.

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

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

По причине несостоятельности кожного барьера, утрате его функций, измененной регуляции генов, ни один показатель экспрессионного анализа не достигает высокого уровня, что, в свою очередь, негативно отражается на действии местного иммунитета. Поскольку в данном исследовании выявлены пониженные уровни экспрессии факторов врожденного

иммунитета, скорее всего, причина развития заболевания в таком случае не будет связана с экзогенной инфекцией. Также имеются определенные метилированные гены в сигнальном пути, влияющем на продукцию описываемых цитокинов, и можно сделать вывод о том, что локально в коже поддерживается воспалительный процесс, вероятно, не связанный с Th2-ответом. Более наглядно это показано на схеме сигнального пути NF-κB с учетом полученных данных (Рисунок 3).

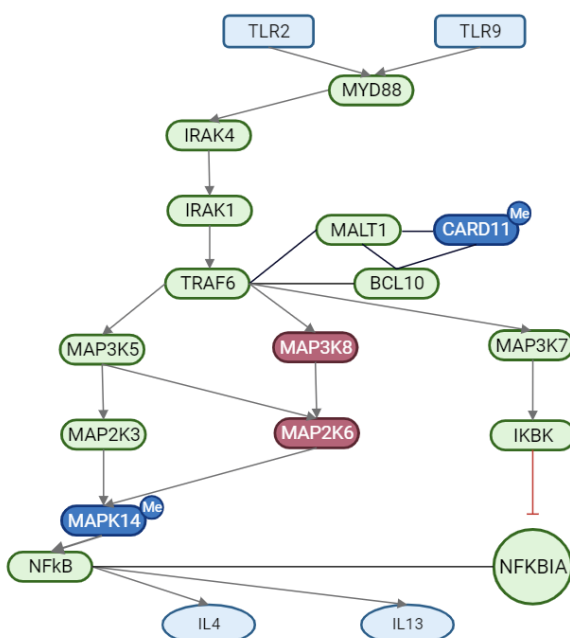


Рисунок 3 – Схема сигнального пути, реализуемого на локальном уровне в коже у пациентов с АтД. Синим цветом обозначены гены с пониженной белковой продукцией; темно-синим цветом выделены гиперметилированные гены; красным цветом – гипометилированные; «Me» соответствует метилированному гену

Данные по МНК отличаются от локального уровня, и все детектированные изменения превышают значения контрольной группы. Экспрессия гена *TLR2* в МНК достоверно повышена у пациентов с АтД, в частности в старшей группе от 12 до 18 лет (более чем в 1000 раз) в остром периоде до начала лечения. Достоверная разница с учетом тяжести заболевания показана как для среднетяжелого течения (более чем в 400 раз по сравнению с контролем), так и для тяжелого течения (почти в 7000 раз) также до лечения. В этом случае после лечения показатели экспрессии снижаются в обеих группах (~ в 100 и в 8 раз соответственно).

Результаты по экспрессии гена *TLR9* в крови аналогичны экспрессии *TLR2*. На системном уровне регистрируются достоверные изменения в сторону повышения в общих группах до и после лечения, хотя после терапии экспрессия снижается более чем в 16 раз. Также достоверные отличия характерны для старшей возрастной группы до лечения (разница с контролем составляет около 1100 раз). В отношении тяжести проявления заболевания до инициации терапии большая разница выявлена между группой среднетяжелого течения (более

чем в 1000 раз) и контролем, а также в случае тяжелого течения (в 300 раз выше, чем в группе сравнения).

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

Исходя из комплексных результатов по экспрессии пептидов и TLRs в крови, можно сделать вывод, что именно на системном уровне происходит активация структур врожденного иммунитета, что служит переходом к адаптивному иммунному ответу. При проведении корреляционного анализа в МНК высокая степень связи была выявлена между показателями TLR9 и HBD1 ($r = 0,74$), как представлено на Рисунке 4. Имеет место синергизм действия факторов врожденного иммунитета и их активация как инициальных структур сигнального пути, ведущего к Th2-иммунному ответу на системном уровне.

