

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«КАЗАНСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи



Тюрин Юрий Александрович

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

3.2.7. Аллергология и иммунология

1.5.11. Микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Фассахов Рустэм Салахович

Казань – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА И АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	20
1.1. Генетические факторы, обуславливающие нарушения барьерной функции кожи и слизистой оболочки дыхательных путей при атопическом дерматите и аллергическом рините.....	21
1.2. Современные аспекты патогенеза атопического дерматита и аллергического ринита	26
1.3. Роль микробного триггера (<i>S. aureus</i>) – продуктов его метаболизма и факторов патогенности в патогенезе атопического дерматита и аллергического ринита	31
1.4. Аллергены пыльцы и клещей домашней пыли с протеиназной активностью, значимые при аллергическом рините и атопическом дерматите.....	38
1.5. Особенности иммунопатогенеза при аллергическом рините (респираторной аллергии)	39
1.6. Изменения микробных консорциумов (микробиоты) кожи и слизистых оболочек верхних дыхательных путей как нестерильных биотопов организма человека при формировании аллергического заболевания	43
1.7. Заключение по главе 1	48
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
2.1. Нозологическая структура основной группы исследуемых больных и состав группы сравнения и контроля.....	50
2.2. Иммунологические методы.....	51
2.3. Молекулярно-генетические методы.....	52
2.4. Биохимические и протеомные методы исследования.....	53
2.5. Микробиологические методы исследования кожи и слизистых оболочек верхних дыхательных путей	54

2.6. Биоинформатический анализ.....	59
2.7. Статистические методы анализа.....	59
ГЛАВА 3. ИЗМЕНЕНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ КОЖИ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ.....	61
3.1. Изменения локальной микробиоты кожи у больных атопическим дерматитом.....	61
3.2. Изменения локальной микробиоты слизистой верхних дыхательных путей у больных с респираторной аллергией (аллергический ринит и сочетанная патология аллергический ринит + атопическая бронхиальная астма).....	77
ГЛАВА 4. ПАТОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ STAPHYLOCOCCUS AUREUS ЛОКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ	90
4.1. Протеиназная активность штаммов <i>Staphylococcus aureus</i> , выделенных с кожи и слизистых оболочек у больных атопическим дерматитом и аллергическим ринитом.....	90
4.2. Энтеротоксин-продуцирующая способность изолятов <i>S. aureus</i> , изолированных с кожи и слизистых верхних дыхательных путей у здоровых бактерионосителей и больных аллергическими заболеваниями.....	104
4.3. Отличия в белковом спектре протеома (секретома) штаммов <i>S. aureus</i> , выделенных из состава микробиоты кожи и слизистых верхних дыхательных путей у больных с атопическим дерматитом и аллергическим ринитом.....	106
ГЛАВА 5. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS, КОЛОНИЗИРУЮЩИХ ЛОКАЛЬНЫЕ БИОТОПЫ КОЖИ И СЛИЗИСТЫЕ ОБОЛОЧКИ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ	115

5.1. Особенности драфт генома штамма <i>S. aureus</i> KZ 188, выделенного с локального биотопа кожи ребенка при атопическом дерматите.....	115
5.2. Профиль генов факторов патогенности штаммов <i>Staphylococcus</i> spp., входящих в состав микробиоты кожи и слизистых верхних дыхательных путей у пациентов с аллергическими заболеваниями	118
ГЛАВА 6. ВЫЯВЛЕНИЕ АССОЦИАЦИЙ МЕЖДУ РАСПРОСТРАНЕННОСТЬЮ SNP В ГЕНАХ TLR2-, TLR4-РЕЦЕПТОРОВ И SPINK5 У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ, АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ, С ЦИТОКИНОВЫМ ПРОФИЛЕМ И КОЛОНИЗАЦИЕЙ ЛОКАЛЬНЫХ БИОТОПОВ ЗОЛОТИСТЫМ СТАФИЛОКОККОМ.....	133
6.1. Ассоциация полиморфизмов (Arg753→Gln, rs5743708) TLR2- и (Asp299→Gly, rs4986790) TLR4-рецептора, а также rs2303067 (1258G→A, Glu420→Lys) гена SPINK5 с атопическим дерматитом и стафилококковой колонизацией кожи при этой патологии.....	133
6.2. Цитокиновый профиль у больных атопическим дерматитом с полиморфизмами (SNP) рецепторов TLR2 и TLR4 и гена SPINK5.....	142
6.3. Мукозальный профиль цитокинов и показатели микробной обсемененности слизистой оболочки верхних дыхательных путей у больных с круглогодичным и сезонным аллергическим ринитом	147
6.4. Изучение мукозального уровня маркеров цитокина TLSP и белка YKL-40 в составе назальных секретов верхних дыхательных путей у больных аллергическим ринитом на фоне колонизации локальных биотопов слизистой носа <i>S. aureus</i>	151
ГЛАВА 7. АЛЛЕРГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS, КОЛОНИЗИРУЮЩИХ ВЕРХНИЕ ДЫХАТЕЛЬНЫЕ ПУТИ И КОЖУ БОЛЬНЫХ АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ	155
7.1. Профиль сенсibilизации к бактериальной rSplA-протеиназе <i>S. aureus</i> и другим аллергенам у пациентов с респираторной аллергией (аллергический ринит + атопическая бронхиальная астма)	158

7.2. Профиль сенсибилизации у больных с круглогодичным и сезонным аллергическим ринитом к другим аллергенам и особенности их системного и локального (мукозального) цитокинового профиля.....	164
7.3. Изучение активации базофилов крови термоинактивированной rSplA-протеиназой <i>S. aureus</i> по интенсивности экспрессии CD203c	168
7.4. Изучение цитокинового профиля активации стимулированных рекомбинантной SplA-протеиназой <i>S. aureus</i> культур мононуклеаров периферической крови пациентов с аллергическим ринитом.....	171
7.5. Определение сенсибилизации у больных детей с младенческой и детской формой атопического дерматита к SspA-протеиназе <i>S. aureus</i>	173
ГЛАВА 8. БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ АЛЛЕРГЕНОВ <i>S. AUREUS</i> И КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ <i>DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS</i>, <i>DERMATOPHAGOIDES FARINAE</i>.....	
8.1. Определение гомологов Spl-протеиназы <i>Staphylococcus aureus</i> среди других бактериальных белков, принадлежащих к другим таксономическим группам и алергокомпонентам из различных источников	178
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	187
ВЫВОДЫ	215
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	217
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	218
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	221
ПРИЛОЖЕНИЕ А	267
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	270
ПРИЛОЖЕНИЕ В	271
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	279
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	280
ПРИЛОЖЕНИЕ Е	282
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж	283

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Многочисленные эпидемиологические исследования, изучающие распространение аллергических заболеваний в Российской Федерации и в мире, отражают неуклонный рост количества больных с аллергической патологией, в том числе и среди детской популяции [14, 36, 189, 300]. По эпидемиологическим данным, в Республике Татарстан, в частности в Казани (опросник ISAAC) распространенность аллергической патологии среди детей школьного возраста составила 47,77%, а в 17,33% случаев у детей школьного возраста впервые установлена манифестация симптомов 2–3-х аллергических заболеваний (АЗ); у 4,46% школьников выявлено сочетание атопического дерматита и респираторной аллергической патологии, где на долю атопической бронхиальной астмы (АБА) приходится до 4,87% новых случаев, а сочетание аллергического ринита (АР) и атопической бронхиальной астмы у детей подтверждено в 12,85% случаев [34, 109]. Наряду с высокой частотой распространенности АЗ в современном мире отмечается тенденция к увеличению тяжести течения АЗ и их коморбидности с другими заболеваниями [27, 33].

Существенное влияние на течение АЗ оказывает микробиота, определенные представители которой могут влиять на течение и патогенез аллергической патологии [7, 41, 62, 136].

Аллергические заболевания, при которых выявляется ассоциация со стафилококковой микрофлорой, составляют более половины случаев в структуре всей аллергической патологии, в том числе при аллергодерматозах, а также бронхиальной астме, ринитах и риносинуситах [23, 37]. Отмечено, что частота встречаемости симптомов аллергического ринита у детей, по данным ISAAC, с возрастом ребенка повышается (от 8,5% у детей 6–7 лет до 14,6% у подростков 13–

14 лет), что требует в том числе оценки состояния микробиоты верхних дыхательных путей (ВДП) и возможного влияния микробного фактора на течение и прогноз этой патологии [118].

Микробный состав дыхательных путей в разных возрастных группах был избирательно изучен в ряде исследований, касающихся неаллергической патологии человека, однако состав микробного консорциума ВДП при аллергических ринитах, особенно у детей и подростков, требует изучения, в том числе с исследованием микробиоты в разные периоды заболевания [53, 190].

Значимость бактерий рода *Staphylococcus* spp. в развитии аллергических заболеваний человека была подтверждена многочисленными исследованиями [8, 47, 107, 96, 192]. В этих работах было установлено, что при аллергическом рините, а также при атопическом дерматите (АтД), прежде всего в детском возрасте, формируется устойчивое бактерионосительство *S. aureus*. С учетом того, что частота бактерионосительства *S. aureus* на коже и слизистых оболочках дыхательных путей у лиц без аллергической патологии в среднем составляет от 32,2 до 60,0% [173], можно предположить наличие качественных различий заселяющих кожу и дыхательные пути представителей микрофлоры, между страдающими аллергической патологией и здоровыми индивидуумами.

Необходимость определения биологических особенностей штаммов *S. aureus*, колонизирующих биотопы кожи и слизистых ВДП, с изучением протеома, а также состояния мукозальных механизмов иммунитета ВДП, где происходит колонизация этими штаммами с характерными свойствами, представляет несомненный интерес для понимания феномена бактерионосительства *S. aureus*, актуального при развитии и реализации атопического фенотипа [173].

Выявление этих особенностей поможет в определении ключевых факторов патогенности *S. aureus* и тонких молекулярных механизмов, реализуемых на основе генотипа микроорганизма, которые могут оказывать существенное влияние на патогенез аллергического заболевания. Определение патогенного потенциала и

соответствующего ему генетического профиля штаммов *S. aureus* при бактерионосительстве у пациентов с аллергической патологией позволит оптимизировать выбор лечебных мероприятий, направленных на санацию бактерионосителя с аллергическим заболеванием. Представляется практически важным среди многообразия факторов вирулентности у *S. aureus* выявить те из них, воздействие которых способно оказывать влияние на патогенез и течение аллергического заболевания.

При развитии аллергического заболевания часто происходит расширение спектра аллергенов, вызывающих сенсibilизацию, что вызывает необходимость определения возможной роли при этом процессе определенных продуктов *S. aureus* [7, 24, 120, 218].

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

Степень разработанности темы исследования

Изучение взаимодействия представителей условно-патогенных бактерий, входящих в состав микробиоты слизистых и кожи человека, их влияния на состояние здоровья и отдельные стороны патогенеза соматических и аллергических заболеваний является актуальным направлением современных микробиологических исследований [40, 41, 49, 187]. Получены убедительные доказательства того, что состав микробиоты слизистых и кожи при развитии АЗ претерпевает существенные изменения [40, 46, 54, 286, 380].

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

противоречивы [37, 156, 207]. В отдельных исследованиях, касающихся детей первых трех лет жизни с рецидивирующими приступами бронхиальной обструкции на фоне бронхиальной астмы, установлена четкая зависимость между характером микробиоты слизистых оболочек ВДП и выраженностью сенсibilизации у этих пациентов [266, 306].

Один из представителей локальной микробиоты кожи и слизистых оболочек человека – золотистый стафилококк (*S. aureus*) может вызывать большое многообразие нозологических форм инфекционно-воспалительных заболеваний человека [353]. Показано, что колонизация *S. aureus* может оказывать существенное влияние на особенности течения такой распространенной аллергической патологии у детей, как атопический дерматит, что обусловлено продукцией широкого спектра токсинов [96, 292].

Существенный интерес представляют и «ферменты агрессии» *S. aureus*, в частности протеиназы, способные оказывать значительное влияние на течение атопического дерматита [343, 363]. Описано образование специфических IgE АТ к этим белкам, хотя роль и значение их в патогенезе АЗ изучена недостаточно [171, 343].

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

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Изучить особенности состояния локальной микробиоты кожи и слизистых оболочек верхних дыхательных путей у больных АтД и АР.
2. Изучить молекулярно-генетический профиль штаммов бактерий *S. aureus*, выделенных с кожи и верхних дыхательных путей больных с аллергической патологией.
3. Изучить протеолитическую и токсинообразующую активность штаммов *S. aureus* с биотопа кожи при АтД и ВДП при респираторной аллергии.
4. Исследовать наличие мутаций в генах TLR2-, TLR4-рецепторах и в гене SPINK5, и их связь с колонизацией кожи *S. aureus* у больных АтД.
5. Изучить влияние мутаций в генах TLR2-, TLR4-рецепторов и в гене SPINK5 на профиль цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-17, ИФН- γ , ИЛ-4 у больных atopическим дерматитом.
6. Изучить аллергенность SplA протеиназы *S. aureus* у больных с респираторной аллергией, и сенсibilизацию к глутамилэндопептидазе SspA и энтеротоксинам *S. aureus* у больных atopическим дерматитом.
7. Провести сравнительный анализ гомологичных последовательностей протеиназ (SplA, SspA) *S. aureus* с распространенными респираторными аллергенами.

Научная новизна

Выявлены количественные изменения локальной микрофлоры кожи при АтД и слизистых оболочек ВДП при АР, проявившиеся в увеличении встречаемости условно-патогенных видов – *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Enterobacter* spp., *Moraxella catarrhalis* и снижении комменсальных видов бактерий (коагулаза-отрицательных стафилококков, таких как *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*), *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp. Впервые показано различие локальной

микробиоты слизистых оболочек ВДП при АР в зависимости от проводимой терапии: базисной или патогенетической (АСИТ). Впервые показано увеличение продукции протеиназ и энтеротоксинов у штаммов *S. aureus*, выделяемых с локальных биотопов кожи и слизистых оболочек ВДП у больных с АтД и АР по сравнению со здоровыми бактерионосителями золотистого стафилококка. Впервые показано наличие генов эксфолиативных токсинов у штаммов *S. aureus*, выделяемых с локальных биотопов кожи при АтД и их отсутствие при АР. Впервые показано наличие мутаций (SNP) rs5743708, rs4986790 в генах TLR2-, TLR4-рецепторов, их преобладание при АтД и взаимосвязь с колонизацией кожи золотистым стафилококком (*S. aureus*). Впервые показано, что наличие мутаций rs5743708, rs4986790 в генах TLR2-, TLR4-рецепторов сопровождается преобладанием выработки цитокинов Т2-иммунного ответа. Впервые показано наличие специфических IgE к SplA-протеиназе *S. aureus* у больных АР. Впервые определена гомология первичной последовательности между алергокомпонентами клещей домашней пыли и протеиназами (Spl- и Ssp-оперонов) *S. aureus*. Выявлено, что снижение врожденной иммунной резистентности в синергизме с нарушением состояния барьерных функций кожи и эпителия у больных с АЗ ассоциировано с генетическими мутациями гена SPINK5 и характеризуется высокой степенью бактериальной колонизации локальных биотопов кожи и слизистых ВДП *S. aureus*.

Теоретическая и практическая значимость работы

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

атопических заболеваний. Установлена связь между клинически значимыми мутациями генов, контролирующими формирование эпидермального барьера кожи и слизистых оболочек, и бактерионосительством *S. aureus* у пациентов с аллергическим заболеванием. Выявлены генетические особенности штаммов *S. aureus*, колонизирующие кожу и слизистые ВДП у пациентов с аллергическими заболеваниями, отличающие их от штаммов, колонизирующих эти биотопы у здоровых бактерионосителей. Отличительной генотипической особенностью штаммов *S. aureus*, колонизирующих биотопы органов-мишеней при развитии аллергического заболевания, является накопление генов, кодирующих разнообразные факторы вирулентности. Получены новые данные, которые позволили констатировать, что изменение защитных свойств эпидермального и эпителиального барьеров организма обусловлено как генетическими факторами макроорганизма, способствующими экспансии *S. aureus* на пораженной коже и слизистых дыхательных путей при аллергическом заболевании, так и фенотипическими проявлениями протеолитических свойств «назальных» и «кожных» стафилококков. Открыты общие закономерности изменения структуры микробиоты кожи и слизистых ВДП при развитии аллергического заболевания, согласующиеся с принципом конкурентного вытеснения одной микрофлоры другой. Полученный рекомбинантный фермент rSplA-Strep-tag II в его термоинактивированном состоянии может использоваться в качестве рекомбинантного аллергена *S. aureus* в лабораторных тестах *in vitro* для выявления сенсibilизации к этому белку пациентов с респираторной аллергией и атопическим дерматитом.

Предложен способ детекции генов, кодирующих факторы патогенности бактерий *S. aureus* [59]. Предложены способы определения IgA и IgG-протеиназной активности бактериальных ферментов, которые могут быть использованы в микробиологической практике [55, 57, 58]. Предложенные способы апробированы и могут быть применимы в работе клинико-диагностических, иммунологических и микробиологических лабораторий системы МЗ РФ и Роспотребнадзора. В процессе

выполнения работы были предложены и запатентованы 6 изобретений Российской Федерации в области клинической лабораторной диагностики, иммунологии и биохимии, а также одна база данных [6].

В ФБУН ГНЦ ПМБ в отдел «ГКПМ-Оболенск» депонированы 13 штаммов от бактерионосителей с аллергодерматозами и респираторной аллергией, отличающиеся выраженной Ig-протеиназной активностью и устойчивостью к амоксициллину, пенициллину, эритромицину, цефтриаксону, ко-тримоксазолу, наличием генов (*sspA*, *splB*, *splA*, *entA*, *ssl7*) факторов, обуславливающих патогенный потенциал этих штаммов (Приложение А, Таблица А.1). Один штамм *Staphylococcus aureus* (B-9297) депонирован как изолят, содержащий ген энтеротоксина (Приложение А, Таблица А.1).

В NCBI GenBank аннотирована информация о драфт геномах штаммов *Staphylococcus aureus* KZ 188 (JAGGIM000000000.1), выделенных с кожи при осложненном атопическом дерматите, *S. aureus* KZ 187 (JAIUGC000000000.1), со слизистой носа от пациента с аллергическим ринитом, *S. epidermidis* KZ 197 (JAIUGO000000000.1), с кожи ребенка с атопическим дерматитом (Приложение А, Таблица А.2). В NCBI GenBank также депонированы 8 нуклеотидных последовательностей (MK 268208, MW 345525, MW 345526, MW345527, MW345528, MW345529, MW345530, MW345531) генов токсинов (*entA*, *set11* *ssl7*), протеиназ (*sspA*, *splA*, *splB*), белка системы адгезинов (*isdB*) у изолятов *S. aureus*, выделенных с участков воспаленной кожи и слизистых оболочек ВДП. Эти участки генома могут быть использованы для разработки генно-инженерных подходов для получения рекомбинантных бактериальных аллергенов *S. aureus* для *in vitro* аллергодиагностики.

Методология и методы исследования

Проведен анализ основных трудов отечественных и зарубежных ученых по вопросам, касающимся патогенеза, клинической картины и роли микробиоты и

отдельных ее представителей (грамположительных бактерий и «триггерных» факторов) в иммунопатогенезе аллергического ринита и атопического дерматита.

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

Положения, выносимые на защиту

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

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

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

4. Мутации генов TLR2-, TLR4-рецепторов и гена SPINK5 ассоциируются с увеличением продукции цитокинов T2-иммунного ответа, что может усугублять течение имеющегося аллергического заболевания и способствовать сенсibilизации к другим аллергенам.

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

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

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора

Диссертационное исследование базируется на большом объеме клинико-экспериментальных исследований и результатов с применением современного программного обеспечения для осуществления биоинформационного и статистического анализа данных. Выводы работы обоснованы и отражают цель и задачи исследования. Исследования были осуществлены на сертифицированном оборудовании, с действующими свидетельствами и аттестатами о метрологической поверке. Апробация работы проведена на заседании Ученого совета ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора РФ (протокол № 2 от 04.02.2022).

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

Клинико-лабораторные исследования больных, а также формирование основной и группы сравнения проведены автором совместно с врачами специализированной поликлиники ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора – к.м.н. Решетниковой И. Д., к.м.н. Шарифуллиной А.А., к.м.н. Е. В. Агафоновой. Идентификация микроорганизмов методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) проведена на масс-спектрометре MALDI Biotyper Systems, серии FLEXTM (Bruker Daltonics, Германия) совместно с к.б.н. Тойменцевой А. А. (ИФМиБ, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Минобрнауки России. Секвенирование геномной ДНК *S. aureus* и протеомные исследования проведены совместно с к.б.н. Григорьевой Т.В., к.б.н. Романовой Ю. Д., Васильевым И. Ю. (ИФМиБ, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», НИЛ «Омиксные технологии»).

Материалы диссертационной работы были представлены на следующих восьми российских и международных конференциях и конгрессах: Международная конференция «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций», посвященная 90-летию НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 5-7 июня 2013 г., Санкт-Петербург; научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации», 23-25 апреля 2014 г., Санкт-Петербург; VI Российская научно-практическая конференция, посвященная 200-летию Казанского государственного медицинского университета, 4-5 апреля 2014 г., Казань; Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), 17-21 June 2017, Хельсинки; Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), 26-30 May 2018, Мюнхен; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: Актуальные проблемы и решения», посвященная 100-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И. Н. Блохиной Роспотребнадзора РФ, 11-12 сентября 2019, Нижний Новгород; VI Национальный конгресс бактериологов, 14-16 сентября 2021 г., Казань; Российско-швейцарский

семинар «Аллергические и аутоиммунные заболевания: новые возможности через новые знания», 17 января 2022 г., Казань, Россия – Цюрих, Швейцария.

Внедрение результатов исследования в практику

Алгоритм клинико-иммунологического исследования пациента при аллергическом заболевании и разработанные способы молекулярно-генетических исследований изолятов, выделяемых от больных с atopической патологией, были внедрены в лечебную практику работы специализированной поликлиники инфекционно-аллергических заболеваний ФБУН КНИИЭМ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (акт внедрения от 15.09.2022 г.). Результаты исследований внедрены в образовательный процесс кафедры аллергологии и иммунологии КГМА– филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (акт внедрения от 16.09.2022 г.).

Рекомендации по современным методам идентификации стафилококков, тестирования протеолитических свойств у патогенных штаммов, входящих в состав кожи и слизистых оболочек ВДП, а также молекулярно-генетические методы (ПЦР) детекции генов протеиназ *spi*-и *ssp*-оперона в геноме штаммов *S. aureus*, выделяемых у больных с АД и АР, учтены при разработке региональных методических рекомендаций, утвержденных Министерством здравоохранения Республики Татарстан (РТ) в 2020 г. и внедренных в работу системы здравоохранения РТ.

По результатам работы подготовлены для системы здравоохранения РТ два информационно-методических письма – «Особенности микробиоты кожи человека при аллергической патологии» и «Особенности микробного консорциума слизистых оболочек верхних дыхательных путей человека при аллергической патологии» для использования в профессиональной деятельности врачей аллергологов, педиатров, дерматовенерологов и отоларингологов (утверждены Министерством здравоохранения РТ, 2020 г.).

Соответствие диссертации паспорту научных специальностей

Диссертация соответствует паспорту научных специальностей: 3.2.7. Аллергология и иммунология и 1.5.11. Микробиология (медицинские науки). Соответствие диссертации паспорту научной специальности 3.2.7. Аллергология и иммунология, определяется направлением исследования: п.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». Соответствие диссертации паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология (медицинские науки), определяется областью исследований, а именно: выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов; морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов.

Выполнение работ осуществлялось в рамках научных исследований Федерального бюджетного учреждения науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора в период 2009–2011 гг. в рамках договора с Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 76-Д «Изучение эпидемиологических аспектов и разработка методов диагностики инфекционных, природно-очаговых и аллергических заболеваний, обусловленных условно-патогенными бактериями, грибами и вирусами»; за период 2011–2015 гг. – в рамках отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации»; за период 2016–2020 гг. – согласно отраслевой научно-исследовательской программы «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (АААА-А16-116041110147-1).

Публикации по теме диссертации

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

Объем и структура диссертации

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

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА И АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Исходя из современных исследований аллергических заболеваний необходимо выделить три значимых аспекта, которые оказывают существенное влияние на патогенез и клинические формы атопического дерматита и аллергического ринита.

Первый аспект касается генетической предрасположенности или основы, которая обуславливает дефект барьерной функции кожи и слизистых оболочек ВДП, а значит, будет способствовать преодолению аллергенами естественных барьеров кожи и эпителиальных тканей дыхательных путей и формированию предрасположенности к аллергическому типу иммунного ответа на аллергены [20, 172, 270, 299].

Второй аспект касается особенностей иммунной реактивности у больных с аллергической патологией и специфических реакций на аллергены клеток иммунной системы кожи и слизистых оболочек ВДП в зависимости от эндотипа аллергического заболевания, с характерной генетической предрасположенностью к особенностям иммунного ответа и антимикробной защите слизистых и кожи [5, 22, 108, 309].

Третий аспект, существенно влияющий на патогенез АЗ, – реакция микробиоты покровных тканей и слизистых оболочек ВДП как нестерильных биотопов организма человека, возникающая при формировании аллергического заболевания или атопического фенотипа.

Изменения состава и свойств представителей микробиоты кожи и слизистых оболочек ВДП могут оказывать влияние как на иммунную реактивность, так и на состояние эпидермального и эпителиальных барьеров, усугубляя его несостоятельность, что отражается на клинической картине и тяжести АЗ [21, 100].

Реакция микробиоты, обусловленная как изменением ее состава, так и вовлечением в процесс сенсibilизации компонентами ее обмена и метаболизма, может расширять спектр аллергенов [49], к которым формируется аллергическая реакция у больных с АЗ, являясь основой «атопического марша» [40, 202, 237].

1.1. Генетические факторы, обуславливающие нарушения барьерной функции кожи и слизистой оболочки дыхательных путей при atopическом дерматите и аллергическом рините

Необходимо отметить, что АтД – это хроническое длительно текущее мультифакторное генетически обусловленное воспалительное заболевание кожи, характеризующееся зудом, хроническим рецидивирующим течением, возрастными особенностями локализации и морфологии очагов поражения, с преобладанием в острой фазе заболевания Т2-иммунного ответа, в хронической фазе сменой Т2-иммунного ответа на Т1-иммунный ответ, выраженной гиперреактивностью кожи на различные триггеры окружающей среды [23, 25, 99, 256].

Нарушения кожно-эпидермального барьера (КЭБ) генетически обусловлены, что приводит к повышенной трансэпидермальной потере воды и проникновению аллергенов и микроорганизмов в глубокие слои дермы. Гены, мутации в которых приводят к дисфункции КЭБ, ассоциированы не только с АтД, но также и с респираторной аллергией опосредованным влиянием, представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Гены кандидаты, мутации в которых приводят к дисфункции КЭБ, и их ассоциация с АтД у человека [172]

Ген	Роль в формировании и КЭБ	Функция гена	Связь с АтД	Публикации
FLG	Метаболизм филагтрина (ФЛГ)	Агрегация нитей кератина	Установлена	[233]

Продолжение Таблицы 1

FLG2		Агрегация нитей кератина	Дискутабельна	[267]
PRSS8 (Cap1/Prss8)		Расщепление про-ФЛГ до ФЛГ	Предполагается	[258]
ASPRV1 (SASpase)		Расщепление про-ФЛГ до ФЛГ	Предполагается	[271]
TMEM79	Образование межклеточных липидных ламеллярных пространств	Секреция ламеллярных тел	Предполагается	[326] [328]
KLK7 (калликреин 7)	Процесс десквамации корнеоцитов	Эндогенная сериновая протеиназа	Предполагается	[200]
SPINK5 (LEKTI)	кожи	Ингибитор сериновых протеиназ	Предполагается	[375] [228]

Генетические факторы и мутации в генах филлагрина (ФЛГ) хорошо изучены в патогенезе атопического дерматита. Установлено, что филлагрин и его метаболиты – значимые компоненты для поддержания нормальной функции КЭБ кожи [257]. Мутации в системе ключевых генов, контролирующих метаболизм данного белка (Таблица 1), изменяют барьерную функцию *stratum corneum*, что усиливает поток аллергенов через кожу и способствует трансэпидермальной потере воды [233].

Необходимо отметить еще одну значимую функцию филлагрина в коже – это образование при его протеолитической деградации урокановой (УК) и пирролидинкарбоновой кислот (ПК) [222]. УК является важным поглощающим УФ-излучение хромофором в *stratum corneum* кожи, способствует поддержанию кислого значения pH кожи, что обеспечивает ингибирующее влияние на рост и

колонизацию кожи некоторыми представителями микрофлоры [172]. Кроме того, эта кислота, действуя на ДК, снижает экспрессию костимулирующих молекул и стимулирует ДК к индукции дифференцировки Treg-лимфоцитов [255]. ПК является основным компонентом, удерживающим воду в *stratum corneum* дермы, предотвращая высыхание кожи.

Всего при геномных исследованиях, охвативших европейскую, африканскую, японскую и латиноамериканскую популяцию, был выявлен 31 генетический локус, ассоциированный с развитием атопического дерматита [291, 299].

При АтД отмечено увеличение рН поверхностного слоя кожи, в том числе из-за снижения образования УК из филагрина, вследствие этого повышается активность калликреинов в коже при АтД, что неблагоприятным образом сказывается на барьерной функции *stratum corneum* [317].

Трансэпидермальная потеря воды при АтД, обусловленная мутацией в гене филагрина (FLG), повышает восприимчивость кожи к метаболитам кожной микробиоты и является основой для изменения состава локальной микробиоты кожи при этой патологии, повышающей риск развития *S. aureus*-обусловленной инфекции кожи [141]. В литературе представлены исследования, что нонсенс-мутация в другом гене FLG2 ассоциирована с АтД у больных из африканской популяции Америки [267].

Другой трансмембранный белок Tmem79/Matt, образуемый в коже, участвует в секреции содержимого ламеллярных телец [326]. Миссенс-мутация гена TMEM79 у больных с АтД может лежать в основе нарушения функции ламеллярных телец и изменения свойств межклеточного липидного слоя в эпидермальном слое кожи, что было установлено у больных с АтД [328].

Процесс десквамации корнеоцитов – важная функция поддержания нормального функционирования КЭБ. В поверхностном слое *stratum corneum* кожи постоянно происходит отмирание корнеоцитов. Это явление называется десквамацией, оно является важным процессом поддержания гомеостаза этого слоя

кожи. Десквамация корнеоцитов в основном регулируется протеолитическим каскадом калликреинов (KLK) – родственных пептидаз, таких как KLK5, KLK7 и KLK14 [139, 296]. Калликреины и ингибитор LEKTI накапливаются в пластинчатых телах и секретируются в межклеточное пространство на границе раздела рогового и гранулезного слоев эпидермиса [172]. Активность этих протеиназ зависит от pH кожи, при повышении которого активность калликреиновых пептидаз в *stratum corneum* возрастает. Необходимо отметить, что активность калликреинов находится под регуляторным контролем системы белков – эндогенных ингибиторов протеиназ, включая лимфоэпителиальный ингибитор сериновых протеиназ (LEKTI), который кодируется геном SPINK5 [165]. Калликреины как пептидазы способны активировать PAR2-рецепторы кератиноцитов кожи, что приводит к подавлению секреции ламеллярных тел (снижается активность ферментов метаболизма липидов) и активизирует образование провоспалительных цитокинов ИЛ-1 α , ИЛ-1 β [196].

Генетические полиморфизмы, которые приводят к повышению активности калликреинов, значимы для патогенеза АтД, характеризуются мутациями с усилением активности KLK7 и мутациями, связанными с потерей функции гена SPINK5. Полиморфизм KLK7 (вставка 4bp) впервые описан в Англии у больных с атопическим дерматитом [360].

Одна из мутаций в стоп-кодоне гена SPINK5, который кодирует LEKTI, была описана в связи с тяжелым редким аутосомно-рецессивным аллергическим синдромом Нетертона, характеризующимся поражением кожи у больных носителей этой мутации [167]. В последующем были исследованы другие полиморфизмы гена SPINK5, которые ассоциировались с АтД [228]. В отдельном исследовании выявлен вариант полиморфизма гена SPINK5 rs2303067 (Glu420→Lys, exon 14, 1258: G→A), который значимо ассоциируется с развитием предрасположенности к АтД [365].

Изменения в кожно-эпидермальном барьере способствуют усилению проникновения аллергенов и антигенов, вызывают формирование хронического

воспаления в коже и активацию системного иммунного ответа на аллергены при atopическом дерматите [142].

Респираторная аллергия и, в частности, одно из ее проявлений аллергический ринит являются наиболее распространенной формой заболевания среди неинфекционных ринитов в популяции человека. Распространенность АР в Российской Федерации регистрируется у 10–24%, за рубежом регистрация несколько выше и составляет до 34% [4]. В основе патогенеза аллергического ринита лежит IgE-опосредованное иммунное воспаление слизистой оболочки полости носа (ВДП), вызванное воздействием аллергенов из внешней среды у генетически предрасположенных к этому заболеванию лиц, и характеризуется заложенностью (обструкцией) носа, ринореей, чиханием и зудом в полости носа [29].

Как один из аспектов патогенеза АР, нарушение целостности и функциональности эпителиального барьера слизистой оболочки ВДП, имеет существенное значение в формировании врожденных реакций иммунного ответа при развитии респираторной аллергии [20].

Состояние эпителиального барьера дыхательных путей обусловлено состоянием белков плотного клеточного соединения (Tight junction) – клаудина и окклюдина, а также нарушением экспрессии эпителиальными клетками E-кадгерина при действии ряда факторов. Такими факторами при АР и респираторной патологии выступают аллергены, которые обладают протеолитической активностью – прежде всего это аллергокомпоненты, образуемые микроорганизмами, а также продукты жизнедеятельности клещей домашней пыли (ДП) [49, 198, 219, 224, 354]. Эти факторы способны повреждать белки плотного клеточного соединения и функцию эпителия слизистой оболочки дыхательных путей, а также через PAR2-рецепторный механизм стимулировать их к синтезу TLSP, ИЛ-33, ИЛ-25 и белка S-100 [201].

Незрелые ДК слизистой оболочки ВДП и респираторного тракта при нарушении целостности эпителиального барьера под действием таких хемокинов,

как TLSP, ИЛ-33, ИЛ-25 и белок S100, дополнительно увеличивают экспрессию на своей поверхности молекул OX40L+, CCL17, CCL22, Noth лигандов, а хемокины CCL17, CCL22 привлекают в слизистую оболочку преимущественно CD4⁺Th2-лимфоциты и стимулируют пролиферацию в ней субпопуляций врожденных лимфоидных клеток второго типа (ILC2), при этом активируется выработка ИЛ-5, ИЛ-13 [197].

Также показано, что снижение экспрессии E-кадгерина клетками эпителия слизистой оболочки ВДП приводит к активации дендритных клеток (ДК) [206], запуская начальную фазу нарушения формирования толерантности к ингаляционным аллергенам, что способствует сдвигу иммунного ответа в сторону T-2 ответа. Таким образом, нарушение эпителиального барьера слизистых ВДП закладывает основу формирования T-2-иммунного ответа и изменению иммунной толерантности к ингаляционным аллергенам.

1.2. Современные аспекты патогенеза атопического дерматита и аллергического ринита

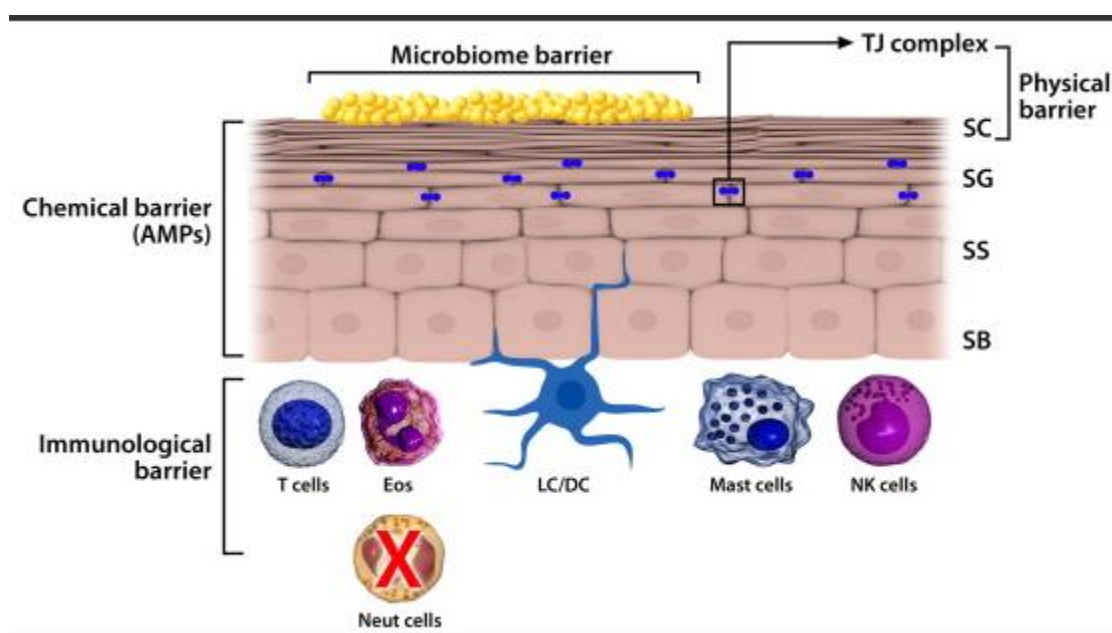
Исходя из современных аспектов патогенеза, необходимо рассмотреть роль компонентов врожденной иммунной системы кожи в формировании хронического воспаления при этом заболевании; роль адаптивного иммунитета, а также роль контактных, пищевых и микробных аллергенов в модуляции аллергического воспаления в коже.

Врожденная иммунная система кожи играет важную роль в регуляции функции кожно-эпидермального барьера наряду с компонентами его локальной микробиоты. Клеточный состав этой системы обусловлен кооперацией кератиноцитов эпидермиса, клеток Лангерганса, субпопуляцией дендритных клеток, меланоцитов, тучных клеток, врожденных лимфоидных клеток (ILC), а также различных субпопуляций T-лимфоцитов кожи [309]. Клетки Лангерганса (Рисунок 1), расположенные в эпидермисе, участвуют в презентации антигена,

относятся к клетками первого иммунного контакта с проникающими через кожу микроорганизмами и их антигенами, в том числе и с поступающими через кожный барьер аллергенами, способны к миграции в дренирующие лимфатические узлы, где стимулируют системные реакции адаптивного иммунного ответа [370]. Экспрессия на клетках Лангерганса, а также кератиноцитах МНС II класса обеспечивает взаимодействие их с Т-лимфоцитами.

«Химический» защитный барьер, как часть кожного барьера, представлен спектром антимикробных пептидов (АМП) и ферментов, в основном продуцируемых кератиноцитами. Ферменты с антимикробной активностью, обнаруживаемые в коже человека, включают лизоцим, РНК-азы и белки семейства S-100 протеинов [131]. Важнейшими АМП кожи человека являются β -дефензины (hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4), а β -дефензин кателицидин LL-37 представляет собой небольшой катионный (заряжен положительно) пептид с молекулярной массой от 4,0 до 5,0 кДа и характерным набором из трех дисульфидных связей [38]. Пептид LL-37 является единственным представителем кателицидинов, образуемых в коже человека [273]. Активная форма АМП LL-37 генерируется из молекулы предшественника hCAP18 путем избирательного протеолиза и состоит из 37 аминокислот с двумя лейциновыми остатками на N-конце. Данная активная форма АМП характеризуется широким спектром антимикробной активности против бактерий [372]. Экспрессия АМП кератиноцитами регулируется с помощью различных механизмов. Показано, что hBD-1 экспрессируется в эпителии, а синтез таких АМП, как hBD-2, hBD-3 и LL-37 индуцируется при развитии воспаления в ответ на микробные антигены микробиоты кожи [181]. Активация синтеза дефензинов в клетках кожи происходит под действием цитокинов семейства ИЛ-1 [352]. Основная роль АМП кожи состоит в разрушении микроорганизмов путем ферментативной деградации бактериальной клеточной стенки, а также эти молекулы оказывают иммуномодулирующее действие и могут взаимодействовать с Toll-подобными рецепторами (TLR). Для LL-37 и hBD установлен хемотаксический эффект на моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы и Т-

лимфоциты.



Кожный барьер состоит из микробиоты (микробиомный барьер); физического, «химического» и иммунного барьеров в норме. SC (stratum corneum) – первый защитный барьер, при нарушении этого барьера TJ-комплекс, находящийся на уровне гранулезного слоя (SG), обеспечивает дополнительный барьер. При разрушении барьеров SC и SG происходит контакт аллергенов, микробных лигандов с клетками Лангерганса (LC) или ДК. Синтез кератиноцитами АМП формирует т.н. «химический» барьер. Локальная микробиота, формирующая т.н. «микробиомный барьер», регулирует локальные врожденные и адаптивные иммунные реакции. «Иммунный барьер» образован Т-лимфоцитами, ДК или клетками Лангерганса, нейтрофилами, эозинофилами, НК-клетками и тучными клетками или базофилами. PRRs-рецепторы регулируют функцию всех этих барьеров [242].

Рисунок 1– Организация кожного барьера

Локальная врожденная иммунная система кожи формирует быструю реакцию в ответ на нарушение целостности кожного барьера и обеспечивает активацию клеток иммунной системы на стимулы, поступающие от микрофлоры. Эта система обеспечивает формирование первой линии антимикробной защиты, направленной на микроорганизмы. Необходимо отметить, что у больных АД врожденная иммунная система кожи функционирует неполноценно из-за

нарушения целостности эпидермального барьера кожи и дисфункции иммунного ответа.

Кератиноциты экспрессируют группу рецепторов врожденного иммунитета, т.н. PRR-рецепторы, которые позволяют им распознавать сигналы от компонентов микробиоты и соединений, возникающих при повреждении кожного барьера, и через этот рецепторный механизм запускать каскад реакций синтеза и секреции цитокинов, хемокинов и АМП.

К группе PRR-рецепторов относят внутриклеточные и внеклеточные Toll-подобные рецепторы (TLR). Воздействие агонистов этих TLR-рецепторов, образуемых микробиотой кожи, способно активировать этот путь сигнализации и поддерживать развитие воспалительной реакции в коже, что также характерно для больных АД.

Кератиноциты кожи человека экспрессируют функциональные TLR1, TLR2, TLR3, TLR5 и TLR6-рецепторы [130, 235], а в некоторых случаях и TLR4, TLR7, TLR9 и TLR10 [252]. Показано, что TLR2-рецепторный механизм в коже способствует сохранению прочности межклеточных Tight junction комплексов эпидермиса и ограничивает проникновение поверхностных микробных антигенов [377].

Рецепторы TLR2 и TLR4 экспрессируются не только на кератиноцитах кожи, но и на клетках «иммунного» барьера кожи (макрофаги, ДК, клетки Лангерганса) [130, 226]. Провоспалительные реакции, индуцированные Toll-подобными рецепторами, формируют первую защитную реакцию организма, которая обеспечивает нейтрализацию микробного фактора и способствует репарации тканей, восстановлению иммунного гомеостаза [188, 226, 274]. Через TLR4- и TLR2-рецепторный механизм активизируется синтез АМП кожи под действием агонистов, являющихся метаболитами микробиоты кожи, например через пептидогликаны *S. epidermidis* [245, 253]. Генетически обусловленные дефекты (мутации в виде различных SNP) TLR-рецепторных белков потенциально могут затрагивать данный механизм врожденной защиты барьеров кожи. В ряде

исследований показано, что генетические полиморфизмы (SNP) генов TLR2-рецептора (Arg753→Gln, rs5743708) и TLR4-рецептора (Asp299→Gly, rs4986790) ассоциированы со снижением активации иммунокомпетентных клеток такими лигандами, как бактериальными липополисахаридами (ЛПС), пептидами, что может приводить к повышенному риску формирования септических инфекций (вызванных гноеродной стафилококковой микрофлорой кожи и слизистых оболочек) у носителей данных SNP [119, 265]. Показано, что при SNP rs5743708 (Arg753→Gln) TLR2-рецептора нарушается активационный каскад реакций, направленных на синтез провоспалительных Th1-цитокинов (интерферон-индуцибельного белка 10, ИЛ-8, ИЛ-1 β , TNF- α), необходимых для эффективной элиминации *S. aureus*, который способен колонизировать глубокие слои дермы [280]. В других исследованиях установлено, что генетический полиморфизм (SNP) rs4986790 гена TLR4-рецептора ассоциирован с риском развития бронхиальной астмы раннего начала и дефицитом локального мукозального (эндобронхиального) иммунитета дыхательных путей [13, 351].

Значимую роль в формировании T2-иммунного ответа (аллергический тип реакций) в коже принадлежит TLSP цитокину [264]. Клеточный цитокин кератиноцитов кожи (механического барьерного слоя) TSLP экспрессируется также в легочной ткани, эпителии ВДП и кишечнике [379]. Синтез этого цитокина активизируется при нарушении целостности эпидермального кожного барьера и активации иммунного барьера кожи. При АД образующий кератиноцитами кожи TLSP в синергизме с цитокинами ИЛ-25, ИЛ-33, ГМ-КСФ способствует активации врожденных лимфоидных клеток кожи второго типа (ILC-2) и CD4⁺ Th2-лимфоцитов, формируя T2-иммунный ответ на антигены/аллергены, поступающие через измененный кожный барьер, также данный цитокин стимулирует синтез ИЛ-4, ИЛ-5 [230, 231]. При атопическом дерматите воспаление в коже характеризуется высокой экспрессией цитокинов T2-иммунного ответа, таких как ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12В, ИЛ-13, ИЛ-23, ИЛ-29, а также ИФН- γ , трансформирующий фактор роста бета (ТФР- β), что было показано в нескольких исследованиях [22, 72].

Установлены эффекты локальных провоспалительных T2-цитокинов на метаболизм филлагрина в коже. Показано, что ИЛ-4, ИЛ-13 подавляют экспрессию не только ФЛГ и кератинов, но и лорикрина, инволюкрина и молекул межклеточной адгезии (десмоглеины, ZO-1), а также керамидных липидов. ИЛ-31, еще один цитокин T2-иммунного ответа, также снижает экспрессию ФЛГ [159]. Более того, одно из исследований показало, что ИЛ-33 и алармин, который в избытке содержится в кератиноцитах, также способен снижать экспрессию ФЛГ [332].