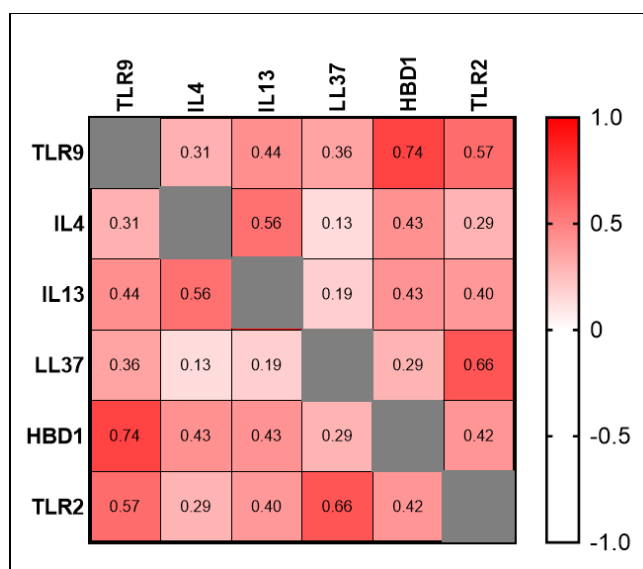


Рисунок 4 – Сила связи между переменными (значения экспрессии $2^{-\Delta\Delta C(t)}$) в МНК при расчете коэффициента корреляции r-Спирмена ($p < 0,05$)

В отношении данных по цитокинам IL4 и IL13 их экспрессия в МНК оказалась выше у пациентов по сравнению с контрольной группой. Экспрессия гена *IL4* была повышена более чем в 1000 раз в общей группе до лечения (в основном за счет старшей возрастной группы), медиана составила 634,73 (85,01-3302,18), а также в 180 раз после лечения (Me = 79,89 (18,13-580,04) отн.ед.). В группе пациентов с АтД средней тяжести этот показатель оставался

повышенным до и после терапии, однако в группе тяжелого течения до лечения медиана составил максимальное значение 1871,53 (649,22-2656,33). Интересно, что с учетом терапии все же наблюдается тенденция к нормализации уровней этих цитокинов. Но в случае IL13 снижение экспрессии происходит эффективнее.

Так, в общей группе до лечения медиана по IL13 составляет 281 (12,83-4903,25), а в контрольной группе 0,34 (0,13-0,95). После лечения экспрессия снижается практически в 30 раз, однако все равно остается выше, чем в контрольной группе (Me = 9,58 (4,89-164,28)). С учетом SCORAD, максимальный уровень экспрессии приходится на группу тяжелого течения АтД до лечения, где медиана равна 3932,01 (50,61-14230,29). Но после лечения уровень IL13 в этой группе также снижается, хотя достоверного изменения между этими группами не выявлено.

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

Таблица 2 – Уровень экспрессии генов в МНК у пациентов с АтД в зависимости от применяемой терапии, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

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

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

Из представленных результатов следует, что в целом через три месяца после лечения уровень экспрессии по всем изучаемым показателям иммунитета снижался. Однако достоверное снижение экспрессии практически по всем параметрам (за исключением гена *DEFB1*) регистрируется в группе, в которой в дополнение к топическому лечению применялась системная терапия (дупилумаб). При этом индекс SCORAD после проведения лечения в среднем улучшился на 63% и составил $17 \pm 6,0$ баллов. Так, основные цитокины IL4 и IL13, на которые направлено действие этого препарата, показали нормализацию экспрессии своих генов после лечения в 3 и 127 раз соответственно (медиана для IL4 после терапии равна 238,86; для IL13 равна 3,13). Уровни экспрессии показателей врожденного иммунитета также снижались. Для TLRs наблюдалось снижение в 302 (для гена *TLR2*) и 16,7 (для гена *TLR9*) раз. Активация гена кателицидина снижалась (в 12 раз по сравнению с состоянием до лечения, $Me = 1,21$). Таким образом, системная терапия, направленная на подавление сигналов цитокинов IL4 и IL13, опосредованно приводит и к нормализации уровней экспрессии факторов врожденного иммунитета.

Продукция цитокинов и IgE в периферической крови детей с атопическим дерматитом и в группе сравнения. На следующем этапе проводилась оценка цитокинового профиля в крови у детей с АД по сравнению с контролем. Поскольку различий среди групп, разделенных по возрасту или по тяжести заболевания, обнаружено не было, данные представлены для общей выборки пациентов. Представленные факторы (IL18, IL3, CXCL9, CXCL10 и IFN- γ) относятся к Th1-группе провоспалительных цитокинов. Данные по концентрациям указывают на достоверное снижение продукции всех этих цитокинов в крови пациентов с АД по сравнению с контролем.

Так, уровень IFN- γ в сыворотке пациентов был достоверно снижен примерно в 2 раза (Me равны 25,68 (23,27-28,11) и 48,34 (35,1-177,2) пг/мл). Поэтому этот цитокин в стадии обострения заболевания неактивен и на системном уровне не поддерживает воспалительный процесс.

Концентрация IL18 в группе пациентов снижена по сравнению с контролем подобно показателю IFN- γ примерно в 2 раза (Me (группа пациентов с АД) = 72,46 (51,6-72,46) пг/мл). Это вновь свидетельствует о том, что при данной клинике обострения заболевания переключения дифференцировки Т-клеток в сторону Th1 происходить не будет. Надо отметить, что IL3 проявляет со направленное действие с IL18. В данном исследовании уровень IL3 в сыворотке крови пациентов также был снижен в полтора раза ($Me = 1,36$ (1,26-1,41) пг/мл, $p < 0,01$). Это подтверждает взаимосвязь с Th1-цитоксином IL18 и отсутствие их активации у данной группы пациентов с АД.

Активация различных сигнальных путей при АД как на локальном, так и на системном уровне возможна при вовлечении в каскад определенных типов хемокинов, которые также регулируют миграцию иммунных клеток к очагу воспаления. В данном исследовании результаты по двум хемокинам, CXCL9 и CXCL10, показали достоверные различия. Концентрация обоих хемокинов снижена в 8,5 и 4,3 раза соответственно, $p < 0,01$. Me (CXCL9) равна 134,03 (107,5-175,3), Me (CXCL10) = 164,76 (157,58-213,57) пг/мл. При проведении корреляционного анализа по Спирмену в группе цитокинов только эти два фактора показали очень высокую силу связи: $r = 1$ ($p = 0,017$). Это может свидетельствовать об их синергетическом действии у пациентов с АД детского возраста, однако проявляющемся не в стадии обострения или манифестации заболевания.

В работе также был проведен анализ уровня общего сывороточного IgE – иммуноглобулина, свидетельствующего о развитии аллергического дерматита. Его концентрация оказалась повышена практически в 8 раз у пациентов с АД по сравнению с контролем (медианы по двум группам соответственно равны 804,18 (609,23-1276,95) нг/мл и 110,68 (34,52-184,8) нг/мл, $p < 0,0001$). По данным описываемого исследования поляризация иммунного ответа у детей с обострением АД на системном уровне происходит по классическому пути в сторону Th2, поскольку общий сывороточный IgE повышен, экспрессия противовоспалительных цитокинов в иммунных клетках крови повышена, а Th1-факторы супрессированы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Атопический дерматит является актуальной проблемой современной иммунологии и дерматологии [Bieber et al., 2008; Горский и соавт., 2022]. В исследовании представлен подход комплексной оценки показателей иммунитета у детей и подростков с обострением заболевания. Предложены метилированные гены-кандидаты для будущего изучения изменения их активности посредством деметилирующих агентов и влияния на течение атопического дерматита. На основании полученных обобщенных данных роль иммунных факторов в патогенезе АД у детей и подростков характеризуется как разнонаправленная. С одной стороны, происходит нарушение противовоспалительного ответа в пораженной коже, что усугубляет течение и длительность заболевания, по всей видимости, из-за измененной степени метилирования генов кератиноцитов и нарушенной (сниженной) экспрессии генов *TLR2*, *TLR9* и *IL4*, что поддерживает локальное воспаление. С другой стороны, на системном уровне доминируют противовоспалительные факторы и активируются структуры врожденного иммунитета, обеспечивая регуляцию острого системного воспалительного процесса и повышения общей сенсibilизации организма. Об этом свидетельствует повышение уровня