В патогенезе АтД существенную роль играет то обстоятельство, что локальная хроническая воспалительная реакция в коже со временем приводит к активации системного иммунитета с формированием у больных АтД со среднетяжелой и тяжелой формами заболевания циркулирующих в периферической крови активированных T-лимфоцитов. Показано, что при АтД определяется длительная системная активация субпопуляций лимфоцитов центральной и эффекторной памяти – T_{cm} ($CCR7^+CD45RO^+$) и T_{em} ($CCR7^-CD45RO^+$), а также выявлены высокие уровни среднесрочной и долгосрочной активации циркулирующих субпопуляций T-клеток памяти (CLA^+). Такая патологическая активация T-лимфоцитов обуславливает развитие эпизодов обострения заболевания [163].

1.3. Роль микробного триггера (*S. aureus*) – продуктов его метаболизма и факторов патогенности в патогенезе атопического дерматита и аллергического ринита

Патогенность *S. aureus*, значимого представителя микробиоты кожи, – переменное свойство этой бактерии и обусловлено многочисленным арсеналом факторов патогенности, которые характерны для этого вида стафилококков [10, 75, 124]. В данной части обзора представлено краткое резюме о факторах этого вида стафилококка, которые прежде всего воздействуют на барьерную функцию кожи и

слизистых оболочек, вызывая дисфункцию кожно-эпителиального барьера и врожденных иммунных механизмов антимикробной защиты этих органов [112, 137, 269].

При АтД формируется снижение устойчивости к кожным инфекциям, вызванным бактериальной (гноеродной), грибковой и вирусной микрофлорой [66, 67]. С золотистым стафилококком и тем широким набором факторов вирулентности, которые присущи бактериям этого вида, связано развитие инфекционных осложнений у больных АтД, а выраженность колонизации кожи бактериями этого вида существенно влияет на тяжесть заболевания, особенно у детей с дебютом АтД [96, 350].

Выявленные разные иммунные реакции на метаболиты штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* у больных АтД [215, 279], а также показана способность *S. aureus* активировать систему комплемента на поверхности кератиноцитов [114]. Штаммы *S. aureus* способствуют сохранению дисбаланса между Т1- и Т2-иммунным ответом у больных АтД. В ряде работ подчеркиваются важные отличия штаммов *S. aureus*, выделенных от больных АтД, от штаммов *S. aureus* другого происхождения, что требует дальнейшего исследования этих штаммов и определения характерных клональных штаммовых линий бактерий этого вида с характерным профилем вирулентности [202]. Так, в некоторых исследованиях, проведенных в Англии, установлено, что клональная генетическая линия СС1 штаммов *S. aureus* чаще выделялась с кожи больных АтД, тогда как штаммы генетической линии СС30 регистрировались у здоровых бактерионосителей этого вида [202].

В составе протеома *S. aureus* идентифицированы разные по направленности действия ферменты и токсины, отнесенные по современной классификации к факторам патогенности бактерий этого вида [112, 269]. На современном этапе изучению этих микробных факторов способствуют «протеомные» технологии и лежащие в их основе методы анализа экспрессии белков, образуемых бактериальной клеткой. Применение технологий и методов протеомного анализа в исследовании белков *S. aureus* началось в 2000-х годах, когда японские

исследователи определили последовательность генома двух устойчивых к метициллину штаммов *S. aureus* (MRSA N315 и Mu50) и впоследствии были открыты несколько разных клональных линий MRSA-штаммов. В последующем были разработаны исчерпывающие базы данных о факторах патогенности разных условно-патогенных и патогенных для человека бактериальных видов, включая *S. aureus*. Протеомный анализ на основе «гелевых» подходов применим для анализа ферментов и токсинов, получения качественных и количественных данных с целью исследования смешанных бактериальных культур, изучения взаимодействия микроорганизмов в составе микробных сообществ [261]. Метод 2D-DIGE – электрофореза белков, в отличие от 2D-PAGE электрофореза, характеризуется применением различных флуоресцентных красителей, которые избирательно связываются с остатками лизина в молекуле белков, позволяя анализировать в одной пробе протеом 2–3-х образцов, полученных из разных бактериальных штаммов, где они могут быть визуализированы и проанализированы отдельно, используя преимущество отчетливого возбуждения и эмиссионных свойств флуоресцентных красителей [268].

Протеолитические ферменты и токсины S. aureus

Необходимо отметить, что патогенный потенциал *S. aureus* может существенно различаться у разных штаммов бактерий этого вида вследствие наличия или отсутствия мобильных генетических элементов, содержащих гены, кодирующие факторы вирулентности.

В составе генома *S. aureus* может быть представлено разное количество закодированных факторов вирулентности: факторы агглютинации А и В (ClfA, ClfB); поверхностные белки, связанные с колонизацией, такие как фактор слипания В и поверхностные белки G и X (SasG, SasX); белок, связанный с формированием биопленок (Var); фибронектин-связывающие белки А и В (FnBPA, FnBPB); коллаген-связывающий белок (Cna) [67]; SdrD, поверхностный белок группы MSCRAMMs, взаимодействующий с десмоглеином-1 и необходимый для интернализации клеток [121]; железо-регулируемые поверхностные детерминанты

А и В (Isd A, Isd B) [359]; плазмакоагулаза (Coa); белок А (Sra); внутриклеточные адгезины оперонов *ica* (*icaA*, *icaB*, *icaC* и *icaD*) [67]; факторы ускользания от иммунного надзора, такие как стафилокиназа (ген *sak*), обладающая фибринолитической активностью, ингибитор активации комплемента, блокирующий конвертазу C3 (ген *scn*), ингибитор хемотаксиса лейкоцитов (ген *chr*); фенолорастворимые модулины (PSM), приводящие к дезинтеграции мембраны; энтеротоксины (SE); эксфолиативные токсины А и В (ETA, ETB); лейкоцидин Пантон – Валентайна (PVL) и лейкоцидин ED (LukED); гемолизины (α , β и γ) и токсин синдрома токсического шока (TSST-1) [67, 134, 303].

Ключевая роль во взаимодействии с кератиноцитами и эпителиальными клетками штаммов *S. aureus* связана с белками его клеточной стенки, такими как ClfA, FnBP, Atl и SdrD. Посредством этих белков осуществляется адгезия и интернализация в кератиноциты через соответствующие клеточные рецепторы человека (аннексин-2, Hsp 69, интегрин $\alpha 5\beta 1$, Hsc70, десмоглеин-1) [279]. Поверхностный белок А (Protein A) *S. aureus* способен активировать синтез провоспалительных цитокинов, взаимодействуя с такими рецепторами, как R1 TNF на макрофагах. Во время интернализации *S. aureus*, попадая в эпителиальные клетки через фибронектин-связывающий белок (FnBP), взаимодействует с интегрином $\alpha 5\beta 1$ эпителиальных клеток [182]. Необходимо отметить, что экспрессия фибронектина в верхнем слое эпидермиса кожи больных АД выше, чем у здоровых лиц, что позволяет предположить его роль в колонизации локальных биотопов кожи штаммами *S. aureus* [153].

Из разнообразных токсинов, образуемых представителями этого вида, отдельные штаммы *S. aureus* способны продуцировать целый набор энтеротоксинов (суперантигенов) [105]. Описано более 23 стафилококковых суперантигенов, в частности TSST, стафилококковые энтеротоксины (от SEA до SEE, от SEG до SEJ, от SEL до SEQ и от SER до SET), а также 11 стафилококковых суперантиген-подобных токсинов (SSL-белки), кодируемых 11-ю генами *ssl*. Суперантигены действуют системно, обладают способностью инициировать

массивную неспецифическую активацию Т-клеток, приводящую к выбросу провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИФН- γ и ФНО и др.) [105].

Учитывая важность протеиназной активности аллергенов, в отдельных работах были изучены эффекты сериновых протеиназ *S. aureus* при респираторной аллергии [343]. В качестве таких стафилококковых белков исследованы Spl-протеиназы *S. aureus* [341], для которых на животной экспериментальной модели показаны потенциальные аллергенные свойства, т.е. способность индуцировать синтез IgE и продукцию цитокинов Т2-иммунного ответа [343].

Показано прямое воздействие протеолитических ферментов микроорганизмов на барьерные функции эпидермиса кожи и эпителия слизистых оболочек, которое приводит к ослаблению защитной роли кожи и слизистых от проникновения аллергенов и микробных токсинов, что может выступать дополнительным механизмом в патогенезе аллергической патологии [80, 210, 322]. «Протеазы *S. aureus* способны расщеплять кателицидины; так, например, ауреолизин обеспечивает инактивацию LL-37 в тканях, инфицированных стафилококками» [95]. «Основной функцией кателицидина кожи у человека является обеспечение врожденной иммунной защиты от бактериальных инфекций, вызванных грамположительной бактериальной микрофлорой (*S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*)».

Эти ферменты способны также нарушить целостность эпидермального барьера кожи, действуя через PAR2-рецепторы кератиноцитов, способствуя снижению секреции ламеллярных телец. PAR2-рецепторы относятся к белковым рецепторам, сопряженным с G-белками, и активируются протеиназами [199, 318]. Различные контактные аллергены (в эту группу входят и белки микроорганизмов) в настоящее время рассматриваются в качестве важных факторов в манифестации и обострении АтД [316]. Установлено, что контактные аллергены, наиболее значимые в патогенезе некоторых форм АтД, аллергического ринита, бронхиальной астмы, выделенные из клещей домашней пыли, тараканов, обладают выраженной протеолитической активностью и по физико-химическим свойствам

относятся к протеиназам серинового и цистеинового типа [254]. Активация экзогенными и эндогенными протеолитическими ферментами PAR2-рецепторов на кератиноцитах и эндотелиальных клетках микрососудов кожи приводит к усилению местной продукции медиаторов воспаления, в том числе стимулирующих выраженный зуд кожи [254]. Несколько дополнительных исследований показали, что активация PAR2-рецепторов на кератиноцитах приводит к увеличению секреции ИЛ-6, ИЛ-8, а также ГМ-КСФ [312]. Установлена роль PAR2-рецепторного сигнального пути в повышении активности CD4+Th2 лимфоцитов, формирующих развитие реакций немедленного типа [318].

По типу активного центра протеиназы образуемые *S. aureus* относят к трем каталитическим типам протеолитических ферментов: сериновым, цистеиновым (тиоловым) и металлопротеазам [63]. К группе сериновых протеиназ относят сериновую протеиназу SspA или глутамилэндопептидазу золотистого стафилококка (V8-протеаза *S. aureus*) [93], а также ферменты с пептидазной активностью (от SplA- до SplF-протеиназы) и известные эксфолиативные токсины стафилококка (ETA, ETB, ETD). Сериновые протеазы (от SplA до SplF) *S. aureus* относятся к «конститутивным» ферментам, их роль в вирулентности изучена недостаточно, секретируются в позднюю экспоненциальную и раннюю стационарную фазы роста культуры на питательных средах [63]. Глутамилэндопептидаза V-8 протеаза (SspA-протеиназа) выделяется микробной клеткой в виде профермента, который при участии ауреолизина, путем протеолитической модификации, конвертируется в активный фермент. Специфическими субстратами данного фермента являются гликопротеины плазмы крови человека, такие как иммуноглобулины всех классов, а также секреторный SC-пептид молекулы sIgA [18]. К группе металлопротеиназ *S. aureus* относят хорошо изученный фермент – ауреолизин [357]. Показана значимая роль этого протеолитического фермента *S. aureus* в процессе выживания штаммов бактерий этого вида в лизосомах макрофагов [239].

К тиоловым протеиназам стафилококка относят стафопаины А, В (ScpA,

SspB, К.Ф. 3.4.22.48), относящиеся к семейству SA, C47 протеиназ. Специфические субстраты стафопаинов (SspB) представляют собой небольшие белковые молекулы, а также некоторые рецепторные белки (CD31, CD11b) лейкоцитов периферической крови (нейтрофилов, моноцитов) [339].

За последние 10 лет внимание исследователей было сосредоточено на более глубоких механизмах воздействия этих ферментов на иммунную систему, в частности на фагоцитирующие клетки иммунной системы, клеточные рецепторы и цитокины. «Иммунокомпетентные клетки, составляющие иммунную систему, взаимодействуют посредством химических сигналов, состоящих из небольших белковых молекул, называемых цитокинами. Эффекты, оказываемые бактериальными ферментами на цитокины, – важный фактор реализации их вирулентности» [78].

Синтез и экспрессия секретлируемых протеолитических ферментов, необходимых для роста и выживания стафилококков, находятся под генетическим контролем [292]. Гены, кодирующие секретлируемые протеазы золотистого стафилококка, организованы на бактериальной хромосоме в виде отдельных оперонов: *ssp*-оперон, который содержит ген сериновой протеазы стафилококка (SspA, V8-protease), ген стафопаина B (тиоловая протеаза, SspB) и ген стафостатина (SspC) – белка ингибитора стафопаина B. В *ssp*-опероне локализованы гены, кодирующие сериновые протеазы, а экспрессия считывания начинается с *sspA*-, *sspB*-, *sspC* генов, в результате образуется полицистронная мРНК, в которой закодированы все три белка. Необходимо отметить, что роль закодированных протеолитических ферментов данного оперона в биологии золотистого стафилококка изучена недостаточно. В *ssp*-опероне содержатся два гена, кодирующих стафостатин A (ScpB), – ингибитор стафопаина A и стафопаин A (ScpA); в *spl*-опероне содержатся 6 генов, кодирующих белки, относящиеся к сериновым протеазам (SplA, B, C, D, E, F). Распределение генов *spl*-оперона в клинических штаммах *S. aureus*, выделенных при инфекционно-воспалительных заболеваниях, отличается вариабельностью [240]. Большинство штаммов *S. aureus*

содержат ген *aug*, кодирующий этот фермент [378]. Необходимо отметить, что исследования встречаемости в геноме бактерий *S. aureus* генов, кодирующих протеиназы, и их роль в реализации патогенного потенциала штамма и его аллергенности у бактерионосителей с аллергическим заболеванием фактически не изучены.

1.4. Аллергены пыльцы и клещей домашней пыли с протеиназной активностью, значимые при аллергическом рините и атопическом дерматите

Аллергены с протеиназной активностью могут через активацию PAR2-рецепторов стимулировать эпителиальные клетки, секретировать цитокин TSLP. Роль TSLP многообразна, в том числе он индуцирует врожденные иммунные реакции ДК [249, 276, 318]. Протеиназной активностью ферментов серинового и тиолового типа обладают причинно-значимые при АР пыльцевые аллергены березы, амброзии (*Amb a 11*), мятлика, райграса и клещей ДП (*Dermatophagoides pterysinus*, *Dermatophagoides farinea*) [213].

Аллергены клещей ДП способны расщеплять TJ-комплекс, воздействуя на белок окклюдин, а затем индуцировать внутриклеточный протеолиз ZO-1. Деградация белков TJ-комплекса и нарушение целостности эпителиального барьера – фактор, повышающий риск аллергической реакции и сенсibilизации к вторичным аллергенам [366]. Установлено, что алергокомпонент *Der p 1* (цистеиновая протеиназа) фекальных белков клещей ДП расщепляет TJ-комплекс, повреждая эпителиальный барьер и способствуя интенсивному контакту ДК «иммунного» барьера эпителия с аллергенами; такими же свойствам обладают и сериновые протеиназы, например *Der f 6* – алергокомпоненты фекального комплекса белков клещей ДП [376].

1.5. Особенности иммунопатогенеза при аллергическом рините (респираторной аллергии)

При действии аллергена и активации или повреждении эпителиальных клеток слизистой оболочки ВДП (носовой полости) они секретируют значимые количества цитокинов TSLP, ИЛ-33, ИЛ-25, которые воздействуют на врожденные лимфоидные клетки 2-го типа (ILC2) и CD4⁺Th2-лимфоциты напрямую или через АПК (Рисунок 2) [152]. Врожденные лимфоидные клетки 2-го типа (ILC2) – особый тип лимфоцитов, локализованных на слизистых оболочках дыхательных путей, которые опосредует иммунный ответ 2-го типа [128, 262].

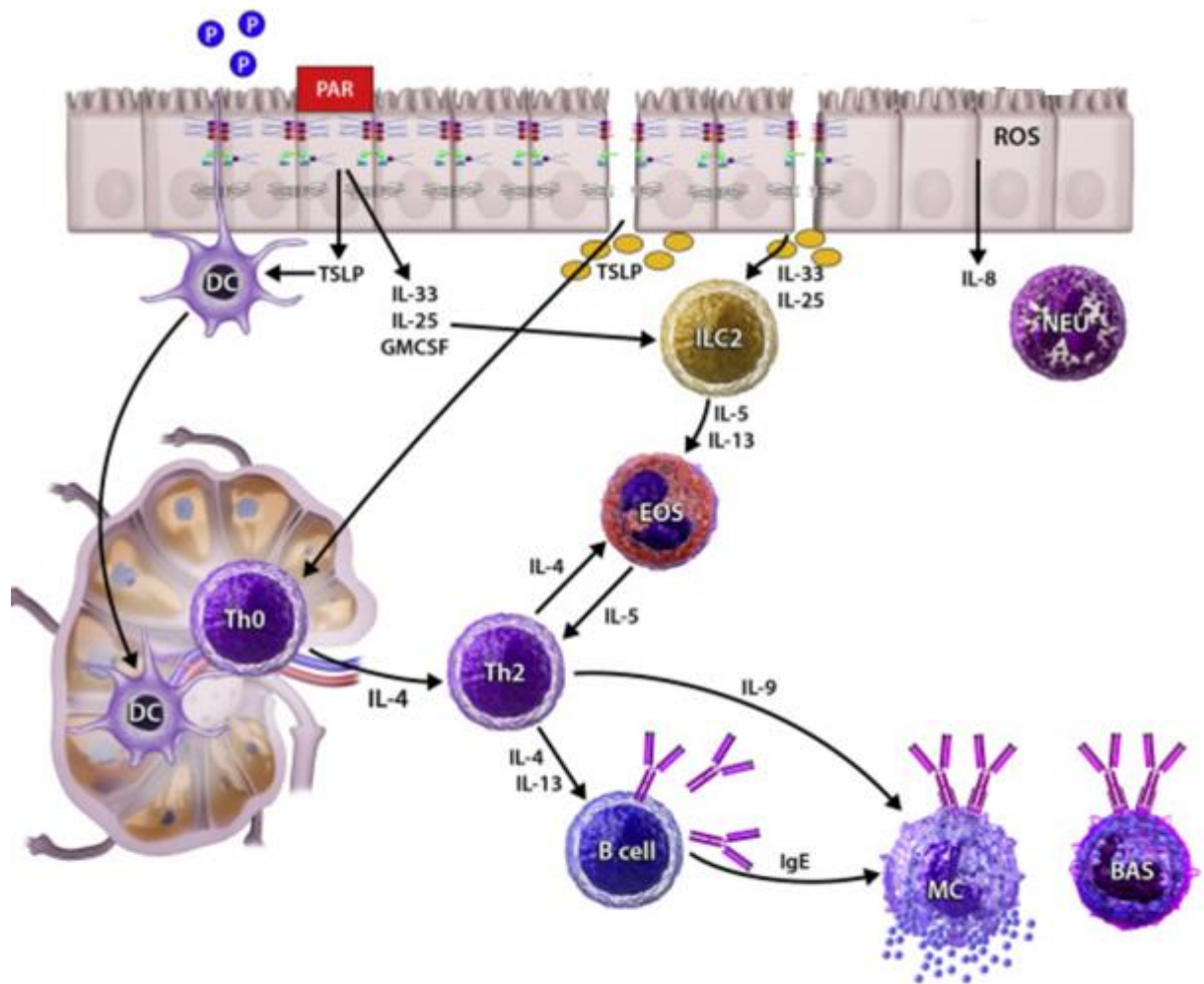


Рисунок 2 – Активация эпителиальных клеток и формирование Т-2 иммунного ответа при действии аллергенов с протеиназной активностью; P – протеиназы (пептидазы), PAR2-рецепторы [представлено из работы 152]

Антигенпрезентирующие клетки (АПК), которые включают незрелые дендритные клетки (экспрессируют CD1a+, CD11c+) и макрофаги захватывают аллергены, созревают и мигрируют в дренирующие лимфатические узлы, где они представляют обработанный аллерген наивным Т-лимфоцитам (CCR7), которые впоследствии поляризуются в CD4+Th2-клетки (CCR4) [198]. Цитокин TSLP является также стимулятором пролиферации наивных Т-клеток (CCR7+) и их прайминга в Th2-фенотип. Активированные аллергеном CD4+Th2-клетки выделяют ИЛ-4, который поддерживает линию Th2-клеток и рекрутирует больше Т-хелперных лимфоцитов в эту популяцию. Кроме этого, при респираторной аллергии и развитии воспалительной Th2-иммунной реакции увеличивается экспрессия не только цитокинов, но и ферментов. Показано, что при формировании респираторной аллергии у больных увеличивалась экспрессия хитиназ, а также хитиназоподобных белков как маркеров активации иммунных реакций [42].

Отмечена также активация синтеза цитокинов у больных с АР, таких как TSLP, ИЛ-33, ИЛ-25, которые способны запускать активацию популяции локальных врожденных лимфоидных клеток 2-го типа (Innate Lymphoid Cells 2, ILC2) в слизистой оболочке ВДП, которые экспрессируют CD294+ (CRTN2), CD127+ (рецептор интерлейкина 7) и ST-2 рецептор для ИЛ-33 (Рисунок 2) [152, 288]. Популяция врожденных лимфоидных клеток 2-го типа (ILC2), локализованная в слизистой оболочке, способна под действием ИЛ-25 секретировать ИЛ-13, который индуцирует Th2-ответ с привлечением в ткани слизистой оболочки эозинофилов, и обеспечивает переключение В-клеток на синтез IgE [16]. Необходимо отметить, что секретируемый ИЛ-33 вовлечен в дифференцировку наивных Th0-клеток в CD4+Th2-лимфоциты по ИЛ-4-независимому механизму, при этом Th2-клетки, поляризованные под действием данного цитокина, способны продуцировать ИЛ-5, ИЛ-13 (по GATA3-, STAT6- и ИЛ-4-независимому механизму) [19]. Экспрессия CD294+ рецептора на ILC2 способствует рекрутингу и активации базофилов, эозинофилов, CD4+Th2-клеток в слизистую оболочку при повреждении эпителиальных барьеров аллергенами с

протеолитической активностью [152, 243]. Установлено, что ILC2, выделяя ИЛ-13, могут поляризовать наивные Th0-клетки в Th2-клетки [198]. Необходимо отметить, что активированные CD4⁺Th2-клетки, экспрессирующие CD40L, CCR4, и транскрипционные факторы Th2-фенотипа STAT-6 и GATA-3, преобладают у больных при АР по сравнению со здоровыми лицами, и эти клетки начинают активно выделять ИЛ-13, который в синергизме с ИЛ-4, действуя через общую рецепторную субъединицу (IL-4R α -цепь), способствует переключению синтеза на IgE в В-лимфоцитах и увеличению локальной концентрации этого гликопротеина (Рисунок 2) [174, 335].

Образующиеся молекулы антител IgE связываются с высокоаффинным рецептором (Fc ϵ RI) на мембранах тучных клеток, базофилов, ДК и сенсibiliзируют эти клетки к аллергенам [192].

При повторном воздействии аллергена и его интенсивном поступлении (на фоне нарушенного эпителиального барьера) запускается процесс перекрестного связывания IgE с Fc ϵ RI на ДК, что облегчает поглощение аллергена этими клетками для обработки и презентации. Взаимодействие молекул IgE-Fc ϵ RI и аллергена на тучных клетках, базофилах формирует развитие классической локальной аллергической реакции (ранняя фаза) с характерными для аллергического ринита симптомами. В последующем назальная экспозиция аллергена при АР вызывает эозинофилию слизистой оболочки носа, что регистрируется при проведении цитологического исследования назального секрета.

Регуляторные T_{reg} CD4⁺CD25⁺-клетки представляют собой отдельный подтип Т-лимфоцитов, которые снижают активность клеток локальной иммунной системы посредством секреции иммуносупрессорных цитокинов ИЛ-10, ТФР- β . Естественные T_{reg} CD4⁺CD25⁺ экспрессируют CD25⁺ и фактор транскрипции Foxp3, активно секретируют цитокины ИЛ-10, ТФР- β , которые опосредуют эффекты на ДК, формируя толерантность к антигенам [35, 297, 324]. Установлено, что у лиц с АР в слизистой оболочке носа преобладают CD4⁺Th2-аллерген-специфические ИЛ-4, секретирующие лимфоциты, над CD4⁺CD25⁺ Treg-лимфоцитами [35, 69]; также

отмечено значительное увеличение ДК, экспрессирующих рецепторы к TSLP, и снижено количество ДК, экспрессирующих ИЛ-10 [301]. Эти данные свидетельствуют о том, что у больных АР возникает выраженный дисбаланс иммунного гомеостаза, что может приводить к формированию Т2-иммунного ответа и потенциально активируется аутоиммунный ответ.

Формированию дисбиоза локальной микрофлоры слизистой оболочки ВДП у больных АР также способствует снижение экспрессии эпителием защитных антимикробных факторов – АМП – под действием локальных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5 и медиаторов аллергического воспаления (гистамина) [15, 32].

При АР выделяют раннюю и позднюю фазы аллергической воспалительной реакции. У части пациентов впоследствии развивается поздняя фаза воспалительной реакции. В ранней фазе при контакте с аллергенами при АР у сенсibilизированных больных в течение первых нескольких минут формируются такие симптомы, как чихание и зуд, ринорея и заложенность носа, которые подвергаются обратному развитию в течение нескольких часов. Иммунологически эта реакция обусловлена «сшиванием» комплексов аллергена и IgE с FcεRI (рецептором) на мембране тучных клеток и базофилов, что приводит к дегрануляции и высвобождению медиаторов – гистамина, триптазы и образующихся de novo лейкотриенов и простагландина (ПГ) D2 [161]. Гистамин вызывает зуд и, действуя на сенсорные нервные окончания, приводит к приступу чихания. Эффекты лейкотриенов и ПГ D2 обуславливают сосудистые эффекты и увеличение секреции слизи, способствуя появлению заложенности носа [154].

Особенности поздней фазы аллергической реакции при АР

Основными симптомами поздней фазы являются заложенность носа и нарушение носового дыхания. Медиаторы, высвобождающиеся во время поздней фазы аллергической реакции, такие как гистамин, ПГ D2 и лейкотриены, вызывают клеточную инфильтрацию эозинофилами, базофилами и Т-клетками из системной циркуляции подслизистой оболочки носа, что способствует повреждению эпителиального барьера слизистой оболочки носа [304]. Значимый вклад в

механизм повреждения эпителиального барьера слизистой ВДП вносят цитокины ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-13 (цитокины поздней фазы аллергической реакции), высвобождаемые из базофилов, тучных клеток и Th2-клеток, что приводит также к изменению состояния локальной микробиоты слизистой. Установлена обратная корреляция между ИЛ-5 и ИЛ-13 и степенью обструкции носовых ходов [329]. Цитокины ИЛ-5, ИЛ-4 активизируют приток эозинофилов в слизистую оболочку и способствуют локальному повышению активности пероксидазы, которая повреждает респираторный эпителий, также способствует нарушению функции эпителиального барьера. Таким образом, эозинофилы и продукты их активации вносят дополнительный вклад в повреждение эпителиального барьера слизистой оболочки как в раннюю, так и в позднюю фазу аллергической реакции при АР [337]. Это, в свою очередь, приводит к высвобождению эпителиальными клетками хемокинов, цитокинов и фактора роста, что поддерживает аллергическое воспаление [211, 213, 214], формируя порочный патогенетический круг.

1.6. Изменения микробных консорциумов (микробиоты) кожи и слизистых оболочек верхних дыхательных путей как нестерильных биотопов организма человека при формировании аллергического заболевания

Разработанные и внедренные в практику технологии высокопроизводительного секвенирования усовершенствовали углубленный таксономический анализ микробных сообществ микробиоты кожи человека. Необходимо отметить, что в микробиоте кожи в составе прокариотических форм доминируют бактерии [54, 307, 320]. Плотность бактериальных популяций и их распределение на коже человека неравномерны. Выделяют области с максимальной (лоб, подмышечная впадина) и наименьшей плотностью бактериальных популяций кожи человека. Кожу человека в норме заселяют бактерии, относящиеся к мезофильным, ксерофильным, ацидофильным, осмоотолерантным и факультативным аэробам. В настоящее время на основе

современных молекулярных исследований микробиома кожи человека было выявлено более 25 бактериальных таксономических групп. Большая часть кожных бактериальных видов относятся к трем филумам: Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria и Bacteroidetes. Показано, что микробиоте кожи присущи индивидуальные особенности на видовом и родовом таксономическом уровне, которая зависит от топографической зоны и возраста человека. В среднем на коже человека идентифицировано до 48 бактериальных видов. Представители филума Actinobacteria, Firmicutes и Proteobacteria составляют до 95,0%. В областях кожи, богатых сальными железами, доминируют пропионибактерии и стафилококки. Представители коринебактерий и стафилококков также доминируют во влажных участках кожи, богатых потовыми железами.

Большинство исследований в специальной литературе посвящено изучению микробиоты кожи верхних слоев эпидермиса и его придатков, а исследований, касающихся микробиоты субэпидермальных слоев кожи, недостаточно, что требует всестороннего изучения микробиоты глублежащих областей кожи в норме и при развитии патологии. В некоторых исследованиях открыты виды бактерий, относящихся к филуму Proteobacteria, которые способны колонизировать глубокие слои кожи человека [115]. Среди грибов в составе микробиоты кожи доминируют всем хорошо известные липофильные дрожжеподобные грибы *Malassezia*, различающиеся по видовому составу. Кроме того, на некоторых участках кожи были идентифицированы грибы таких родов, как *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Episoccum*. На сообщества микроскопических грибов кожи существенное влияние оказывает топография ее исследуемых участков и некоторые региональные физиологические особенности [70, 72].

Таким образом, можно констатировать, что на состав микробиоты кожи человека существенное влияние оказывают эндогенные факторы (возраст, пол, генетические особенности, иммунный статус, основные заболевания кожи, топография зон кожи, соматические заболевания, межмикробные взаимодействия) и экзогенные факторы (особенности личной гигиены, микросреда обитания и

жилища, география проживания, особенности питания, психоэмоциональный статус человека) [173].

В некоторых исследованиях показана тенденция к обеднению микробного биоразнообразия на локальных биотопах пораженной кожи у больных АД при обострении дерматита как своеобразная реакция микробиоты на хронический воспалительный процесс в дерме [49], а в других исследованиях отмечено доминирование отдельных представителей бактериальных видов, таких как *Staphylococcus aureus* как на пораженных, так и на непораженных участках кожи, что свидетельствует о вторичных причинах иммунного дисбаланса [72].

Необходимо отметить, что общепризнанной функцией т.н. «нормального» микробиома кожи является подавление активности иммунных воспалительных реакций и активация синтетических процессов в ней, особенно липидов как соединений, способствующих удержанию воды и уменьшению ее потери через кожу [72]. Необходимо учитывать, что у больных АД происходит активация и системного иммунитета, что также отражается на состоянии микробиоты не только кожи, но и слизистых оболочек ЖКТ, верхних дыхательных путей.

Комплексные исследования микробных сообществ и их изменений у больных АД требуют дальнейшего изучения, в том числе встречаемости на локальных биотопах культивируемых микроорганизмов с последующим определением их вирулентного и аллергенного потенциала, особенно это касается продуктов их метаболизма и сложных белков с различными функциями.

Изучение изменения микробиоты и факторов, определяющих этот процесс, имеет важное значение для оптимизации терапии этого хронического дерматоза, особенно при аппликационной топической терапии с применением пробиотических бактерий, способствующих нормализации локального микробиоценоза пораженной кожи и снижению выраженности воспалительной реакции [54, 208].

Микробиота ВДП представлена множеством микробных видов, формируется сразу после рождения ребенка. Начальная колонизация слизистой оболочки ВДП

происходит в период родов, а значимые изменения в ее составе происходят в течение первого года жизни, что связано с созреванием иммунной системы в этот период жизни ребенка [4, 168]. В последующем первичная микробиота трансформируется в микробный консорциум, характерный для взрослого состояния, для которого характерно снижение плотности и разнообразия микробных популяций.

Назальная микробиота. По данным многочисленных исследований, направленных на изучение назальной микробиоты здоровых индивидуумов, было установлено, что она формируется за счет бактериальной флоры Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria с представителями таких родов, как Bifidobacterium, Corynebacterium, Staphylococcus, Streptococcus, Dolosigranulum, Moraxella с доминированием Moraxella spp. [334].

Микробиота ВДП детей раннего возраста представлена бактериями таких родов, как Moraxella spp., Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Haemophilus spp., Dolosigranulum spp. и Corynebacterium spp. [135]. В послеродовой период носоглоточная микробиота подобна микробиоте родовых путей матери и близка по составу с микробиотой кожи. В последующем, начиная с 2–3-х месяцев жизни, состав микробиоты претерпевает изменения: снижается встречаемость Moraxella spp., Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Haemophilus spp., увеличивается встречаемость Dolosigranulum spp. и Corynebacterium spp. При искусственном вскармливании отмечается преобладание в составе микробиоты бактерий таких родов, как Staphylococcus spp. и, в частности, вида *S. aureus*.

Микробиота ВДП оказывает протективный эффект в отношении возбудителей респираторных инфекций [374]. В исследованиях, посвященных микробиоте здоровых детей до 2-х лет, было показано, что бактерии рода Dolosigranulum spp. и Moraxella spp. в ассоциации с Corynebacterium spp. образуют более стабильный микробный консорциум в этой возрастной группе, в отличие от часто болеющих детей этого возраста с высоким риском респираторных инфекций, для которых были характерны в составе микробиоты ассоциации бактерий родов

Streptococcus spp. и *Haemophilus* spp. [362]. С последними видами *H. influenza* и *S. pneumoniae* были связаны респираторно-вирусные инфекции и бронхолит [151].

Микробиота ВДП взрослых лиц отличается от микробиоты детей. У человека большая часть бактерий назальной микробиоты формируется за счет представителей филумов *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*. При этом у подавляющего большинства индивидуумов взрослой популяции колонизация слизистой носа происходит бактериями рода *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. и *Propionibacterium* spp., а представители других бактериальных родов встречаются реже. В частности, у детей отмечается высокая плотность бактериальной микрофлоры в составе микробиоты носа. Микробиота передних отделов носовой полости у взрослых в основном включает представителей филума *Actinobacteria*, *Firmicutes* и в меньшей степени представителей анаэробных бактерий, относящихся к *Bacteroidetes* [331].

Микробиом ВДП пожилых лиц. Микробные сообщества передних носовых ходов взрослых лиц в возрасте 18–40 лет значительно отличаются от других биотопов (носоглотка, язык, слизистая оболочка щек, ротоглотка), но эти отличительные вариации постепенно уменьшаются при возрастном старении организма. Изменения в составе микробных сообществ носовой микробиоты начинают формироваться у взрослых среднего возраста (40–65 лет), у которых в составе микробного консорциума доминируют представители *Cutibacterium*, *Corynebacterium* и *Staphylococcus*, а у лиц старше 65 лет микробное сообщество носа по составу приближается к ротоглоточному микробному сообществу [185]. Эти изменения в бактериальном сообществе носа, как правило, обусловлены процессами иммунного «старения» [162].

На формирование аллергической патологии респираторной системы у ребенка оказывает влияние не только наследственная предрасположенность, но и особенности его резидентной микробиоты, которая оказывает влияние на формирующуюся иммунную реактивность [321]. Некоторые исследования показали, что симбиотическая микробиота снижает риск формирования

аллергических реакции и аллергической патологии органов дыхания, а изменения в составе бактерий симбионтов ВДП могут усиливать локальную пролиферацию базофилов, увеличить количество эозинофилов и вызывать дисбаланс Т1-/Т2-иммунного ответа, снижать количество регуляторных CD4⁺Treg- и CD4⁺Th17-лимфоцитов [293]. Отмечено преобладание представителей *Propionibacterium* spp., *Prevotella* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacteroidetes* и *Streptococcus* spp. в норме у здоровых лиц по сравнению с больными аллергическими ринитами [247]. Исследования микробиома у больных АР подтвердили дисбаланс микробиоты, который коррелировал с уровнем общего IgE у этих больных [214].

1.7. Заключение по главе 1

Изменения состояния локальной микробиоты имеет существенное влияние на течение аллергической патологии, характер ответа на терапию и прогноз развития коморбидных заболеваний при таких распространенных аллергических болезнях, как атопический дерматит и аллергический ринит, которые формируют картину «атопического марша», предшествуя или сопровождая развитие тяжелых форм аллергической патологии, таких как атопическая бронхиальная астма.

Диагностика формирующихся сдвигов в состоянии микробных консорциумов кожи и слизистых имеет актуальное значение при разработке современных персонализированных подходов в терапии этих заболеваний, с учетом факта тесной взаимосвязи между микробиотой кожи, слизистых оболочек и особенностями локальных иммунных реакций, формирующихся в дерме и слизистой оболочке ВДП при атопическом дерматите и аллергическом рините.

Определение значимости факторов (иммунных и неиммунных) и оценка их влияния на количественные и качественные изменения локальной микробиоты кожи и слизистых ВДП и механизмы их формирования имеет большое значение в понимании всех аспектов патогенеза аллергического ринита и атопического дерматита.

Сами факторы можно подразделить на иммунные (локальный и системный цитокиновый профиль, профиль сенсibilизации в т.ч. к метаболитам и продуктам жизнедеятельности представителей микробиоты, в частности к *S. aureus*) и неиммунные, к которым можно отнести генетические особенности макроорганизма (клинически значимые SNP в генах, контролирующих врожденные иммунные реакции, например TLR2-, TLR4-рецепторы и гены, контролирующие гомеостаз энзимов в эпидермальном барьере кожи, например, SPINK5, биологические свойства микроорганизмов, представителей микробиоты).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Нозологическая структура основной группы исследуемых больных и состав группы сравнения и контроля

В основную группу исследования были включены 840 больных АЗ, 465 человек из которых страдали АтД, а у 375 человек была респираторная аллергическая патология, включающая АР и сочетание АР с АБА. Критериями включения пациентов в основную группу с диагнозом АтД были клинические данные, результаты объективных диагностических тестов, позволяющих подтвердить диагноз АтД и исключить другие заболевания кожи. Критерии включения в основную группу пациентов с респираторной аллергией: подтвержденный диагноз сезонный АР (САР) или круглогодичный АР (КАР); сочетанные нозологии (САР+АБА) или КАР+АБА; АР+АтД.

Группа сравнения состояла из 135 человек бактерионосителей *S. aureus* без аллергической патологии, у которых при трехкратном исследовании носоглотки и кожи выделяли культуру *S. aureus* с двух биотопов одновременно (кожа и слизистые оболочки ВДП) или перманентно с одного биотопа с интервалом 3–6 месяцев.

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

Исследовано 935 микробных консорциумов кожи и слизистых оболочек ВДП (носа и носоглотки) у пациентов с аллергическими заболеваниями и 235 – у бактерионосителей *S. aureus* без аллергической патологии и здоровых лиц. В работе применены клинико-иммунологические, молекулярно-генетические, биохимические, протеомные, бактериологические, микологические, статистические и биоинформатические методы исследования.

2.2. Иммунологические методы

Определение концентраций цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-4, TNF- α , ИФН- γ , ГМ-КСФ, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-5, трансформирующего фактора роста бета-1 или TGF- β , и TSLP), а также хитиназоподобного гликопротеина YKL-40 в биообразцах [56, 241] (культуральные жидкости МК, сыворотка крови, назальные смывы) от пациентов осуществляли иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия), eBioscience, Bender Med Systems, Cloud-clone corp. (США), R&D Systems, MN (США), Quidel (США).

МК периферической крови культивировали *in vitro* в питательной среде RPMI 1640 с L-глутамином, в которую вносили антигены *S. aureus* и оценивали цитокиновый ответ клеток в ответ на стимуляцию. Продукцию цитокинов в образцах культуральных жидкостей МК определяли иммуноферментным методом, используя коммерческие тест-системы в соответствии с методикой производителя.

Концентрацию общего IgE определяли в сыворотке крови с помощью набора реагентов компании «Хема» (Россия) для иммуноферментного определения.

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

Определение IgE к рекомбинантой термоинактивированной SspA-протеиназе *S. aureus* выполняли неконкурентным иммуноферментным методом анализа.

Концентрацию IgE к аллергенам d1, d2, клещей ДП, полыни обыкновенной (w 6) и аллергокомпонентам березы (rBet v1), сои (Gly m4), эпидермальным аллергенам домашних животных (Can f1, Can f2, fel d1), плесневым грибам (Asp f3), энтеротоксинам А, В (m80, m81) *S. aureus* определяли в сыворотке крови по

технологии ImmunoCAP® (Phadia AB) на анализаторе Immuno CAP 100, v.1 (Phadia AB, Упсала, Швеция).

Проточная цитофлуориметрия. Методом проточной цитофлуориметрии определяли фенотип лимфоцитов с использованием наборов моноклональных антител 6-color TBNK BD Multitest и IMK lymphocyte Kit [84], а экспрессию CD203c на базофилах периферической крови анализировали на основе 3-цветного проточного цитометрического протокола, разработанного для мониторинга активации базофилов на основе идентификации клеток, являющихся CD3^{neg}, CRTH2^{pos} и CD203c^{pos}, с использованием реагентов для изучения активации базофилов Allergenicity Kit (Immunotech SAS, Beckman Coulter Company, Франция) согласно инструкции производителя. Исследования проведены на анализаторе FACSCanto II с программным обеспечением Cell Quest, Becton Dickinson.

2.3. Молекулярно-генетические методы

Генотипирование полиморфизмов в генах Toll-подобных рецепторов человека – TLR2 (Arg753→Gln), TLR4 (Asp299→Gly) осуществляли методом аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР) с применением наборов «SNP-экспресс» НПО «Литех» (Москва, Россия). Идентификация полиморфизма Glu420→Lys в гене SPINK5 осуществляли методом ПЦР с последующим энзиматическим расщеплением эндонуклеазой *HphI* продуктов амплификации по методу, представленному в работе Walley A. J. et al., 2001 [365]. Геномную ДНК человека выделяли из лейкоцитов периферической крови и клеток буккального эпителия, применяя наборы реагентов «ДНК-экспресс», «ДНК-экспресс кровь-плюс» НПО «Литех».

Исследование генетического профиля изолятов *S. aureus*, выделенных с биотопов кожи и слизистых оболочек ВДП у больных АтД, АР и бактерионосителей без аллергического заболевания. Выделение бактериальной ДНК из штаммов проводили с помощью стандартного набора реагентов ZR

Genomic DNA II Kit™ (Zymo Research, США) [104], ДНК-сорбент (НПО «Литех», Россия). ПЦР-детекцию генов энтеротоксинов в штаммах *S. aureus* осуществляли по протоколу Jarraud S. et al., 2002 [217]. ПЦР-детекцию целевых участков генов стафилококковых суперантигенподобных белков SSL2 осуществляли по методу Smyth D. S., 2007 [340] и оригинальному разработанному способу [59]. ПЦР-детекцию целевых участков генов протеиназ *S. aureus* проводили по методологии Zdzalik M. et al., 2012 [378], а целевых участков генов гемолизинов, лейкоцидинов, эксфолиативных токсинов *S. aureus* проводили по методам, представленным в работе Jarraud S. et al., 2002 [217], Nakaminami H. et al., 2008 [284]. Синтез и очистка необходимых праймеров осуществлена в ЗАО «Синтол» (Москва, Россия).

Секвенирование генома (whole-genome shotgun sequencing) штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis*, выделенных с кожи, и слизистых ВДП у больных АЗ проведено на платформе Illumina Miseq. Секвенирование фрагментов генома ДНК штаммов *S. aureus* для подтверждения специфичности детектирования целевых генов также проведено на платформе Illumina Miseq с применением реагентов GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fishers Cientific, США), dsDNA BR Assay Kit Qubit (Invitrogen, США), NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB), DNA HS Assay Kit (Invitrogen, США).

2.4. Биохимические и протеомные методы исследования

Биохимические свойства штаммов *S. aureus*, выделенных с кожи и слизистых ВДП. Протеолитическую активность выделенных штаммов *Staphylococcus* spp. определяли разработанными способами, представленными в работах [55, 57, 58]. Ингибиторный анализ протеолитической активности КЖ штаммов проводили с растворами подобранных ингибиторов (ЭДТА – 0,5-1,0 мМ, 1,10-фенантролин – 5,0 мМ, PMSF – 1,0 мМ, пепстатин А – 7×10^{-3} мг/мл) [45] на основе оригинального высокочувствительного способа определения протеолитической активности [60].

Энтеротоксин-продуцирующую активность штаммов *S. aureus* оценивали иммунохимическим методом с применением набора реагентов RIDASCREEN (R) SET A, B, C, D, E (R-Biopharm AG, Германия).

Анализ белков «протеома» штаммов *S. aureus* проводили методами 2D- и 2D-DIGE электрофореза [195]. Предварительно проводили извлечение и концентрирование белков исследуемых штаммов для изоэлектрофокусировки с последующим электрофорезом в градиентном ПААГ, визуализацию белковых пятен и масс-спектрометрическую идентификацию. Для идентификации белков проводили предварительный трипсинолиз белков в геле. Масс-спектрометрический анализ осуществляли на масс-спектрометре MaXis Impact (Bruker, Германия). Полученные пептиды разделяли на хроматографе UltiMate 3000 uHPLC. Масс-спектры обрабатывали с помощью DataAnalysis 4.1. Белки идентифицировали по масс-листам с помощью программы Mascot 2.4.0,

Получение и очистка рекомбинантной SplA-протеиназы *S. aureus*. Фрагмент гена *splA* без сигнального пептида амплифицировали методом ПЦР из геномной ДНК штамма *S. aureus* NCTC 8325 и клонировали в *E. coli* согласно протоколам. В качестве экспрессионной конструкции использовали плазмидный вектор pASG-IBA2 (IBA GmbH, Германия) [177]. Очистку рекомбинантного белка осуществляли системой Strep-tag согласно протоколам [177].

2.5. Микробиологические методы исследования кожи и слизистых оболочек верхних дыхательных путей

Забор материала для микробиологического исследования

Отбор биологического материала с кожи для выделения и идентификации бактерий на комплекс питательных сред проводили методом смыва и отпечатка, которые представлены в работах Заборовой В. А. и Арзуманян В. Г. с соавт. [3, 26].

Для выделения и идентификации бактерий рода *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. производили смывы и отпечатки с участков

поражений кожи (в стадию обострения АтД), а с интактных участков только методом смыва тампоном на комплекс плотных селективных сред (Приложение Б, Рисунок Б.1).

Для выделения и идентификации дрожжеподобных грибов рода *Candida* spp., *Malassezia* spp., *Cryptococcus* spp. биологический материал с кожи забирали методом смыва на тампон, смоченный 0,1 М калий-фосфатным буферным раствором с твином 80 (рН 7,9) [3], как с участков поражений кожи (в стадию обострения АтД), так и с интактных участков (в стадию ремиссии АтД), а также у лиц группы сравнения и контроля (Приложение Б, Рисунок Б.1).

Отбор биологического материала для выделения и идентификации *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp. производили с участков по границе пораженных очагов кожи (в стадию обострения АтД) и с интактных участков кожи (в стадию ремиссии АтД), а также у лиц группы сравнения и контроля методом смыва (Приложение Б, Рисунок Б.1).

Для выделения и идентификации бактерий рода *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Moraxella* sp., *Haemophilus* spp. и непатогенных *Neisseria* spp. со слизистой оболочки носа забор материала проводили на стерильный ватный тампон, смоченный физиологическим раствором, в области средней носовой раковины в течение 30 секунд. Отбор материала из носовых ходов на *S. pneumoniae* осуществляли зонд-тампонами в транспортную среду Амиеса [11, 28]. Материал с тампона переносили в жидкие транспортные среды. Доставляли материал в лабораторию в течение 2 часов с момента забора.

Количественная оценка микробной обсемененности кожи и слизистой оболочки носа

Для количественной оценки обсемененности локальных участков кожи (пораженной и интактной) бактериями рода *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. и грибами *Candida albicans* полученный материал методом смыва забирали с участков кожи площадью 1 см², как описано в работе Заборовой В. А. и соавт. [26], а количество колониеобразующих единиц на

1 см² кожи (КОЕ/см²) выражали для оптимальной статистической обработки в виде числа (N), рассчитанного как $\text{Log}_{10} \text{КОЕ/см}^2$. Например, $\text{Log}_{10} 750 \text{ КОЕ/см}^2 = 2,87$.

Количественное определение микробной обсемененности слизистой носа бактериями *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella* spp. проводили методом разведений материала, полученного на тампон, который помещали в 1 мл транспортной среды. Готовили серию разведений 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ раз стерильным физиологическим раствором и высевали по 20 мкл из каждого разведения на соответствующие элективные питательные среды, подсчитывали число КОЕ/мл или тампон. Количество колониеобразующих единиц на 1 тампон или мл (КОЕ/мл) выражали также в виде числа (N), рассчитанного как $\text{Log}_{10} \text{КОЕ/мл}$.

Выделение и идентификация микроорганизмов

Для выделения бактерий рода *Staphylococcus* spp. применяли селективные среды: желточный солевой агар (ЖСА) и стафилококкагар (пр-во ФБУН и ГНЦ ПМБ, Россия), культивировали при 37°C в течение 24 часов. Идентификацию проводили по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам, а также с применением метода MALDI-TOF MS, который был апробирован для идентификации бактерий этого рода, выделенных от человека из клинического материала в работах других исследователей [68]. Блок-схема этапов выделения и идентификации представлена в Приложении В, Рисунок В1.

Для выделения бактерий рода *Corynebacterium* spp. применяли селективные среды: 5% КА (кровяной агар) и коринебакагар (пр-во ФБУН и ГНЦ ПМБ, Россия), культивирование осуществляли при 37°C в течение 48 часов. Идентификацию проводили по морфологическим (окраска по Граму и микроскопирование), культуральным и биохимическим свойствам (тесты на расщепление глюкозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, каталазная, цистиная активность), а также методом MALDI-TOF MS как одним из скрининговых методов для родовой и видовой идентификации *Corynebacterium* spp. группы non diphtheriae [102]. Блок-схема этапов выделения и идентификации представлена в Приложении В, Рисунок

В.2.

Для выделения бактерий рода *Lactobacillus* spp. применяли селективные среды: жидкую и агаризованную МРС-среду, лактобакагар (пр-во ФБУН и ГНЦ ПМБ, Россия), капустный агар с карбонатом кальция. Культивирование и выделение осуществляли по методическим приёмам, представленным в работе [111]. Идентификацию проводили по морфологическим (окраска по Граму), культуральным и биохимическим свойствам (каталазный тест, продукция лактата) по разработанной блок-схеме (Приложение В, Рисунок В.3), а также методом MALDI-TOF MS.

Для выделения и идентификации энтеробактерий (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.) применяли агар Мосселя, среду Эндо-ГРМ, среду Гисса-ГРМ, среду Клиглера-ГРМ (пр-во ФБУН и ГНЦ ПМБ, Россия) по соответствующей блок-схеме (Приложение В, Рисунок В.4). Идентификацию бактерий осуществляли по морфологическим (окраска по Граму), культуральным и биохимическим тестам, а также методом MALDI-TOF MS.

Для выделения бактерий рода *Pseudomonas* spp. применяли селективные среды: ЦПХ-агар, цетримидный агар (пр-во ФБУН и ГНЦ ПМБ, Россия), среду Кинг А по соответствующей блок-схеме (Приложение В, Рисунок В.5). Идентификацию осуществляли, основываясь на морфологических, культуральных (рост при разных температурах), биохимических свойствах (оксидазный тест), а также методом MALDI-TOF MS.

Для выделения бактерий *Haemophilus* spp. применяли «Гемофилус» агар с ростовой и селективной добавкой (пр-во ФБУН и ГНЦ ПМБ, Россия), кровяной агар (КА) с лошадиной кровью для определения гемолиза по соответствующей блок-схеме (Приложение В, Рисунок В.6). Идентификацию *Haemophilus* spp. осуществляли по морфологическим (окраска по Граму), культуральным и биохимическим тестам (ONPG-тест, оксидазный тест), а также методом MALDI-TOF MS. Культивирование проводили при температуре 37°C в течение суток, в эксикаторе со свечой-таблеткой.

Для выделения *S. pneumoniae* полученный материал с транспортной среды высевали на плотную среду Columbia agar Base (Conda, Испания) с добавлением 5% бараньей крови. Посевы инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение суток [28]. Идентификацию *S. pneumoniae* проводили на основании морфологических, культуральных свойств и данных оптохинового теста, лизиса в присутствии солей желчи [28, 315].

Выделение непатогенных бактерий рода *Neisseria* spp. проводили на среде шоколадный агар (пр-во ФБУН и ГНЦ ПМБ, Россия), а также на 10% сывороточном агаре для пересева чистой культуры (блок-схема представлена в Приложении В, Рисунок В.7). Идентификацию осуществляли по морфологическим (окраска по Граму), культуральным и биохимическим тестам (оксидазный тест, тесты на утилизацию углеводов: глюкозы, мальтозы, фруктозы, сахарозы, лактозы), а также методом MALDI-TOF MS.

Выделение грамположительных бактерий рода *Bacillus* spp. проводили с применением дифференциальной среды: желточно-солевой агар (ЖСА) с полимиксином и 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (чда) (Россия). Пересев осуществляли на МПА. Идентификацию осуществляли по морфологическим (окраска по Граму), культуральным и биохимическим тестам (тест на расщепление глюкозы и маннита, тест на разжижение желатины, тест на редукцию нитратов) по Васильеву Д. А. и соавт. [17], а также методом MALDI-TOF MS.

Выделение нелипофильных и липофильных дрожжеподобных грибов *Candida* spp., *Malassezia* spp., *Cryptococcus* spp. проводили на селективных средах Сабуро с хлорамфениколом и декстрозой, модифицированной среде Диксона, содержащей оливковое масло с твинами и без твинов [148]. Посевы культивировали при 32°C и 40°C в течение 5 дней в пакетах для предотвращения высыхания среды по разработанной блок-схеме (Приложение В, Рисунок В.8). Идентификацию культур грибов осуществляли на основе морфологических (окраска по Граму), культуральных и биохимических методов (β -глюкозидазная, каталазная активность), а также методом MALDI-TOF MS.

Идентификацию микроорганизмов с применением метода MALDI-TOF MS осуществляли на масс-спектрометре MALDI Biotyper Systems серии FLEXTM (Bruker Daltonics, Германия) на основе сравнительного анализа полученных белковых профилей с данными референтных масс-спектров программы BioTyper 3.0 и 3.1 (Bruker Daltonics, Германия). Для родовой и видовой идентификации микроорганизмов учитывали показатели Score values: значения от 1,999 до 1,700 соответствовали достоверной родовой идентификации, а значения от 2,000 до 3,000 – достоверной видовой идентификации. Ранги для достоверной родовой идентификации составляли категорию В, для достоверной видовой – категорию А.

2.6. Биоинформатический анализ

Поиск линейных В-клеточных эпитопов в антигенах *S. aureus* выполнен *in silico* на интернет-ресурсе IEDB (<http://www.iedb.org>) с применением алгоритма VeriPred-2.0 при значении average: 0,50–0,530 [220]. Идентификационный поиск гомологичных структур известных алергокомпонентов осуществлен с помощью интернет-ресурса Allermatchtm (<http://allermatch.org>), который позволил осуществить прогнозирование потенциальной алергенности белков.

2.7. Статистические методы анализа

В работе применены программа для статистического анализа и визуализации данных Prism v.8.3.0. Использовали методы параметрической и непараметрической статистики анализа данных: рассчитывали относительную частоту признака (частость), ошибку относительной величины частоты (m_p), медиану (Me), 25- и 75-перцентили (Q1;Q3) признака, среднюю арифметическую (M), стандартное отклонение (SD), а также статистические методы сравнения, такие как U-критерий Манна-Уитни, критерий Колмогорова-Смирнова, t-критерий Стьюдента и вспомогательный критерий Фишера [110]. Распределение генотипов на

соответствие закону Харди – Вайнберга – Кастла выполнено по критерию χ^2 , статистическую значимость различий по частоте аллелей и генотипов между группами определяли по критерию χ^2 -критерию Пирсона, для выявления ассоциации генотипов и аллелей с факторами были рассчитаны отношения шансов (ОШ) с 95%-м ДИ.

ГЛАВА 3. ИЗМЕНЕНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ КОЖИ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ

3.1. Изменения локальной микробиоты кожи у больных атопическим дерматитом

В настоящее время интерес к изучению микроорганизмов, заселяющих кожу и слизистые оболочки верхних дыхательных путей, как открытых нестерильных биотопов организма имеет существенное практическое значение для изучения особенностей бактерионосительства *S. aureus*, протекающего на фоне аллергического заболевания [81, 85, 86].

В данной части исследования представлены аналитические данные по состоянию микробных консорциумов пораженной кожи у больных АД с разной стадией заболевания и формой дерматита (младенческая, детская, взрослая). Возрастная и нозологическая характеристика пациентов с атопическим дерматитом и сопутствующей аллергической патологией, включённых в исследование, представлена в Таблице 2.

Критериями включения пациентов в основную группу с диагнозом АД были клинические данные, результаты объективных диагностических тестов, позволяющих подтвердить диагноз АД и исключить другие заболевания кожи. Диагноз АД был основан на критериях, приведенных в клинических рекомендациях [99].

Таблица 2 – Основная группа: пациенты с атопическим дерматитом и сочетанной аллергической патологией

№	Диагноз и шифр МКБ 10	Возраст	Кол-во больных
1	АтД, младенческая форма, в стадиях обострения и ремиссии. МКБ 10: L20:L20,8-20,9	0–6 месяцев	100
2	АтД, младенческая форма в стадии обострения и неполной ремиссии с осложненным течением (поверхностной стафилодермией и импетиго) или микотической инфекцией кожных покровов. МКБ 10: L20:L20,8-20,9	1–2,5 года	45
3	АтД, младенческая форма, ст. обострения и ремиссии. МКБ 10: L20:L20,8-20,9	7 мес. – 2 года	70
4	АтД, детская форма, ст. обострения и ремиссии, в т.ч. сочетанные формы: АтД+САР. МКБ 10: L20:L20,8-20,9+ МКБ 10: J30,1, J 30,2, J 30,3, J 30,4	2,5–13 лет	120
5	АтД, подростковая форма в ст. обострения и ремиссии, в т.ч. сочетанные формы АтД+КАР	14–18 лет	50
6	АтД, взрослая форма в ст. обострения и ремиссии, в т.ч. сочетанные формы (АтД+АР)	Старше 18 лет	80
7	Всего		465

Группа сравнения состояла из 135 человек бактерионосителей *S. aureus*, без аллергической патологии, у которых при трехкратном исследовании носоглотки и кожи выделяли культуру *S. aureus* с двух биотопов одновременно (кожа и слизистые оболочки ВДП) или перманентно с одного биотопа с интервалом 3-6 месяцев. Группа контроля состояла из «условно» здоровых лиц (100 человек) без аллергической патологии и отсутствия носительства на коже и слизистых ВДП *S. aureus* (Таблица 3).

Таблица 3 – Группа сравнения и контрольная группа здоровых лиц разного возраста

№	Возраст	Группа сравнения	Кол-во человек	Группа контроля	Кол-во человек
1	0–2 года	Здоровые бактерионосители <i>S. aureus</i>	25	Здоровые дети	25
2	3–12 лет	Здоровые бактерионосители <i>S. aureus</i>	35	Здоровые дети и подростки	30
3	13–18 лет	Здоровые бактерионосители <i>S. aureus</i>	30	Здоровые подростки	20
4	19–47 лет	Здоровые бактерионосители <i>S. aureus</i>	45	Условно-здоровые взрослые	25
5	Всего	-	135	-	100

Данные, касающиеся клинико-лабораторных показателей у больных АД (сведения об аллергологическом семейном анамнезе, объективные данные осмотра, показатели ОАК, биохимического анализа крови, ОАМ, морфологических фенотипов атопического дерматита и состояния кожного покрова, а также результаты аллергокомпонентной диагностики сенсibilизации, паразитологического исследования фекалий, значения индексов тяжести заболевания по шкалам IGA, SCORAD), были нами сгруппированы и отражены в «Базе данных клинико-лабораторных характеристик пациентов с атопическим дерматитом бактерионосителей *Staphylococcus aureus*» (номер государственной регистрации № 2021623211 в Реестре Баз данных РФ от 27.12.2021 г.) [6].

Для расчета встречаемости культивируемых микроорганизмов на локальных участках кожи (Приложение Г, Рисунок Г.1) нами были использованы учетные данные разработанной «Карты результатов микробиологического обследования» (Приложение Д, Таблица Д.1). Основываясь на данных «Карты результатов микробиологического обследования», рассчитана встречаемость основных микробных видов, выявленных у больных АД (Приложение Е, Таблица Е.1).

В сводной Таблице 4 представлены сравнительные данные, касающиеся встречаемости на локальных участках кожи культивируемых представителей микробиоты у больных АтД детей в возрасте до 2-х лет с детской формой АтД в динамике заболевания от стадии обострения до ремиссии [30, 86].

Таблица 4 – Среднее значение Ме (Q1;Q3) частот встречаемости культивируемой микрофлоры на локальных участках кожи у больных АтД детей в возрасте до 2-х лет и в группе контроля и сравнения (в %)

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

Продолжение Таблицы 4

<i>Candida azyma</i>	8,0 2,7;10,5	6,0 2,6;9,7	6,8 2,5;13,5	15,0 7,1;25,5	$p_{2-3} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$
<i>M. caprae</i>	15,4 4,6;28,9	6,3 2,7;9,5	20,6 9,8;35,8	20,6 8,5;37,5	$p_{2-3} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$
<i>M. globose</i>	4,5 1,8;6,8	9,0 2,5;6,8	н/о	н/о	$p_{1-2} < 0,05$

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

По полученным данным у больных детей с младенческой формой АтД в возрасте до 2-х лет по сравнению со здоровыми детьми контрольной группы установлены значимые отличия во встречаемости представителей филума Firmicutes [81, 86]. Установлено значительное увеличение встречаемости *S. aureus* в стадии обострения заболевания и снижение колонизации этим видом в стадии ремиссии заболевания на 30,9% ($p < 0,05$).

Выявлены видовые отличия во встречаемости коагулаза-отрицательных стафилококков (КОС). Так, у больных детей при развитии АтД на локальных участках кожи не встречались такие виды КОС, как *S. haemolyticus* и *S. saprophyticus*. Встречаемость вида *S. epidermidis* у детей с АтД на локальных участках кожи была снижена на 42,2% в стадию обострения заболевания по сравнению со здоровыми лицами (Таблица 4). Следует отметить, что у детей с АтД были идентифицированы представители сапрофитных видов бактерий – *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. в стадию обострения заболевания, в то время как у здоровых детей и бактерионосителей без аллергической патологии (группа сравнения) данные представители не выделялись. Показатели микробного обсеменения сапрофитами кожи пораженных областей, в частности *Pseudomonas* spp., в стадию обострения заболевания составили $4,5 \pm 2,7 \text{ Log}_{10} \text{ КОЕ/см}^2$ ($35 \times 10^3 \pm 500 \text{ КОЕ/см}^2$). Показатели микробного обсеменения бактериями *Bacillus* spp. пораженных воспалительным процессом областей кожи составила $3,6 \pm 1,7 \text{ Log}_{10} \text{ КОЕ/см}^2$

($4,0 \times 10^3 \pm 50,0$ КОЕ/см²). Для детей с АтД также были выявлены значимые изменения во встречаемости представителей филума Actinobacteria в составе микробиоты локальных участков кожи [86]. В ранее проведенных исследованиях показано, что *Corynebacterium* spp. кожи человека участвуют в гидролитическом расщеплении компонентов жиров кожного покрова, образуя при этом жирные кислоты, которые локально поддерживают слабокислое значение рН среды кожи, обеспечивая «защитный» эффект кожно-эпидермального барьера [85, 86].

В этой возрастной группе нами было выявлено значимое снижение встречаемости видов *Lactobacillus* spp. у больных АтД детей как в стадию обострения заболевания, так и в стадию ремиссии на 23,2% и 29,3% соответственно по сравнению с контрольной группой (Таблица 4). Отмечено также и снижение показателей микробного обсеменения пограничных участков пораженной кожи у больных АтД детей представителями *Lactobacillus* spp. Показатель микробного обсеменения кожи *Lactobacillus* spp. у больных АтД детей составил $2,4 \pm 1,7 \text{ Log}_{10}$ КОЕ/см² ($250,0 \pm 50,0$ КОЕ/см²), а у здоровых детей контрольной группы был в 10,0 раз выше и составил $3,5 \pm 0,7 \text{ Log}_{10}$ КОЕ/см² ($3 \times 10^3 \pm 5,0$ КОЕ/см²).

Значимо различались по частоте встречаемости представители грибов идентифицированных семейств *Sacharomycetalis*, *Malasseziaceae* и *Tremellaceae* в составе микробиоты кожи локальных участков у больных АтД детей этой возрастной группы [86]. Так, дрожжеподобные грибы *Candida* spp. у больных детей в стадии обострения АтД выделялись чаще на 36,0%, особенно *Candida albicans*, чем у здоровых бактерионосителей (группа сравнения) и детей группы контроля, что согласуется с данными Арзуманян В. Г. [2]. Для детей группы сравнения отмечено выделение грибов рода *Candida* spp., не более чем у 6,8 % (Q12,5; Q3 13,5) обследуемых индивидуумов, в основном отмечено выделение *Candida azyma*. Отмечалось также значимое снижение встречаемости *Malassezia capre* у больных АтД детей как в период ремиссии заболевания, так и в стадии обострения (Таблица 4). Вид *Malassezia globosa* выделялся только у больных АтД.

В сводной Таблице 5 представлены сравнительные данные, касающиеся встречаемости культивируемых бактериальных видов микробиоты на локальных участках кожи детей с АД и детей – бактерионосителей *S. aureus* без аллергической патологии (группа сравнения) в возрастной группе от 2 до 14 лет.

Таблица 5 – Среднее значение $Me (Q1;Q3)$ частот встречаемости культивируемой микрофлоры на локальных участках кожи у больных АД в возрасте 2–14 лет и в группах контроля и сравнения (в %)

Таксономическая группа (вид)	Дети с АД		Группа сравнения n=35	Контрольная группа n=35	p
	Стадия обострения n=180	Стадия ремиссии n=160			
	1	2	3	4	
<i>S. aureus</i>	33,5 13,5;66,5	15,8 8,8;35,5	9,6 3,9;8,5	н/о	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
<i>S. epidermidis</i>	35,6 14,5;65,6	42,5 17,5;53,5	60,0 38,2;87,5	62,0 28,5;97,5	$p_{1-4} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
<i>S. haemolyticus</i>	30,0 17,5;52,8	8,7 2,5;12,5	6,5 3,0;8,7	5,0 3,5;6,5	$p_{1-4} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
<i>S. saprophyticus</i>	н/о	н/о	9,0 4,8;14,8	16,0 6,5;25,8	$p_{3-4} > 0,05$
<i>S. xylosum</i>	н/о	н/о	10,0 5,0;14,5	10,0 5,5;12,8	$p_{3-4} > 0,05$
<i>Bacillus sp.</i>	н/о	н/о	н/о	н/о	-
<i>Corynebacterium spp.</i>	6,4 3,8;11,5	19,5 7,8;34,7	39,0 18,2;68,5	45,0 18,5;75,8	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$
<i>Lactobacillus spp.</i>	4,0 2,4;6,8	9,4 4,8;13,7	27,0 17,5;38,7	46,0 18,6;64,8	$p_{1-4} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$
<i>Pseudomonas sp</i>	9,5 2,1;13,8	6,0 4,8;8,5	н/о	н/о	$p_{1-2} > 0,05$

Продолжение Таблицы 5

<i>Candida albicans</i>	19,4 6,9;24,5	8,0 4,5;12,5	5,5 2,8;9,7	н/о	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
<i>Candida parapsilosis</i>	н/о	3,5 1,4;6,8	6,5 3,0;7,8	7,0 4,3;12,8	$p_{3-4} < 0,05$ $p_{2-4} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
<i>M. caprae</i>	73,4 36,2;87,5	10,0 4,3;16,8	29,5 17,7;48,7	н/о	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
<i>M. globosa</i>	28,0 13,3;45,5	7,8 3,8;12,7	7,0 4,3;12,5	н/о	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
<i>M. sympodialis</i>	н/о	н/о	65,7 18,0;78,5	68,5 27,8;83,5	$p_{3-4} > 0,05$

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

По полученным данным у детей в возрасте 2–14 лет с детской формой АДД по сравнению со здоровыми детьми контрольной группы также установлены значимые изменения во встречаемости представителей филума Firmicutes. Установлено, что в стадии обострения АДД отмечается значительное увеличение встречаемости *S. aureus* в стадию обострения заболевания, чем в стадию ремиссии. Выявлены также видовые отличия во встречаемости КОС. Так, у больных детей при развитии АДД на локальных участках кожи не встречался вид *S. saprophyticus* по сравнению со здоровыми детьми без аллергической патологии.

Встречаемость вида *S. epidermidis* у детей этой возрастной группы с АДД на локальных участках кожи также была значимо снижена, особенно в стадию обострения заболевания.

Для детей этой возрастной группы с АДД также были выявлены существенные отличия во встречаемости представителей филума Actinobacteria в составе микробиоты локальных участков кожи. Выявлены различия в частоте встречаемости коринебактерий. Установлено, что встречаемость *Corynebacterium* spp. у больных АДД детей была снижена на 25,5–38,6% соответственно как в стадию обострения заболевания, так и в стадию ремиссии, по сравнению с группой сравнения и контроля (Таблица 5). Отмечено также значимое снижение на 42,0%

встречаемости видов *Lactobacillus* spp. у больных АтД детей в период обострения заболевания.

У детей этой возрастной группы установлены также значимые различия в частоте встречаемости представителей грибов идентифицированных семейств *Sacharomycetalis*, *Malasseziaceae* и *Tremellaceae* в составе микробиоты кожи локальных биотопов [81, 86]. Встречаемость вида *Candida albicans* у больных детей в стадии обострения заболевания была также выше на 19,4%, чем у здоровых детей этой возрастной группы. Отмечено увеличение встречаемости липофильных дрожжеподобных грибов *M. globose*, *M. sarcae* на коже у детей с АтД в стадию обострения заболевания по сравнению с группой сравнения и контроля (Таблица 8). Выявлено отсутствие выделения *M. sympodialis* с кожи детей с АтД по сравнению с контрольной группой, где данный вид липофильных грибов выделялся в 65,0% случаев (Таблица 5).

Сравнительные данные, касающиеся встречаемости культивируемых представителей микробиоты кожи на локальных участках кожи у подростков с АтД в возрастной группе 15-18 лет и подростков контрольной группы (таблице 6).

Таблица 6 – Среднее значение Me ($Q1;Q3$) частот встречаемости культивируемой микрофлоры на локальных участках кожи у больных подростков с АтД в возрастной группе от 15 до 18 лет и в группах контроля и сравнения (в %)

Таксономическая группа (вид)	Подростки с АтД		Группа сравнения n=30	Контрольная группа n=20	P
	Стадия обострения n=50	Стадия ремиссии n=45			
	1	2			
<i>S. aureus</i>	48,6 27,5;87,5	18,5 8,4;28,5	9,5 5,3;11,8	н/о	$p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,01$
<i>S. epidermidis</i>	44,4 17,0;34,6	45,6 26,7;53,5	67,8 38,5;87,5	89,0 36,9;90,3	$p_{1-4} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{3-4} > 0,05$
<i>S. haemolyticus</i>	18,6 7,5;27,5	18,0 9,0;28,7	7,8 3,9;12,7	н/о	$p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$

Продолжение Таблицы 6

	1	2	3	4	
<i>S. hominis</i>	н/о	н/о	28,4 12,2;32,7	15,0 7,9;24,5	$p_{3-4} < 0,05$
<i>S. xylosus</i>	н/о	н/о	н/о	14,0 7,7;18,6	-
<i>Bacillus spp.</i>	8,5 3,9;12,6	6,5 3,6;8,4	н/о	н/о	$p_{1-2} < 0,05$
<i>Corynebacterium spp.</i>	10,1 4,2;7,8	6,5 3,6;8,9	34,5 18,6;45,8	38,0 17,2;64,0	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,03$
<i>Lactobacillus spp.</i>	6,9 3,5;10,8	12,8 5,9;15,8	38,5 18,8;56,9	36,6 16,7;67,5	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$
<i>Pseudomonas spp.</i>	3,0 2,4;5,8	6,0 3,5;11,6	н/о	н/о	$p_{1-2} < 0,05$
<i>Candida albicans</i>	27,8 16,3;32,5	9,7 4,4;12,8	8,8 5,1;14,6	н/о	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
<i>Candida parapsilosis</i>	н/о	7,6 3,9;13,6	8,7 5,0;14,9	14,0 7,7;24,5	$p_{2-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$
<i>Cryptococcus sp.</i>	8,5±3,9	1,5±0,7	н/о	н/о	$p_{1-2} < 0,05$
<i>M. caprae</i>	68,0 26,5;76,5	24,8 12,5;32,8	18,6 7,1;26,8	8,0 5,0;12,8	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$
<i>M. globose</i>	16,0 5,1;19,5	8,5 5,6;12,9	18,6 7,1;23,8	н/о	$p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
<i>M. sympodialis</i>	12,0 7,5;21,6	5,0 2,5;8,5	66,7 28,6;84,5	70,0 30,5;85,6	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$

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

Анализ полученных данных позволил выявить достоверные изменения в частоте встречаемости представителей филума Firmicutes у подростков с АтД по сравнению с подростками группы сравнения и контроля. Установлено, что в стадии обострения АтД у подростков отмечена высокая частота встречаемости *S. aureus* на локальных участках пораженной кожи 48,0% (Q₁27,5; Q₃87,5) в сравнении с группой контроля и сравнения, у которых данный вид стафилококка выделялся с кожи в 9,5% (Q₁5,3; Q₃11,8) случаев (Таблица 6). Также были характерны видовые отличия во встречаемости КОС. Так, у подростков при развитии АтД на локальных участках кожи не встречался вид *S. hominis*, тогда как у здоровых подростков и бактерионосителей группы сравнения он был характерен для бактериоценоза кожи. Встречаемость вида *S. epidermidis* у подростков с АтД также была достоверно снижена в стадии обострения заболевания, как и в стадии ремиссии заболевания, что является характерной отличительной особенностью групп сравнения и контроля, в которых этот вид КОС выделялся с частотой 67,8–89,0% (Таблица 6). У подростков с АтД были выявлены статистически достоверные изменения во встречаемости представителей филума Actinobacteria в составе микробиоты локальных участков кожи.

Установлено также, что встречаемость *Corynebacterium* spp. у подростков с АтД в стадии обострения заболевания была ниже, чем у здоровых лиц (контрольная группа) и в группе сравнения. Отмечено также значимое снижение встречаемости видов *Lactobacillus* spp. у подростков с АтД. Установлены особенности встречаемости у подростков с АтД бактерий, относящихся к представителям Proteobacteria. Выявлено также выделение с локальных биотопов кожи у подростков с АтД представителей *Pseudomonas* spp. в 3,0–6,0% случаев.

У подростков с АтД установлены значимые различия в частоте встречаемости представителей грибов идентифицированных семейств *Sacharomycetalis*, *Malasseziaceae* и *Tremellaceae* в составе микробиоты локальных участков кожи [86]. Встречаемость вида *Candida albicans* у подростков в стадии обострения заболевания была выше, чем у лиц контрольной группы и группы

сравнения. Отмечено также увеличение встречаемости липофильных дрожжеподобных грибов *M. carne*, *M. globose* на пораженной коже у подростков с АД в стадию обострения АД по сравнению с группой контроля (Таблица 6). Нами установлено также выделение с локальных биотопов кожи у подростков с АД в стадию обострения и ремиссии заболевания грибов *Cryptococcus spp.*

Сравнительные данные, касающиеся встречаемости культивируемой микрофлоры микробиоты кожи на локальных участках у взрослых пациентов с АД и здоровых лиц контрольной и группы сравнения представлены в сводной Таблице 7.

Таблица 7 – Среднее значение Me ($Q1$; $Q3$) частот встречаемости культивируемой микрофлоры на локальных участках кожи у взрослых пациентов с АД и в группах контроля и сравнения (в %)

Таксономическая группа (вид)	Взрослые с АД		Группа сравнения n=45	Контрольная группа n=25	p
	Стадия обострения n=80	Стадия ремиссии n=50			
	1	2			
<i>S. aureus</i>	38,7 15,4; 83,4	15,0 5,0; 23,0	7,4 3,9; 6,5	н/о	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
<i>S. epidermidis</i>	25,7 12,8; 34,7	38,5 16,8; 43,3	53,8 23,4; 81,5	56,0 21,8; 86,5	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$
<i>S. haemolyticus</i>	10,0 4,3; 18,6	6,5 3,4; 11,2	6,8 3,7; 11,4	н/о	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
<i>S. hominis</i>	н/о	н/о	14,6 5,2; 21,5	32,0 15,3; 45,7	$P_{3-4} < 0,05$
<i>S. saprophyticus</i>	н/о	8,0 3,8; 12,4	15,0 7,3; 12,4	31,0 19,2; 54,7	$P_{3-4} < 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$
<i>S. xylosus</i>	н/о	н/о	8,6 4,2; 12,5	21,0 8,1; 28,9	$P_{3-4} < 0,05$
<i>Bacillus spp.</i>	н/о	8,0±3,8	н/о	н/о	-

Продолжение Таблицы 7

	1	2	3	4	
<i>Corynebacterium</i> spp.	18,6 9,3; 23,5	17,8 5,4; 21,8	35,9 17,1; 54,5	54,6 19,9; 76,5	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,01$ $p_{3-4} < 0,05$ $p_{2-4} > 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$
<i>Lactobacillus</i> spp.	9,5 3,2; 12,8	19,0 5,5; 23,8	28,5 16,7; 34,6	43,0 19,9; 66,5	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$
<i>Pseudomonas</i> spp.	12,5 3,6; 17,8	н/о	н/о	н/о	-
<i>Candida albicans</i>	10,4 5,4; 16,5	8,7 3,9; 12,8	6,8 3,7; 11,5	н/о	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
<i>Cryptococcus</i> sp.	12,0 3,8; 17,6	8,6 3,9; 14,7	7,6 3,5; 13,8	н/о	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
<i>M. caprae</i>	12,0 6,6; 16,5	7,7 3,7; 12,2	19,5 8,9; 23,8	8,0 4,4; 11,6	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,04$ $p_{3-4} < 0,05$ $p_{1-4} > 0,05$ $p_{2-4} > 0,05$
<i>M. globose</i>	н/о	9,7 4,1; 12,6	н/о	н/о	$p_{2-3} < 0,05$
<i>M. sympodialis</i>	7,7 2,9; 13,2	34,7 16,7; 43,6	66,7 27,0; 86,5	68,0 29,3; 72,5	$P_{2-4} < 0,05$ $P_{1-4} < 0,05$

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

При анализе сравнительных данных установлено, что у взрослых с АДД по сравнению со здоровыми лицами контроля и группы сравнения имеются также значимые изменения во встречаемости представителей филума Firmicutes. Выявлено, что у взрослых больных АДД встречаемость *S. aureus* на локальных участках пораженной кожи выше на 38,7% в стадии обострения заболевания и на 15,0% в ремиссии по сравнению с контрольной группой (Таблица 7).

Выявлены также видовые отличия во встречаемости коагулаза-отрицательных видов стафилококков: у взрослых при развитии АДД на локальных

участках кожи не встречался вид *S. hominis*, тогда как у здоровых лиц он выделялся. Встречаемость вида *S. epidermidis* у взрослых с АД на локальных участках кожи также была значимо снижена в разные стадии заболевания, более выражено в стадию обострения (на 30,0%) и менее выражено (на 18,0%) в стадию ремиссии. Обнаруживался у взрослых больных АД в 6,5–10,0% случаев *S. haemolyticus*, который не выделялся с кожи здоровых лиц группы контроля (Таблица 7). У взрослых с АД были также выявлены значимые изменения во встречаемости представителей филума Actinobacteria в составе микробиоты локальных участков кожи. Выявлены изменения в частоте встречаемости коринебактерий. Встречаемость *Corynebacterium spp.* у взрослых с АД в стадии обострения заболевания была ниже на 36,6%, чем у здоровых лиц контрольной группы. Нами установлено снижение показателей микробного обсеменения кожи *Corynebacterium spp.* при взятии материала по границе очагов поражения. Показатели микробного обсеменения *Corynebacterium spp.* у взрослых больных с АД составили $2,6 \pm 1,8 \text{ Log}_{10} \text{ КОЕ/см}^2$ ($450,0 \pm 70,0 \text{ КОЕ/см}^2$), тогда как у здоровых лиц (контрольная группа) показатель составил $3,4 \pm 2,1 \text{ Log}_{10} \text{ КОЕ/см}^2$ ($2500,0 \pm 130,0 \text{ КОЕ/см}^2$), что в 5,5 раза выше. Отмечено также значимое снижение на 33,5% встречаемости видов *Lactobacillus spp.* у взрослых с АД, как и у детей и подростков, т.е. фактически отмечена общая закономерность (Таблица 7).

У взрослых с АД установлены значимые различия в частоте встречаемости представителей дрожжеподобных грибов идентифицированных семейств *Sacharomycetalis*, *Malasseziaceae* и *Tremellaceae* в составе локальной микробиоты кожи. Встречаемость вида *Candida albicans* у взрослых в стадию обострения заболевания была выше на 10,4%, чем в группе контроля. Отмечено, что у взрослых больных с АД увеличилась встречаемость *M. capre* в стадию обострения заболевания и *M. globose* и снизилась встречаемость *M. sympodialis* по сравнению с контрольной группой (Таблица 7).

Патогенный вид бактерий рода стафилококков – вид *S. aureus* является распространенным представителем бактериальной микрофлоры в составе

микробиоты кожи у больных с АтД (на фоне развития АЗ), что согласуется с приведенными данными других исследований, где показано, что у лиц с аллергической патологией этот вид может колонизировать кожу в 80,0% случаев, а при бактерионосительстве может колонизировать кожу у 20,0–30,0% индивидуумов [85,104].

В связи с этим нами на основе полученных данных по частоте встречаемости бактериальных видов были рассчитаны абсолютные риски (EER, CER) колонизации кожи разных участков тела при бактерионосительстве в группе сравнения (здоровые лица без аллергической патологии) и на фоне развития atopического дерматита (аллергическое заболевание), см. Таблицу 8.

Таблица 8 – Абсолютный риск колонизации кожи *S. aureus* при развитии аллергического заболевания (атопического дерматита)

Показатель	Сравниваемые группы и абсолютный риск, в долях		
	АтД (основная группа), n=45	Группа сравнения бактерионосители n=26	p
EER (кожа лица)	0,897	-	<0,05
CER (кожа лица)	-	0,248	
EER (кожа верхних конечностей)	0,876	-	<0,05
CER (кожа верхних конечностей)	-	0,125	
EER (кожа нижних конечностей)	0,89	-	<0,02
CER (кожа нижних конечностей)	-	0,086	
EER (кожа шейной области)	0,85	-	<0,05
CER (кожа шейной области)	-	0,257	

Примечание: Абсолютный риск (EER) – для основной группы, при чувствительности (Se)=0,68 и специфичности (Sp)=0,93; абсолютный риск (CER) – для группы сравнения при чувствительности Se=0,93 и специфичности Sp=0,87.

По полученным данным можно констатировать, что *S. aureus* можно отнести к доминирующему бактериальному виду стафилококковой микрофлоры кожи, риск колонизации которым значимо возрастает на фоне развития АтД (Таблица 8).

Вид *S. epidermidis*, как значимый представитель микробиоты кожи, имеет существенное значение в защите кожи от колонизации патогенными бактериями. Как показали наши исследования, он чаще выявляется на здоровой коже лица, конечностей и тела, а при развитии патологического процесса частота выделения его снижается (Таблица 8) [85, 86]. Необходимо отметить, что облигатные комменсалы кожи, такие как *Corynebacterium* spp., *S. epidermidis*, представительство которых снижается в составе микробиотопов кожи у больных с АД, а также у бактерионосителей группы сравнения, проявляют антагонизм в отношении других условно-патогенных бактерий, в том числе и в отношении *S. aureus*.

Выявленные нами изменения отражают полимикробную картину кожи, которая характерна для атопического дерматита: достоверное снижение колонизации и обсемененности кожи *Corynebacterium* spp. (особенно кожи лица, шеи и некоторых областей тела, где наблюдается большая плотность сальных желез), а также снижение встречаемости и показателей микробной обсемененности бактериями *Lactobacillus* spp. Данная микробная картина кожи характеризует снижение защитных свойств кожной микрофлоры и барьерных свойств самой кожи при атопическом дерматите, способствует контаминации и колонизации кожи сапрофитами, такими как *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., которые не были характерны для микробных консорциумов кожи здоровых лиц [85]. Выявлены также и изменения микробиоты у больных АД, которые характеризовались увеличением колонизации пораженной кожи грибами *Candida albicans*, *M. caprae*, *M. globosa* и выделением у некоторых больных представителей грибов рода *Cryptococcus* spp.

3.2. Изменения локальной микробиоты слизистой верхних дыхательных путей у больных с респираторной аллергией (аллергический ринит и сочетанная патология: аллергический ринит + атопическая бронхиальная астма)

Микробиологическое исследование ВДП проведено в динамике заболевания: при первичном обращении в стадии обострения АР [31, 83, 94]; затем – после проведения терапии в стадии ремиссии заболевания. Терапия АР включала симптоматическую и базисную терапию, а у некоторых пациентов – патогенетическую терапию. В качестве патогенетической терапии проведена аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) АР. При проведении базисной терапии (в т.ч. симптоматической терапии) пациентам назначались лекарственные средства в виде таблетированных форм блокаторов H₁-рецепторов гистамина второго поколения, антигистаминных препаратов со стабилизирующим действием на мембраны тучных клеток (кетотифен), препаратов кромоглициевой кислоты, в среднетяжелых случаях – интраназальные ГКС (флутиказона пропионат, беклометазон дипропионат).

При проведении патогенетической терапии (АСИТ) у пациентов с АР, которая по длительности была предсезонной, предсезонно-сезонной и круглогодичной, им назначались лечебные аллергены: применяли неинъекционные методы проведения АСИТ. Возрастная и нозологическая структура пациентов с респираторной аллергической патологией, составляющих основную группу и включенных в исследование, представлена в Таблице 9.

Таблица 9 – Основная группа: больные с респираторной аллергией

№	Диагноз	Возраст	Кол-во
1	САР	6–7 лет	75
2	САР	8–14 лет	35

Продолжение Таблицы 9

3	КАР+АБА	6–10 лет	50
4	САР +АБА среднетяжелая	15–18 лет	25
5	КАР	14–18 лет	45
6	КАР+АБА среднетяжелая	15–18 лет	50
7	КАР+АтД	Старше 18 лет	50
8	САР	Старше 18 лет	45
Всего			375

Критериями включения в основную группу пациентов с проявлениями респираторной аллергии были: САР или КАР; сочетанные формы респираторной аллергии (САР+АБА) или КАР+АБА; сочетанная аллергическая патология – АР+АтД с сенсibilизацией к бытовым, пыльцевым и пищевым аллергенам.

Сравнительные данные, касающиеся встречаемости бактерий *Staphylococcus* spp. микробиоты ВДП у детей с САР, у детей 6–14 лет и в группе бактерионосителей (группа сравнения), представлены в сводной таблице 10.

Таблица 10 – Среднее значение Ме (Q1; Q3) частот встречаемости культивируемых *Staphylococcus* spp. микробиоты ВДП у детей с САР в возрасте 6–14 лет и в группе сравнения (в %)

Таксономическая группа (вид)	САР		Стадия ремиссии (АСИТ) n=35	Группа сравнения, n=46	p
	Стадия обострения n=110	Стадия ремиссии (базисная терапия) n=56			
	1	2	3	4	
<i>S. aureus</i>	41,8 23,7; 76,5	28,5 13,0; 42,8	10,5 5,1; 12,8	6,5 (3,6; 9,5) ¹ 12,7 (4,9; 18,8) ²	p ₁₋₄ <0,05 p ₂₋₄ <0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₃₋₄ <0,05 ²

Продолжение Таблицы 10

<i>S. epidermidis</i>	9,0 2,7; 14,8	5,0 2,9; 7,6	26,7 14,5; 38,9	63,6 (7,1; 78,5) ¹ 28,9 (16,6; 8,5) ²	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$
<i>S. haemolyticus</i>	37,2 14,6; 47,8	25,0 10,7; 34,8	38,0 18,2; 45,8	7,0 (3,7; 12,4) ¹ 15,0 (8,2; 21,6) ²	$p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$
<i>S. hominis</i>	11,0 7,9; 16,5	7,4 3,4; 11,5	18,7 7,5; 36,4	21,8 (8,0; 35,8) ¹ 9,7 (4,3; 12,7) ²	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{1-4} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
<i>S. saprophyticus</i>	н/о	н/о	н/о	25,3 (9,4; 34,8) ¹ 14,8 (5,2; 21,5) ²	-

Примечание: Частоты встречаемости микроорганизмов рассчитаны на основе анализа данных в период осенне-зимнего¹ и весенне-летнего сезонов²; н/о – не определялся; статистическую значимость между группами оценивали по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$.

Встречаемость патогенного *S. aureus* в стадию обострения САР в составе локального биотопа слизистой ВДП достоверно была выше у этих пациентов, чем в стадию ремиссии после проведения базисной терапии. Встречаемость этого вида в ремиссию заболевания снижалась в 1,4 раза после проведения соответствующей терапии, причем больший положительный эффект на снижение частоты встречаемости этого вида отмечен при проведении АСИТ (в 3,9 раза), чем при базисной терапии. В стадии ремиссии этой формы аллергического ринита после АСИТ частота выделения *S. aureus* у больных фактически была такой же, как в группе здоровых бактерионосителей (группа сравнения) в весенне-летний период (Таблица 10).

Необходимо отметить, что в группе бактерионосителей *S. aureus* без аллергической патологии (группа сравнения) частота выделения этого вида возрастала в весенне-летний период, при этом частота носительства этого вида у здоровых бактерионосителей была ниже, чем у пациентов с АР.

Отмечено, что у пациентов с САР выявлено достоверное снижение частоты выделения со слизистой ВДП таких комменсальных видов КОС, как *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis* и увеличение встречаемости *S. haemolyticus*, что не характерно для группы бактерионосителей без аллергической патологии (группа сравнения), Таблица 10,

Сравнительные данные, касающиеся встречаемости бактерий *Staphylococcus* spp. микробиоты ВДП у детей с КАР в возрастной группе 6–14 лет и в группе бактерионосителей (группа сравнения) представлены в сводной Таблице 11.

Таблица 11 – Среднее значение Ме (Q1; Q3) частот встречаемости культивируемых *Staphylococcus* spp. микробиоты ВДП у детей 6–14 лет с КАР и в группе сравнения (в %)

Таксономическая группа (вид)	КАР		Группа сравнения (здоровые бактерионосители без АЗ), n=34	p
	Стадия обострения n=55	Стадия ремиссии (базисная терапия) n=48		
	1	2	3	
<i>S. aureus</i>	62,0 26,5; 86,7	45,0 27,1; 36,8	6,5 (4,2; 10,5) ¹ 12,7 (5,7; 18,5) ²	p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₁₋₂ <0,05
<i>S. epidermidis</i>	15,0 4,8; 21,8	43,0 21,1; 67,8	64,5 (28,2; 75,8) ¹ 28,0 (17,7; 36,5) ²	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05
<i>S. haemolyticus</i>	18,2 5,2; 24,8	4,0 2,8; 5,8	7,0 (4,3; 12,8) ¹ 15,0 (6,1; 25,5) ²	p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₁₋₂ <0,05
<i>S. hominis</i>	н/о	18,9 8,6; 28,7	21,8 (10,0; 32,8) ¹ 9,7 (5,0; 13,8) ²	p ₂₋₃ <0,05 ²

Продолжение Таблицы 11

<i>S. saprophyticus</i>	н/о	н/о	21,8 (12,0; 30,5) ¹ 9,7 (5,0; 12,5) ²	-
<i>S. hylosus</i>	н/о	10,0 4,3; 15,8	н/о	-

Примечание: Частоты встречаемости микроорганизмов рассчитаны на основе анализа данных в период осенне-зимнего¹ и весенне-летнего сезонов²; н/о – не определялся; статистическую значимость между группами оценивали по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$.

В этой группе пациентов с КАР отмечена такая же закономерность; частота выделения *S. aureus* со слизистой ВДП была выше в 9,5 раз при обострении заболевания и снижалась в стадию ремиссии, по сравнению с группой сравнения, где при проведении микробиологического обследования установлена максимальная встречаемость этого вида только в весенне-летний период (Таблица 11). Нами также показано, что в этой группе пациентов в стадии обострения заболевания наблюдалось увеличение встречаемости на слизистой ВДП *S. haemolyticus*, *S. hylosus* и снижение встречаемости *S. epidermidis*. Необходимо отметить, что в группе сравнения в весенне-летний период отмечено увеличение колонизации слизистой носа *S. aureus* и снижение встречаемости *S. epidermidis*. В основной группе значимых сезонных колебаний в частоте встречаемости *S. aureus* не выявлено.