экспрессии *TLR2*, *TLR9*, *CAMP*, *DEFB1*, *IL4*, *IL13*, а также увеличение концентрации IgE и снижение провоспалительных Th1-цитокинов.

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

ВЫВОДЫ

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

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

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

4. В мононуклеарных клетках крови показано изменение уровня экспрессии генов паттерн-распознающих рецепторов по сравнению с контрольной группой: у пациентов с АтД регистрируется повышение экспрессии генов *TLR2* (в 540 раз), *TLR9* (в 740 раз). Для генов Th2-цитокинов регистрируется повышение экспрессии генов *IL4* (в 1400 раз) и *IL13* (в 800 раз). В

отношении генов АМП также выявлено усиление их экспрессии (в 140 раз) для *DEFB1* и (в 40 раз) для *CAMP*. Изменения уровня экспрессии генов в МНК наблюдаются в группах при разделении пациентов по возрасту (более выраженные изменения выявляются в группе 12-18 лет) и тяжести заболевания (подобные изменения проявляются как при среднетяжелом, так и при тяжелом течении).

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

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

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Сведения, полученные по полногеномному исследованию метилирования, а также анализу экспрессии генов в коже среди пациентов с тяжелым течением АтД, могут служить основой для исследований в области фармакогеномики с целью обеспечения персонализированного подхода в разработке и применении новых лекарственных средств (чей механизм, в частности, связан с влиянием на процессы метилирования/деметиличивания).

2. Полученные данные по полногеномному метилированию, а также по экспрессионному анализу могут использоваться для разработки диагностических систем.

3. Комплексный подход, включающий изучение экспрессии генов и цитокиновой продукции в крови, позволяет судить об иммунофенотипе заболевания, что определяет выбор дальнейшей тактики ведения пациента.