Сравнительные данные, касающиеся встречаемости бактерий *Staphylococcus* spp. микробиоты ВДП у подростков и взрослых (15 лет и старше) с КАР и в группе бактерионосителей (группа сравнения) представлены в Таблице 12.

Таблица 12 – Среднее значение Ме (Q1; Q3) частот встречаемости *Staphylococcus* spp. культивируемой микробиоты ВДП у подростков и взрослых с КАР и в группе сравнения (в %)

Таксономическая группа (вид)	КАР		Стадия ремиссии (АСИТ) n=35	Группа сравнения n=30	p
	Стадия обострения n=145	Стадия ремиссии (базисная терапия) n=47			
	1	2			
<i>S. aureus</i>	52,4 24,1; 76,8	42,8 21,2; 68,5	21,8 8,9; 29,8	16,6 (6,8; 20,3) ¹ 6,6 (4,5; 8,5) ²	p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₁₋₄ <0,05
<i>S. epidermidis</i>	5,5 1,9; 7,8	22,7 8,1; 35,6	38,7 17,1; 67,6	43,3 (12,0; 74,8) ¹ 67,0 (28,6; 70,2) ²	p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₃₋₄ <0,05
<i>S. haemolyticus</i>	22,7 3,4; 27,5	35,6 12,5; 52,5	6,0 4,0; 9,5	10,0 (5,4; 13,5) ¹	p ₂₋₃ <0,05 p ₃₋₄ <0,05 p ₁₋₄ <0,05 p ₂₋₄ <0,05
<i>S. hominis</i>	16,0 6,0; 25,5	14,9 5,1; 20,8	6,0 3,0; 7,5	7,0 (4,6; 11,5) ¹ 10,0 (5,4; 14,8) ²	p ₁₋₂ >0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₁₋₄ <0,05 p ₃₋₄ <0,05 ²
<i>S. saprophyticus</i>	н/о	н/о	н/о	10,0 (5,4; 12,8) ¹ 20,0 (12,3; 28,5) ²	-
<i>S. hylosus</i>	18,0 6,1; 25,7	4,2 2,9; 5,9	н/о	н/о	p ₁₋₂ <0,05

Примечание: Частоты встречаемости микроорганизмов рассчитаны на основе анализа данных в период осенне-зимнего¹ и весенне-летнего сезонов²; н/о – не определялся; статистическую значимость между группами оценивали по U-критерию Манна-Уитни, p<0,05.

В основной группе пациентов с КАР установлено, что фактически у половины больных подростков и взрослых лиц слизистая ВДП при этой форме аллергического ринита в стадию обострения заболевания колонизируется *S. aureus*. У одной пятой из этих пациентов в стадию обострения заболевания выделяется *S.*

haemolyticus, в дальнейшем в динамике заболевания при переходе в ремиссию частота выделения этого вида возрастает. Отмечено также снижение колонизации слизистой ВДП *S. epidermidis* в стадию обострения заболевания при этой форме ринита. Выявлен положительный эффект АСИТ-терапии при данной форме ринита, по сравнению с базисной терапией, на снижение частоты колонизации слизистой ВДП *S. aureus* и увеличение колонизации комменсалом *S. epidermidis* (Таблица 12). Установлено изменение структуры колонизации слизистой ВДП при данной форме ринита коагулаза-отрицательными стафилококками (КОС). Так, при КАР, в отличие от бактерионосительства (группа сравнения) в структуре видов КОС, отсутствуют вид *S. saprophyticus* и присутствует *S. hylosus*, который не был нами выделен при бактерионосительстве без аллергической патологии. У подростков и взрослых при КАР отмечено увеличение частоты колонизации слизистой ВДП (фактически в 2 раза!) КОС *S. hominis* по сравнению с группой бактерионосителей без аллергической патологии (группа сравнения).

Сравнительные данные, касающиеся встречаемости бактерий *Staphylococcus spp.* микробиоты ВДП у подростков (15–18 лет с САР+АБА) и взрослых с САР, а также в группе бактерионосителей без АЗ (группа сравнения), представлена в сводной Таблице 13.

Таблица 13 – Среднее значение Me (Q1; Q3) частот встречаемости культивируемых *Staphylococcus* spp. микробиоты ВДП у подростков и взрослых с САР и в группе сравнения (в %)

Таксономическая группа (вид)	САР		Стадия ремиссии (АСИТ) n=36	Группа сравнения n=40	p
	Стадия обострения n=60	Стадия ремиссии (базисная терапия) n=45			
	1	2			
<i>S. aureus</i>	76,6 25,4; 80,8	58,0 27,3; 68,9	42,0 18,2; 55,5	15,0 (8,6; 22,7) ¹ 7,5 (4,1; 11,6) ²	p ₁₋₂ <0,05 p ₃₋₄ >0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₁₋₄ <0,05 p ₂₋₄ >0,05
<i>S. epidermidis</i>	11,6 4,1; 17,5	33,3 17,0; 45,7	47,2 18,3; 65,6	42,5 (17,8;68,3) ¹ 70,0 (27,2;81,5) ²	p ₁₋₂ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₂₋₄ <0,05 p ₁₋₄ <0,05
<i>S. haemolyticus</i>	33,3 11,5; 43,5	44,4 17,4; 65,8	13,8 5,7; 19,5	10,0±4,7 ¹ (20,0±6,3) ²	p ₁₋₂ <0,05 p ₃₋₄ <0,05 p ₁₋₄ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₂₋₄ <0,05
<i>S. hominis</i>	н/о	н/о	20,0 5,9; 26,8	2,5 (1,4; 3,5) ¹ 10,0 (4,7; 16,8) ²	p ₂₋₄ < 0,05
<i>S. saprophyticus</i>	н/о	н/о	н/о	5,0 (3,4; 7,8) ¹ 22,5 (8,6; 32,5) ²	-
<i>S. hylosus</i>	8,3 (3,5; 12,1)	9,0 (4,0;12,5)	н/о	н/о	p ₁₋₂ >0,05

Примечание: Частоты встречаемости микроорганизмов рассчитаны на основе анализа данных в период осенне-зимнего¹ и весенне-летнего сезонов²; н/о – не определялся; статистическую значимость между группами оценивали по U-критерию Манна-Уитни, p<0,05.

При САР у подростков и взрослых пациентов при микробиологическом исследовании в острую стадию заболевания отмечена также высокая частота встречаемости *S. aureus* (в 5,1 раза превышающая встречаемость в группе

сравнения) (Таблица 13). Также выявлено снижение частоты колонизации ВДП в острую стадию заболевания *S. epidermidis* и отсутствие колонизации локальных биотопов *S. hominis*, *S. saprophyticus*. Установлен положительный эффект от АСИТ, заключающийся в снижении частоты колонизации слизистой ВДП *S. aureus*, *S. haemolyticus* и увеличении частоты колонизации *S. epidermidis* (Таблица 13).

Сравнительные данные, касающиеся встречаемости других видов бактерий, относящихся к филумам Firmicutes, Actinobacteria и Proteobacteria в составе локальной микробиоты ВДП у детей и подростков (6–14 лет) с АР и в группе сравнения в зависимости от проводимой терапии, представлены в Таблице 14.

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

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

Продолжение Таблицы 14

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

Примечание: Частоты встречаемости микроорганизмов рассчитаны на основе анализа данных в период осенне-зимнего¹ и весенне-летнего сезонов²; н/о – не определялся; статистическую значимость между группами оценивали по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$.

При развитии аллергического ринита микробная картина слизистой ВДП у пациентов характеризуется полимикробным спектром. Отмеченные закономерности при развитии АР у детей и подростков в острую стадию заболевания характеризуются снижением частоты колонизации слизистой ВДП *Corynebacterium* spp. (Таблица 14). В острую стадию заболевания у детей и подростков отмечено увеличение частоты колонизации слизистой ВДП грамотрицательными бактериями, относящимися к *Enterobacter* spp., *Moraxella* spp., а также гемофильными бактериями *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus haemolyticus*. После АСИТ в стадию ремиссии частота колонизации грамотрицательными видами бактерий указанных родов снижается, а представители рода *Enterobacter* spp. и гемофильных бактерий *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* нами не выявлялись (Таблица 14). Установлены также изменения в частоте встречаемости у больных в возрасте 6–14 лет с АР бактерий, относящихся к непатогенным нейссериям. Так, нами отмечено снижение встречаемости *Neisseria flavescens* в стадию обострения аллергического

ринита и отсутствие выделения *Neisseria subflava* у этих пациентов в этот период. Нами также выявлено, что встречаемость назального носительства *S. pneumoniae* у детей с АР в возрасте 6–14 лет составила 18,0% (Q₁8,5; Q₃28,5), что не отличало эту группу от детей бактерионосителей группы сравнения без аллергического ринита (Таблица 14) [11, 28]. Однако нами установлено, что в группе детей с аллергическим ринитом в стадии ремиссии заболевания после проведения АСИТ встречаемость назального носительства *S. pneumoniae* снижалась на 6,0% (p<0,05). Нами также показано, что среди изолятов *S. pneumoniae*, выделенных как от детей с АР, так и от здоровых бактерионосителей без аллергической патологии, увеличивается доля (на 2,0–5,0%) резистентных штаммов к антимикробным препаратам (за 5-летний сравнительный период): к пенициллину, амоксициллину/клавуланату, амоксициллину, кларитромицину, клиндамицину, цефтриаксону и цефиксиму [315].

Сравнительные данные, касающиеся встречаемости основных представителей бактерий, относящихся к представителям филума Actinobacteria, Proteobacteria в составе микробиоты ВДП у больных подростками (15–17 лет) и взрослых с АР, а также в группе сравнения, представлены в Таблице 15.

Таблица 15 – Среднее значение Me (Q₁; Q₃) частот встречаемости культивируемых представителей Actinobacteria, Proteobacteria локальной микробиоты ВДП у взрослых с АР и в группе сравнения (в %)

Таксономическая группа (вид)	АР		Стадия ремиссии (АСИТ) n=37	Группа сравнения n=38	p
	Стадия обострения n=64	Стадия ремиссии (базисная терапия) n=60			
	1	2	3	4	
<i>Corynebacterium</i> spp.	9,4 3,6; 12,7	8,3 3,5; 10,5	23,5 7,6; 30,8	10,5 (4,9; 13,8) ¹	p ₁₋₄ <0,05 ² p ₁₋₃ <0,05 p ₃₋₄ <0,05 ¹
<i>Enterobacter</i> spp.	15,6 6,5; 25,6	н/о	н/о	5,3 (3,6; 7,5) ¹ (н/о) ²	p ₁₋₄ <0,05

Продолжение Таблицы 15

Moraxella spp.	26,6 10,5;36,8	16,7 4,8; 28,6	8,3 4,5; 12,5	7,9 (4,3; 11,2) ¹ 18,4 (6,2; 20,5) ²	p ₁₋₄ <0,05 p ₁₋₂ <0,05 p ₃₋₄ <0,05 ² P ₂₋₃ <0,05
Neisseria flavescens	6,0 2,7; 9,5	18,0 7,9; 25,6	21,0 6,7; 35,3	24,0 (9,6; 35,0) ¹	p ₁₋₃ <0,05 p ₁₋₄ <0,05 p ₂₋₃ >0,05 p ₃₋₄ >0,05
Neisseria subflava	н/о	н/о	28,0 7,5; 38,5	25,0 7,3; 39,6 ¹	p ₃₋₄ >0,05
Haemophilus influenzae	25,0 12,5; 43,8	15,0 7,6; 21,5	н/о	н/о ¹ 5,3 (1,5; 7,0) ²	p ₁₋₄ <0,05 p ₂₋₄ <0,05
Haemophilus parainfluenzae	24,0 10,3; 32,8	18,0 8,5; 27,8	5,0 2,5; 9,5	12,5 (5,3; 34,6) ¹	p ₁₋₃ <0,05 p ₁₋₄ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₃₋₄ <0,05
Haemophilus haemolyticus	18,0 4,6; 29,0	17,0 3,4; 28,7	6,0 3,8; 8,5	8,0 4,4; 9,5	p ₁₋₃ <0,05 p ₁₋₄ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₃₋₄ >0,05

Примечание: Частоты встречаемости микроорганизмов рассчитаны на основе анализа данных в период осенне-зимнего¹ и весенне-летнего сезонов²; н/о – не определялся; статистическую значимость между группами оценивали по U-критерию Манна-Уитни, при p<0,05.

В данной возрастной группе пациентов с АР также отмечено снижение частоты колонизации слизистой ВДП в стадию обострения аллергического ринита *Corynebacterium* spp. и увеличение частоты колонизации грамотрицательными видами бактерий *Enterobacter* spp., *Moraxella* spp. Установлено также увеличение частоты колонизации слизистой ВДП у больных аллергическим ринитом гемофильными бактериями – *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus influenzae* spp. по сравнению с группой сравнения (Таблица 15). Отмечено, что в группе пациентов с аллергическим ринитом после курса АСИТ частота выделения гемофильных бактерий – *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus influenzae* снижалась. В стадию ремиссии АР особенно после проведения АСИТ микробный состав выделяемых

бактерий фактически приближается к составу здоровых бактерионосителей без аллергической патологии (группе сравнения), Таблица 15. Установлены также изменения во встречаемости у взрослых больных с АР представителей *Proteobacteria*. Выявлено снижение частоты выделения *Neisseria flavescens* на 18,0% в стадию обострения аллергического ринита. Отмечено также отсутствие встречаемости *Neisseria subflava* у больных АР взрослых лиц в стадию обострения и ремиссии заболевания после базисной терапии, в отличие от здоровых и лиц получивших АСИТ, у которых данный вид выделялся у 25,0–28,0% обследованных (Таблица 15).

Фактически данных, касающихся трансформации полимикробных сообществ кожи и слизистых оболочек при развитии аллергических реакций в этих органах, получено недостаточно, в связи с этим в данном исследовании по характеру изменения встречаемости микробных видов нами показаны особенности этой трансформации, характеризующие своего рода дисбиотическую реакцию этих органов при формировании аллергического заболевания [30, 31, 85].

ГЛАВА 4. ПАТОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ STAPHYLOCOCCUS AUREUS ЛОКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ

4.1. Протеиназная активность штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных с кожи и слизистых оболочек у больных атопическим дерматитом и аллергическим ринитом

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

Учитывая тот факт, что при анализе микробиоты доминирующими аэробными бактериальными представителями микрофлоры кожи и слизистых ВДП у пациентов с АЗ выступают *Staphylococcus spp.*, изучение свойств мы сфокусировали на этой таксономической группе и, в частности, на наиболее патогенном виде – *S. aureus*.

*Иммуноглобулин-расщепляющая активность изолятов *Staphylococcus spp.*, входящих в состав микробиоты кожи и ВДП*

Снижение барьерных функций кожи и слизистых оболочек ВДП при развитии аллергического воспаления при АЗ способствует заселению кожи и слизистых оболочек бактериями и грибами с особыми свойствами. Одним из возможных механизмов подавления функции иммунокомпетентных клеток могут

выступать протеолитические ферменты *S. aureus*, которые способны расщеплять АМП, а также иммуноглобулины, такие как IgA и IgG. Протеиназы этих видов способны путем частичного протеолиза инактивировать защитные функции кателицидинов кожи. Так, в частности, ауреолизин протеолитический фермент, выделенный из *S. aureus*, обеспечивает инактивацию биологических эффектов АМП кожи LL-37. В результате исследования протеолитической активности культуральной жидкости (КЖ) изолятов *Staphylococcus spp.* кожи была установлена видовая дифференциация штаммов по способности расщеплять иммуноглобулин (IgG), протеолитическая активность внеклеточных ферментов штаммов определена при pH 7.4 (Рисунок 3).

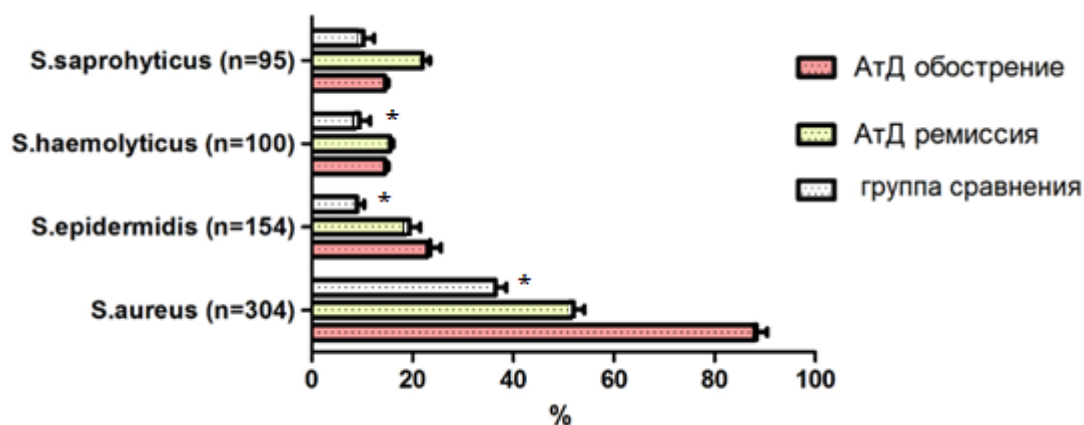


Рисунок 3 – Частота встречаемости протеиназоактивных (иммуноглобулин-расщепляющих) изолятов штаммов *Staphylococcus spp.* (протеолитическая активность при pH 7.4, субстрат IgG), выделенных с кожи пациентов с АтД и здоровых бактерионосителей контрольной группы

Где n – количество исследованных штаммов *Staphylococcus spp.*

Ошибка (m_p) относительной величины частоты встречаемости показана интервалами; * - различия статистически значимы по t-критерию при применении переменной Фишера, $p < 0,05$

Показано, что при изучении протеолитической активности 653 изолятов бактерий *Staphylococcus spp.*, выделенных с кожи здоровых бактерионосителей, а также больных с АтД в разные стадии заболевания (обострение и ремиссия), видом, характеризующимся высокой встречаемостью протеолитической активности, были

штаммы *Staphylococcus aureus* (Рисунок 3). Встречаемость штаммов *S. aureus* с выявленной протеолитической активностью на коже больных АтД в зависимости от стадии заболевания составила от $52,0 \pm 2,8\%$ (ремиссия) до $89,0 \pm 1,7\%$ (обострение), а у здоровых лиц контрольной группы – $35,0 \pm 2,7\%$, что почти в 1,5–2,5 раза меньше, чем у больных АтД в разные стадии заболевания.

Среди видов *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* доля протеолитически активных изолятов была почти в 3,0 раза меньше, чем среди изолятов *S. aureus*, выделенных с кожи лиц группы сравнения (Рисунок 3). Среди штаммов *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, выделенных от больных АтД, доля протеолитически активных штаммов была почти в 5,0 раз меньше, чем среди изолятов *S. aureus*, выделенных от этих пациентов в стадию обострения заболевания.

Определение удельной протеолитической активности КЖ изолятов *Staphylococcus spp.* проводили разработанным иммуноферментным способом [55], характеризующим способность расщеплять иммуноглобулин человека на фрагменты при разных значениях pH: 6,4; 7,4 и 8,5 при 25°C (Таблица 16).

Таблица 16 – Удельная протеолитическая активность (IgG-расщепляющая активность) супернатантов КЖ эталонного и изолированных с кожи пациентов с АтД штаммов *S. aureus* (M±SD)

Вид исследованных штаммов	Активность супернатанта, Усл. ед.×10 ⁻⁵ (при pH 6,4)	Активность супернатанта, Усл. ед.×10 ⁻⁵ (при pH 7,4)	Активность супернатанта, Усл. ед.×10 ⁻⁵ (при pH 8,5)
	1	2	3
<i>S. aureus</i> АТСС 29213	0,082±0,01	1,2±0,02	1,45±0,02
<i>S. aureus</i> стадия обострения n=90	0,1±0,02*	1,88±0,02**	1,0±0,01***

Продолжение Таблицы 16

<i>S. aureus</i> стадия ремиссии n=114	0,07±0,02	0,78±0,02	0,7±0,01
<i>S. epidermidis</i> стадия обострения n=56	0,06±0,01*	0,8±0,02**	0,58±0,01
<i>S. epidermidis</i> стадия ремиссии n=66	0,04±0,02	0,6±0,02	0,54±0,01
<i>S. haemolyticus</i> стадия обострения n=45	0,08±0,01*	0,5±0,01	0,9±0,02 ***
<i>S. haemolyticus</i> стадия ремиссии n=57	0,06±0,01	0,3±0,01	0,6±0,02
<i>S. saprophyticus</i> стадия обострения n=45	0,03±0,01	0,2±0,02**	0,1±0,02
<i>S. saprophyticus</i> стадия ремиссии n=56	0,03±0,01	0,1±0,02	0,3±0,02 ***

Примечание: Условные единицы активности (усл. ед.). 1 усл. ед. соответствует превращению 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25°C на 1,0 мл супернатанта КЖ [84]; * - средние значения колонки 1 статистически значимо различаются между штаммами одного вида в стадии обострения и ремиссии, $p < 0,05$; ** - средние значения колонки 2 статистически значимо различаются между штаммами одного вида в стадии обострения и ремиссии ($p < 0,05$); *** средние значения колонки 3 статистически значимо различаются между штаммами одного вида в стадии обострения и ремиссии, $p < 0,05$.

Анализ полученных данных позволяет отметить, что иммуноглобулин-расщепляющая активность супернатантов КЖ представителей *Staphylococcus* spp. имеет максимальную активность при pH 7,4 и 8,5. При pH 6,4 иммуноглобулин-расщепляющая активность ферментов снижалась фактически на порядок (почти в 10 раз). При pH 7,4 иммуноглобулин-расщепляющая активность у исследованных штаммов снижалась в ряду от вида *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S.*

saprophyticus. Таким образом, иммуноглобулин-расщепляющая активность у кожных штаммов *S. saprophyticus* была в 9,0–10,0 раз меньше, чем у *S. aureus*. Также установлено, что иммуноглобулин-расщепляющая активность штаммов (рН 7,4), выделенных в стадию обострения АД, для видов *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* была значимо выше, чем в стадии ремиссии.

Иммуноглобулин-расщепляющая активность изолятов Staphylococcus spp., входящих в состав микробиоты слизистой оболочки ВДП при АР

Исследована также встречаемость иммуноглобулин-расщепляющей активности у *Staphylococcus spp.*, выделенных со слизистой носоглотки у бактерионосителей, здоровых лиц контрольной группы и пациентов с АР (Рисунок 4). Установлена видовая дифференциация штаммов по способности расщеплять иммуноглобулин IgA человека, протеолитическая активность внеклеточных ферментов штаммов определена при рН 7.4 [48, 57].

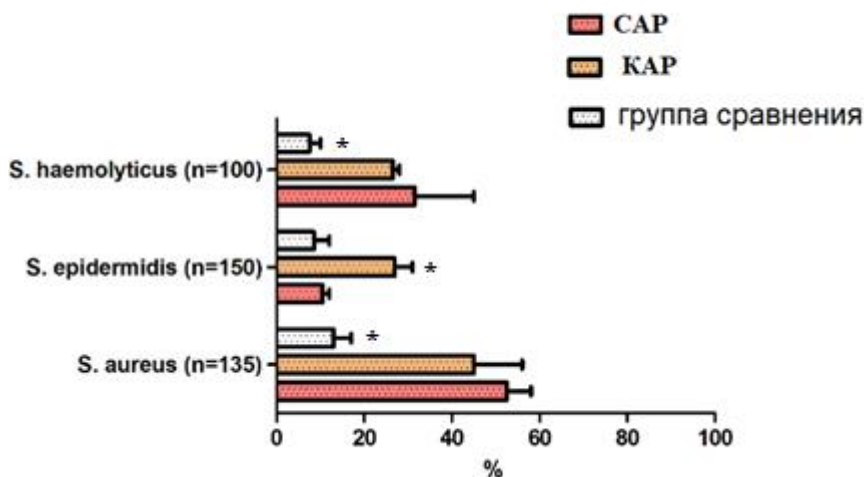


Рисунок 4 – Частота встречаемости протеиназоактивных изолятов штаммов *Staphylococcus spp.* (при рН 7,4, субстрат IgA человека), выделенных с ВДП (носа) пациентов с АР (КАР и САР) и бактерионосителей без АЗ (группа сравнения) n – общее количество исследованных штаммов. Ошибка (m_p) относительной величины частоты встречаемости показана интервалами; * - различия статистически значимы по t-критерию Стьюдента при применении переменной Фишера, $p < 0,05$

Анализ полученных данных, касающийся сравнительного исследования распространенности иммуноглобулин-расщепляющей активности у выделенных с ВДП изолятов *Staphylococcus* spp. показал, что более половины ($52,5 \pm 4,3\%$) исследованных изолятов *S. aureus* от пациентов с КАР способны расщеплять IgA человека, тогда как у бактерионосителей группы сравнения встречаемость протеолитически активных изолятов в 4 раза меньше и составила $13,0 \pm 2,8\%$ ($p < 0,05$) (Рисунок 4). Распространенность IgA-расщепляющей активности среди изолятов *S. epidermidis* от пациентов с САР (в стадии обострения заболевания) была в 2 раза выше, чем среди изолятов, выделенных от бактерионосителей группы сравнения и пациентов с САР в стадии обострения заболевания, т.е. при выраженных симптомах ринита. Встречаемость изолятов *S. epidermidis* с IgA-расщепляющей активностью в стадию обострения САР составила $34,6 \pm 3,8\%$, а в стадию обострения КАР – только $16,7 \pm 3,0\%$; фактически протеолитические свойства изолятов этого вида в этих группах пациентов с разной формой АР достоверно различались в 2,0 раза ($p < 0,03$). У бактерионосителей группы сравнения встречаемость IgA-расщепляющей активности среди изолятов *S. epidermidis* составила $9,4 \pm 2,3\%$ (Рисунок 4). Большая распространенность IgA-протеиназной активности была установлена среди изолятов *S. haemolyticus*, выделенных от пациентов с КАР, чем среди изолятов *S. epidermidis*, выделенных от этой группы пациентов. То есть слизистые ВДП у пациентов с КАР в стадии обострения колонизируются изолятами стафилококков, среди которых распространенность IgA-протеазной активности выше у *S. haemolyticus*, *S. aureus* (Рисунок 4). В стадии обострения при САР встречаемость IgA-протеолитически активных изолятов *S. haemolyticus* составила $28,0 \pm 4,4\%$, при КАР $34,0 \pm 4,7\%$, а в группе сравнения – не более $9,0 \pm 2,8\%$; таким образом, различия между группами больных и здоровых бактерионосителей достоверно различались (в 2,9–3,6 раза).

Нами установлено, что от пациентов с АР фактически выделяется более чем в 3 раза больше IgA-протеолитически активных изолятов *Staphylococcus* spp., чем от здоровых бактерионосителей контрольной группы (Рисунок 4).

Ингибиторный анализ протеиназной активности КЖ изолятов Staphylococcus spp

Установлено, что у стафилококков видов *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, по данным международной базы пептидаз MEROPS (www.ebi.ac.uk/merops) идентифицировано несколько десятков, а у некоторых видов – до нескольких сотен белков с пептидазной активностью, которые классифицируются в зависимости от строения активного центра на несколько каталитических классов (сериновые, металлзависимые, цистеиновые), которые в базе данных объединены в кланы (группы) Clan AC, Clan CA, Clan MA, Clan SE [78].

В связи с этим нами было проведено исследование, направленное на определение вклада в протеолитическую активность выделяемых видов стафилококков, протеиназ (пептидаз) с разным каталитическим типом активных центров, которые преимущественно определяются в КЖ. Определение вклада в протеолитическую активность протеиназ КЖ штаммов ферментов разного каталитического класса проводили с помощью ингибиторного анализа [45]. С этой целью в КЖ штаммов вводили соответствующие ингибиторы протеолитических ферментов (Таблица 17). Данный анализ позволил оценить вклад (в %) в иммуноглобулин-расщепляющую активность КЖ изученных штаммов протеиназ (пептидаз) разных каталитических классов.

Результаты ингибиторного анализа КЖ изолятов, выделенных с кожи, представлены в Таблице 17; результаты ингибиторного анализа КЖ штаммов *S. haemolyticus* и *S. aureus*, выделенных с ВДП, – в Таблице 18. При анализе полученных данных установлено, что ЭДТА в максимальной концентрации (1,0 mmol) ингибировал от 40,0 до 45,0%, а в 2 раза меньшей концентрации (0,5 mmol) – от 15,0 до 20,0% иммуноглобулин-расщепляющей активности КЖ у изолятов *S. aureus* и *S. epidermidis* за счет возможного ингибирования большинства металлопептидаз, а также кальций-зависимых тиоловых пептидаз. Ингибирование

металлопептидаз обычно происходит в результате связывания иона металла (например, Zn^{2+}).

Таблица 17 – Ингибиторный анализ КЖ штаммов *Staphylococcus* spp., выделенных с кожи

Название ингибитора, (концентрация)	После внесения ингибитора остаточная Ig-протеиназная активность КЖ изолятов, в % M(SD)	
	<i>S. aureus</i> (n=15)	<i>S. epidermidis</i> (n=15)
ЭДТА, 0,5 mmol	85,0 (5,0)	80,0(5,0)
ЭДТА, 1 mmol	60,0 (7,0)	55,0(8,0)
1,10-фенантролин, 5 mmol	90,0 (5,0)	87,0(7,0)
PMSF, 1,0 mmol	25,0 (6,0)	30,0 (5,0)
Пепстатин А, 7×10^{-3} мг/мл	97,0(8,0)	99,0(6,0)

Таблица 18 – Ингибиторный анализ КЖ штаммов *Staphylococcus* spp., выделенных с ВДП

Название ингибитора, (концентрация)	После внесения ингибитора остаточная Ig-протеиназная активность КЖ изолятов, в % M(SD)	
	<i>S. aureus</i> (n=25)	<i>S. haemolyticus</i> (n=20)
ЭДТА, 0,5 ммоль	80,0 (3,0)	85,0(5,0)
ЭДТА, 1 ммоль	35,0 (5,0)	32,0(6,0)
1,10-фенантролин, 5,0 Ммоль	89,0 (5,0)	80,0(8,0)
PMSF, 1,0 Ммоль	30,0 (6,0)	30,0(5,0)
Пепстатин А, 7×10^{-3} мг/мл	98,0(7,0)	98,0(6,0)

К металлопептидазам (по базе данных MEROPS) у вида *S. aureus* отнесены такие протеолитические ферменты, как ауреолизин (aureolysin, Clan MA, M04.009), нейтральная пептидаза (thermoactinomyces-type, Clan MA, M04.021) и ряд других пептидаз (BlaR1 peptidase, M56.001; FtsH-2 peptidase, M41.009; MecR1 g.p., M56.002; PrtV peptidase, M06.002), а также пептидазы, отнесенные к неклассифицированным пептидазам семейства M4: peptidase T, V, MecR1 (M56.002), которая участвует в проявлении устойчивости штаммов к антибиотикам на основе β -лактама [132], а также ряд белков, относящихся к не пептидазным гомологам (семейство M61 non-peptidase homologues, семейство M78 non-peptidase homologues).

К металлопептидазам у вида *S. epidermidis* отнесены такие пептидазы, как протеиназа, подобная ауреолизину (SepA, M04.009), олигопептидаза F (PepF, M03.007), карбоксипептидаза Ss1 (M20,008), а также неклассифицированные пептидазы семейств M79, M82, M4, M56 и др.

Другой ингибитор – 1,10-фенантролин – представляет собой более селективный агент, чем ЭДТА, в отношении хелатирования ионов цинка по сравнению с ионами кальция и поэтому более подходит в качестве диагностического реагента для Zn-зависимых металлопептидаз [325]. Установлено, что в концентрации 5,0 *mmol* 1,10-фенантролин ингибировал от 10,0 до 13,0% иммуноглобулин-расщепляющей активности КЖ штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*, которая может быть обусловлена Zn-зависимыми металлопептидазами, стабильными в присутствии ионов кальция.

При использовании PMSF, который блокирует активность сериновых пептидаз, в том числе относящихся к семействам S1 и S8, нами установлено, что от 70,0 до 75,0% протеолитической активности КЖ штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* блокируется при 1,0 *mmol* концентрации этого ингибитора.

К сериновым пептидазам *S. aureus* отнесены такие пептидазы, как SspA-протеиназа или глутамилэндопептидаза по классификации MEROPS (glutamyl endopeptidase I, S01.269), глутамил пептидаза B1 (glutamyl peptidase BI, S01.443),

группа Spl-протеиназ (SplA, S01.503; SplB, S01.282; SplC, S01.283; SplE, S01.312; SplD, S01.526), а также эксфолиативные токсины (ETB, S01.445; ETA, S01.270).

К сериновым пептидазам *S. epidermidis* отнесены неклассифицируемые пептидазы семейства M29, S11, S13, S54 подсемейства SB1 и ESP пептидаза (ESP peptidase, S01.522), по классификации MEROPS.

Пепстатин А в концентрации 7×10^{-3} мг/мл ингибировал иммуноглобулин-расщепляющую активность КЖ штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis* незначительно (от 2,0 до 3,0%), а для КЖ, полученных от *S. haemolyticus*, не более чем на 1,0%.

Пепстатин А избирательно ингибирует пептидазы семейств A1, A2 (пептидазы, подобные катепсину D человека) [234]. У *Staphylococcus spp.* представители ферментов семейства пептидаз A1, A2 не описаны, при этом у видов *Staphylococcus spp.* выделяют только пептидазы A8, A24 семейств, в связи с чем полученные нами данные отражают закономерность незначительного влияния *пепстатина А* на протеолитическую активность КЖ штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*.

В этой части исследования нами изучено действие протеолитических ферментов штаммов *S. aureus* на поверхностные рецепторы лимфоцитов периферической крови человека [84].

При инкубации донорских лимфоцитов периферической крови человека с протеолитически активными супернатантами КЖ штаммов *S. aureus* (эталонный и изолированные с кожи и слизистых) выявлено достоверное уменьшение экспрессии рецепторов, относящихся к кластерам дифференцировки CD4, CD8, CD16, по сравнению с контролем и протеазонеактивными супернатантами ($p < 0,001$ и $p < 0,0001$) (Таблица 19). Протеолитически активные супернатанты эталонного штамма, изолятов кожи, слизистых носа и зева достоверно не изменяли экспрессию таких кластеров дифференцировки, как CD3 и CD19 ($p > 0,05$) (Таблица 19) [84].

Таблица 19 – Экспрессия кластеров дифференцировки CD3, CD4, CD19, CD8, CD16 на донорских лимфоцитах после инкубации с супернатантами КЖ штаммов *S. aureus* [84]

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

Примечание: (К–) – отрицательный контроль, (К+) – положительный; ^ap<0,05, ^bp<0,01 по сравнению с отрицательным контролем и группой протеазонеактивных изолятов [84].

Цитофлюорограммы экспрессии рецепторов (CD3, CD19, CD4, CD8, CD16) на донорских лимфоцитах после инкубации с протеолитически активным супернатантом КЖ эталонного штамма *S. aureus* АТСС 29213 (положительный контроль) стерильным мясопептонным бульоном (отрицательный контроль) представлены на Рисунке 5 [84].

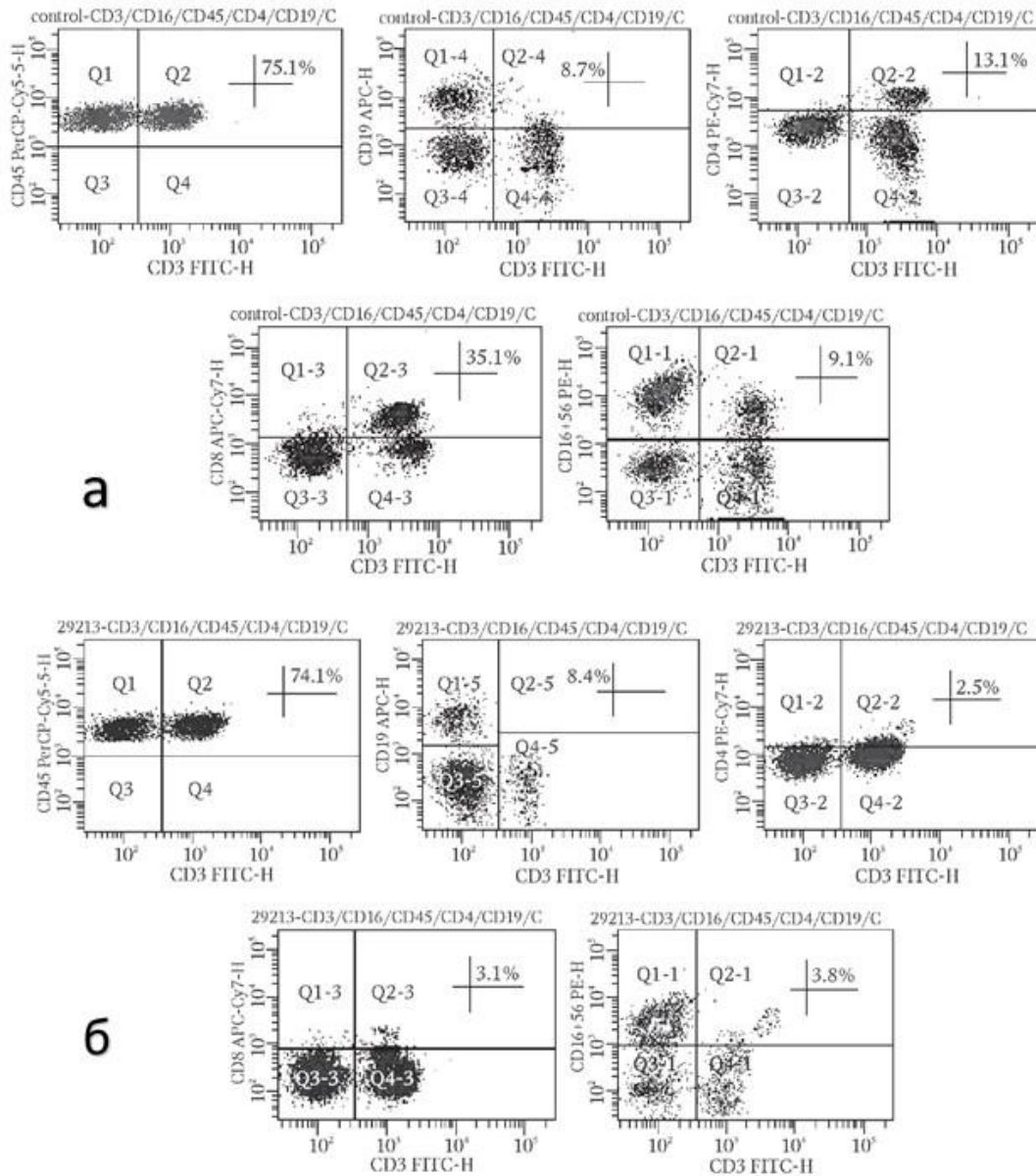


Рисунок 5 – Цитофлюорограмма экспрессии кластеров дифференцировки CD3, CD19, CD4, CD8, CD16 на донорских лимфоцитах после инкубации с супернатантом КЖ

а) – отрицательный контроль – стерильная жидкая питательная среда (1,5% пептон); б) – положительный контроль – супернатант питательной среды культивирования протеазопозитивного штамма *S. aureus* (ATCC 29213) [84]

Проведенное исследование позволяет констатировать, что протеолитические ферменты супернатантов КЖ *S. aureus*, которые расщепляли молекулы иммуноглобулина (IgG) на фрагменты, избирательно действует на те клеточные рецепторы лимфоцитов, у которых внеклеточная область молекулы состоит из

иммуноглобулиноподобных доменов, не действуя на другие рецепторы, меченные анти-CD3, CD19 [84].

Действие стафилококковых энзимов супернатантов на рецепторный аппарат Т-лимфоцитов с избирательным протеолизом рецепторов, имеющих Ig-подобную структурную организацию внеклеточных доменов, возможно может запускать *in vivo* одним из механизмов апоптоза тех субпопуляций лимфоцитов, которые экспрессируют эти рецепторы (Т-лимфоциты CD3⁺CD4⁺; CD3⁺,CD8⁺; НК-лимфоциты [78, 84].

При инкубации бесклеточных супернатантов КЖ, полученных при культивировании кожных изолятов *S. aureus*, выделенных от пациентов с АтД, с мононуклеарами периферической крови человека также наблюдали статистически значимое снижение экспрессии CD14 в опытных образцах по сравнению с контролем (Таблица 20) [85].

Установлено, что субстратами протеолитических ферментов штаммов *S. aureus* могут быть также и гликопротеины (CD14 рецепторы) [85].

Протеолитические ферменты КЖ *S. aureus* способны воздействовать на другие гликопротеины, в частности на CD14 рецепторы, локализованные на моноцитах и макрофагах [85].

Протеолитическая модификация стафилококковыми ферментами данного рецептора на клетках моноцитарного ряда может подавлять реакции как адаптивного, так и врожденного иммунитета кожи, направленные на вирусные, бактериальные микроорганизмы и опухолевые клетки [85].

Таблица 20 – Экспрессия кластеров дифференцировки на мононуклеарах крови (CD14^{pos}) человека после инкубации с бесклеточными супернатантами штаммов *S. aureus*, выделенных с кожи [85]

Штаммы	1-й эксперимент		2-й эксперимент	
	Активность (супернатант+ Tris HCl буфер, pH 7,4) (1:1), Усл. ед. × 10 ⁻⁵ M(SD)	Экспрессия кластера CD14, в % M(SD)	Активность (супернатант+ Tris HCl буфер, pH 7,4) (1:2), Усл. ед. × 10 ⁻⁵ M(SD)	Экспрессия кластера CD14, в % M(SD)
Протеазоактивные штаммы				
<i>S. aureus</i> KZ 12-32 (B 9286)	0,61 (0,05)	70,0(3,0)	0,3(0,05)	40,0(2,7) ^a
<i>S. aureus</i> KZ 12-46(B-9289)	0,68(0,07)	65,0(5,0)	0,3(0,05)	31,5(3,1) ^b
<i>S. aureus</i> KZ 188 (B-9297)	0,72(0,04)	56,0(4,0)	0,32(0,05)	33,0(3,0) ^c
<i>S. aureus</i> KZ 03 (B-9285)	0,75(0,05)	80,0(5,0)	0,31(0,05)	43,0(3,5) ^d
Протеазонеактивные штаммы				
<i>S. aureus</i> № 43	0	96,7(0,6)*	0	96,0(0,7)**
<i>S. aureus</i> № 44	0	98,6(0,7)*	0	97,5(0,8)**
<i>S. aureus</i> № 28	0	95,8(0,6)*	0	97,0(0,7)**
Контроль отрицательный (К-)	0	98,3(0,7)*	0	99,0(0,8)**

Примечание. К – стерильная питательная среда, МПБ; * различия статистически значимы по сравнению с протеазоактивными штаммами, $p < 0,05$; ** различия статистически значимы по сравнению с протеазоактивными штаммами и отрицательным контролем во 2-м эксперименте, $p < 0,05$, $t = 2,4$; ^{a,b,c,d} – различия между экспрессией CD14 в 1-м эксперименте и 2-м эксперименте статистически значимы, $p < 0,01$, $t = 2,45$ [85].

Необходимо учесть, что, обладая протеиназным потенциалом, стафилококки, колонизирующие кожу и слизистые ВДП, способны вызвать нарушение барьерной функции кожи и слизистых оболочек ВДП, особенно этот эффект может быть усилен при со-колонизации пораженной кожи дрожжеподобными грибами *Candida* sp., а на слизистых оболочках этот эффект может быть усилен за счет действия Ig-расщепляющих протеиназ, образуемых, в

частности, *S. pneumoniae* [28, 90], и ферментов, секретируемых представителями непатогенных нейссерий (*Neisseria* spp.), *Haemophilus* spp., колонизирующих слизистые оболочки ВДП.

Нами в дополнительных исследованиях, было показано, что такие представители микробиоты кожи и слизистых оболочек, как грибы рода *Candida albicans*, которые часто колонизируют кожу и слизистые больных АЗ, также обладают выраженной протеолитической активностью [65, 90]. Причем установлено, что свежевыделенные изоляты *Candida albicans* со слизистой оболочки ротоглотки у больных с респираторной аллергией характеризовались более выраженной протеиназной активностью (в качестве субстрата использовали IgG₁, sIgA человека), чем изоляты, выделенные с кожи больных АтД [90]. При этом нами было установлено, что супернатанты, полученные от изолятов *Candida albicans*, способны расщеплять гликопротеины IgG и IgA человека при физиологическом значении pH=7,4, а действие супернатантов КЖ клинических изолятов *Candida albicans* на культуру мононуклеаров периферической крови человека приводило к статистически значимому уменьшению детекции экспрессии рецепторов, меченых моноклональными анти-CD4-антителами [65, 90].

Протеолитически активные штаммы *S. aureus*, в том числе способные синтезировать один из протеолитических ферментов – ауреолизин, являются своего рода «триггером» воспалительных процессов в дерме вследствие многообразных патофизиологических эффектов данного фермента на кератиноциты кожи [91].

4.2. Энтеротоксин-продуцирующая способность изолятов *S. aureus*, изолированных с кожи и слизистых верхних дыхательных путей у здоровых бактерионосителей и больных аллергическими заболеваниями

Энтеротоксины или «суперантигены» *S. aureus* – значимые факторы патогенности этого вида, которые могут вызывать непосредственные проявления

токсикоинфекции при попадании с пищей в организм человека, а также могут участвовать в патогенезе аллергического воспаления при АтД и респираторной аллергии; особенно высокая чувствительность к действию этих токсинов может быть у детей. В связи с этим представляло существенный интерес определить способность к продукции энтеротоксинов у клинически значимых штаммов *S. aureus*, выделенных от пациентов с АЗ и здоровых бактерионосителей контрольной группы. У изолятов определяли способность к продукции пяти основных серологических типов стафилококковых энтеротоксинов (SET) – А, В, С, D, Е в иммунохимическом тесте методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (набор реагентов RIDASCREEN(R) SET А, В, С, D, Е), что позволило выявить активно продуцирующие изоляты *S. aureus*. По результатам теста изученные штаммы были распределены на продуцирующие токсины и токсин-негативные штаммы (Рисунок 6).

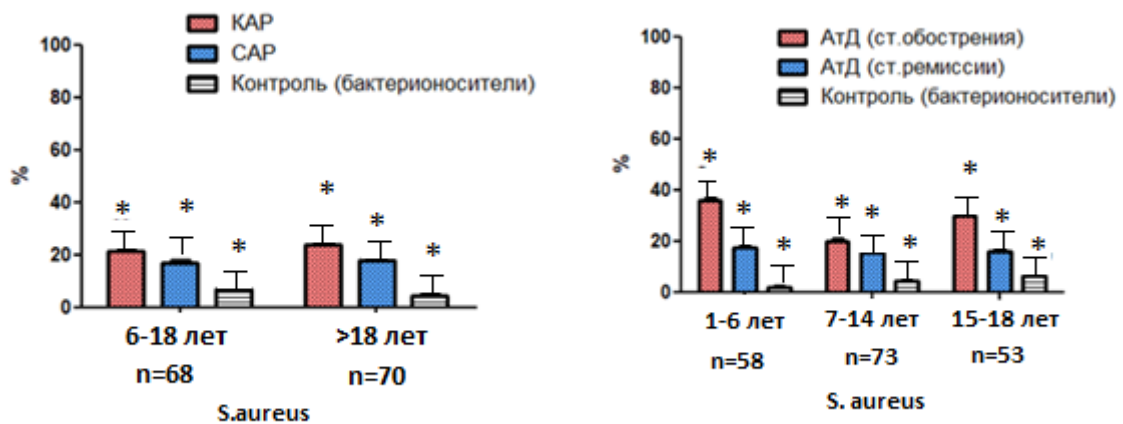


Рисунок 6 – Частота выделения продуцирующих энтеротоксины (А, В, С, D, Е) штаммов *S. aureus*, выделенных от больных разного возраста с АтД и АР
* – различия между группами пациентов в стадии обострения заболевания и бактерионосителей без аллергической патологии, а также пациентов в стадии ремиссии статистически значимы по t-критерию Стьюдента при применении переменной Фишера, $p < 0,05$. Ошибка (m_p) относительной величины частоты встречаемости показана интервалами

Способность образовывать энтеротоксины (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) среди штаммов *S. aureus*, высеянных с кожи детей и подростков до 14 лет с АтД,

составила от $18,0 \pm 3,3\%$ до $38,0 \pm 4,2\%$, и эта способность проявлялась в 5,0–9,5 раз чаще, чем у штаммов, полученных от лиц группы сравнения (бактерионосителей без аллергической патологии). У подростков в возрасте 15–18 лет с АД встречаемость таких штаммов составила от $15,0 \pm 4,9\%$ до $28,0 \pm 6,1\%$, что в 2,5–4,6 раза выше, чем в группе сравнения (бактерионосители) (Рисунок 6). Установлена высокая распространенность продукции энтеротоксинов (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) среди штаммов *S. aureus*, выделенных со слизистой ВДП у пациентов с АР, где почти каждый пятый изолят продуцировал энтеротоксины (при КАР – $23,5 \pm 5,1\%$ у детей и подростков; а при САР у взрослых – $18,5 \pm 4,6\%$), тогда как в группе сравнения встречаемость таких штаммов составила от $2,8 \pm 1,9\%$ до $6,4 \pm 2,9\%$.

4.3. Отличия в белковом спектре протеома (секретомы) штаммов

***S. Aureus*, выделенных из состава микробиоты кожи и слизистых верхних дыхательных путей у больных с атопическим дерматитом и аллергическим ринитом**

Для выявления различий в протеоме (белковом комплименте генома) штаммов *S. aureus*, выделенных от бактерионосителей без аллергической патологии и с аллергической патологией, проведен анализ образцов белков выделенных из КЖ «назальных» и «кожных» штаммов. Для этих целей образцы белков, выделенные из жидкой среды культивирования (КЖ) двух сравниваемых штаммов (от больного с АЗ и носителя без АЗ) окрашивали флуоресцентными красителями Су3 и Су5, объединяли и изоэлектрофокусировали, затем разделяли в градиентном полиакриламидном геле (Приложение Ж, Рисунок Ж.1).

С помощью программного анализа с использованием модуля дифференциального анализа гелей, который нормализовал изображения, окрашенные Су3 и Су5 флуоресцентными красителями для каждого геля, было установлено от 27 (у «назальных» штаммов) до 46 (у «кожных» штаммов) белковых

пятен на пару изображений (Cy5/Cy3) с нормально распределенными объемными соотношениями. Рассчитывали также среднее значение объемных соотношений и показатель 2SD, который был выбран в качестве порогового уровня для констатации различий в интенсивности флуоресценции в белковых фракциях. Используя этот порог в качестве «отсечки» для отслеживания протеомных изменений в экспрессии белка, были выявлены статистически значимые различия в относительном содержании белка в белковых пятнах.

После визуализации, анализа интенсивности флуоресценции и регистрации различий между образцами белков в гелях, гели фиксировали, окрашивали серебром и вырезали белковые пятна, представляющие интерес для анализа, – для последующего трипсинолиза и проведения масс-спектрометрической идентификации белков (Приложение Ж, Рисунок Ж.1). В результате проведенного исследования и масс-спектрометрического анализа нами было идентифицировано 36 белков, характеристика которых представлена в Таблице 21. Эти белки были подразделены нами на следующие группы: секретлируемые белки, связанные с клеточной оболочкой и цитозольные белки.

Отмечено, что в каждом из протеомов было выделено несколько идентифицированных белков, в частности гемолизины H1a и H1b, которые претерпевали посттрансляционную модификацию (ПТМ), поскольку один и тот же идентифицированный белок локализовался в разных белковых пятнах. Используя выбранные критерии количественной оценки различий ($>2SD$), общее количество однозначно идентифицированных белков, экспрессия которых различалась между штаммами *S. aureus*, полученными от бактерионосителей без аллергической патологии и больных АЗ, была выделена в сводной Таблице 21 цветом.

Так нами были установлены значимые различия по экспрессии белков в протеоме (в 3,0 раза и более) между штаммами, выделенными от больных АЗ и от бактерионосителей без АЗ, в следующих группах белков: 1) секретлируемые белки: гидролитические ферменты – Aur, SplA, SplE, SspA-протеиназы, OppF металлопротеиназа, трансгликозилаза, термонуклеаза, липаза (Lip); 2) токсины:

SSL7, SSL5 – суперантиген-подобные белки, Hla, Hlb гемолитины; 3) белки антигены: IsaA – антиген А стафилококка; 4) белки, связанные с клеточной оболочкой бактериальной клетки: внеклеточный фибриноген-связывающий белок (Efb), SdrD – белок, участвующий в адгезии к компонентами внеклеточного матрикса; IsdA – белок фактор патогенности, участвующий в регуляции обмена железа; 5) цитозольные белки бактериальной клетки: AdhE–Fe-зависимая ацетальдегидрогеназа, PurL лигаза, участвующая в биосинтезе пуриновых оснований, ClpB – белок шаперон, участвующий в ответе бактериальной клетки на тепловой стресс, MgrA – регуляторный белок, участвующий в автолитической активности и множественной лекарственной устойчивости бактериальной клетки (регулятор транскрипции НТН-типа).

Различия в экспрессии этих белков могут отражать метаболические и патогенные свойства штаммов *S. aureus*.

Таблица 21 – Результаты и параметры идентифицированных белков протеома/секретома «назальных» и «кожных» штаммов *S. aureus*, выделенных от пациентов с аллергическими заболеваниями и бактерионосителей без аллергической патологии (группа сравнения)

№	Белок (функция) ^а	Ген ^б	М. м ^в .	pI ^г	Сравнение протеомов <i>S. aureus</i>			
					«назальные» штаммы от пациента с АР (n=4) / «назальные» штаммы от бактерионосителей без АЗ (n=4)		«кожные» штаммы от пациентов с АД (n=4) / «кожные» штаммы от бактерионосителей без АЗ (n=4)	
					Кратность изменения интенсив- ности флуо- ресценции (экспрессии белка) ^д	Mowse Score ^е	Кратность изменения интенсив- ности флуо- ресценции (экспресси и белка) ^д	Mowse score ^е
2	3	4	5	6	7	8	9	
1	Efb – фибриноген связывающий белок (адгезин, внеклеточный фибриноген-связывающий белок, играющий важную роль в вирулентности штаммов)	efb	18,7	9,82	2,4	150	4,4	235
2	IsaA – иммунодоминантный антиген А (фермент трансгликозилаза, повышенная экспрессия in vivo отмечена при развитии сепсиса, выражена экспрессия при формировании биопленок, высокая секреция этого белка отмечена мутантными штаммами по secG или secG/secY2 системам)	isaA	24,2	6,1	2,2	135	2,4	98

Продолжение Таблицы 21

	2	3	4	5	6	7	8	9
3	Coa – коагулаза	coa	57,3	8,39	2,2	97	2,7	135
4	Nuc –термонуклеаза (фермент, который катализирует гидролиз как ДНК, так и РНК в 5 ' положении фосфодиэфирной связи)	nuc	25,4	9,29	2,15	113	4,2	362
5	SSL7 – стафилококковый суперантигено-подобный белок (влияет на все три пути активации комплемента и ингибирует расщепление C5 КК, предотвращая его связывание с конвертазами C5, и предотвращает опосредованную C5a миграцию нейтрофилов)	ssl 7	26,1	8,92	4,8	456	3,2	305
6	SSL5 – стафилококковый суперантигено-подобный белок 5 (секретируемый белок, который играет роль в подавлении врожденных механизмов антибактериальной защиты, в частности, модулирует взаимодействие между SELPLG хозяина и Р-селектином, тем самым нарушает начальный хемотаксис нейтрофилов к месту инфекции)	ssl 5	27,1	9,63	5,6	78	3,8	92

Продолжение Таблицы 21

	2	3	4	5	6	7	8	9
7	IsdA – белок фактор патогенности, участвующий в регуляции обмена железа (поверхностный рецептор, закрепленный в клеточной стенке, участвует в экстракции гема из окисленного метгемоглобина, получает гем от IsdB и передает на IsdC белок, играет роль в подавлении иммунного ответа; хозяина через подавление бактерицидной активности аполактоферрина)	isdA	38,7	9,64	3,8	234	3,2	204
8	SplA – сериновая протеиназа	splA	25,5	8,97	4,8	167	4,12	325
9	SplB – сериновая протеиназа	splB	26,1	9,21	1,1	87	2,19	96
10	SplE – сериновая протеиназа	splE	25,6	9,32	1,2	65	2,3	95
11	Lip – липаза, катаболизм липидов	lip	76,4	9,05	1,0	68	3,7	108
12	SdrD – белок компонент клеточной оболочки (играет важную роль в адгезии и опосредует взаимодействия с компонентами внеклеточного матрикса; способствует устойчивости бактерий к фагоцитозу и снижает бактериальный клиренс)	sdrD	112,0	4,7	3,1	86	2,2	235
13	SsaA – белок секреторный антиген стафилококка	ssaA	29,3	8,96	4,5	56	3,4	315

Продолжение Таблицы 21

	2	3	4	5	6	7	8	9
14	RocD – фермент орнитин аминотрансфераза (обмен аминокислот)	argD /rocD	43,0	6,56	2,7	79	н. о	н. о
15	ClpB – белок шаперон участвует в ответе бактериальной клетки на тепловой стресс	clpB	98,0	4,97	4,2	304	н. о	н. о
16	AdhE – Fe-зависимая ацетальдегидрогеназа (углеводный метаболизм)	adhE	95,0	5,85	3,23	234	н. о	н. о
17	OppF – металлопротеиназа семейства Peptidase M3	oppF	70,0	5,14	2,4	134	4,3	204
18	FbaA – фруктозо-бифосфат альдолаза (гликолиз)	fbaA	30,8	4,7	2,4	210	2,7	95
19	MhpC – гидролаза	mhpC	31,0	4,7	2,2	95	2,16	283
20	PgaM – изомераза (2,3-бисфосфоглицерат-зависимая фосфоглицерат мутаза)	pgaM	26,7	5,0	2,13	443	3,3	35
21	PurH – мультифункциональный энзим с гидролитической и трансферазной активностью, участвующий в биосинтезе пуриновых азотистых оснований	purH	54,5	6,0	2,34	342	2,1	63
22	PurL лигаза, участвующая в биосинтезе пуриновых оснований	purL	80,0	4,5	3,1	174	2,25	231
23	CidC – фермент, участвующий в обмене менахинонов в бактериальной клетке	cidC	64,0	7,0	4,4	295	2,5	25

Продолжение Таблицы 21

	2	3	4	5	6	7	8	9
24	Hmp – диоксигеназа, участвует в нейтрализации последствий нитрозативного стресса или пероксинитрита	hmp	43,0	5,0	2,18	304	2,7	48
25	RhbC – белок, участвующий в биосинтезе сидерофоров бактериальной клеткой при низком содержании железа в среде	rhbC	76,0	5,7	4,5	64	3,1	485
26	AroA – альдегид лиаза (обмен ароматических аминокислот)	aroA	40,0	6,0	3,2	164	3,6	219
27	EcsA – белок системы ABC-транспортеров	ecsA	28,0	5,0	2,18	231	2,8	
28	FusA фактор элонгации G (матричный биосинтез белка)	fusA	77,0	4,5	2,2	75	2,19	234
29	UhpT – белок транспортер, участвует в мембранном транспорте фосфорилированных гексоз (член 2-компонентной регуляторной системы HptS / HptR, которая регулирует гены, участвующие в системе транспорта гексозофосфата, в ответ на изменения во внеклеточных источниках фосфата)	uhpT	29,5	6,04	2,2	304	2,2	87

Продолжение Таблицы 21

	2	3	4	5	6	7	8	9
30	MgrA – белок регулятор транскрипции НТН-типа (регуляторный белок, участвующий в автолитической активности, множественной лекарственной устойчивости, фактор вирулентности)	mgrA	17,1	6,84	4,7	109	4,6	96
31	HlgA – гамма-гемолизин компонент А (цитолизин, токсин)	hlgA	34,9	9,6	2,2	79	3,3	67
32	HlgB – гамма-гемолизин компонент В (цитолизин, токсин)	hlgB	36,7	9,35	2,32	245	3,8	54
33	Hlb – бета-гемолизин	hlb	37,2	8,7	4,2	211	3,5	126
34	Hla – (белок предшественник) альфа-гемолизина	hla (hly)	35,9	8,7	3,3	423	2,4	109
35	Aur (ауреолизин) – металлопротеиназа	aur	56,3	5,02	2,17	312	3,4	345
36	SspA – сериновая протеиназа	sspA	36,3	4,99	2,18	95	4,6	198

Примечание:

^a аннотации функции белка получены от Universal Protein Resource (UniProt), который представляет базу данных о последовательностях и аннотациях белков. База данных UniProt включает UniProt (UniProtKB), эталонные кластеры UniProt (UniRef) и архив UniProt (UniParc);

^b аннотации генов для идентифицированных белков получены из ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank/genomes/Bacteria/Staphylococcus_aureus_NCTC_8325, на внутреннем сервере Mascot или из базы данных NCBItrg;

^{b, г} значения М.м (кДа) и pI были получены по результатам анализа программой Mascot 2.4.0;

^д изменение экспрессии белка рассчитывали, как отношение среднего значения объема, основанное на нормализованном объеме белкового пятна, стандартизованное относительно внутреннего стандарта с помощью программного анализа;

^е индексы по шкале Mowse score при ($p < 0,05$) показывают шкалу значимости идентифицированного белка с помощью анализа MALDI-TOF PMF (MS), MS в сочетании с дополнительным анализом тандемных фрагментов в MALDI-TOF/TOF в режиме (MS / (MS)) или с помощью ЖХ-МС/МС (МС/ МС); н.о. – не определялся.

ГЛАВА 5. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, КОЛОНИЗИРУЮЩИХ ЛОКАЛЬНЫЕ БИОТОПЫ КОЖИ И СЛИЗИСТЫЕ ОБОЛОЧКИ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ

В данной главе представлены результаты исследования генетического профиля штаммов *S. aureus*, которые лежат в основе высокого патогенного потенциала этих бактерий у больных атопическим дерматитом и аллергическим ринитом.

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

Штамм *S. aureus* KZ 188 был выделен из очага инфицированной кожи щеки 18-месячной девочки (рожденной на 37-й неделе беременности), в период обострения АД, методом отпечатка пораженной кожи питательным агаром (ЖСА) [76].

При аллергологическом обследовании был выставлен диагноз: АД с эритематозно-плоскоклеточными бляшками и диффузным поражением кожи, осложненный вульгарной стафилодермией (импетиго), стадия обострения. При бактериологическом исследовании фекалий установлен сопутствующий дисбактериоз кишечника, субкомпенсированная форма с дефицитом бифидо- и лактобактерий, нормальной кишечной палочки с обильным ростом в биообразце содержимого толстого кишечника культуры штаммов *S. aureus* и *Klebsiella* spp. ($\sim 10^4$ КОЕ на грамм кала). По данным дополнительного аллергологического обследования установлена непереносимость коровьего молока, пшеницы и кукурузного белка у ребенка. Из семейного анамнеза установлено, что у матери

развился мастит (выделен штамм *S. aureus*, драфт геном данного изолята представлен в NCBI GenBank: JAKXMJ000000000.1) (Приложение Е, Таблица Е.2), в связи с чем было прекращено грудное вскармливание через 2 месяца после родов. Выявлена наследственная отягощенность по atopическим заболеваниям в семье ребенка: у родной сестры матери – АтД, у матери – atopическая бронхиальная астма с сезонным аллергическим ринитом; у отца – atopическая бронхиальная астма, поллиноз.

Полученная сборка WGS драфт генома выделенного штамма *S. aureus* KZ 188 (NCBI GenBank: JAKXMJ000000000.1) состояла из 3 977 982 п. н. в 80 контигах с ожидаемым охватом 427,56x (по эталону *Staphylococcus aureus* ER02243.3; CP030479.1), N50 – 1 408 563 п. н., процент G+C составил 32,93%. Аннотация сборки WGS выявила всего 2758 кодирующих последовательностей (CDS), 19 генов рРНК, 59 – тРНК, 4 – нкРНК [76].

Мультилокусное типирование последовательностей полученного генома штамма *S. aureus* KZ 188 с использованием SRST2 v.0,1.4.6 позволило отнести выделенный нами штамм к ST7-типу. Показано, что штаммы *S. aureus* данного сиквенс типа (ST7) ответственны за развитие мастита и инфекции кожи, а также могут вызывать инфекционно-воспалительные процессы у сельскохозяйственных молочно-продуктивных животных [138].

Прогнозирование патогенного потенциала, выполненное с помощью PathogenFinder v.1.1 и VFDB, позволило детектировать гены фибриноген-связывающих белков – sdrA, sdrC, sdrD, sdrE, sdrF и sdrG, факторов адгезии clfA, clfC, ген eno – стрептококковой енолазы, включая вариант с защитными антигенными свойствами [180], а также ген tuf – фактор элонгации микоплазмы. Из протеолитических ферментов в геноме выявлены ген splA – протеиназы, из токсинов гены энтеротоксина (entP), гемолизинов, лейкоцидинов.

В связи с этим выделенный штамм можно охарактеризовать как несомненный патогенный вариант с множественной лекарственной устойчивостью, утяжеляющий течение АтД, который может персистировать в молочной железе с

развитием мастита. Прогнозирование лекарственной устойчивости к антимикробным препаратам для данного изолята проведено с помощью ResFinder v.4.1 и RGI v.5.2.0 – pyhdfd78af_0 против CARD v.3.1.4 (Рисунок 7).

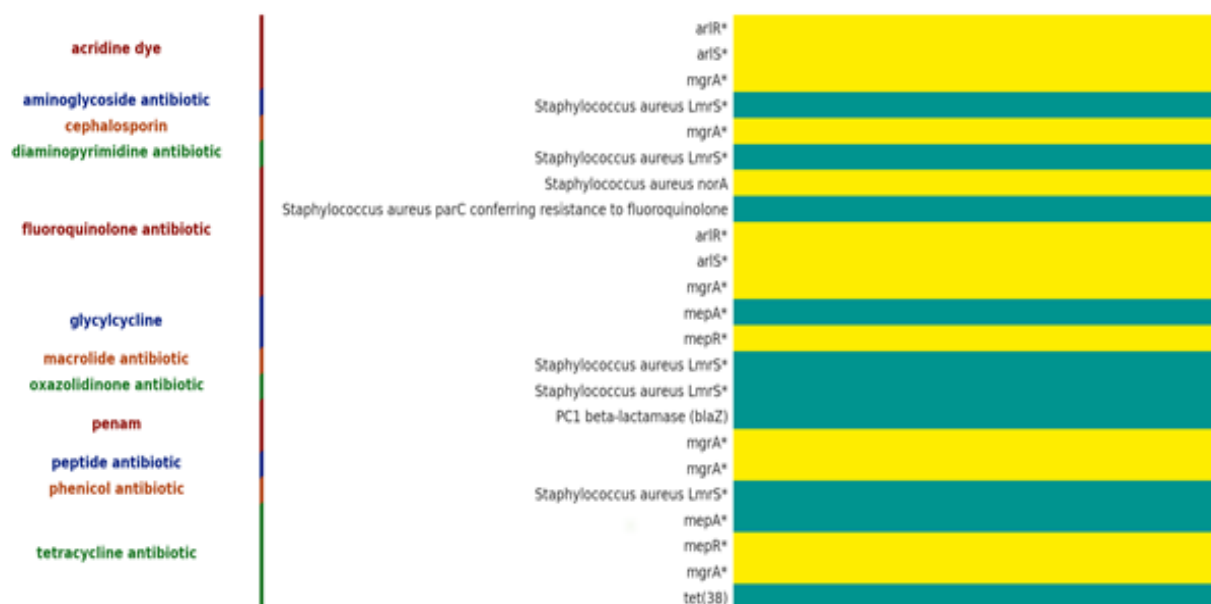


Рисунок 7 – Тепловая карта профиля устойчивости к антимикробным препаратам для штамма *S. aureus* KZ_188, построенная RGI, сгруппированная по классам антимикробных препаратов

Исходя из исходного кода программы: желтое пересечение обозначает идеальное попадание, бирюзовое – строгое попадание; гены, отмеченные звездочкой (*), встречаются несколько раз и в нескольких кластерах

Подтверждены такие детерминанты генов устойчивости к антимикробным препаратам, как *mgrA*, *norA*, *arlRS*, *LmrS*, *mepAR*, компоненты системы эффлюкса *tet*, два гена β -лактамаз – *blaZ*, модификатор-мишени фторхинолона – *parC*.

Необходимо отметить, что для штаммов золотистого стафилококка, выделяемых от больных с АД и АР, характерна устойчивость к антимикробным препаратам, особенно это относится к MRSA-штаммам, которые нередко изолируются от этих больных. Для выделенных нами MRSA-штаммов характерна устойчивость к нескольким антимикробным препаратам по сравнению с метициллинчувствительными культурами [12, 89]. Нами в выборочном

исследовании 88 изолятов *S. aureus*, выделенных от амбулаторных пациентов с АЗ (АтД и АР) с кожи и слизистых, в 18 (20,4%) штаммах выявлена фенотипическая и генотипическая (ген *mecA*+) устойчивость к оксациллину, они были отнесены к MRSA-штаммам, при этом у этих штаммов определялись при М-ПЦР типировании таргеты, характерные для SCC_{mec} кассет IV типа [89]. Штаммы, содержащие SCC_{mec} кассеты IV типа, в большинстве своем относят к клональной группе CC8, которая включает такие родственные эпидемически значимые штаммы, как EMRSA-2, -6, -12, -13 и -14, распространенные во многих странах мира (Великобритании, США, Германии, Франции и Нидерландах) [89]. Кассеты SCC_{mec} IV типа также выявляются у штаммов *S. epidermidis*, колонизирующих кожу и слизистые оболочки человека, что предполагает возможность передачи данного мобильного элемента от *S. epidermidis* к *S. aureus* [89].

5.2. Профиль генов факторов патогенности штаммов *Staphylococcus spp.*, входящих в состав микробиоты кожи и слизистых верхних дыхательных путей у пациентов с аллергическими заболеваниями

Сравнительный анализ изолятов *S. aureus*, выделенных от пациентов с АЗ и бактерионосителей группы сравнения, показал, что изоляты *S. aureus*, выделенные с пораженной кожи и слизистых ВДП от пациентов с АЗ, достоверно чаще содержат гены гемолизин *hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*, чем изоляты *S. aureus*, встречающиеся у бактерионосителей группы сравнения (Таблица 22).

Таблица 22 – Встречаемость генов гемолизин у штаммов *S. aureus*, выделенных от пациентов с АЗ и бактерионосителей группы сравнения

Целевой ген	Частота встречаемости позитивных штаммов по генам гемолизин, в % ($P \pm m_p$)			p
	АтД n=65 1	АР n=58 2	Группа сравнения n=56 3	

Продолжение Таблицы 22

IIIa	31,0±5,7	43,0±6,5	16,0±4,8	$p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
IIIb	36,9±5,9	17,2±4,9	12,5±4,4	$p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
IIIc	44,6±6,1	18,9±5,1	14,3±4,6	$p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
IIId	33,8±5,8	29,3±5,9	14,3,0±4,6	$p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$

Примечание: статистическая значимость различий между группами пациентов с АЗ и группой сравнения оценивалась с t-критерием Стьюдента с применением переменной Фишера, при $p<0,05$. В сравниваемых группах (1, 2, 3) рассчитаны ошибки относительной величины частоты встречаемости (m_p).

Среди многочисленных экзотоксинов *S. aureus* тропность к клеткам кожи (кератиноцитам) имеет группа эксфоликативных токсинов, таргеты генов, кодирующих эти токсины, были определены нами методом мультипраймерной ПЦР у штаммов *S. aureus* ($n=132$). Изучена распространенность и комбинация этих генов у изолятов, выделенных при тяжелой и среднетяжелой степени АтД. Так, на Рисунке 8 представлена частота встречаемости генов эксфоликативных токсинов (eta, etb, etd) и их комбинаций в геноме изолятов *S. aureus*, выделенных от пациентов с разной степенью тяжести АтД.

Установлено, что при тяжелой степени тяжести АтД, который характеризовался распространенным поражением с вовлечением кожи туловища, конечностей с развитием эритематозно-сквамозной формы воспаления, изоляты *S. aureus*, выделенные с пораженной кожи, в 26,9±6,1% случаев содержали гены etb, edin-C токсинов, что имело значимое отличие от генотипического профиля изолятов *S. aureus*, выделенных при среднетяжелой степени тяжести АтД, где таких изолятов было 18,4±6,2%, $p<0,05$ (Рисунок 8). Изоляты *S. aureus*, выделенные с кожи пациентов с легкой степени тяжести АтД (с ограниченно локализованным поражением кожи и протекающего с редкими обострениями – до 2 раз в год), не содержали генов eta, etd, edin-C токсинов.

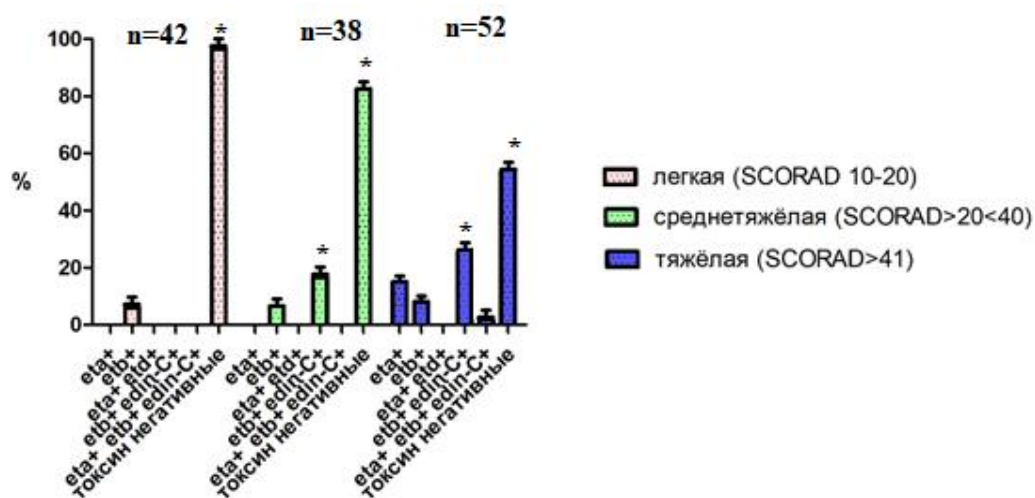


Рисунок 8 – Частота встречаемости генов eta, etb, etd эксфоликативных токсинов ETA, ETB, ETD и гена edin-C, кодирующего токсина EDIN-C, принадлежащего семейству СЗ АДФ-рибозилтрансфераз, в геноме изолятов *S. aureus* при разной тяжести АДД

* Статистическая значимость различий между группами тяжести АДД оценивалась с помощью переменной Фишера, $p < 0,05$. Показан интервал ошибки относительной величины частоты встречаемости (m_p)

Установлено, что в независимости от степени тяжести АДД от $6,0 \pm 2,3\%$ до $12,0 \pm 3,4\%$ всех выделенных изолятов *S. aureus* содержали ген etb (эксфоликативного токсина В), в дальнейших исследованиях эти изоляты были отнесены к MRSA штаммам с генотипом mecA, SCCmec I.

Изоляты *S. aureus*, содержащие гены etb и edin-c, были изолированы только от пациентов со среднетяжелой и тяжелой степенью тяжести АДД, при этом отмечено, что при тяжелой степени АДД частота выделения штаммов, содержащих два этих гена, возрастала почти в 2 раза.

При тестировании изолятов *S. aureus*, выделенных со слизистой носа (ВДП) от пациентов с САР и КАР, штаммов, содержащих гены вышеуказанных токсинов, нами не выявлено. В проведенных исследованиях показано, что гены эксфоликативных токсинов детектируется методом ПЦР не во всех изолятах *S. aureus*, выделяемых от больных с АЗ.

Группа генов, кодирующих лейкоцидины Luk и PVL (токсин Пантона-Валентайна), была исследована в изолятах *S. aureus*, выделенных от пациентов с поражением кожи и слизистых оболочек ВДП. Особенностью этих токсинов является то, что они состоят из двух отдельных олигомерных белков.

Лейкоцидин Luk состоит из LukF (34 кДа) и LukS (33 кДа), а лейкоцидин PVL – из LukF-PV (34 кДа) и LukS-PV (33 кДа), проявляют цитолитические свойства по отношению к нейтрофилам человека [223]. В данном исследовании детектировали таргеты генов, кодирующих S и F белки PVL лейкоцидина (luk-S-V и luk-F-PV) и таргеты лейкоцидина Luk (lukE-lukD и lukM).

На Рисунке 9 представлены данные, отражающие распространенность генов лейкоцидинов среди изолятов *S. aureus* (всего исследовано 129 штаммов), выделенных с пораженной кожи при АтД.

При анализе полученных данных установлено, что гены лейкоцидинов в изолятах *S. aureus*, выделенных от пациентов с тяжелой и среднетяжелой степенью тяжести АтД, встречаются достоверно чаще – на 12,0–17,0%, чем при легкой степени тяжести заболевания (Рисунок 9). Только $61,0 \pm 2,4\%$ изолятов *S. aureus* при тяжелом АтД по генам лейкоцидинов были негативными, тогда как при легком и среднетяжелом АтД – $93,0 \pm 7,5\%$ и $77,1 \pm 7,1\%$ соответственно, ($p < 0,05$).

Таргеты генов S и F субъединиц PVL-токсина и субъединиц лейкоцидина Luk (lukE-lukD и lukM) были нами выявлены только в изолятах *S. aureus*, выделенных от больных с КАР. Таргеты генов лейкоцидина LukE и D, M – в $32,0 \pm 6,5\%$ штаммов, а таргеты luk-S-PVL и luk-F-PVL – только в $6,0 \pm 3,3\%$ штаммов из 50 исследованных изолятов *S. aureus*, выделенных от больных с КАР.

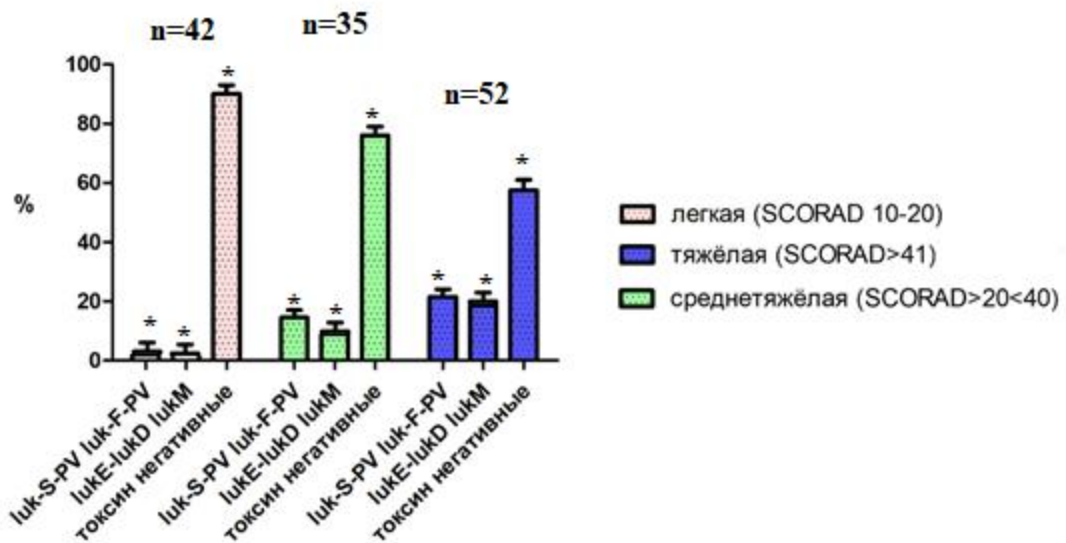


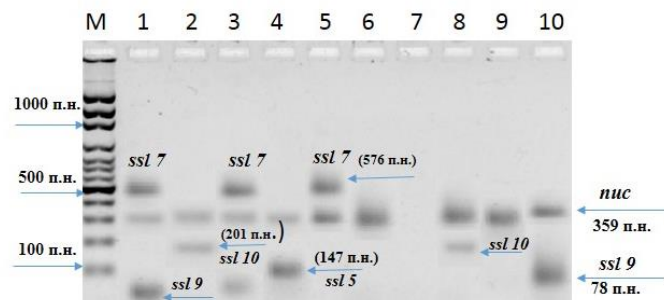
Рисунок 9 – Частота встречаемости генов лейкоцидинов Luk и PVL в штаммах *S. aureus* пораженной кожи при различной степени тяжести АД

*Статистическая значимость различий между группами тяжести пациентов с АД оценивалась с помощью вспомогательной переменной Фишера, $p < 0,05$. Показан интервал ошибки относительной величины частоты встречаемости (m_p)

Распространенность комплекса генов, кодирующих «суперантигены» и суперантиген-подобные белки (SSL-белки) в изолятах S. aureus, выделенных у пациентов с АЗ

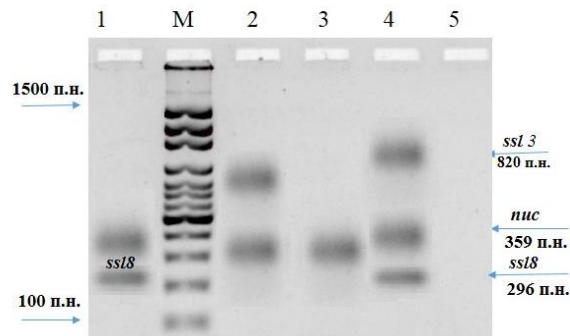
В данной части исследования изучена распространенность генов, кодирующих токсины со свойствами суперантигенов, относящиеся к группе энтеротоксинов: entA(sea), entB(seb), entC(sec), entD(sed), see, seg, seh, sei, sej, а также гена tst, кодирующего TSST-1 токсин [77, 179]. Другая группа генов кодирует подобные энтеротоксинам белки, которые получили название «суперантиген-подобные белки». Международный комитет по номенклатуре стафилококковых суперантигенов рекомендовал переименовать белки, ранее называемые стафилококковыми экзотоксинами (SET), в стафилококковые «суперантиген-подобные белки» (SSL) и соответственно гены экзотоксинов (set 1-11) были переименованы в гены ssl1 – ssl11 (нумерация зависит от начала репликации и принята по часовой стрелке в круговой хромосоме) [260].

Стафилококковые суперантиген-подобные белки (SSL) имеют высокое сходство доменных структур со стафилококковыми суперантигенами или т.н. группой энтеротоксинов *S. aureus*, но кодируются отдельным кластером генов в пределах области генома (от 12–17 kb), формирующей остров патогенности, аналогичный SaPIn2. При этом установлено, что между генами токсинов располагаются межгенные последовательности размером от 339 до 446 п.н. Генов, кодирующих суперантиген-подобные белки в геноме штаммов *S. aureus*, может быть от 2–3 до 11 [183]. Целевые таргеты генов (*ssl3*, *ssl5*, *ssl7*, *ssl8*, *ssl9*, *ssl10*) суперантиген-подобных белков, выявленные нами методом М-ПЦР в геномной ДНК штаммов *S. aureus*, выделенных с кожи и слизистой оболочки носа ВДП у больных АД и АР, представлены на Рисунках 10, 11.



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

Рисунок 10 – Электрофореграмма результата электрофореза в 2% агарозном геле продуктов амплификации М-ПЦР (фото негатив)



М – ДНК GelPilot 100 bp Plus Ladder (Qiagen, Германия); дорожка 1 – штаммы *S. aureus* со слизистой ВДП от пациентов с КАР, позитивные на гены *ssl 8* (296 п.н.); дорожка 5 – отрицательный контроль ПЦР-смесь; дорожка 2 – штамм *S. aureus* со слизистой ВДП от пациентов с САР, позитивный на ген *ssl 3* (820 п.н.); дорожка 3 – штамм *S. aureus* с кожи, негативный на гены *ssl 3* и *ssl 8*; дорожка 4 – штамм *S. aureus* с кожи при АтД, позитивный на ген *ssl 3* (820 п.н) и *ssl 8* (296 п.н.); *nuc* (359 п.н.) ген термонуклеазы, TNase (КФ 3.1.31.1) *S. aureus* (для контроля качества выделения и специфичности бактериальной ДНК)

Рисунок 11 – Результаты электрофореза в 2% агарозном геле продуктов амплификации М-ПЦР (фото негатив)

Локализация генов на островках патогенности предполагает, что суперантиген-подобные белки – это факторы патогенности, которые блокируют некоторые реакции врожденного и адаптивного иммунного ответа организма, участвующие в противоинфекционном иммунитете.

При изучении генома изолятов *S. aureus*, выделенных с кожи пациентов с АтД, нами были выявлены определенные комбинации этих генов и установлено их преимущественное распределение в штаммах при тяжелом и среднетяжелом АтД, а также при обострении дерматита (Таблица 23).

Изоляты *S. aureus*, выделенные с пораженной кожи у пациентов с АтД со среднетяжелой и тяжелой степенью тяжести, в $89,7 \pm 3,2\%$ и $98,0 \pm 2,0\%$ случаев соответственно содержали в своем геноме комбинации генов, кодирующих суперантиген-подобные белки. При легкой степени тяжести АтД таких изолятов было выделено $67,7 \pm 6,1\%$.

Таблица 23 – Частота встречаемости комбинаций генов суперантигено-подобных белков (ssl) и энтеротоксинов в геноме изолятов *S. aureus*, выделенных от пациентов с АД с разной степенью заболевания

Комбинация целевых генов	Р±m _p в % позитивных штаммов <i>S. aureus</i> на таргеты генов <i>ssl</i> и <i>ent</i>					P
	Легкая степень (n=57)	Средняя тяжесть (n=87)	Тяжелая (n=45)	Стадия обострения (n=102)	Стадия ремиссии (n=112)	
	1	2	3	4	5	
ssl 3, ssl5, ssl7, ssl9	24,5±5,6	48,2±5,3	42,2±7,3	40,0±4,8	н/о	p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05
ssl5, ssl7, ssl9 ssl10	25,5±5,6	32,1±5,0	40,0±7,3	36,0±4,7	20,5±3,8	p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₄₋₅ <0,05
ssl7, ssl9, ssl10,	14,0±4,5	11,4±3,4	15,5±5,3	20,0±3,9	7,1±2,4	p ₁₋₃ >0,05 p ₂₋₃ >0,05 p ₄₋₅ <0,05
seb, ssl5, ssl7, ssl9	10,5±4,0	9,1±3,0	22,2±6,1	25,0±4,2	н/о	p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05
sea, seb, ssl8	33,0±6,2	89,7±3,2	98,0±2,0	96,0±1,9	54,4±4,7	p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₄₋₅ <0,05
tst, ssl4, ssl5	н/о	н/о	4,4±3,0	14,0±3,4	н/о	-
sec, sed, seh, ssl7, ssl9	3,5±2,4	н/о	26,6±6,5	15,0±3,5	15,2±3,4	p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₄₋₅ >0,05
ssl7, ssl10	8,8±3,7	25,3±4,6	11,1±4,7	22,0±4,1	н/о	p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05
Всего негативных	33,3±6,2	10,3±3,2	2,0±2,0	4,0±1,9	45,6±4,7	p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₄₋₅ <0,05
Всего позитивных	67,7±6,1	89,7±3,2	98,0±2,0	96,0±1,9	54,4±4,7	p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₄₋₅ <0,05

Примечание: статистическая значимость между группами оценивалась с помощью переменной Фишера, p<0,05. н/о – не определялись. m_p - ошибка относительной величины частоты (P) встречаемости. *ent* – гены энтеротоксинов.

В выборке штаммов преобладали изоляты *S. aureus*, содержащие комбинации от 4 до 5 генов суперантиген-подобных белков (ssl4, ssl5, ssl7, ssl9 и ssl4, ssl5, ssl7,

ssl9) и энтеротоксинов с геном ssl8 (sea, seb, ssl8), на втором месте встречались изоляты, содержащие комбинацию из 3-х генов (ssl7, ssl9, ssl10) этих белков.

В стадию обострения АД 96,0±1,9% изолятов *S. aureus* содержали гены, кодирующие суперантиген-подобные белки, а в стадию ремиссии заболевания таких изолятов было выделено 54,4±4,7%. Выявлено также, что изоляты *S. aureus*, выделенные с кожи больных АД, содержат в своем геноме не только гены суперантиген-подобных белков, но и гены энтеротоксинов. Так, при легкой степени тяжести АД таких изолятов было выделено 33,0±6,2%, при среднетяжелой – 89,7±3,2%, а при тяжелой – 98,0±2,0% (Таблица 23). Также отмечено, что в стадию обострения заболевания почти каждый выделенный изолят *S. aureus* содержал набор генов энтеротоксинов и суперантиген-подобных белков (96,0±1,9%), тогда как в стадию ремиссии АД (54,4±4,7%) таких изолятов было выделено почти в 1,8 раза меньше, $p < 0,05$, Таблица 23.

Встречаемость генов энтеротоксинов и суперантиген-подобных белков у изолятов S. aureus, выделенных с ВДП от пациентов с КАР и САР

Частота встречаемости генов, кодирующих энтеротоксины и TSST-1 токсин в геноме изолятов *S. aureus*, выделенных с ВДП у пациентов с АР, представлены на Рисунке 12. Установлено, что при КАР средняя частота встречаемости генов энтеротоксинов sea, seb, sec, seh составила от 15,4±4,5% до 27,6±5,5%, тогда как при САР встречаемость этих генов в 2,0 раза меньше и составила от 7,6±3,2% до 12,3±4,0%, ($p < 0,05$).

Таким образом, при развитии КАР, характеризующегося длительным сохранением симптомов заболевания, частота встречаемости токсигенных изолятов *S. aureus*, выделяемых со слизистой носа ВДП, в несколько раз выше, чем при САР.

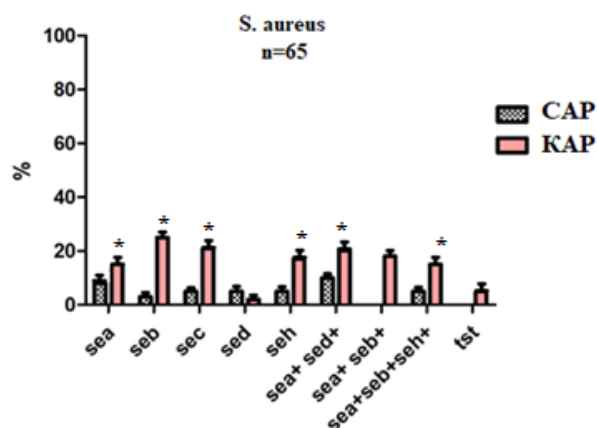


Рисунок 12 – Частота встречаемости генов энтеротоксинов в изолятах *S. aureus* от больных АР

*Статистическая значимость между группами пациентов с САР и КАР оценивалась с помощью вспомогательной переменной Фишера, $p < 0,05$. Показан интервал ошибки относительной величины частоты встречаемости (m_p)

Нами также изучена и распространенность генов, кодирующих суперантиген-подобные белки среди штаммов *S. aureus*, выделенных с ВДП от пациентов с АР (Рисунок 13). Установлено, что при КАР встречаемость штаммов *S. aureus*, содержащих в своем геноме кластеры генов, кодирующих суперантиген-подобные белки, достоверно выше, чем при САР.

Так, встречаемость штаммов *S. aureus*, содержащих от 3 до 4 генов суперантиген-подобных белков при КАР, составила от $17,0 \pm 5,1\%$ до $28,3 \pm 6,1\%$, тогда как при САР – от $7,5 \pm 2,6\%$ до $24,5 \pm 5,9\%$ (Рисунок 13). Отмечена высокая распространенность у штаммов *S. aureus*, выделенных от больных с САР, комбинации генов *ssl5-ssl7-ssl9-ssl10*, кодирующих соответствующие суперантиген-подобные белки. При КАР высокая распространенность была характерна для штаммов *S. aureus*, с комбинацией генов энтеротоксина и суперантиген-подобных белков *sea-ssl7-ssl10* (Рисунок 13).