4. Атопический дерматит тяжелого течения требует применения системной терапии. С помощью показателей иммунитета (*TLR2*, *TLR9*, *CAMP*, *IL4*, *IL13*) возможно контролировать достижение терапевтического эффекта и его удержания на фоне проводимого лечения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Bystritskaia E.** Epigenetics of toll-like receptors and their role in allergy / E. Bystritskaia, L. Gankovskaya, L. Namazova-Baranova [et al.] // **Clinical & Translational Allergy**. – 2018. – Vol. 8. – № S1. – P. 17. [**WoS, Scopus**]
2. **Bystritskaia E.** The role of Staphylococcus spp. and antimicrobial peptides in atopic dermatitis / O. Svitich, A. Kudryavtseva, K. Neskородova, E. Bystritskaia // **Allergy**. – 2018. – Vol. 73. – № S105. – P. 88-89. [**WoS, Scopus**]
3. **Bystritskaya E. P.** Methylation and expression of TLR2 and TLR4 and their role in asthma / O. A. Svitich, E. P. Bystritskaya, V. A. Gankovskii [et al.] // **Allergy**. – 2019. – Vol. 74. – № S106. – P. 367. [**WoS, Scopus**]
4. **Bystritskaia E.** Methylation of TLRs in atopic dermatitis: Epigenetic regulation / E. Bystritskaia, A. Kudryavtseva, V. Sobolev, O. Svitich // **Allergy**. – 2020. – Vol. 75. – № S109. – P. 466-467. [**WoS, Scopus**]
5. **Быстрицкая Е. П.** Исследование роли β -дефенсина-2 в грудном молоке при атопическом дерматите у детей / Ю. А. Бунина (Богуславская), А. В. Кудрявцева, Е. П. Быстрицкая [и др.] // **Врач**. – 2020. – Т. 31. – № 5. – С. 85-87.
6. **Быстрицкая Е. П.** Association of the NOS3 Gene Polymorphisms with the Risk of Atopic Dermatitis in Children / O. A. Svitich, A. V. Kudryavtseva, E. S. Slyusareva, E. O. Kravtsova, E. A. Meremianina, E. P. Bystritskaya, V. V. Sobolev, A. I. Ryabtsev, A. B. Potapova, V. V. Zverev // **Bulletin of experimental biology and medicine**. – 2020. – Vol. 170. – № 12. – P. 787-790. [**WoS, Scopus, PubMed, Springer**]
7. **Bystritskaya E.** Epigenetic Studies of Atopic Dermatitis / Sobolev V., Bystritskaya E., Svitich O. // **Atopic Dermatitis - Essential Issues** / ed. C. Pereira. – IntechOpen. – 2021. – P. 35-48. ISBN 978-1-83962-723-1. [**WoS, Chemical Abstracts**]
8. **Быстрицкая Е. П.** Анализ метилирования ДНК в пораженной и непораженной коже у взрослых пациентов с атопическим дерматитом / О. Ю. Смолкина, Е. П. Быстрицкая, О. А. Свитич [и др.] // **Молекулярная медицина**. – 2021. – Т. 19. – № 1. – С. 53-64. [**Chemical Abstracts**]
9. **Быстрицкая Е. П.** Полногеномный профиль метилирования ДНК и экспрессия генов TLR2, TLR9, IL4, IL13 при атопическом дерматите у детей и подростков / Е. П. Быстрицкая, Н. Н. Мурашкин, А. И. Материкин [и др.] // **Иммунология**. – 2022. – Т. 43. – № 3. – С. 255-265. [**WoS, Scopus, Chemical Abstracts**]
10. **Быстрицкая Е. П.** Экспрессия генов HBD1 и LL37 при атопическом дерматите у детей и подростков / Е. П. Быстрицкая, Н. Н. Мурашкин, А. И. Материкин [и др.] // **Российский иммунологический журнал**. – 2022. – Т. 25. – № 4. – С. 405-410. [**PubMed**]

11. Быстрицкая Е. П. Профили экспрессии генов факторов врожденного иммунитета у пациентов с атопическим дерматитом / Е. П. Быстрицкая, Н. Н. Мурашкин, О. Ю. Олисова [и др.] // **Медицинская иммунология**. – 2023. – Т. 25. – № 5. – С. 1037-1042. [Scopus]
12. Bystritskaya E. Atopic dermatitis: molecular and epigenetic mechanisms of immunopathogenesis in children / N. Murashkin, O. Svitich, E. Bystritskaya [et al.] // **Pediatric dermatology**. – 2023. – Vol. 40. – P. 86. [WoS, Scopus]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП – антимикробный пептид
АтД – атопический дерматит
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК – комплементарная ДНК
МНК – мононуклеарные клетки
РНК – рибонуклеиновая кислота
CAMP (LL37) – cathelicidin antimicrobial peptide
CXCL – chemokine (C-X-C motif) ligand
FcεR – Fc receptors for IgE
HBD – human β-defensin
IFN – interferon
Ig – immunoglobulin
IL – interleukin
PRR – pattern recognition receptors
SCORAD – Scoring of Atopic Dermatitis
Th – T helper
TLR – Toll-like receptors