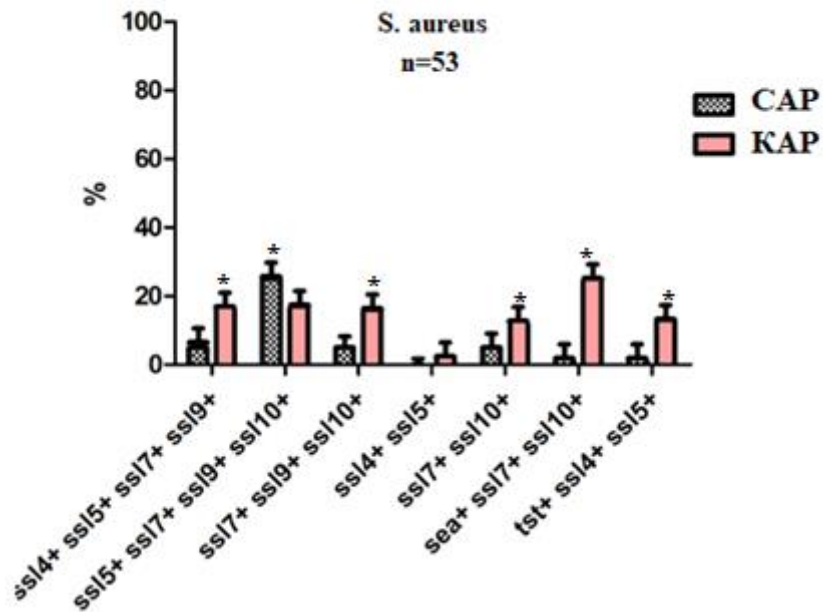


Рисунок 13 – Частота встречаемости генов, кодирующих суперантиген-подобные белки в изолятах *S. aureus*, выделенных с ВДП у пациентов с АР

*Статистическая значимость между группами пациентов с САР и КАР оценивалась с помощью вспомогательной переменной Фишера, $p < 0,05$. Показан интервал ошибки относительной величины частоты встречаемости (m_p)

Распространенность генов протеолитических ферментов в изолятах S. aureus, выделенных от пациентов с АЗ

В данной части исследования была изучена распространенность генов, кодирующих внеклеточные протеиназы в изолятах *S. aureus*, выделенных с покровных тканей (кожа и слизистые оболочки ВДП) у пациентов с АЗ. Скрининг проведен на наличие таргетов генов, кодирующих ферменты, которые объединены в четыре оперона, локализованные на бактериальной хромосоме: ssp-оперон (sspA, V8-протеаза; sspB, стафопаин В), scp-оперон (scpA, стафопаин А), spl-оперон, aur-оперон (aur, ауреолизин) [48, 77]. Поскольку для обнаружения конкретного гена, кодирующего протеазу, использовалась только одна пара праймеров, полиморфизмы генов не учитывались. Однако анализ

последовательностей интересующих генов *S. aureus*, депонированных в NCBI GenBank, показал, что степень гомологии между последовательностями от разных референтных штаммов *S. aureus* не менее 95%, что оправдывает принятый экспериментальный подход скрининга этих генов. Проведено сопоставление наличия определенных генов, кодирующих протеиназы, в геномах изолятов *S. aureus* с особенностями клинического течения atopического дерматита (степени тяжести дерматита, длительности, стадии заболевания), а также длительности и клинических особенностей течения АР.

На Рисунке 14 представлена частота встречаемости комбинации генов протеиназ и в геноме изолятов *S. aureus*, изолированных от пациентов с АтД и бактерионосителей без АЗ (группа сравнения).

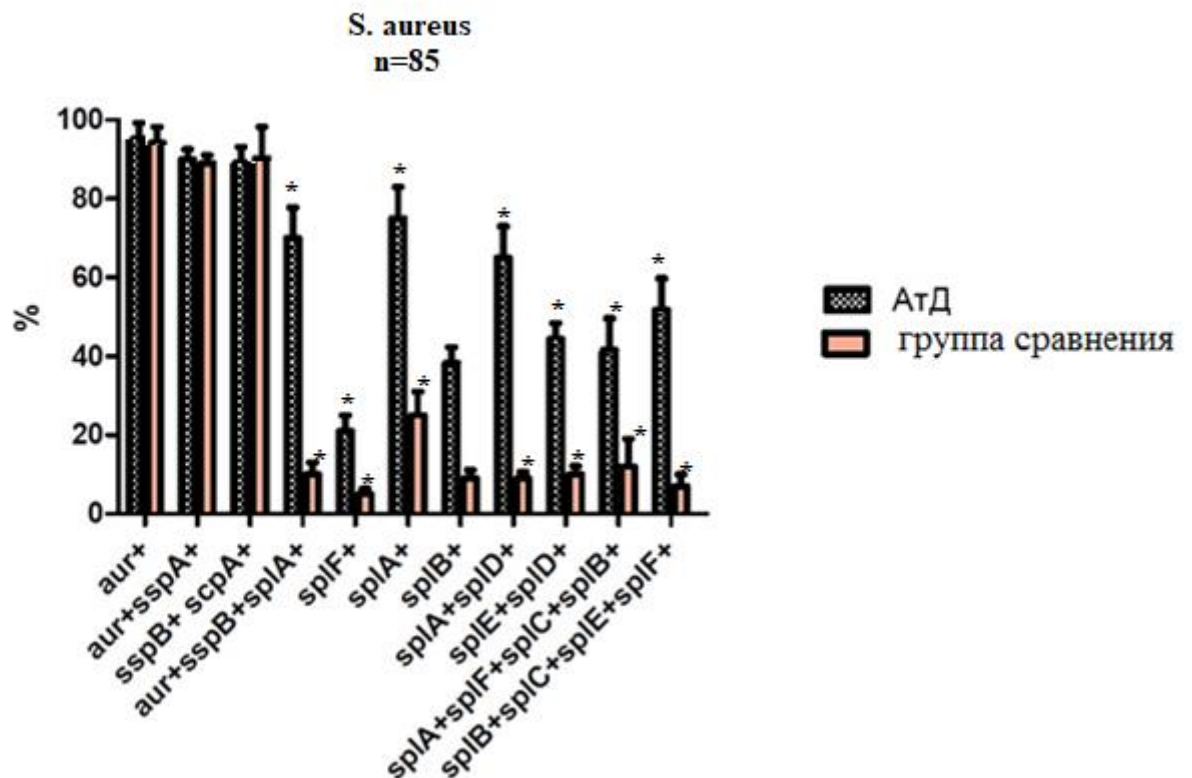


Рисунок 14 – Частота встречаемости генов и их комбинаций, кодирующих протеиназы в изолятах *S. aureus*, выделенных с кожи при АтД и группы сравнения

*Статистическая значимость между группами пациентов с АтД и группой сравнения оценивалась с помощью вспомогательной переменной Фишера, $p < 0,05$.

Показан интервал ошибки относительной величины частоты встречаемости (m_p)

Анализ полученных данных позволил установить, что в подавляющем большинстве тестированных штаммов *S. aureus*, выделенных как от пациентов с АтД, так и от здоровых лиц контрольной группы, встречаются гены *aur* (металлзависимая протеиназа – ауреолизин), *sspA* (сериновая протеиназа), *scrA* и *sspB* (тиоловые протеиназы – стафопаины А, В) [357]. Значимые различия в частоте встречаемости у изолятов *S. aureus*, выделенных от больных АтД и лиц группы сравнения, были получены по следующим генам протеиназ: *aur-sspB-splA*; *splA*, *splF*, *splB*, *splA-splD*, *splE-splD*. У больных АтД значимо выше была встречаемость штаммов *S. aureus* с генотипом, содержащим четыре гена *Spl*-протеиназ, чем в группе сравнения (Рисунок 14).

В следующей части работы представлены данные по встречаемости генов протеиназ в изолятах *S. aureus*, выделенных с ВДП от больных с АР (КАР и САР) с разной продолжительностью симптомов заболевания и от здоровых бактерионосителей группы сравнения (Рисунок 15).

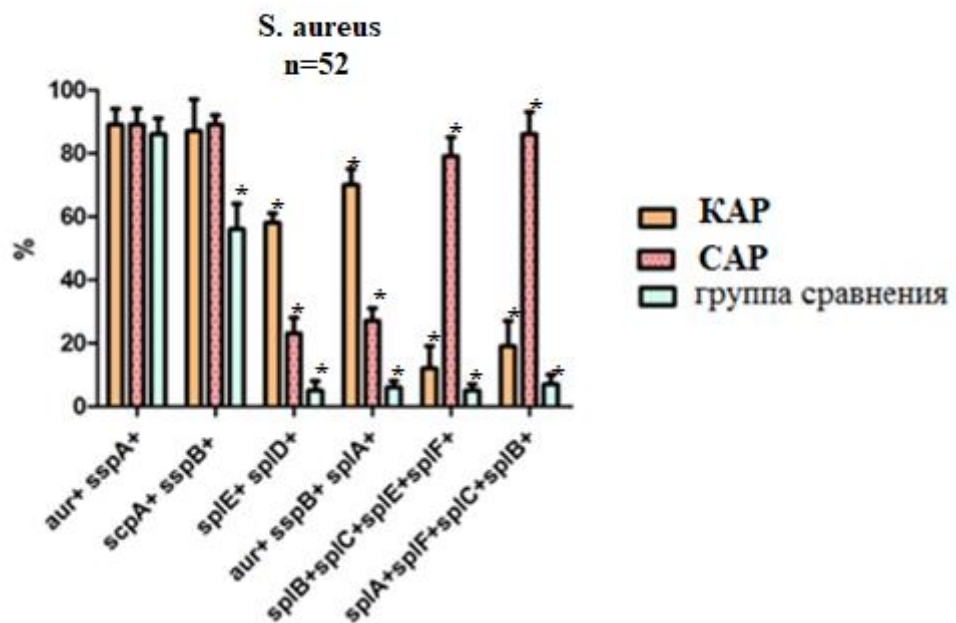


Рисунок 15 – Частота встречаемости штаммов *S. aureus* с характерным генотипическим профилем генов протеиназ у здоровых лиц (бактерионосители группы сравнения) и пациентов с АР

*Статистическая значимость между группами пациентов с АР и группой сравнения оценивалась с помощью вспомогательной переменной Фишера, $p < 0,05$. Показан интервал ошибки относительной величины частоты встречаемости (m_p)

Встречаемость штаммов *S. aureus* с генотипическим профилем генов *aur-sspA*, кодирующих металлзависимую протеиназу ауреолизин и сериновую протеиназу, между штаммами от здоровых бактерионосителей группы сравнения и больными с АР (КАР и САР) статистически не различалась и была высокой ($86,5 \pm 4,7\%$) (Рисунок 15).

Статистически значимое различие между больными АР и группой сравнения было выявлено нами по встречаемости в штаммах *S. aureus* генов *scpA* и *scpB*, которые кодируют стафопаины А и В. У больных АР встречаемость штаммов с генотипическим профилем (*scpA-scpB*) составила $86,5 \pm 4,7\%$, что в 1,5 раза выше, чем у лиц группы сравнения (Рисунок 15).

У больных АР, как САР, так и КАР нами выявлена высокая частота встречаемости изолятов *S. aureus* с такими характерными генотипическим профилями генов протеиназ, как *aur-sspB-splA*, *splE-splD*, а также *splB-splC-splE-splF*, и *splA-splF-splC-splB*, по сравнению со штаммами, колонизирующими слизистые ВДП лиц группы сравнения (Рисунок 15). Так, изоляты *S. aureus* с профилем *aur-sspB-splA* и *splE-splD* встречались при КАР в 8,5 раз, а при САР – почти в 4,2 раза чаще, чем у лиц группы сравнения (Рисунок 15). Изоляты *S. aureus* с профилем *splB-splC-splE-splF* встречались при КАР почти в 2,0 раза, а при САР – почти в 11,0 раз чаще, чем в группе сравнения (Рисунок 15). Такая же закономерность отмечена для изолятов *S. aureus* с профилем генов протеиназ *splA-splF-splC-splB*: так, они встречались при КАР почти в 2,3 раза, а при САР – в 11,7 раз чаще, чем у бактерионосителей группы сравнения (Рисунок 15). Нами также детектированы во всех штаммах *S. aureus* (полученных как от здоровых бактерионосителей, так и от больных с КАР, у которых определялись таргеты генов протеиназ *spl*-оперона) таргеты гена *isdB*, кодирующего один из двух гем-связывающих доменов NEAr-транспортера (NEAT) у бактерий этого вида [359], что, возможно, является генетической особенностью штаммов, колонизирующих слизистую оболочку носа, в секрете которой содержатся гем-содержащие протеины, в том числе и гемоглобин.

Филогенетический анализ генов *S. aureus*, кодирующих протеиназы, эксфолиативные токсины, которые играют существенную роль в патогенезе atopического дерматита [224], показал тесную филогенетическую связь этих генов. Филогенетический анализ был проведен нами с применением метода UPGMA. На основании данных филогенетического анализа показано родство генов, кодирующих сериновые протеиназы (*spl*-оперона и *sspA*) и эксфолиативные токсины (*eta* и *etd*) у штаммов *S. aureus* (Рисунок 16). В результате проведенного филогенетического анализа гены протеиназ и эксфолиативных токсинов были сгруппированы в три генетических кластера (клады): первый кластер включал родственные гены, кодирующие сериновые протеиназы *spl*-оперона, такие как *SplD*, *SplF*, *SplE*, *SplC*, *SplA*; второй кластер – гены сериновой протеиназы *SspA* и эксфолиативных токсинов *ETA* и *ETD*; третий кластер – был сформирован из генов (*sspB* и *scpA*), кодирующих стафопаины у *S. aureus*. Отдельными ветвями филогенетического дерева выделены гены *aur* (металлзависимая протеиназа ауреолизин) и *etb* (эксфолиативный токсин В, *ETB*) (Рисунок 16).

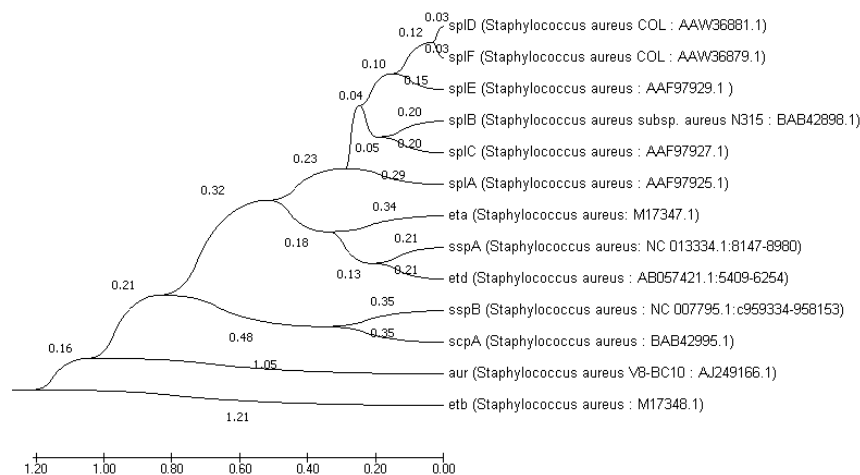


Рисунок 16 – Филогенетическое дерево, иллюстрирующее эволюционную взаимосвязь генов протеиназ и эксфолиативных токсинов у штаммов *S. aureus*. Филогенетическое дерево было выведено с использованием метода UPGMA; показано оптимальное дерево с суммой длин ветвей 6,64; эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода Neighbor-joining и выражены в единицах количества замен оснований на кодон; в анализ включены 13 нуклеотидных последовательностей генов

**ГЛАВА 6. ВЫЯВЛЕНИЕ АССОЦИАЦИЙ МЕЖДУ
РАСПРОСТРАНЕННОСТЬЮ SNP В ГЕНАХ TLR2-, TLR4-РЕЦЕПТОРОВ
И SPINK5 У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ,
АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ, С ЦИТОКИНОВЫМ ПРОФИЛЕМ
И КОЛОНИЗАЦИЕЙ ЛОКАЛЬНЫХ БИОТОПОВ ЗОЛОТИСТЫМ
СТАФИЛОКОККОМ**

**6.1. Ассоциация полиморфизмов (Arg753→Gln, rs5743708) TLR2- и
(Asp299→Gly, rs4986790) TLR4-рецептора, а также rs2303067 (1258G→A,
Glu420→Lys) гена SPINK5 с атопическим дерматитом и стафилококковой
колонизацией кожи при этой патологии**

Представлены результаты исследования по выявлению генетических мутаций генов TLR2-, TLR4-рецептора и гена SPINK5 у больных с АтД и АР (респираторной аллергией). Известно, что TLR2- и TLR4-рецепторы клеток участвуют в реакциях врожденного и адаптивного иммунного ответа на пептидогликаны грамположительных и ЛПС грамотрицательных бактерий [176, 364].

TLR2- и TLR4-рецепторы относятся к трансмембранной группе Toll-подобных рецепторов и экспрессируются на иммунокомпетентных клетках (макрофаги, дендритные клетки) [281]. Провоспалительные реакции, индуцированные этими Toll-подобными рецепторами, формируют первую защитную реакцию организма, которая обеспечивает нейтрализацию микробного фактора и способствует репарации тканей и восстановлению иммунного гомеостаза [274].

В ряде исследований показано, что генетические полиморфизмы генов TLR2-рецептора (Arg753→Gln, rs5743708) и TLR4-рецептора (Asp299→Gly, rs4986790) ассоциированы со снижением активации иммунокомпетентных клеток ЛПС,

бактериальными пептидами и повышенным риском стафилококковых септических инфекций [119, 265], что может быть обусловлено снижением образования провоспалительных Th1-цитокинов, необходимых для эффективной элиминации *S. aureus*.

Исследования, касающиеся изучения распространенности данных мутаций в TLR2- и TLR4-рецепторов у больных с АЗ и их связь с риском колонизации локальных биотопов кожи и слизистых ВДП золотистым стафилококком, в литературе отсутствуют.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов в исследованных группах больных АтД и группе контроля соответствовало закону Харди – Вайнберга – Кастла и было равновесным. В проведенном исследовании прежде всего определили частоту встречаемости двух полиморфных генотипов TLR2-рецептора (rs5743708) и TLR4-рецептора (rs4986790) у пациентов с АтД (легкая, среднетяжелая и тяжелая) и здоровых лиц контрольной группы (Таблица 24).

Таблица 24 – Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов, толл-подобных рецепторов (TLR2, TLR4) у пациентов с АтД и здоровых лиц контрольной группы

Ген/генотип	Частота в группе с АтД, % (абс. ч) n=150	Частота в группе контроля (здоровые лица), % (абс. ч) n=100	p-value χ^2	ОШ (95% ДИ)
TLR2 (rs5743708, 2258G→A, Arg753→Gln)				
G	89,0 (133)	97,0 (97)	4,9 p=0,03	3,9 (1,0-14,0)
A	11,0 (17)	3,0 (3)		
GG	79,0 (118)	94,4 (94)	0 p=0,9	1 (0,6-1,5)
GA	20,0 (30)	5,1 (5)	8,9 p=0,002	4,7 (1,7-13,0)
AA	1,0 (2)	0,9 (1)	-	1,3 (0,1-23,0)
TLR4 (rs4986790, 896A→G)				
A	92,4 (139)	94,0 (94)	0,3 p=0,57	1,3 (0,4-4,0)
G	7,6 (11)	6,0 (6)		

Продолжение Таблицы 24

AA	87,0 (131)	90,6 (91)	0	1
AG	11,0 (17)	8,4 (8)	0,5 P=0,5	1,4 (0,5-3,7)
GG	2,0 (2)	1,0 (1)	-	2,0 (0,18-23,2)

«В результате анализа данных распределения генотипов отмечено, что у пациентов с АтД частота встречаемости непалиморфного генотипа GG TLR2-рецептора составила 79,0%, в контрольной группе здоровых лиц – 94,4%, а частота полиморфного генотипа GA TLR2 у больных АтД составила 20,0%, у здоровых лиц контрольной группы – 5,1% (p-value $\chi^2 < 0,01$)» (Таблица 24) [97, 178, 357].

Таким образом, установлено достоверное снижение распространенности в 1,2 раза протективного генотипа GG и увеличение частоты генотипа GA (rs5743708, 2258G→A) TLR2 в 3,9 раза среди пациентов с АтД. Снижение встречаемости генотипа GG и увеличение генотипа GA является одним из факторов риска АтД у пациентов с атопическим фенотипом (ОШ=4,7; 95%ДИ 1,7–13,0, p=0,002). Генотип AA (гомозиготная мутация) у пациентов и в группе здоровых лиц распространен редко (1,0 и 0,9% соответственно). У пациентов с АтД частота аллеля G гена TLR2 составила 89,0%, в контрольной группе – 97,0%, а частота полиморфного аллеля A (rs5743708, 2258G→A) у больных – 11,0%, в группе здоровых – 3,0% (p-value $\chi^2 < 0,05$). Таким образом, частота полиморфного аллеля A (rs5743708, 2258G→A) гена TLR2 у больных с АтД в исследуемой популяции была в 3,7 раз выше, чем в контрольной группе.

В отдельном исследовании показано, что наличие мутации (rs4986790, 896A→G) в гене TLR4 рецептора повышает риск развития инфекции мочевыводящих путей у носителей этого аллеля и снижает резистентность слизистых оболочек к условно-патогенной микрофлоре, а также способствует снижению экспрессии данного рецептора на эпителии [113].

В нашем исследовании частота распределения генотипов по полиморфизму rs4986790 (896A→G) TLR4-рецептора в исследуемой группе больных АтД и

здоровых лиц контрольной группы распределилась следующим образом: частота генотипа AA у больных АтД составила 87,0%, а в группе контроля – 90,6%, генотипа AG – 12,0% у больных, в группе контроля – 8,4% (p-value χ^2 p>0,05) (Таблица 24). Распространенность генотипа GG у больных – 2,0%, а в группе контроля – 1,0%, что не показало достоверных различий между группами. Частота встречаемости аллеля A (rs4986790, 896A→G) гена TLR4 у больных составила 92,4%, в контроле – 94,0%, аллеля G у больных – 7,6%, в контроле – 6,0%, что также не выявило достоверных различий (p-value χ^2 > 0,05, ОШ=1,4, 95%ДИ: 0,56–4,0) [178, 357].

Следующим этапом исследования было выявление особенностей микробной обсемененности кожи изолятами *S. aureus* у больных АтД с разными генотипами по полиморфизмам rs5743708, rs4986790 TLR2- и TLR4-рецепторов.

Показатель микробной обсемененности оценивали в виде средних значений бактериального обсеменения кожи, выраженного в Log₁₀ КОЕ/см² на локальных биотопах (конечности, лицо). Показатель микробной обсемененности кожи у больных АтД по стадиям заболевания и в зависимости от генотипа по SNP rs5743708 TLR2-рецептора представлен в Таблице 25.

При анализе полученных данных установлено, что у больных АтД вне зависимости от возрастной группы степень микробного обсеменения кожи *S. aureus* была выше в 10–100 раз (на 1,0–2,0 Log₁₀ КОЕ/см²) в стадию обострения заболевания у лиц с наличием полиморфного генотипа GA по TLR2 (rs5743708) (p<0,05), при этом отмечена характерная особенность в этой группе: степень микробного обсеменения кожи *S. aureus* при переходе из обострения в стадию ремиссии у больных с данным полиморфным генотипом не менялась и была более 130×10³ КОЕ бактерий на см² пораженной кожи (>5,0 Log₁₀ КОЕ/см²) (Таблица 25).

Таблица 25 – Показатели микробной обсемененности локальных участков кожи *S. aureus* у пациентов с АтД с разными полиморфными генотипами TLR2 (rs5743708, 2258G→A) рецептора

Форма АтД	Степень микробной обсемененности кожи <i>S. aureus</i> (Log_{10} КОЕ/см ²), М±SD				p
	Генотип TLR2 (rs5743708, 2258G→A) GG (n=30)		Генотип TLR2 (rs5743708, 2258G→A) GA (полиморфный) (n=25)		
	Стадия обострения	Стадия ремиссии	Стадия обострения	Стадия ремиссии	
	1	2	3	4	
Младенческая	4,5±0,5	2,5±0,6	5,5±0,6	6,5±0,7	p ₁₋₂ <0,05 p ₃₋₄ >0,05 p ₁₋₃ <0,05
Взрослая	4,5±0,4	2,5±0,8	6,5±0,5	6,0±0,5	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₄ <0,05 p ₃₋₄ >0,05

Примечание: Статистическая значимость в группах оценивали по парному t-критерию Стьюдента, p<0,05.

Показатель микробной обсемененности кожи у больных АтД по стадиям заболевания и в зависимости от генотипа по SNP rs4986790 TLR4-рецептора представлен в Таблице 26.

Установлено, что у пациентов с АтД вне зависимости от возрастной группы пациентов степень микробного обсеменения кожи *S. aureus* была на 2,0 Log_{10} КОЕ/см² (140±5,0 КОЕ/см²) выше у лиц с наличием полиморфного генотипа AG по TLR4-рецептору (rs4986790, 896AG) (p<0,05); при этом отмечена также закономерность: отсутствие снижения степени микробного обсеменения кожи *S. aureus* при переходе из обострения в стадию ремиссии заболевания (Таблица 26).

Таблица 26 – Показатели микробной обсемененности локальных участков кожи *S. aureus* у пациентов с АтД с разными полиморфными генотипами TLR4 (rs4986790, 896A→G) рецептора

Форма АтД	Степень микробной обсеменённости кожи <i>S. aureus</i> (Log ₁₀ КОЕ/см ²), M±SD				P
	Генотип TLR4 (rs4986790, 896A→G) AA (n=25)		Генотип TLR4 (rs4986790, 896A→G) AG (полиморфный) (n=17)		
	Стадия обострения	Стадия ремиссии	Стадия обострения	Стадия ремиссии	
	1	2	3	4	
Младенческая	4,5±0,5	2,5±0,8	5,5±0,5	5,5±0,5	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₄ <0,05 p ₃₋₄ >0,05
Детская	4,5±0,2	3,0±0,4	6,5±0,5	6,0±0,5	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₄ <0,05 p ₃₋₄ >0,05
Взрослая	4,0±0,5	2,5±0,6	5,5±0,5	5,5±0,5	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₄ <0,05 p ₃₋₄ >0,05

Примечание: Статистическая значимость в группах оценивали по парному t-критерию Стьюдента, p<0,05.

Сводные данные распределения показателей степени микробного обсеменения локальных биотопов кожи и слизистых оболочек ВДП *S. aureus* в группах больных с полиморфизмами TLR2- и TLR4- рецепторов представлены на Рисунке 17. Показано, что у больных с респираторной аллергией (АР) с полиморфизмом (rs5743708, 2258G→A) TLR2-рецептора и генотипом (GA), в независимости от возрастной группы, степень микробного обсеменения слизистых оболочек ВДП *S. aureus* выше, чем у больных с генотипом GG (p<0,05) (Рисунок 17).

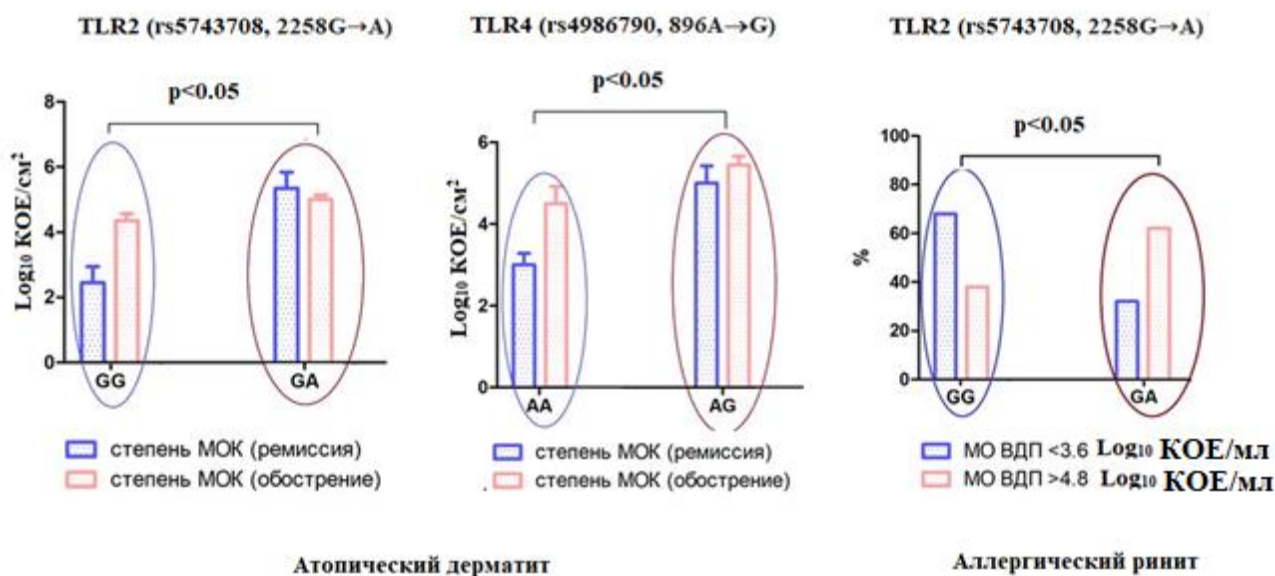


Рисунок 17 – Показатели микробной обсемененности кожи (МОК) *S. aureus* у больных АД с полиморфными генотипами TLR2 (rs 5743708, 2258G→A) и TLR4 (rs 4986790, 896A→G) и распределение генотипов полиморфизма TLR2 (rs5743708, 2258G→A) у больных с АР в зависимости от степени микробной обсемененности ВДП *S. aureus*

Статистическая значимость в группах больных при АД оценивали по парному t-критерию Стьюдента, $p < 0,05$; в группах с АР с применением вспомогательной переменной Фишера, $p < 0,05$

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных SNP rs2303067 (1258G→A, Glu420→Lys) гена SPINK5, кодирующего белок ингибитор сериновых протеиназ LEKTI и регулирующего функцию эпидермального барьера, у пациентов с АД и здоровых лиц контрольной группы представлено в Таблице 27.

Таблица 27 – Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена SPINK5, кодирующего ингибитор сериновых протеаз ЛЕКТИ, регулирующего функцию эпидермального барьера у пациентов с АтД и здоровых лиц контрольной группы

Ген/генотип		Частота в группе с АтД, % (Абс. ч) n=150	Частота в группе контроля (здоровые лица), % (Абс. ч) n=100	p-value χ^2	ОШ (95% ДИ)
rs2303067, 1258G→A (Glu420→Lys)					
G		32 (48)	49 (49)	5,3 p=0,02	2,04 (1,14- 3,6)
A		68 (102)	51 (51)		
Кодоминантная модель	GG	6 (9)	18 (18)	0,1 p=0,7	1 (0,27- 3,7)
	GA	52 (78)	62 (62)	2,6 p=0,1	2,5 (0,9- 6,8)
	AA	42 (63)	20 (20)	12,8 p=0,003	6,3 (2,1-18,0)

Анализ распространенности полиморфного аллеля А (мутантного) (Glu420→Lys) гена SPINK5 у пациентов с АтД показал, что аллель А встречался в группе пациентов с АтД в 1,3 раза чаще, чем в контрольной группе здоровых лиц ($\chi^2=5,3$, $p=0,02$). Генотип GG гена SPINK5 у больных встречался в 3,0 раза реже, чем в контрольной группе здоровых лиц. Аллель А (Glu420→Lys) гена SPINK5 является фактором риска, ассоциированным с АтД (ОШ=2,04, 95%ДИ 1,14–3,6 $p=0,02$). Наличие генотипа GG гена SPINK5 является «протективным» фактором, и представлено в группе контроля здоровых лиц без АЗ и патологии кожи. Мутантный генотип AA (Glu420→Lys) гена SPINK5 преобладал в группе пациентов с АтД, что можно отнести к факторам риска развития АтД у лиц с атопическим фенотипом (ОШ=6,3, 95%ДИ 2,1–18,0) в кодоминантной модели (Таблица 27) [76].

Связь полиморфного варианта rs2303067 гена SPINK5, кодирующего 15-доменный белок ЛЕКТИ (ингибитор сериновых протеиназ) и выраженности

бактериальной колонизации пораженной кожи предплечья или щечной области *S. aureus* у пациентов с АтД, оценивали с помощью критерия χ^2 «хи-квадрат», при значимости $p < 0,05$, применяя анализ таблиц сопряженности 2×3 и 2×2 при степенях свободы 2 и 1 соответственно. Для этого методом случайной выборки было отобрано 56 пациентов с АтД (возраст больных 6–45 лет) и проведен анализ распределения генотипов гена SPINK5 в зависимости от степени микробного обсеменения гладкой кожи предплечья и лица *S. aureus* (Таблица 28).

Таблица 28 – Распределение генотипов полиморфных вариантов гена SPINK5 (rs2303067, 1258G→A, Glu420→Lys) у больных АтД в зависимости от степени МО (микробного обсеменения) гладкой кожи предплечья и лица таксонами *S. aureus*

Генотип	Частота встречаемости полиморфного генотипа, Абс.ч. (%)		χ^2
	Степень колонизации <2,8±0,6 Log ₁₀ КОЕ/см ²	Степень колонизации ≥4,6±0,6 Log ₁₀ КОЕ/см ²	
GG	20 (35,7)*	8 (14,3)	p<0,01
GA	6 (10,7)	5 (8,9)	
AA	2 (3,5)*	15 (26,8)	
Всего	56 (100)		

Примечание: *Статистическая значимость между группами с разной степенью колонизации оценивалась с применением $\chi^2_{0.01}$ критерия Пирсона, $p < 0,01$

Оценка частоты встречаемости генотипов и показателей микробного обсеменения (МО) кожи *S. aureus* определяли в группе из 56 обследованных больных АтД. У большей части больных АтД – 20 (35,7%) человек с генотипом GG (rs2303067, 1258G→A) гена SPINK5 (отсутствует мутантный аллель) кожа предплечий и лица колонизировалась штаммами *S. aureus* в степени МО менее 2,8±0,6 Log₁₀ КОЕ/см² (или ≤640,0±8,0 КОЕ/см²), а с генотипом AA такая степень МО выявлена только у 2 (3,5%) человек. Степень МО кожи более 4,6±0,6 Log₁₀ КОЕ/см² (>43,0±8,0×10³ КОЕ/см²) выявлена у 8 (14,3%) больных с генотипом GG, а с генотипом AA – у 5 (26,8%) больных ($\chi^2=11,5$, $p < 0,01$). Степень МО кожи менее

$2,8 \pm 0,6 \text{ Log}_{10} \text{ КОЕ/см}^2$ ($<640,0 \pm 8,0 \text{ КОЕ/см}^2$) была выявлена у 6 (10,7%) больных с генотипом GA, и только у 5 (8,9%) более $4,6 \pm 0,6 \text{ Log}_{10} \text{ КОЕ/см}^2$ ($>43,0 \pm 8,0 \times 10^3 \text{ КОЕ/см}^2$), $p > 0,05$. Таким образом, установлено, что у больных АД с мутантным генотипом AA (Glu420→Lys) гена SPINK5 высокая степень обсемененности кожи *S. aureus* регистрировалась в 7,6 раза чаще (Таблица 28).

Таким образом, наличие гомозиготного полиморфного генотипа SNP (Glu420→Lys) гена SPINK5 достоверно повышает риск выраженной бактериальной колонизации кожи больных АД штаммами *S. aureus* [76]. Наличие гетерозиготного полиморфного генотипа варианта (Glu420→Lys) гена SPINK5, по нашим данным, достоверно не влияло на показатель бактериальной обсемененности кожи *S. aureus* у пациентов с АД.

6.2. Цитокиновый профиль у больных атопическим дерматитом с полиморфизмами (SNP) рецепторов TLR2 и TLR4 и гена SPINK5

При анализе цитокинового профиля сыворотки крови у больных АД выявлено значимое повышение концентрации Th2-цитокина ИЛ-4 по сравнению с группой контроля (здоровые лица), $p < 0,05$ (Рисунки 18 и 19).

При этом отмечено, что концентрация ИЛ-4 в группах больных АД с полиморфными аллелями (мутация) в генах TLR2-рецептора (rs 5743708, 2258G→A) и TLR4-рецептора (rs 4986790, 896A→G) была выше по сравнению с группой больных без полиморфного аллеля с генотипами GG (TLR2, rs 5743708, 2258G→A) и AA (TLR4, rs 4986790, 896A→G), $p < 0,05$ (Рисунок 18). Также нами установлено, что концентрация ИЛ-4 в сыворотках крови обследованных лиц группы контроля с наличием полиморфных аллелей (rs 4986790, 896A→G) с генотипами AG и GG по гену TLR4-рецептора была выше, чем у здоровых лиц группы контроля без полиморфного аллеля и с генотипом AA, $p < 0,05$ (Рисунок 18).

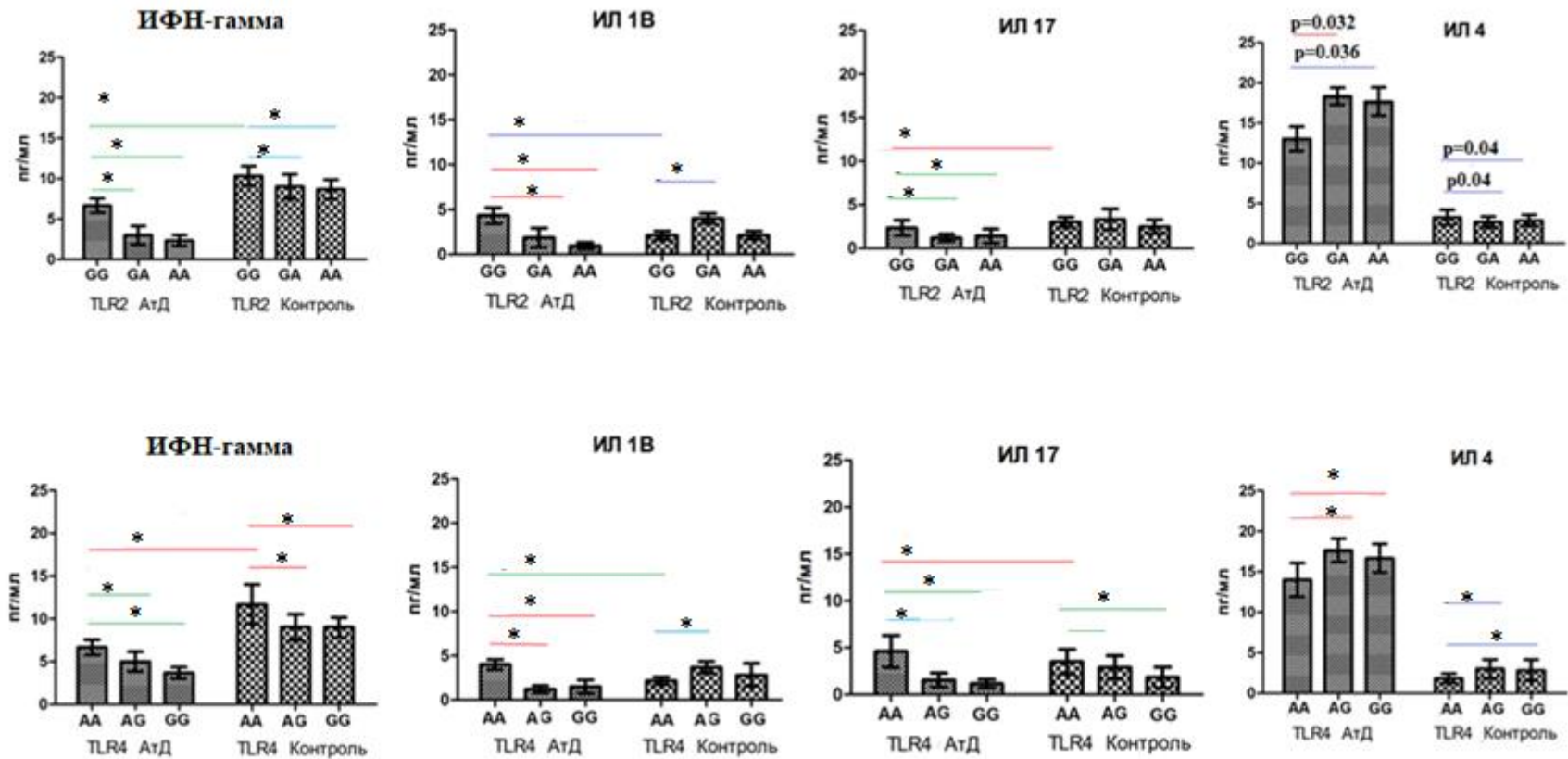
При анализе цитокинового профиля сыворотки крови у больных АД установлено снижение концентрации ИФН- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-17 в группах больных с

наличием полиморфных аллелей (SNP) в генах TLR2-рецептора (rs 5743708, 2258G→A) и TLR4-рецептора (rs 4986790, 896A→G) по сравнению с группой контроля и группой больных АтД с отсутствием полиморфного аллеля и генотипами GG (TLR2, rs 5743708, 2258G→A) и AA (TLR4, rs 4986790, 896A→G), $p < 0,05$ (Рисунок 18).

Необходимо отметить, что снижение уровня сывороточного ИФН- γ у пациентов с АтД отражает значимые изменения в системе врожденного иммунитета, которые опосредуются взаимодействием PAMP структур микроорганизмов с Toll-подобными рецепторами ДК через ядерный фактор NF- κ B и другие пути передачи сигналов, такие как митоген-ассоциированные протеиновые MAP-киназы, активатор транскрипции STAT-1, адаптерный белок MyD88, TIR-содержащий адаптерный белок TIRAP.

У больных АтД только с отсутствием полиморфных аллелей и генотипами GG (TLR2, rs 5743708, 2258G→A) и AA (TLR4, rs 4986790, 896A→G) при анализе цитокинового профиля сыворотки крови нами было установлено, что концентрация ИЛ-1 β была выше, чем в группе контроля, $p < 0,05$ (Рисунок 18).

У больных АтД с отсутствием полиморфных аллелей и генотипами GG (TLR2, rs 5743708, 2258G→A) и AA (TLR4, rs 4986790, 896A→G) при анализе концентрации в сыворотке Th1/Th17 цитокина ИЛ-17 установлены разные его концентрации в зависимости от типа рецептора и генотипа (Рисунок 18). Так, у больных с отсутствием полиморфного аллеля и генотипом GG (TLR2, rs 5743708, 2258G→A) его концентрация в сыворотке крови была ниже, чем в группе контроля, $p < 0,05$. У больных АтД с отсутствием полиморфного аллеля и генотипом AA (TLR4, rs 4986790, 896A→G) концентрация в сыворотке крови была выше, чем в контроле, $p < 0,05$ (Рисунок 18).



Верхний ряд: концентрация цитокинов Me (Q1; Q3), пг/мл ИФН-γ, ИЛ-1β, ИЛ-17, ИЛ-4 в сыворотке крови больных АтД и в группе контроля (здоровых лиц) в зависимости от полиморфных генотипов TLR2, rs 5743708, 2258G→A. Нижний ряд: концентрация цитокинов (M±m, пг/мл) ИФН-γ, ИЛ-1β, ИЛ-17, ИЛ-4 в сыворотке крови больных АтД и в группе контроля (здоровых лиц) в зависимости от полиморфных генотипов TLR4, (rs 4986790, 896A→G). Кол-во больных АтД на ИФН-γ, N=70 человек, контроль, N=28 человек; кол-во больных АтД на ИЛ-1β, N=29 человек, контроль, N=28 человек; кол-во больных АтД на ИЛ-17, N=32 человека, контроль, N=18 человек; кол-во больных АтД на ИЛ-4, N=69 человек; контроль, N=18 человек. *Статистическая значимость оценивалась по U-критерию Манна-Уитни, p<0,05.

Рисунок 18 – Концентрация цитокинов в сыворотке крови больных АтД

Анализ цитокинового профиля и концентрации ИЛ-4 в группах больных АтД с полиморфными аллелями (мутация) гена SPINK5 (rs2303067, 1258G→A, Glu420→Lys) была выше по сравнению с группой больных без полиморфного аллеля и группой контроля, $p < 0,05$ (Рисунок 19).

В результате анализа данных нами установлено, что уровень ИФН- γ значительно снижен в группе лиц – носителей гетерозиготных полиморфных генотипов генов, кодирующих TLR2- и TLR4-рецепторы [357]. Анализ цитокинового профиля сыворотки крови у больных АтД выявил снижение концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-17 в группах больных с полиморфными аллелями (мутация) гена SPINK5 (rs2303067, 1258G→A, Glu420→Lys) по сравнению с группой контроля и группой больных АтД с отсутствием полиморфного аллеля и генотипом GG SPINK5 (rs2303067, 1258G→A, Glu420→Lys).

Таким образом, нами установлено, что выявленные SNP генов TLR2-, TLR4-рецепторов и гена SPINK5 у больных атопическим дерматитом ассоциируются с увеличением продукции цитокина ИЛ-4 как одного из цитокинов, T2-иммунного ответа и снижением концентрации Th1-цитокинов у больных носителей гетерозиготных и гомозиготных полиморфных генотипов, что может усугублять течение имеющегося аллергического заболевания и способствовать сенсibilизации к другим аллергенам. Повышенная колонизация локальных биотопов кожи и слизистых оболочек ВДП условно-патогенной микрофлорой (*S. aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*) у больных с атопическими заболеваниями ассоциируется с полиморфизмами (SNP) TLR2-, TLR4-рецепторов и гена SPINK5, участвующими в формировании кожно-эпителиальных защитных барьеров человека и характерным цитокиновым профилем.

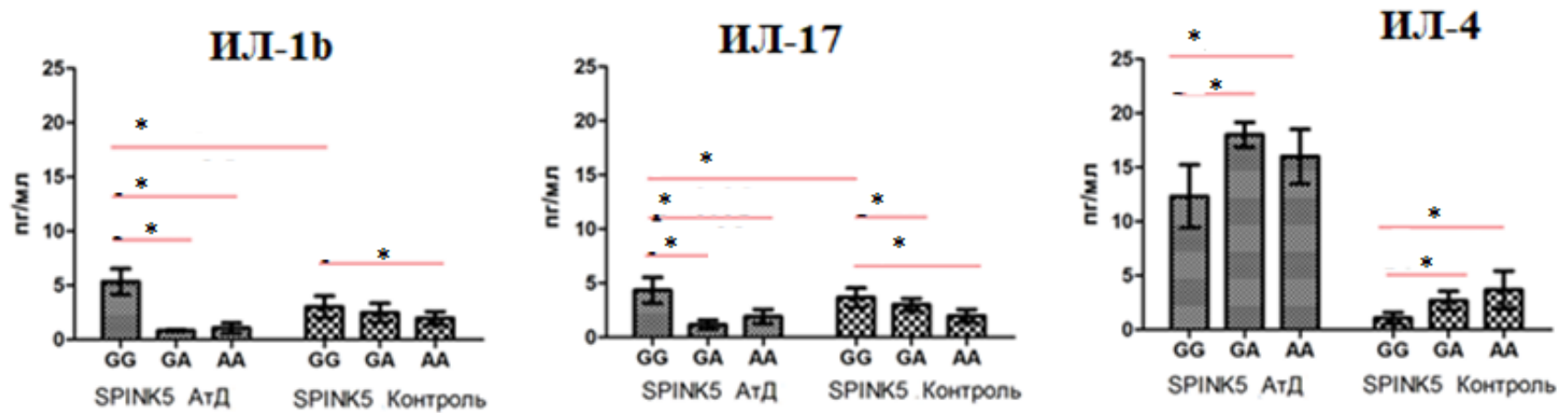


Рисунок 19 – Концентрации цитокинов Me (Q1;Q3), пг/мл, ИЛ-1 β , ИЛ-17, ИЛ-4 в сыворотке крови больных АтД и в группе контроля (здоровых лиц) в зависимости от полиморфных генотипов (rs2303067, 1258G→A, Glu420→Lys) гена SPINK5. Кол-во больных АтД на ИЛ-1 β , N=69 человек; контроль, N=58 человек; кол-во больных АтД на ИЛ-17, N=72 человек; контроль, N=38 человек; кол-во больных АтД на ИЛ-4, N=49 человек; контроль, N=38 человек.

*Статистическая значимость в группах оценивали по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$

6.3. Мукозальный профиль цитокинов и показатели микробной обсемененности слизистой оболочки верхних дыхательных путей у больных с круглогодичным и сезонным аллергическим ринитом

В данной части исследования проведен корреляционный анализ (Таблица 29) взаимосвязи между степенью бактериальной обсемененности ВДП в стадию обострения САР у детей в возрасте от 6 до 14 лет и мукозальным уровнем цитокинов ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-17. В стадию обострения заболевания со слизистых ВДП с большей частотой выделяются *S. aureus*, *Moraxella catarrhalis* и представители грамотрицательных бактерий, в частности *Enterobacter spp.* или *Klebsiella spp.*

Таблица 29 – Связь между мукозальным уровнем ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-17 (в пг/мл назального смыва) и показателем микробной обсеменённости (МО) бактериальной микрофлорой ВДП при САР у детей в возрасте 6 –14 лет

Цитокин (концентрация)	Коэффициент корреляции r Спирмена		
	Показатель МО		
	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>S. aureus</i>	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>Moraxella catarrhalis</i>	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>Klebsiella spp</i> <i>Enterobacter spp</i>
ИЛ-4	0,23 p<0,05 n=23	0,32 p<0,05, n=22	0,45 p<0,05 n=19
ИЛ-13	0,62 p<0,05 n=18	0,51 p<0,05 n=16	0,48 p<0,05 n=12
ИЛ-17	-0,59 p<0,05 n=24	-0,48 p>0,05 n=16	-0,47 p<0,05 n=15

Анализ полученных данных (Таблица 29) показал, что степень бактериальной обсемененности изолятами *S. aureus* ВДП у пациентов с САР в стадии обострения значимо коррелирует с мукозальным уровнем ИЛ-13: чем выше мукозальная

концентрация данного цитокина, тем выше степень бактериальной обсемененности. Выявленная закономерность позволяет предположить, что факторы, продуцируемые *S. aureus*, вступают в синергизм с респираторными (пыльцевыми) аллергенами и активируют продукцию Т-2 цитокинов, таких как ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, участвующих в патогенезе аллергического IgE-зависимого воспаления с вовлечением эозинофилов [319]. Необходимо отметить, что ИЛ-4 способствует поляризации Т-клеток по Th2-фенотипу [294].

Также установлена значимая обратная корреляция с мукозальным уровнем ИЛ-17 и степенью бактериальной обсемененности изолятами *S. aureus* ВДП в стадию обострения ринита. Можно констатировать, что чем выше мукозальный уровень ИЛ-17, тем менее выражена бактериальная обсемененность *S. aureus* ВДП в стадию обострения САР. Такая же закономерность отмечена для грамотрицательных бактерий *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, выделяемых у пациентов с САР. Выявление данной закономерности у пациентов с САР позволяет предположить, что достаточная продукция ИЛ-17 Th17-клетками позволяет эффективно сдерживать выраженную бактериальную колонизацию слизистой оболочки ВДП *S. aureus* через механизм опосредованной стимуляции ИЛ-17 локального тканевого воспаления, активации синтеза провоспалительных цитокинов и хемокинов, регуляции и координации функции макрофагов и гранулоцитов [133]. Можно констатировать, что при выраженной степени обсеменения слизистой оболочки носа *S. aureus* у пациентов с САР в стадии обострения ринита механизм активации фагоцитарной элиминации бактерий через механизм Th-17-ИЛ-17 может быть подавлен.

В данной части представлены данные, касающиеся изучения мукозального содержания цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-17 в стадию обострения и ремиссии САР в зависимости от бактериальной обсемененности бактериальной микрофлорой. В Таблице 30 представлена значимая обратная зависимость между уровнем ИЛ-17 и степенью бактериальной обсемененности *S. aureus* ВДП в стадии обострения САР у детей (6–14 лет) и взрослых (старше 18 лет).

Таблица 30 – Связь между мукозальным содержанием ИЛ-17 (в пг/мл назального смыва) и показателем МО бактериальной микрофлорой ВДП при КАР у детей и взрослых в стадии обострения ринита

Цитокин (концентрация)	Коэффициент корреляции r Спирмена		
	Показатель МО		
	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>S. aureus</i>	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>Moraxella catarrhalis</i>	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>Klebsiella spp</i>
ИЛ-17 (возраст 6–14 лет)	-0,6 p<0,05 n=21	-0,41 p>0,05 n=14	-0,38 p<0,05 n=15
ИЛ-17 (старше 18 лет)	-0,56 p<0,05 n=23	-0,48 p>0,05 n=13	-0,47 p<0,05 n=10

Отмечено, что степень обсемененности слизистой ВДП у детей и взрослых в стадию обострения КАР обратно коррелирует с мукозальным содержанием ИЛ-17, причем отмечено, что данный вид связи более выражен для изолятов *S. aureus*, чем для представителей *Moraxella catarrhalis* и *Klebsiella spp*. Можно констатировать, что при выраженной степени обсеменения слизистой оболочки носа *S. aureus* у пациентов с КАР в стадии обострения ринита механизм активации фагоцитарной элиминации бактерий, опосредованный ИЛ-17, недостаточен (Таблица 30).

В Таблице 31 представлены результаты анализа зависимости между мукозальным содержанием ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-10 и степенью бактериальной обсемененности слизистой ВДП в стадии обострения КАР у детей и взрослых [94]. В данной стадии КАР в этой возрастной группе с большей частотой выделялись *S. aureus*, *Moraxella catarrhalis*, а также *Haemophilus influenzae*.

Таблица 31 – Связь между мукозальным уровнем ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-10 (в пг/мл назального смыва) и показателем МО бактериальной микрофлорой ВДП при КАР у детей и взрослых в стадии обострения

Цитокин (концентрация)	Коэффициент корреляции r Спирмена		
	Показатель МО		
	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>S. aureus</i>	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>Moraxella catarrhalis</i>	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>Haemophilus influenzae</i>
ИЛ-4 (6–14 лет)	0,53 p<0,05 n=23	0,38 p<0,05 n=12	0,4 p<0,05 n=9
ИЛ-4 (старше 18 лет)	0,56 p<0,05 n=23	0,32 p>0,05 n=10	0,47 p<0,05 n=15
ИЛ-13 (6–14 лет)	0,62 p<0,05 n=24	0,51 p<0,05 n=13	0,38 p>0,05 n=12
ИЛ-13 (старше 18 лет)	0,56 p<0,05 n=23	0,48 p<0,05 n=12	0,47 p=0,003 n=16
ИЛ-10 (6–14 лет)	0,3 p>0,05 n=23	-0,45 p>0,05 n=8	-0,38 p>0,05 n=14
ИЛ-10 (старше 18 лет)	-0,23 p>0,05 n=23	-0,49 p<0,05 n=12	-0,47 p>0,05 n=11

В результате анализа полученных данных установлено, что степень бактериальной обсемененности ВДП *S. aureus* у пациентов с КАР в стадии обострения значимо коррелирует с мукозальным уровнем ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-10: чем выше концентрация данных цитокинов, тем выше степень бактериальной обсемененности. Таким образом, учитывая тот факт, что выживаемость, рост и дифференцировка эозинофилов опосредуется такими цитокинами, как ИЛ-5, а пролиферация тучных клеток в локальном биотопе зависит от ИЛ-4, ИЛ-13 [61, 64],

увеличение бактериальной обсемененности слизистой носа при этой форме ринита *S. aureus* дополнительно стимулирует гуморальный иммунный ответ при данной форме атопии, что может способствовать локальному тканевому накоплению базофилов и эозинофилов в слизистой оболочке носа и активации гуморального иммунного ответа при стафилококковом бактерионосительстве. Компоненты изученной микробиоты способны активировать рецепторы врожденного иммунитета, в частности группу Толл-подобных рецепторов (TLR2), экспрессируемых на эпителии слизистых оболочек верхних дыхательных путей [94]. Следствием этого может быть активация синтеза провоспалительных цитокинов, в том числе и ИЛ-10, что нами показано по корреляционной зависимости. Данный цитокин может выступать как значимый иммунорегуляторный фактор, супрессирующий локальное аллергическое воспаление [94].

6.4. Изучение мукозального уровня маркеров цитокина TLSP и белка YKL-40 в составе назальных секретов верхних дыхательных путей у больных аллергическим ринитом на фоне колонизации локальных биотопов слизистой носа *S. aureus*

TLSP – ИЛ-7-подобный цитокин с иммуномодулирующим действием, экспрессируется эпителиальными клетками в ответ на бактериальные антигены локальной микробиоты [259]. TLSP способен стимулировать Th2- и T_{reg}-клетки и может участвовать в подавлении Th1- и Th17-иммунного ответа, ограничивая экспрессию провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-17 и ИФН- γ [259]. В данной части работы проведено исследование взаимосвязи между мукозальным уровнем данного цитокина в назальных смывах и степенью бактериальной обсемененности слизистой ВДП, часто выделяемыми бактериальными видами у больных с длительно текущим КАР с сопутствующей АБА (Таблица 32).

Таблица 32 – Корреляция между мукозальным уровнем TLSP (в пг/мл назального смыва) и показатель МО бактериальной микрофлорой ВДП при КАР+АБА у детей и взрослых в стадию обострения ринита

Цитокин (концентрация)	Коэффициент корреляции r Спирмена		
	Показатель МО		
	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>S. aureus</i>	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>Moraxella catarrhalis</i>	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>Klebsiella spp</i>
TLSP (6–14 лет)	0,71 p<0,05 n=23	0,49 p>0,05 n=8	0,34 p<0,05 n=9
TLSP (старше 18 лет)	0,67 p<0,05 n=24	0,43 p>0,05 n=11	0,47 p<0,05 n=13

Полученные данные подтверждают зависимость между мукозальным уровнем TLSP и степенью бактериальной обсемененности слизистой ВДП *S. aureus* у пациентов с КАР и АБА. Таким образом, метаболиты и антигены *S. aureus* могут стимулировать продукцию эпителием слизистой оболочки ВДП у пациентов с КАР цитокина TLSP более активно, чем грамотрицательные представители микробиоты слизистой носа. TSLP, синтезируемый эпителиальными клетками, может выполнять ключевую роль в поддержании локального аллергического воспаления, активируя ДК слизистой оболочки, которые мигрируют в дренирующие лимфатические узлы и в дальнейшем инициируют адаптивную фазу аллергического иммунного ответа у этих пациентов [229].

Менее выраженная корреляционная связь показана между уровнем TLSP и степенью бактериальной обсемененности слизистой ВДП *Moraxella catarrhalis* и *Klebsiella spp*.

Необходимо также отметить, что ИЛ-4 способствует усилению выработки TSLP эпителиальными клетками [170, 229], а уровень данного цитокина выше у пациентов с КАР при колонизации слизистой *S. aureus*, причем, как нами было

установлено, чем выше степень бактериального обсеменения слизистой *S. aureus*, тем выше уровень ИЛ-4.

Для подтверждения этого факта нами проанализирована связь между мукозальным уровнем TLSP и уровнем специфических IgE к бактериальному аллергокомпоненту *S. aureus* (m 80, энтеротоксин) у пациентов с КАР (дети, подростки и взрослые). Показано, что у этих пациентов выявляется статистически значимая корреляционная связь (r Спирмена = 0,49, $p < 0,05$) между уровнем TLSP в назальном смыве и уровнем специфичных IgE к энтеротоксину *S. aureus* (аллергенному компоненту m 80) [77].

Определен в назальных смывах ВДП у больных АР мукозальный уровень хитиназо-подобного белка YKL-40 как одного из маркеров воспалительной реакции. «Уровень YKL-40 у пациентов с КАР, как нами ранее было установлено, в назальных смывах в 43,0 раза выше, чем у здоровых лиц контрольной группы, а при САР содержание его в смывах в 3,0 раза выше, чем в контрольной группе» [88]. «Содержание этого белка в назальном смыве здоровых лиц незначительно мало, и составило, по нашим данным $0,006 \pm 0,001$ нг/мкг белка назального смыва, при этом в ряде проб этот гликопротеин методом ИФА не определялся, а при сравнительном исследовании содержание YKL-40 в назальном смыве при САР было в 12,0 раз ниже, чем при КАР» [88, 354]. В Таблице 33 представлена зависимость между мукозальным уровнем YKL-40 и показателями обсемененности бактериальной микрофлорой ВДП при КАР в группе детей и взрослых в стадию обострения заболевания.

Таблица 33 – Связь между мукозальным уровнем YKL-40 (в пг/мл назального смыва) и степенью обсемененности бактериальной микрофлорой ВДП при КАР у детей и взрослых в стадию обострения ринита

Цитокин (концентрация)	Коэффициент корреляции r Спирмена		
	Показатель МО		
	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>S. aureus</i>	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>Moraxella catarrhalis</i>	Log ₁₀ КОЕ/тампон <i>Klebsiella spp</i>

Продолжение Таблицы 33

YKL-40 (6-14 лет)	0,73 p<0,05 n=28	0,8 p>0,05 n=28	0,74 p<0,05 n=19
YKL-40 (>18 лет)	0,6 p<0,05 n=16	0,58 p<0,05 n=17	0,54 p>0,05 n=13

Полученные данные также подтверждают статистически значимую сильную корреляционную связь между мукозальным уровнем YKL-40 и степенью бактериальной обсемененности слизистой ВДП *S. aureus* и *Klebsiella spp.* как у детей, так и у взрослых пациентов с КАР. Выявлена зависимость локального уровня этого гликопротеина как одного из маркеров воспаления у пациентов на фоне КАР, от микробного фактора, в частности от колонизации слизистой ВДП *S. aureus*, который, возможно, стимулирует синтез этого гликопротеина макрофагами и гранулоцитами, в частности эозинофилами, так как нами получены прямые корреляционные связи между уровнем этого биомаркера и содержанием эозинофилов и нейтрофилов в назальных смывах у больных с АР [354]. Белок YKL-40 из-за его корреляции с клиническими проявлениями АР и уровнем бактериальной обсемененности ВДП *S. aureus*, *Klebsiella spp.* можно также рассматривать как «биомаркер» локального дисмикробиоценоза слизистой ВДП при аллергическом рините.

ГЛАВА 7. АЛЛЕРГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, КОЛОНИЗИРУЮЩИХ ВЕРХНИЕ ДЫХАТЕЛЬНЫЕ ПУТИ И КОЖУ БОЛЬНЫХ АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Представлены результаты, отражающие исследования аллергенных свойств продуктов жизнедеятельности штаммов *S. aureus*, колонизирующих ВДП и кожу, которые вызывают IgE-опосредованную сенсибилизацию у больных с респираторными атопическими заболеваниями.

В качестве таких продуктов нами исследован один из стафилококковых белков *S. aureus*, обладающий функцией сериновых протеиназ и относящийся к т.н. группе Spl-протеиназ, для которых показаны потенциальные аллергенные свойства, т.е. способность индуцировать синтез IgE и продукцию Th2-цитокинов на животной модели [341, 343]. Данные белки образуются штаммами *S. aureus* в процессе своей жизнедеятельности. «В ряде экспериментальных исследований было установлено, что сериновые протеиназы Spl-типа *S. aureus* могут индуцировать Th2-иммунный ответ (на мышинной модели) при внутри трахеальном введении, при этом происходило развитие аллергического воспаления в легочной ткани и продукция в дренирующих лимфатических узлах специфических IgE и цитокинов Th2-профиля» [87, 344].

В качестве аллергена нами была получена рекомбинантная стафилококковая сериновая протеиназа – rSplA-Strep (tag) с применением экспрессионной конструкции на основе плазмидного вектора «pASG-IBA2» (IBA GmbH, Германия), как описано в работе [87]. Для создания рекомбинантной протеиназы была проведена амплификация методом ПЦР фрагмента гена *splA*, кодирующего сериновую SplA протеиназу без сигнального пептида (SP) по матрице геномной ДНК референс штамма *S. aureus* 8325-4, а экспрессия, клонирование и очистка

рекомбинантного белка осуществлена согласно протоколам, представленным в руководстве [177]. Очистку продуцируемого рекомбинантного белка осуществляли коммерческой системой Strep-tag по рекомендациям, представленным в руководстве [177].

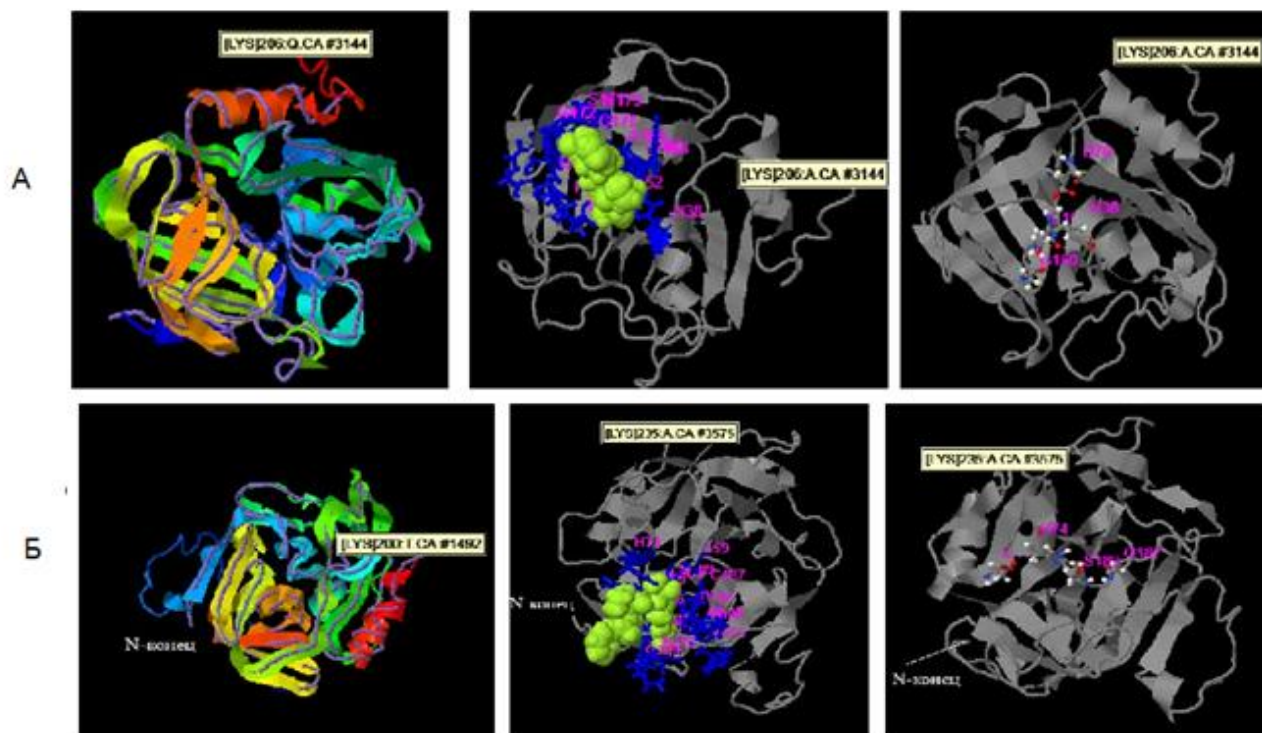
Проверка идентичности полученного аллергена осуществлена методами масс-спектрометрического анализа (метод Peptide Mass Fingerprinting), результаты были обработаны с помощью программ Mascot 2.4.0 (www.matrixscience.com). По данным отчета Mascot по базе SwissProt полученные образцы рекомбинантной протеиназы характеризовались значительной долей перекрытия (22–25%) с целевыми сериновыми SplA протеиназами штаммов *S. aureus* Mu3 /ATCC 700698, *S aureus* strain JH9, JH1 (Таблица 34).

Таблица 34 – Физико-химические параметры рекомбинантной SplA протеиназы по результатам отчета программы Mascot при их масс-спектрометрической идентификации

№ пробы образца	Молекулярная масса Mw (расчит.)/Mw эксперим.	Изоэлектрическая точка pI расчит./pI эксп.	Молярный коэффициент экстинкции* $\epsilon_{280 \text{ нм}}^{0,1\%}$ (расчит/эксперим)	Отчет Mascot доля перекрытия в % с аннотированными белками базы SwissProt	Индекс score/exp:	Точность измерения масс, ppm
5	23,0/24,2	8,0/8,1	0,83/0,81	22,0% Serine protease SplA OS=Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698) Serine protease SplA OS=Staphylococcus aureus (strain JH1) Serine protease SplA OS=Staphylococcus aureus (strain JH9) OX=359786 GN=splA PE=3 SV=1	57/0,15	1,8
3	23,0/24,8	8,0/8,4	0,83/0,79	25,0% Serine protease SplA OS=Staphylococcus aureus (strain JH9) OX=359786 GN=splA PE=3 SV=1 Serine protease SplA OS=Staphylococcus aureus (strain Mu3 / ATCC 700698)	56/0,14	1,63

Примечание: * значением поглощения при 280 нм при длине оптического пути 1 см для 0,1 % раствора белка, то есть 1 мг/мл.

С использованием программного ресурса I-TASSER нами были созданы 3D-модели мономеров аутентичной SplA-протеиназы и полученной рекомбинантной SplA-протеиназы с С-концевой Strep-тэг меткой (Рисунок 20).



А) рекомбинантная SplA протеиназа (сбалансированная модель, модель с сайтами, связывающими лиганды, и модель с каталитической триадой); Б) аутентичная SplA-протеиназа *Staphylococcus aureus* (сбалансированная модель, модель с сайтами, связывающими лиганды, и модель с каталитической триадой). Модели выполнены с помощью программного ресурса I-TASSER.

Рисунок 20 – 3D-модели SplA-протеиназы *S. aureus*

7.1. Профиль сенсibilизации к бактериальной rSplA-протеиназе *S. aureus* и другим аллергенам у пациентов с респираторной аллергией (аллергический ринит + атопическая бронхиальная астма)

Изучена сенсibilизация к SplA-протеиназе *S. aureus* у пациентов с аллергическими ринитами на фоне бактерионосительства *S. aureus*. Уровень сывороточных специфических IgE к полученной рекомбинантной

термоинактивированной (при 50°C в течение 1 часа) splA-протеиназе *S. aureus* определяли в двух группах больных, состоящих из 104 обследованных с САР (65 человек) и КАР (39 человек) в период обострения и ремиссии заболевания.

В первой группе у 55 (85,0%) больных с САР в периоде обострения заболевания была определена высокая степень бактериальной обсемененности ВДП *S. aureus* 10^4 – 10^5 КОЕ/мл (2,0–5,0 Log₁₀ КОЕ/мл). В период ремиссии у 29 (45,0%) из этих больных степень бактериальной обсемененности ВДП *S. aureus* снижалась до 10^2 – 10^3 КОЕ/мл. (2,0–3,0 Log₁₀ КОЕ/мл).

Во второй группе больных с КАР у 29 (74,4%) из них в период обострения заболевания при бактериологическом исследовании ВДП степень бактериальной обсемененности *S. aureus* была высокой и составила 10^4 – 10^5 КОЕ/мл, и только у 10 (25,6%) чел. она не превышала 10^3 КОЕ/мл. В ремиссию заболевания у 25 (64,0%) больных из этой выборки сохранялось бактерионосительство *S. aureus* на уровне 10^3 КОЕ/мл, а у 14 (36,0%) больных происходило снижение обсемененности до 10^2 КОЕ/мл. На Рисунке 21 показан уровень IgE антител к различным аллергокомпонентам у этих больных с САР и КАР.

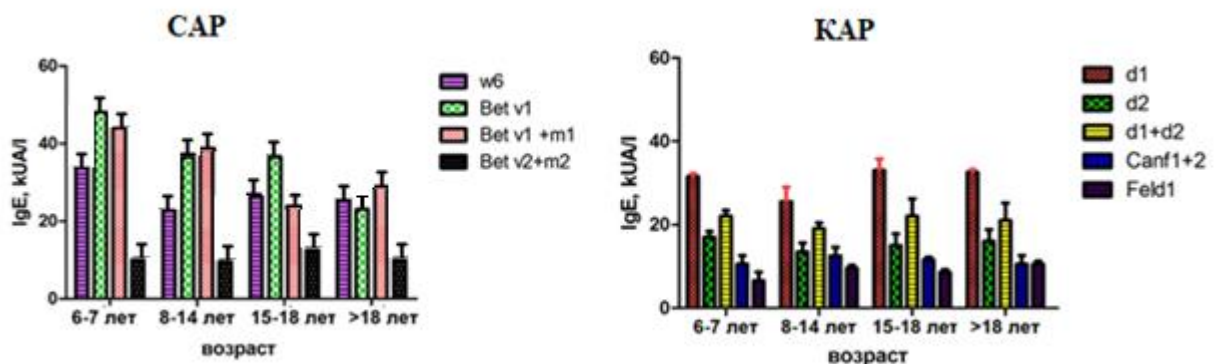


Рисунок 21 – Значение сывороточных антител IgE (M±SD) к значимым аллергокомпонентам у больных с АР (САР и КАР)

Выборка больных САР составила N=65 человек, КАР – N=39 человек

При САР у больных в возрасте от 6 до 18 лет и старше были выявлены высокие значения сенсibilизации к главному алергокомпоненту березы (Bet v1), полыни обыкновенной (w6) и сочетанная сенсibilизация к двум алергокомпонентам березы (Bet v1, Bet v2). Установлена также в этой группе клинически значимая сенсibilизация к плесневым грибам *Penicillium notatum* (m1) [1].

У больных КАР высокие значения сенсibilизации были установлены нами во всех возрастных группах к клещам ДП (d1, d2), а также выявлена значимая сенсibilизация к эпидермальным алергенам (Can f 1, Can f 2, Fel d1) домашних животных – кошек и собак (Рисунок 21).

На Рисунке 22 показан установленный титр сывороточных специфических IgE к рекомбинантной термоинактивированной SplA-протеиназе *S. aureus* в тех же возрастных группах пациентов с алергическим ринитом.

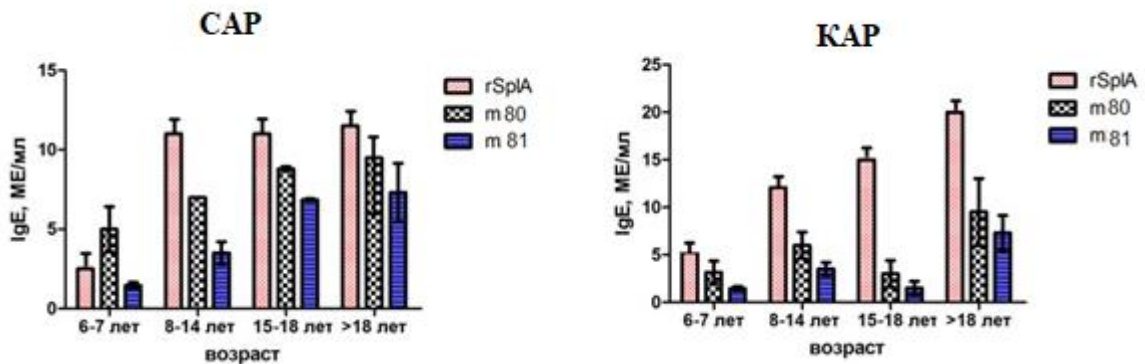


Рисунок 22 – Значение показателей сывороточных IgE ($M \pm SD$) к рекомбинантной термоинактивированной SplA-протеиназе *S. aureus* и известным алергенам *S. aureus* – m 80, m 81 (энтеротоксины SEA и SEB)
Выборка больных САР составила 65 человек, КАР – 39 человек

При САР нами было установлено, что титр специфических IgE к rSplA-протеиназе *S. aureus* возрастает в 4,3 раза у детей старше 7 лет и взрослых, по сравнению с детьми в возрастной группе до 7 лет (Рисунок 22). У детей с АР в возрасте от 6 до 7 лет титр IgE к этому белку составил $2,9 \pm 0,32$ ME/мл, а у детей и

подростков в возрасте от 8 до 18 лет, а также у взрослых титр АТ возрастал до $12,4 \pm 0,4$ МЕ/мл, что свидетельствует о значимости этого бактериального белка в сенсibilизации при респираторной аллергии.

У больных с КАР выявлено постепенное нарастание титров специфических IgE к рекомбинантной форме SplA-протеиназе *S. aureus* с возрастом (Рисунок 22). У детей в возрасте от 6 до 7 лет титр был ниже, чем у детей старше 7 лет и взрослых, и составил в среднем $5,2 \pm 0,32$ МЕ/мл. У взрослых лиц с этой формой ринита титр специфических IgE в сыворотке к данному ферменту составлял $18,7 \pm 0,42$ МЕ/мл, что свидетельствует о выраженной сенсibilизации к этому бактериальному белку. Нами также установлено при САР и КАР нарастание титра специфических IgE к аллергокомпонентам m 80 и m 81 *S. aureus* (сенсibilизация к продуктам жизнедеятельности штаммов *S. aureus*, к его энтеротоксинам SEA и SEB) (Рисунок 22).

Обструктивные нарушения функции легких у больных с АР и выраженность сенсibilизации к бактериальной термоинактивированной SplA-протеиназе S. aureus

Проведена сравнительная оценка выраженности обструктивных нарушений функции легких по данным основных показателей спирометрии у больных с сочетанной формой респираторной аллергии в группе больных с КАР и у больных с САР.

Во всех группах оценивали уровень сывороточных специфических IgE к термоинактивированной SplA-протеиназе и показатели спирометрических исследований, отражающих выраженность обструктивных изменений функции легких, прежде всего это отношение ОФВ1/ФЖЕЛ (FEV1/FVC) и значение средней объемной скорости максимального полувыдыхаемого потока в интервале между 25% и 75% ФЖЕЛ (MEF 25–75) (Рисунок 23).

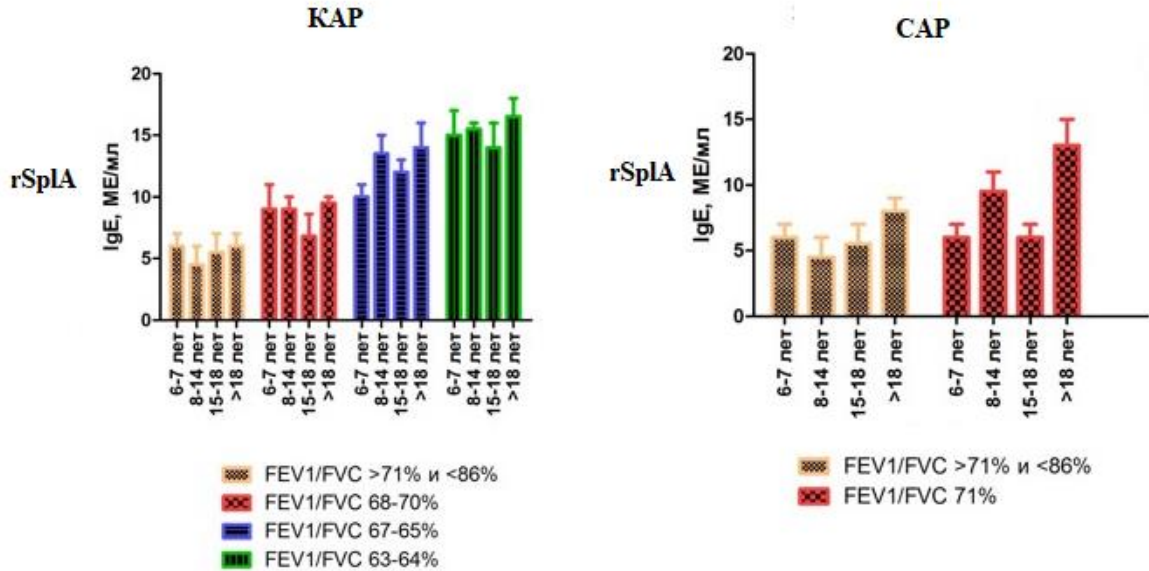


Рисунок 23 – Уровень IgE ($M \pm SD$) к термоинактивированной rSplA-протеиназе *S. aureus* и спирометрические показатели функции легких у пациентов с аллергическим ринитом и сочетанной аллергической респираторной патологией (АБА)

Установлено, что у больных с КАР во всех возрастных группах при титре специфических IgE к бактериальной термоинактивированной rSplA-протеиназе ниже $6,8 \pm 1,2$ МЕ/мл обструктивные изменения были не выражены, по данным спирометрического исследования, и отношение FEV1/FVC составляло более 71%, но не выше 86% от должного значения (Рисунок 23). У больных с КАР при титре сывороточных специфических IgE к rSplA-протеиназе от $7,8 \pm 1,8$ до $17,0 \pm 2,9$ МЕ/мл, по данным спирометрических показателей, были выявлены обструктивные изменения функции легких: выраженное снижение показателя FEV1/FVC (Рисунок 23).

При этом установлено, что у больных с КАР отмечено ухудшение спирометрических показателей и возрастание обструктивных изменений функции легких, по данным спирометрии, во всех возрастных группах при титре

сывороточных специфических IgE к rSp1A-протеиназе более $8,6 \pm 0,42$ МЕ/мл. При титре сывороточных специфических IgE к rSp1A-протеиназе более $10,6 \pm 0,4$ МЕ/мл во всех возрастных группах больных с КАР (КАР+АБА, КАР+АтД) нами установлено снижение спирометрического показателя FEV1/FVC ниже 68,0% от должного значения (Рисунок 23).

У больных с САР спирометрический показатель FEV1/FVC составил от 71% до 86% от должного, обструктивных изменений функции легких по данным спирометрического исследования у них не выявлено. Однако нами отмечено, что при титре сывороточных специфических IgE к термоинактивированной rSp1A-протеиназе от $5,4 \pm 0,5$ до $7,9 \pm 0,9$ МЕ/мл спирометрические показатели FEV1/FVC были в интервале 72–86%, а при титре от $8,0 \pm 0,5$ до $13,0 \pm 0,6$ МЕ/мл спирометрический показатель FEV1/FVC составил 71% (Рисунок 22).

7.2. Профиль сенсibilизации у больных с круглогодичным и сезонным аллергическим ринитом к другим аллергенам и особенности их системного и локального (мукозального) цитокинового профиля

Для определения локального и системного цитокинового профиля была исследована группа больных с АР (КАР, n=20 и САР, n=24), состоящая из 44 человек разного возраста с уровнем IgE в сыворотке крови от 14 до 212 МЕ/мл. У всех больных в показателях риноцитогаммы выявлялись эозинофилы (разброс показателя от Q_1 - 2% до Q_3 12%) [92, 314]

Локальный статус у этих больных был типичен для аллергического ринита. Так, основные симптомы заболевания у больных с КАР включали чиханье, заложенность носа и нарушение носового дыхания, выраженный зуд в носу и ринорею, которые беспокоили пациентов вне зависимости от сезона, периодически обостряясь в зависимости от смены места жительства, действия провоцирующих факторов (сигаретный дым, холодный воздух, профессиональные факторы). У больных КАР сочетался с другой аллергической патологией (АБА, АтД). У

больных САР локальный статус и симптомы заболевания характеризовались также чиханием, заложенностью носа и нарушение носового дыхания, зудом в носу и ринореей, которые дебютировали в начале лета и сохранялись на протяжении всего лета до начала осени. По продолжительности симптомов у 11 больных САР отмечено интермиттирующее легкое течение, у 13 больных – персистирующее среднетяжелое течение.

Профиль сенсibilизации у больных с САР в основном характеризовался сенсibilизацией к алергокомпонентам березы обыкновенной (rBet v 1, rBet v 2): у 95,8% (23 человека) установлена сенсibilизация к rBet v 1. Титр специфических IgE к rBet v 1 более 50 kUA/л выявлен только у 1 больного САР с АБА, персистирующего, среднетяжелого течения. Очень высокий уровень (15,8–40,8 kUA/л) к rBet v 1 выявлен у 45,8% (11 больных), высокий уровень (3,5–15,8 kUA/л) – у 37,5% (9 больных), средний уровень (1,7–2,0 kUA/л) у 8,3% (2 больных). Сенсibilизация к другим алергокомпонентам выявлена у 20,8% (5 больных) к полыни обыкновенной (w6) и сочетанная сенсibilизация – к алергокомпоненту полыни обыкновенной (w6) и минорному компоненту березы rBet v 2 (профилин) [355].

Профиль сенсibilизации у больных с КАР в основном был обусловлен развитием реакции на d1 алергокомпонент клеща ДП *Dermatophagoides pteronyssinus* (70%) и на d2 *Dermatophagoides farina* (75%), при этом у 55% больных выявлена сочетанная сенсibilизация к двум (d1 и d2) алергокомпонентам клещей ДП. При этом у 20,0% (4 человека) больных с АР выявлен очень высокий уровень сенсibilизации к d2 алергокомпоненту (титр IgE более 89,0 kUA/л), у 2-х больных из них КАР сочетался с АтД и рецидивирующим бронхитом, что, возможно, показывает дополнительный путь поступления алергена через поврежденный кожный барьер. У 20,0% (4 человека) также выявлена очень высокая сенсibilизация к d1 алергокомпоненту (титр более 70,0 kUA/л), при этом у 2-х больных из них АР сочетался с тяжелой атопической персистирующей бронхиальной астмой и алергическим конъюнктивитом. У 25% больных КАР

также нами установлена сенсibilизация к минорному аллергокомпоненту d202 или Der p 1, представляющему собой цистеиновую протеазу (титр IgE не более 16,9 kUA/л).

Нами выявлено расширение спектра сенсibilизации у больных с САР к аллергенам грибов и *Staphylococcus aureus*. При САР в исследуемой выборке больных нами установлена сенсibilизация к аллергокомпонентам плесневых грибов, таких как *Penicillium notatum* (m1), *Cladosporium herbarum* (m2), *Aspergillus fumigatus* (m3). Сенсibilизация у пациентов с САР к аллергокомпоненту (m81) *Staphylococcus aureus* установлена у 60,0% (12 человек), уровень аллергенспецифичных IgE составил от 1,0 до 17,0 kUA/л, т.е. был средним и высоким. Сенсibilизация у пациентов с САР к аллергокомпоненту (m80) *Staphylococcus aureus* установлена у 35,0% (7 человек), а уровень аллергенспецифичных IgE составил от 2,1 до 10,2 kUA/л, т.е. был средним и высоким [1, 92, 314, 354].

Локальный уровень TSLP в назальных секретах пациентов с АР

С учетом значимости данного цитокина в системе локального иммунитета слизистых оболочек его титр может расцениваться как «биомаркер», свидетельствующий о нарушении функции эпителиального барьера слизистой оболочки под действием внешних триггеров (компоненты микробиоты и аллергены), что усиливает сенсibilизацию больных АР. Нами показано, что у больных с САР определяется значимая корреляционная связь (r Спирмена 0,46, $p < 0,05$) между мукозальным уровнем TSLP в назальном секрете и титром специфичных IgE к энтеротоксину *Staphylococcus aureus* (аллергенному компоненту m 80). А также нами установлена значимая корреляционная связь (r Спирмена 0,56, $p < 0,05$) между уровнями цитокинов TSLP и ГМ-КСФ в назальных секретах у этих пациентов. У больных с САР уровень TSLP в назальных секретах достоверно коррелировал и с выраженностью сенсibilизации к аллергокомпоненту m3 плесневого гриба *Aspergillus fumigatus* [354].

Локальный уровень цитокинов ТНФ- α , и ГМ-КСФ у больных АР

В данной части исследования нами изучена связь между выраженностью сенсibilизации к аллергенам клещей ДП, грибов и бактерий, микробиоты слизистой ВДП у больных АР, и уровнем цитокинов. ГМ-КСФ стимулирует образование и функцию эозинофилов, моноцитов и нейтрофилов. Цитокин ГМ-КСФ синтезируется при аллергическом воспалении эпителиальными клетками дыхательных путей [314, 354]. Нами выявлено, что у больных КАР отмечается статистически значимая корреляционная связь (r Спирмена 0,58, $p < 0,05$) между концентрацией ГМ-КСФ в назальном секрете и уровнем IgE к алергокомпоненту d1 *Dermatophagoides pteronyssinus* клещей ДП. При этом у этих больных также была выявлена значимая корреляционная связь между уровнем ГМ-КСФ в назальном секрете и титром IgE к минорному алергену d202 клещей ДП. Алергокомпонент d202 представляет собой фермент цистеиновую протеиназу клещей ДП. Такая же статистически значимая корреляционная связь (r Спирмена 0,53, $p < 0,05$) установлена у этих больных между ГМ-КСФ в назальном секрете и титром IgE к энтеротоксину (m 81) *Staphylococcus aureus*. Установлена также прямая статистически значимая зависимость между локальным уровнем ТНФ- α и сенсibilизацией к энтеротоксину (m 81) *Staphylococcus aureus* (r Спирмена 0,43, $p < 0,05$).

У больных с САР выявлена статистически значимая связь между локальным уровнем в назальных секретах TSLP и ГМ-КСФ (r Спирмена 0,54, $p < 0,05$). Статистически значимая связь у больных с САР установлена между локальным уровнем ГМ-КСФ и титром IgE к алергокомпонентам плесневых грибов m3 и m2 (r Спирмена 0,66, $p < 0,05$ и $r = 0,58$, $p < 0,05$ соответственно) [92, 355].

Сывороточный профиль цитокинов TGF- β , ИЛ-4, ИЛ-10 у больных алергическим ринитом

Сывороточный уровень цитокинов у пациентов с АР, характерный для периода обострения симптомов заболевания, представлен в Таблице 35.

Установлено, что при САР у пациентов почти в 2 раза выше уровень концентрации TGF- β – цитокина, регулирующего T_{reg} клетки и функции Th2/Th9 лимфоцитов, и ИЛ-4, чем при КАР. У пациентов с АР (КАР и САР) сывороточный уровень ИЛ-4 почти в 2,0 раза выше, чем у здоровых лиц контрольной группы. У больных с КАР установлена обратная статистически значимая связь между концентрацией ИЛ-4 и TGF- β в сыворотке крови (r Спирмена - 0,49, $p < 0,05$) [92]. Также показано, что уровень общего IgE в сыворотке крови обратно коррелирует с уровнем ИЛ-10 у этих пациентов (r Спирмена -0,63, $p = 0,002$) и уровнем TGF- β (r Спирмена -0,49, $p < 0,05$). При САР установлена обратная корреляционная связь между уровнем общего IgE и возрастом пациента (r Спирмена -0,51, $p < 0,05$). Такая же связь показана в этой группе пациентов между уровнем цитокина TGF- β и возрастом (r Спирмена - 0,45, $p < 0,05$) [92].

Таблица 35 – Сывороточный профиль цитокинов у больных с КАР и САР

Форма АР	Концентрация цитокинов, пг/мл (Me; Q1-Q3)		
	ИЛ-4	ИЛ-10	TGF- β
САР (n=24)	0,54 0,17-0,76*	0,36 0,22-0,61	35900,0 13090,0-53000,0
КАР (n=20)	0,4 0,24-0,75*	0,42 0,17-0,75	17 000,0 5700,0-19500,0*
Контрольная группа (n=15)	0,19 0,07-0,32	0,41 0,17-0,75	40300,0 7700,0-65000,0

Примечание:* – статистическая значимость между больными и группой контроля оценивали по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$.

7.3. Изучение активации базофилов крови термоинактивированной rSplA-протеиназой *S. aureus* по интенсивности экспрессии CD203c

Антиген CD203c представляет собой клеточный фермент эктонуклеотид-пирофосфатазу (фосфодиэстеразу 3 или E-NPP3), который рассматривается как антиген активации базофилов крови и экспрессируется на клетках предшественниках базофилов и самих базофилах как эффекторах IgE-зависимых реакций гиперчувствительности немедленного типа [144]. Экспрессия этого фермента увеличивается на базофилах в ответ на перекрестное связывание аллергенов с рецептором IgE.

В тесте с клетками ПК нами был выявлен дозозависимый эффект рекомбинантной термоинактивированной SplA-протеиназы *S. aureus* на экспрессию CD203c на активированных базофилах крови пациентов с аллергическим ринитом и сочетанной формой респираторной аллергии (Рисунок 24).

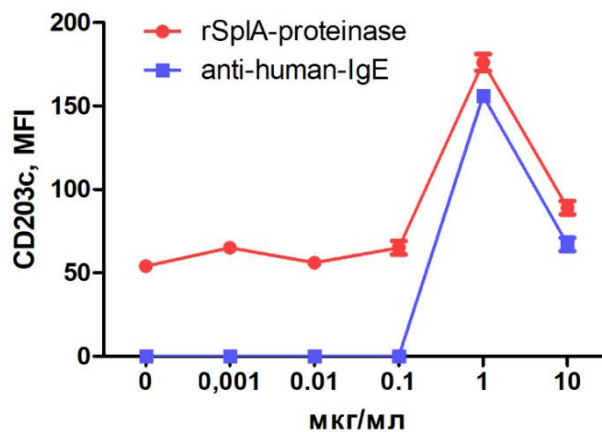


Рисунок 24 – Дозозависимый эффект рекомбинантной термоинактивированной SplA-протеиназы *S. aureus* (rSplA-протеиназа) на экспрессию CD203c на базофилах периферической крови у пациентов с респираторной аллергией. Клетки периферической крови инкубировали в серии разведений rSplA-протеиназы *S. aureus* (с концентрацией от 0,001 до 10 мкг/мл) при 37⁰С в течение 15 минут

В настоящей части исследования изучили индукцию активации рекомбинантной термоинактивированной SplA-протеиназой *S. aureus* экспрессии

CD203c на базофилах периферической крови (метод проточной цитофлуориметрии) сенсibilизированных к этому ферменту больных с аллергическим ринитом и с сочетанной формой респираторной аллергии (АР+АБА). По данным других исследований, CD203c является специфическим маркером активации базофилов человека и экспрессируется в ответ на перекрестное связывание аллергенов с FcεRI клеточным рецептором.

У больных с АР и сочетанной респираторной аллергией (АР+АБА) воздействие на базофилы ПК рекомбинантной rSplA-протеиназой *S. aureus* приводило к значимой активации экспрессии CD203c по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (Таблица 36).

Таблица 36 – Значение индекса активации CD203c базофилов крови при действии термоинактивированной rSplA-протеиназы *S. aureus* у пациентов с респираторной аллергией (АР+АБА)

Группы	Индекс активации базофилов (ИА), M±SD		Уровень IgE к rSplA-proteinase ME/мл (ELISA)
	rSplA-proteinase	anti-human-IgE	
Аллергический ринит:			
1) САР (n=15)	2,3±0,3*	3,3±0,3	<5,6
2) САР (n=17)	2,4±0,4*	3,1±0,3	5,7 до 7,0
3) САР (n=18)	3,4±0,3* ^a	3,2±0,3	>7,1
4) КАР (n=18)	2,1±0,4* ^a	3,2±0,3	<5,6
5) КАР (n=19)	2,4±0,3* ^a	3,4±0,3	5,7-6,9
6) КАР (n=15)	3,1±0,3* ^a	3,5±0,3	>7,0
Сочетанная респираторная аллергическая патология			
7) КАР+АБА (n=15)	2,3±0,4*	3,1±0,2	<5,6
8) КАР+АБА (n=14)	2,8±0,2* ^a	3,1±0,3	>7,0
9) САР+АБА (n=18)	2,6±0,2*	3,3±0,2	<5,6
10) САР+АБА (n=15)	2,6±0,3*	3,1±0,3	5,7 до 7,0

Продолжение Таблицы 36

11) САР+АБА (n=18)	3,1±0,3* ^a	3,2±0,2	>7,0
Контрольная группа (здоровые добровольцы)			
12) Дети 7-8 лет (n=15)	1,1±0,1	3,5±0,4	<0,35
13) Взрослые >18 лет n=16)	1,1±0,1	3,6±0,5	<0,50

Примечание: клетки крови базофилы инкубировали при 37°C в течение 15 минут с rSplA-proteinase (1,0 мкг/мл) и anti-human-IgE (1,0 мкг/мл) в питательной среде и анализировали экспрессию CD203с методом проточной цитометрии. Индекс активации (ИА) рассчитывали, как отношение MFI_{стим} / MFI_{контроль}. * статистическую значимость между группами контроля и пациентов с респираторной аллергией с сенсibilизацией к rSplA-протеиназе *S. aureus* определяли по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$; ^a – статистическую значимость внутри групп (САР, КАР, САР+АБА, КАР+АБА) у пациентов с респираторной аллергией определяли по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$.

В нашем исследовании методом проточной цитометрии было показано, что у сенсibilизированных больных с АР и АР+АБА нестимулированные базофилы периферической крови экспрессировали детектируемые уровни CD203с, сходные с таковыми у здоровых добровольцев.

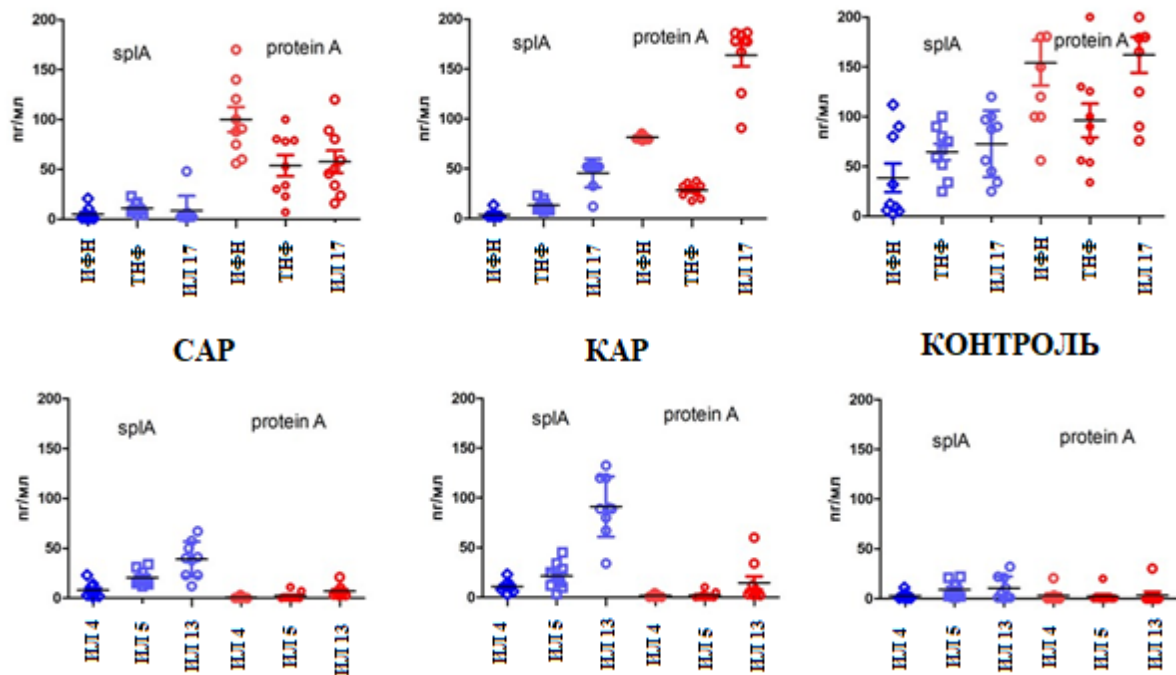
У больных с респираторной аллергией (САР, КАР, САР+АБА) с титром антител (IgE) к rSplA-протеиназе более 7,0 МЕ/мл индекс активации (ИА) базофилов был в 3,0 раза выше, чем у несенсibilизированных здоровых бактерионосителей контрольной группы (Таблица 36). Инкубация базофилов с рекомбинантной rSplA-протеиназой *S. aureus* (1 мкг/мл) приводила к значительной активации CD203с (ИА \geq 2,0) у всех пациентов с АР и сочетанной респираторной аллергией (АР+АБА) с положительным значимым уровнем IgE >5,0 МЕ/мл к протеиназе *S. aureus* по сравнению со здоровыми лицами контрольной группы (Таблица 36).

7.4. Изучение цитокинового профиля активации стимулированных рекомбинантной SplA-протеиназой *S. aureus* культур мононуклеаров периферической крови пациентов с аллергическим ринитом

В ответ на стимуляцию белком А *S. aureus* культуры МК периферической крови здоровых лиц происходило статистически значимое нарастание продукции Th1/Th17 цитокинов (ИФН- γ , TNF- α , ИЛ-17) по сравнению со стимуляцией рекомбинантной SplA-протеиназой *S. aureus* (Рисунок 25).

В тесте с культурой МК периферической крови здоровых лиц контрольной группы, рекомбинантная SplA-протеиназа *S. aureus*, в отличие от белка А *S. aureus*, менее активно стимулировала продукцию Th1/Th17-цитокинов, чем белок А, при этом продукцию Th2-цитокинов (ИЛ-5, ИЛ-13) она активировала более активно [87]. При стимуляции культуры МК периферической крови, полученной от больных с АР, рекомбинантной SplA-протеиназой установлена продукция преимущественно Th2-цитокинов (ИЛ-13, ИЛ-5, ИЛ-4), в отличии от стимуляции этих клеток белком А *S. aureus* [87]. Полученные нами данные подтверждают, что

Spl-протеиназы *S. aureus* способны вызывать у больных с АР и сочетанными формами респираторной аллергической патологии (АР+АБА) формирование Т2-иммунного ответа и образование специфичных IgE к SplA-протеиназе [87], тогда как естественный адаптивный иммунный ответ к известным антигенам стафилококков, в частности к белку А, в основном характеризуется развитием Т1-иммунного ответа с цитокиновым Th 1/Th17 профилем [236, 382].



Верхний ряд: профиль цитокинов ($M \pm SD$) Th1/Th17-типа (ИФН- γ , ТНФ- α , ИЛ-17) при стимуляции мононуклеаров рекомбинантной SplA-протеиназой и белком А (protein A) *S. aureus* на 3-и сутки культивирования клеток
 Нижний ряд: показан профиль цитокинов ($M \pm SD$) Th2-типа (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13) при стимуляции мононуклеаров рекомбинантной SplA-протеиназой и белком А *S. aureus* на 3-и сутки культивирования клеток; CAP – мононуклеары пациентов с интермиттирующим АР (n=10); KAP – мононуклеары пациентов с персистирующим АР (n=10); Контроль – мононуклеары здоровых лиц (n=10)
 Рисунок 25 – Цитокиновый профиль при стимуляции мононуклеаров ПК рекомбинантной SplA-протеиназой и белком А (protein A) *S. aureus*

При определении сенсibilизации в группе больных детей с АтД с детской и младенческой формами АтД (встречаемость и колонизация кожи *S. aureus* в этот период значительная) нами были выявлены высокие титры специфических IgE к SspA-протеиназе *S. aureus*, а также показано, что после назначения противовоспалительной, антимикотической и антимикробной терапии, в конце 3-й недели лечения, происходит снижение уровня специфических антител к SspA-протеиназе *S. aureus*, что, возможно, отражает процесс элиминации штаммов *S. aureus*. Так, титр специфических IgE к SspA-протеиназе *S. aureus* у детей с

младенческой (экссудативной) формой АД в возрасте до 1 года после 2–3 недель терапии снижался в 2,3 раза (с $5,7 \pm 0,8$ до $2,5 \pm 0,84$ МЕ/мл), у детей в возрасте от 1,5 лет до 2,5 лет – в 5,3 раза, в возрастной группе детей от 3 до 5 лет – в 2,1 раза ($p < 0,05$).

Открытие того факта, что Spl-протеиназы, как белки секретома *S. aureus*, могут вызывать аллергические реакции, является особо примечательным свойством, поскольку естественный адаптивный иммунный ответ к большинству антигенов стафилококков в основном имеет Th1/Th17 цитокиновую направленность [236, 382].

Таким образом, продукты жизнедеятельности штаммов *S. aureus*, заселяющих слизистые ВДП, в частности SplA-протеиназа, обладают аллергенными свойствами, вызывая IgE-опосредованную сенсibilизацию у больных с респираторными атопическими заболеваниями.

«Открытие аллергенной природы Spl-протеиназ *S. aureus* ставит вопрос о том, может ли индуцируемое ими отклонение иммунного ответа от защитного Th1/Th17-типа и смещение его у пациентов с АР в сторону Т2-иммунного ответа способствовать дополнительной функции этих ферментов, заключающейся в перенастройке локального иммунного ответа для повышения выживаемости и персистенции микроорганизма. Данный механизм манипуляцией иммунным ответом показан при изучении действия антигенов *Aspergillus fumigatus*, известному аллергену дыхательных путей человека» [87, 123].

7.5. Определение сенсibilизации у больных детей с младенческой и детской формой атопического дерматита к SspA-протеиназе *S. aureus*

У детей с АД и бактерионосителей в штаммах *S. aureus* ($89,2 \pm 7,9\%$ и $95,9 \pm 11,9\%$ соответственно) выявлена высокая частота идентификации методом М-ПЦР таргетных участков гена *sspA* сериновой протеиназы [93]. В связи с этим, используя выделенные штаммы как продуценты протеиназ, нам удалось

эффективно очистить и выделить фракцию глутамилэндопептидазы (SspA-протеиназы) из КЖ штамма продуцента (показатель степени очистки и выход фермента по активности представлены в Таблице 37 [93]).

Таблица 37 – Характеристика разных стадий очистки протеаз из КЖ при культивировании *S. aureus* [93]

Стадия очистки	Объем V, мл/содержание общего белка, в мг	Общая активность в у.е. × 10 ⁵	Специфическая удельная активность, у.е. × 10 ⁵ /мг/степень очистки	Выход по активности, %/выход по белку, %
Культуральная жидкость, КЖ (1)	100/650	1,4	0,0021/1	100/100
Хроматография на сефадексе G-50 и G-75 (2)	50/9,5	0,5	0,05/23,8	35,7/1,5
Фракционирование NH ₄ (SO ₄) ₂ сульфатом аммония (3)	250/8,4	0,6	0,07/33,3	42,8/1,3
Фракционирование ацетоном и диализ (4)	320/6,6	0,7	0,01/47,6	50,0/1,0
Концентрирование (5)	50,0/6,2	0,9	0,14/66,6	64,2/0,9
Ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе (6)	15/2,1	0,6	1,3 /619	42,8/0,3

Идентификация полученного гомогенного фермента (протеолитически активной фракции) проведена масс-спектрометрическим методом (PMF) после предварительного фракционирования в геле с применением SDS-ПААГ электрофореза. При обработке программой Mascot 2.4.0, набора спектров масс-листов, полученных после трипсинолиза выделенной фракции фермента, была показана высокая доля перекрытия (39,0%) пептидных «отпечатков» с последовательностями глутамилэндопептидазы (SspA-протеиназой) штамма *Staphylococcus aureus* gi|479275765|gb|CCW21286.1 при score 104, exp: 0,0023 (Рисунок 26) (база данных NCBI).

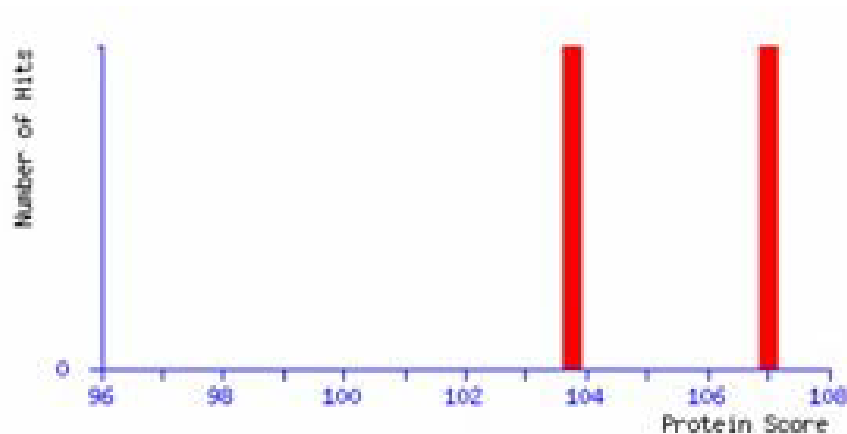


Рисунок 26 – Диаграмма отчета Mascot для набора МС-спектров при идентификации выделенной протеиназы *S. aureus* по методу PMF (показаны наиболее вероятные идентифицированные белки ($p < 0,05$))

Рассчитанная изоэлектрическая точка фермента (pI) составила 5,22, а молекулярная масса (M.w.) 35,3 кДа. При изоэлектрофорезе выделенной изоформы глутамилэндопептидазы ее экспериментальная изоэлектрическая точка соответствовала pI = 5,35.

Необходимо отметить, что при выделении из КЖ *S. aureus* одной из изоформ глутамилэндопептидазы, было удалено значительное количество балластных белковых фракций, содержащихся в КЖ, при этом выход по белку составил 0,3% [93].

Полученный аутентичный энзим – SspA протеиназа *S. aureus* в виде термоинактивированного антигена – был использован в иммунологических исследованиях.

Профиль сенсibilизации к бактериальной термоинактивированной глутамилэндопептидазе (SspA-протеиназе) S. aureus при АтД

Кожные покровы пациентов с АтД с высокой частотой колонизируются штаммами *S. aureus*. По имеющимся данным, иммунный ответ на антигены *S. aureus* у этих пациентов имеет ряд особенностей: гиперреактивность к белкам клеточной стенки *S. aureus* при кожных реакциях гиперчувствительности замедленного типа; выявление реагинов (IgE) к антигенам клеточной стенки и

растворимым клеточным белкам *S. aureus* при высоком уровне общего IgE в сыворотке; отсутствие четко выраженной корреляции между уровнем IgE к антигенам клеточной стенки и кожными реакциями немедленного типа на клеточные антигены *S. aureus* [204]. В связи с тем, что фактически данные по уровню реагинов (IgE) к белкам золотистого стафилококка у этих пациентов противоречивы [186, 225] и не изучен иммунный ответ и его особенности при АД к растворимым секретируемым антигенам, какими являются протеиназы, нами проведено исследование уровня АТ IgE к термоинактивированной фракции SspA-протеиназы на основе разработанной методологии иммуноферментного определения.

Определяли уровень специфических IgE к SspA-протеиназе *S. aureus* у больных детей с АД до лечения (в период обострения) и после назначения противовоспалительной, антимикотической и антимикробной терапии. В результате нами установлено значимое снижение уровня специфических антител IgE к SspA-протеиназе *S. aureus* (Рисунок 27).

Показано, что после назначения противовоспалительной, антимикотической и антимикробной терапии [79] в конце 3-й недели лечения происходит снижение уровня специфических IgE к SspA-протеиназе *S. aureus*, что, возможно, отражает процесс элиминации штаммов *S. aureus*. Так, титр специфических IgE к SspA-протеиназе *S. aureus* у детей с младенческой (экссудативной) формой АД в возрасте до 1 года после 2–3 недель терапии снижался в 2,3 раза (с $5,7 \pm 0,8$ до $2,5 \pm 0,0,84$ МЕ/мл), у детей в возрасте от 1,5 лет до 2,5 лет – в 5,3 раза, в возрастной группе детей от 3 до 5 лет – в 2,1 раза ($p < 0,05$) (Рисунок 27). При определении сенсibilизации больных детей с детской и младенческой формой АД, когда колонизация кожи *S. aureus* высокая, нами были установлены высокие титры специфических IgE к SspA-протеиназе *S. aureus*, а также показано, что после назначения противовоспалительной, антимикотической и антимикробной терапии происходит снижение уровня специфических IgE к SspA-протеиназе *S. aureus*, что,

возможно, отражает процесс санации кожных очагов и элиминацию штаммов *S. aureus*.

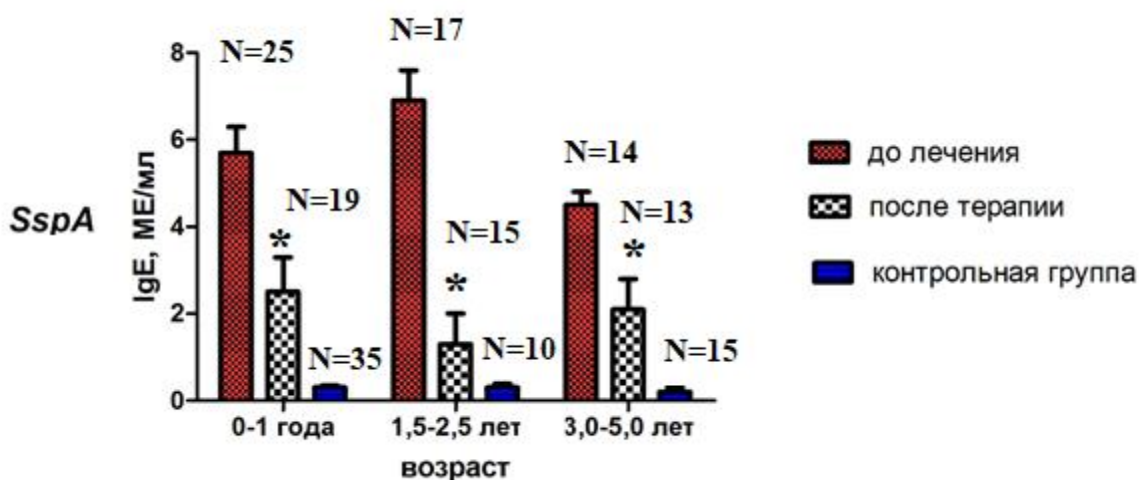


Рисунок 27 – Концентрация сывороточных специфических IgE ($M \pm SD$) к SspA-протеиназе *S. aureus* у детей с АД, осложненным вторичной инфекцией, до назначения местной терапии (до лечения) и после местной терапии (после лечения) Концентрация специфических IgE к SspA в контрольной группе (здоровые дети без атопической патологии) составила: $0,41 \pm 0,16$ МЕ/мл в возрастной группе от 0 до 1 года; $0,44 \pm 0,16$ МЕ/мл в возрастной группе от 1,5 до 2,5 лет; менее $0,35 \pm 0,18$ МЕ/мл в возрастной группе от 3,0 до 5,0 лет; * статистическая значимость до и после лечения проверена с применением критерия U-Манна-Уитни, $p < 0,05$

Учитывая формирующуюся сенсibilизацию к сериновым протеиназам *spl*- и *spr*-оперона, нами проведено изучение методом биоинформационного анализа гомологии первичной структуры данной группы бактериальных ферментов с другими антигенами и алергокомпонентами, в том числе микробными, которые потенциально могут обуславливать перекрестную реактивность у больных с АЗ.

ГЛАВА 8. БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ АЛЛЕРГЕНОВ *S. AUREUS* И КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS*, *DERMATOPHAGOIDES FARINAE*

Представлены данные исследований по изучению первичной структуры аллергенов *S. aureus* (SplA) и клещей ДП.

Биоинформационный анализ структурной первичной гомологии был основан на концепции пептидного континуума родства белков (ПКРБ) в эволюционной иерархии организмов, которая обуславливает частное его проявление – иммуноэпитопный континуум родства белков (ИЭКРБ) [103].

8.1. Определение гомологов Spl-протеиназы *Staphylococcus aureus* среди других бактериальных белков, принадлежащих к другим таксономическим группам и аллергокомпонентам из различных источников

Поиск белков гомологов осуществлен по аминокислотной последовательности предшественника SplA-протеазы *S. aureus* штамма USA300 длиной 235 а.о. (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q2FFS9.fasta>). Бактерии, относящиеся к группе Terrabacteria, содержат белок-кодирующие последовательности, имеющие разную степень гомологии (идентичности) с SplA-протеазами *S. aureus* (Рисунок 28).

При биоинформатическом поиске гомологичных SplA-протеиназе белков у других бактерий, были идентифицированы гомологичные в разной степени сериновые протеиназы (Таблица 38), выявленные у таких бактерий, как *Enterobacter hormaechei* (гомология 80,0%), *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (гомология 60,4%), *Staphylococcus hyicus* (гомология 50,2%), *Corallococcus* sp. (гомология 46,8%), *Staphylococcus saccharolyticus* (гомология

44,3%) и *Staphylococcus saprophyticus* (гомология 41,9%), многие из которых являются секретируемыми и относятся к группе Peptidase_S1B. У вида *Enterobacter hormaechei* выявлен фрагмент сериновой протеиназы, гомологичный на 80% (на участке 54 а.о.) SplA-протеиназе *S. aureus*. Гомология между разными изоформами (А, В, D до F) Spl-протеиназ *S. aureus* составляет от 94,0 до 43,9%. В Таблице 38 представлен результат идентификационного поиска гомологичных SplA-протеиназе *S. aureus* алергокомпонентов разного происхождения.



Рисунок 28 – Схема выравнивания аминокислотной последовательности SplA-протеазы *S. aureus*

Представлен результат выборочного выравнивания а. о. SplA-протеазы *S. aureus* (Query) и гомологичной сериновой протеазой (A0A4V6L2W5_STAHY1), выявленной у *S. hyicus*; серым цветом выделены идентичные – а. о.; красным цветом показаны аминокислотные остатки (а.о.) активного центра фермента

Таблица 38 – Перечень идентифицированных алергокомпонентов гомологичных SplA-протеиназе *S. aureus*

Белок бактериальный	Гомологичные структуры в эпитопах алергокомпонентов			
	Алергокомпонент	Биохимическая характеристика	% сходства / число а.о.	Источник Аллергена
SplA-протеиназа	Pol g 1	Фосфолипаза А1 (КФ.3.1.1.32)	77,8/18	Polistes gallicus

Продолжение Таблицы 38

SplA-протеиназа	Der f 4	Альфа-амилаза	74,2/31	Клеши ДП <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
	Asp fl 3	Щелочная сериновая протеиназа	68,4/19	<i>Aspergillus flavus</i>
	Der f 6	Химотрипсин	55,2/203	Клеши ДП <i>Dermatophagoides farinae</i>

При анализе аллергокомпонентов, гомологичных SplA-протеиназе, идентифицировано 4 значимых аллергена с высокой степенью гомологии с ферментом *S. aureus*. Один из них – фосфолипаза A1 (аллерген Pol g 1) яда Осы французской или галльской (*Polistes gallicus*), которая представляет один из видов общественных ос из семейства Vespidae (обитает в Средней и Южной Европе). Учитывая высокую степень гомологии, возможно формирование потенциально перекрестных реакций между бактериальной протеиназой *S. aureus* и фосфолипазой A1 яда этого вида осы, что необходимо учитывать в диагностике и интерпретации лабораторных тестов. Другой аллергокомпонент (Der f 4) альфа-амилаза из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* также содержит высоко гомологичный участок, гомологичный бактериальной SplA-протеиназе *S. aureus*. Нами идентифицированы еще два фермента, имеющие гомологию с SplA-протеиназой *S. aureus*, – это сериновая протеиназа из плесневого гриба *Aspergillus flavus* (Asp fl 3) и химотрипсин из клеща домашней пыли *Dermatophagoides farinae*, известный как аллерген Der f 6.

Необходимо отметить, что специфические IgE к Der f 6 формируются только у 40,0% пациентов, сенсibilизированных к клещам ДП [376]. Необходимо отметить, что Asp fl 3 является мажорным аллергеном *Aspergillus flavus*; отмечена также перекрестная реактивность между другими аллергенами *A. flavus*, *A. fumigatus* и *P. citrinum* [155].

Результаты проведенных исследований показали высокую степень гомологии между бактериальной SplA-протеиназой *S. aureus* и аллергокомпонентами (Der p 4 или α -амилаза) из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* и Der f 6 (химотрипсин) *Dermatophagoides farinae*, что может обуславливать формирование перекрестных реакций между ними (Рисунок 29).

Гомологи SspA-протеиназы S. aureus среди бактериальных белков, принадлежащих к другим бактериальным видам, и различных аэроаллергенов

Поиск белков гомологов осуществлен по аминокислотной последовательности SspA-протеиназы *Staphylococcus aureus* (источник данных о последовательности представлен на сайте <https://www.uniprot.org/uniprot/Q2FZL2> штаммов *S. aureus* NCTC 8325/ PS 47). Бактерии, относящиеся к группе Terrabacteria, содержат белок-кодирующие последовательности, имеющие разную степень гомологии (идентичности) с SspA-протеиназой *Staphylococcus aureus* (Таблица 39).

Bepired Linear Epitope Prediction 2.0 Results

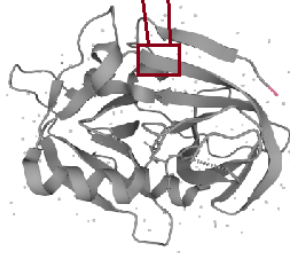
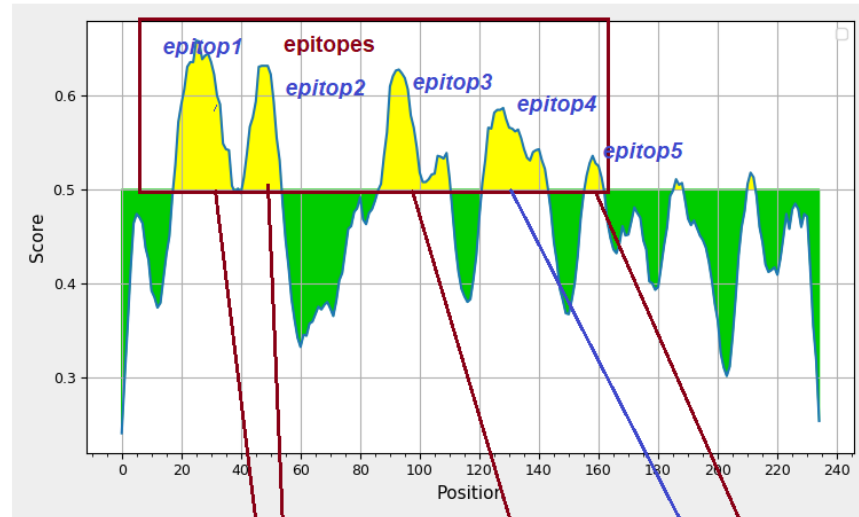
Input Sequences

```

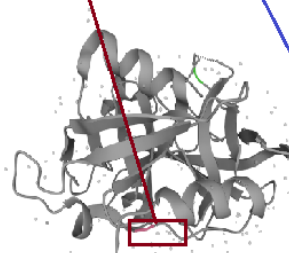
1 MNENVVKGL TALTILTSLG FAENISNQP SIKAAEKNVK EITDATKEY NSVAVFVGGT
61 GVVVGKNTIV TNKHIKNSD IFKNRVSAAH SSKGKGGNY DVKDIVEYPG KEDLAIVVHH
121 ETSSTGLNFN KINVSYTKFAD GAKVKDRISV IGVKGAQTK YKMFESTGTI NHISGTFMEF
181 DAYAQPNGISG SPVLNSKHLE IGILYAGSGK DESEKNFGVY FTPQLKEFIQ NNIEK
    
```

SplA-proteinase

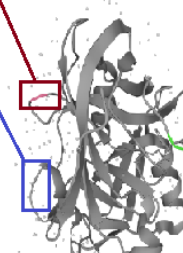
Center position: 4 Threshold: 0.500



Serine protease splA
JUL4 | Model: 1 | Instance ASML | A | GLU 1



Serine protease splA
JUL4 | Model: 1 | Instance ASML | A | TYR 100



Serine protease splA
JUL4 | Model: 1 | Instance ASML | A | SER 161

Job status: COMPLETED **Der f 6** *Dermatophagoides farinae*
epitop1

```

splA 1 MNENVVKGL TALTILTSLG FAENISNQP SIKAAEKNVK EITDATKEY NSVAVFVGGT 47
Derf6 1 MKRIFLMTIIVLIVIVDFRPPRSIQPWAYLDSNFFPRSKGDSPIAGVVGQDADLAE 60
epitop2
splA 48 EPTYS---VVAIVGDI VVVVGKNTIV TNKHIKNSDI--FKNRVSAHHSKRGKG 97
Derf6 61 AEFQISLLKDYLIKRRMCH--SLISESTVVTAACCTYGGKASSLSVRYGTN-ORTSSSY 118
epitop4
splA 98 GNYDKDIVEVPGKE-----DLAVHWHETSSTEGLEN--KIVSYTKER--SAKVKDRISV 150
Derf6 119 GILRWFVIGHESYLDQYQI---LILPNVVP--EVQMNERETSDIVSGD---KVYI 174
epitop3
splA 151 IETP---SGD-----SMTIVGNRCNEMWGSINAHFPGMICALKTKQSGCNGDSC 190
Derf6 178 YWGLTENGNGDLEPKLQK--SMTIVGNRCNEMWGSINAHFPGMICALKTKQSGCNGDSC 234
epitop5
splA 191 SEVLNSKHLEIGILYAGSGKDESEKNFGVYFTPQLKEFIQNNIEK 235
Derf6 235 GELVSNRKLIGVLSWSPKCPFGYMSVETREHYVLDWITKNTIV 279
    
```

You may add additional sequences to this alignment (in FASTA format)

Job status: COMPLETED **Der p 4** *Dermatophagoides pteronyssinus*
epitop 1 epitop 2

```

splA 1 -----MNENV-----KGLTALTILTSLGFAENISN--QPHSIAKAENK-- 39
Derp4 1 KYHNPHFIGNRSVITHLMENKVDIIDECEERFSGPYGGVQVSEVNEHALDRRPWYER 60
epitop 1 epitop 2
splA 40 -----KEL---IDATREPNSVVAIVG---GVVVGKNTIVTNKHIKNSDIIFKNRVSAAHHS 92
Derp4 61 YQPVSYEETRSGDEGQERRMRCRKAQV-----RIYVDVILNHTGACSG 107
epitop 3
splA 93 YKKGSGNYIVVDIVVDFGKEDLA-IVVHETS--TEGLENFN 130
Derp4 108 KETIGHHYDGN-TLQYFVFPFGNDHGHESCPQDLEIHD--TNPKEARNCRLSGRLDK 166
epitop 4 epitop 5
splA 131 KIVSITKFA--GAKVKDRISVIG-----YKGAQTKYKMFESTGTINHISGTFME 179
Derp4 167 QSEVIVRQKQVDFLNHLIDGVAEFRSDASTHCEDDLSISYRHH-----NINKE-- 218
splA 180 FDAYACFASQSEVLNSKHLEIGILYAGSGKDESE 214
Derp4 219 ---FEENSQ--EFTY---HETVYGGGINSNRYVTSLGRRIIEFRFYKEITNFRGNPN 268
splA 215 -----KNFGVY----- 220
Derp4 269 LHWLKNFG--EWGLVPSGDALVIMIDSHDLRVGHGKLGFPNINCPEGRLKKAATAFMLAWNY 328
splA 221 -----KNFVQY----- 220
Derp4 329 GVPRVMSSYFNWQIIKDGKVDNWDVWPPSDKNGNLSVHPNPDMTCNHIEWICHRHREIY 388
splA 221 -----FTPOLKEFIQNNIEK----- 235
Derp4 389 NMVFRMIAGQEPVHNWWDNGYQIA--SRGNRA--TAINLCRNQNLQOKLHTGLPAGTYC 448
splA 236 ----- 235
Derp4 449 DIISGNLIDNKTGKSIHVDKNGQADVYVGHDFDAFVAYHIGARIYS 496
    
```

Рисунок 29 – Гомологичные SplA-протеиназе *S. aureus* аллергокомпоненты клещей ДП

Таблица 39 – Гомологи SspA-протеиназы *Staphylococcus aureus* у других видов стафилококков, лактобацилл, энтерококков, бацилл

№	Вид микроорганизма	Характеристика	Идентичность, в %	Продукт, (фермент)
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Условно-патогенный микроорганизм для человека (инфекции кожи и мягких тканей, глаз, бактериемия). Входит в состав микробиоты кожи	51,1	Сериновая протеаза, Peptidase_S1_PA_chymotrypsin
2	<i>Staphylococcus hyicus</i>	Возбудитель инфекционно-воспалительных процессов у сельскохозяйственных животных	93,0	Сериновая протеиназа Peptidase_S1_PA_chymotrypsin
3	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Условно-патогенный микроорганизм для человека (инфекции мочевыводящих путей). У сельскохозяйственных животных вызывает инфекционно-воспалительные процессы ЖКТ	42,3	Сериновая протеиназа Peptidase_S1_PA_chymotrypsin
4	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	Условно-патогенный микроорганизм для человека (может вызывать инфекционно-воспалительные процессы, включая бактериемию, сепсис, артриты, холециститы, инфекцию ЦНС и МВП)	42,9	Сериновая протеиназа Peptidase_S1_PA_chymotrypsin

Продолжение Таблицы 39

5	<i>Bacillus cereus</i>	Условно-патогенный микроорганизм для человека, распространен в почве. Патогенность обусловлена разнообразным количеством образуемых токсинов (гемолизины), ферментов (протеиназ, фосфолипаз)	30,9	Сериновая протеиназа Peptidase_S1_PA_chymotrypsin
6	<i>Enterococcus mundtii</i>	Роль в патологии человека не изучена (обнаруживается в фекальном консорциуме бактерий)	55,1	Сериновая протеиназа Peptidase_S1_PA_chymotrypsin
7	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Входит в состав микробиоты кишечника человека	45,1	Сериновая протеиназа Peptidase_S1_PA_chymotrypsin
8	<i>Enterococcus faecalis</i>	Входит в состав микробиоты кишечника человека. Может вызывать инфекционно-воспалительные процессы (внутрибольничные инфекции или фекальную инфекцию органов малого таза при хирургической патологии)	46,3	Сериновая протеиназа Peptidase_S1_PA_chymotrypsin
9	<i>Staphylococcus edaphicus</i>	Роль в патологии человека не известна	44,4	Сериновая протеиназа Peptidase_S1_PA_chymotrypsin
10	<i>Lacrimispora indolis</i>	Роль в патологии человека не известна	41,0	Сериновая протеиназа Peptidase_S1_PA_chymotrypsin

Идентифицированы гомологичные в разной степени (30,0–93,0%) SspA-протеиназе *S. aureus* сериновые протеиназы (Peptidase_S1_PA_chymotrypsin) у пяти

видов стафилококков: *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. edaphicus*, а также у *Bacillus cereus*. Сериновые протеиназы, относящиеся к химитрипсиноподобным ферментам с 46,0–55,0%-й гомологией SspA-протеиназе, идентифицированы также у двух видов энтерококков (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus mundtii*) и лактобацилл (*Lactobacillus curvatus*) (Таблица 39).

При анализе алергокомпонентов гомологичных SspA-протеиназе *Staphylococcus aureus* идентифицировано пять значимых аллергенов с высокой степенью гомологии (51,0-68,0%) с этим ферментом *S. aureus* (Таблица 40).

Таблица 40 – Перечень идентифицированных алергокомпонентов, гомологичных SspA-протеиназе *S. aureus*

Бактериальный белок	Гомологичные структуры в эпитопах алергокомпонентов			
	Название алергокомпонента	Биохимическая характеристика	% сходства /число а.о.	Источник Аллергена
SspA-протеиназа	Der f 23	Перитрофиноподобный белок	68,3 / 41	<i>Dermatophagoides farinae</i>
	Ani s 10	Белок с неизвестной функцией	57,1/126	<i>Anisakis simplex</i>
	Der p 23 (Major mite allergen)	Перитрофиноподобный белок	56,6/ 53	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
	Bet v 1 (Major pollen allergen)	Белок Bet v 1 принадлежит к семейству растительных белков, связанных с патогенезом (PR-10), которые продуцируются в ответной реакции на различные фитопатогены	53,2/124	<i>Betula pendula</i>
	Amb a 11	Цистеиновая протеиназа	51,9/185	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>

Примечание: а.о. – аминокислотные остатки

Необходимо отметить, что в ряду из пяти известных гомологичных аллергокомпонентов большей гомологией с SspA-протеиназой *S. aureus* обладал аллергокомпонент Der f 23 из КДП *Dermatophagoides farinae*, по своей природе являющийся перитрофиноподобным протеином. Необходимо отметить, что Der f 23 является основным аллергеном клещей ДП с преимущественно конформационными эпитопами, связывающими IgE [205]. Не менее интересен еще один гомологичный сериновой протеиназе *S. aureus* аллерген Der p 23 из клещей ДП вида *D. Pteronyssinus*; он характеризуется 56,6%-й гомологией фрагмента из 53 а.о. Представляет собой перитрофиноподобный белковый домен и является аллергеном с высокой активностью, которая коррелирует с повышенной экспрессией CD203c на базофилах у пациентов, сенсibilизированных к этому белку клещей *D. pteronyssinus* [366].

Из гомологичных SspA-протеиназе *S. aureus* растительных (пыльцевых) аэроаллергенов необходимо отметить мажорный аллерген березы Bet v1 и аллерген амброзии Amb a 11. Почти у 95,0% сенсibilизированных пациентов с проявлениями респираторной аллергии (САР) на пыльцу березы образуются IgE к Bet v1. Аллерген амброзии Amb a 11 по природе относится к цистеиновым протеиназам и характеризуется 51,0%-й гомологией с SspA-протеиназой *S. aureus* в области, включающей 185 а.о. Гомологичных тканевых антигенов человека к SspA- и SplA-протеиназам *S. aureus* нами не выявлено.

Таким образом, выявление методом биоинформатического анализа потенциально перекрестно реагирующих (подобных или гомологичных) эпитопов между сериновыми протеиназами *S. aureus* и аллергенами/антигенами из других источников позволит объективно прогнозировать элиминационные мероприятия и правильно оценить или интерпретировать диагностические тесты у пациентов с респираторными и кожными проявлениями аллергического заболевания, у которых установлены клинически значимые уровни сенсibilизации и титры аллерген-специфических антител к этим протеиназам *S. aureus*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С середины XX века отмечен мировой тренд существенного роста аллергических заболеваний (АЗ), который продолжается до сих пор [39, 101]. Значимыми факторами, влияющими на высокую распространенность аллергических заболеваний в мире, остаются экологические и климатические изменения среды обитания современного человека, которые усугубляются для жителей крупных мегаполисов и промышленных агломераций [52]. Следствием давления этих факторов, а также появлением «скрытых» и новых аллергенов, является возрастание тяжести аллергической патологии, ее коморбидности с другими заболеваниями [44]. В связи с этим на современном этапе актуализируются вопросы, касающиеся изучения разных аспектов патогенеза аллергических заболеваний человека – от исследования генетических факторов, модулирующих особенности иммунного ответа и функцию естественных барьеров кожи и слизистых оболочек до влияния микробиоты организма человека, через исследование микробиома отдельных органов и систем или отдельных представителей микрофлоры, и их метаболитов [336, 361]. В ходе этих исследований было показано значимое влияние микробиоты кишечника и органов дыхания на формирование, течение аллергической патологии человека и особенности иммунного реагирования на антигены при таких заболеваниях, как атопическая бронхиальная астма, пищевая аллергия, в разных возрастных группах популяции человека [212].

Показано также важное влияние микробиоты и микробиома дермы на патогенез заболеваний кожи, в том числе и аллергической природы [62]. Одной из важных проблем в структуре как аллергической патологии, так и дерматологии является атопический дерматит – заболевание, характеризующееся хроническим рецидивирующим течением и отягощенным влиянием на состояние здоровья детей и подростков. При данной аллергической патологии кожи одним из факторов,

существенно модулирующих тяжесть заболевания, его течение и ответ на терапию, является состояние микробиоты кожи. Изучение этого фактора нами было реализовано в данном исследовании для раскрытия закономерностей изменения микробиоты при развитии АЗ.

На коже здорового взрослого человека определяется более 15 таксономических филумов различных представителей микробиоты, среди которых такие как Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria [70, 194]. В нашем исследовании с локальных участков пораженной кожи были выделены культивируемые виды бактерий, являющихся представителями пяти основных филумов – Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, а также грибов Ascomycota и Basidiomycota. Представители данных бактериальных филумов также были характерны и для локальных участков здоровой кожи, лиц группы контроля. Для кожи человека характерно, в отличие от микробиоты кишечника, доминирование представителей филума Actinobacteria, а для микробиоты кожи, как и для микробиоты кишечника, характерно значительное разнообразие микробных представителей на уровне вида. В нашем исследовании показано, что значимые изменения во встречаемости представителей филума Firmicutes, как по видовому спектру, так и по частоте выделения, выявлены на коже пациентов с АтД. У детей с АтД до 2-х лет отмечено значительное увеличение локальной колонизации кожи *S. aureus*. Выявлены видовые отличия в частоте встречаемости на локальных участках кожи коагулаза-отрицательных видов стафилококков, различающихся у больных детей и здоровых группы контроля. При развитии АтД у детей не встречались такие виды КОС, как *S. haemolyticus* и *S. saprophyticus*. Характерной особенностью явилось выявленное нами снижение частоты выделения *S. epidermidis* у детей с АтД на всех локальных участках кожи. Следует особо отметить, что экспансия *S. aureus* определенных участков пораженной кожи при АтД, выраженная в стадию обострения, может приводить к селективным сдвигам в видовом спектре стафилококков, а также способствовать относительному снижению колонизации кожи стрептококками, коринебактериями, что было нами

установлено у детей этой возрастной группы при развитии АтД. Нами установлены закономерные значимые изменения в частоте выделения у детей этого возрастного периода при АтД представителей филума Actinobacteria в составе локальной микробиоты кожи. Видовые различия выявлены во встречаемости коринебактерий, значимо снижена встречаемость и степень микробного обсеменения интактной кожи видами *Lactobacillus* spp. у больных АтД детей этого возраста.

Экспансия или вытеснение видом *S. aureus* комменсального *S. epidermidis* у детей раннего возраста с АтД, происходящая в стадию обострения заболевания и сохраняющаяся в ремиссии заболевания, может существенно изменять иммунологическую реактивность кожи и снижать ее защитные свойства, связанные с воздействием комменсалов на иммунные клетки дермы. Установлено, что *S. epidermidis* способен активировать популяцию иммунокомпетентных клеток кожи (индуцируя активацию специфичных для *S. epidermidis* ИЛ-17+CD8+ Т-лимфоцитов), которые формируют так называемую гетерологичную резистентность ее к инфицированию патогенными микроорганизмами, стимулируя синтез кератиноцитами АМП [283]. Проведенные исследования, в частности MLST типирование при секвенировании генома *S. epidermidis*, выявили высокий уровень разнообразия штаммов, которые, в отличие от *S. aureus*, характеризуются низким патогенным потенциалом [338]. Роль комменсального *S. epidermidis* в составе локальной микробиоты кожи двоякая: во-первых, *S. epidermidis* продуцирует и секретирует ряд АМП, таких как фенолрастворимые модулины (PSMs) и бактериоцины, которые могут непосредственно предотвращать колонизацию кожи патогенными видами бактерий, включая стрептококки группы А (GAS), *S. aureus* и даже другими более патогенными штаммами *S. epidermidis* [126, 158]; во-вторых, *S. epidermidis* активирует иммунный ответ в коже через Toll-подобный (TLR) рецепторный механизм [244, 367]. Необходимо также отметить, что *S. epidermidis*, а точнее компоненты его клеточной стенки, способствуют сохранению целостности эпителиального барьера кожи, особенно во время восстановления кожи после микротравм, действуя через TLR2-рецепторный механизм [244].

Несмотря на то, что *S. epidermidis* обычно считается комменсальным организмом, он может проявлять и патогенный потенциал [158].

Другие комменсалы кожи – представители *Corynebacterium* spp. – способны ингибировать рост патогенных видов стрептококков и стафилококков кожи путем активной продукции липаз. Учитывая выявленное нами снижение встречаемости этих видов комменсалов у детей при обострении АД, а также в стадию ремиссии заболевания, в отличие от здоровых детей, можно предположить дефект данного механизма защиты кожи при этом заболевании.

Нами установлено, что в норме у здоровых детей контрольной группы на локальных биотопах кожи чаще, чем у больных АД выделялись представители *Corynebacterium* spp. Последние интересные работы показали существование межвидового влияния представителей этих комменсалов кожи на *S. aureus*. Так, открыт факт взаимодействия между *S. aureus* и *Corynebacterium* spp. кожи, который был установлен американским ученым Мэтью М. Рэмси, 2016 (Бостон, США) и другими исследователями, показавшими изменения экспрессии генов, кодирующих факторы патогенности у *S. aureus* при со-культивировании и взаимодействии со штаммами *Corynebacterium striatum*, обычным комменсалом кожи; фенотипически при этом штаммы *S. aureus* проявляли выраженную адгезию к эпителиальным клеткам [310]. Подобные исследования были проведены и в отношении взаимовлияний между *S. aureus* и *Propionibacterium* spp. [371]. Таким образом, было высказано предположение, что обычные доминирующие бактерии комменсалы кожи играют определенную роль в регуляции экспрессии генов у *S. aureus*, направляя ее в сторону реализации комменсализма, подавляя экспрессию факторов вирулентности, которые обеспечивают или определяют риск развития инфекции, вызванной *S. aureus* [310].

Таким образом, можно констатировать, что у детей до двух лет с АД микробиота кожи претерпевает дисбиотические изменения и характеризуется экспансией определенных ниш кожи представителями филума Firmicutes; в частности, в стадии обострения доминирует выделение *S. aureus*, тогда как другие

виды стафилококков подавляются, что приводит к снижению иммунологической и колонизационной резистентности кожи, обусловленной воздействием на нее комменсалов, таких как *Corynebacterium* spp.

Изменения встречаемости на локальных биотопах кожи взрослых лиц с АтД фактически подобны той трансформации, которая была нами выявлена у детей с АтД. Так, для взрослых больных с АтД были характерны, по сравнению со здоровыми лицами контрольной группы, такие же значимые изменения в частоте встречаемости представителей филума Firmicutes. Отмечено, что в стадии обострения АтД у взрослых встречаемость *S. aureus* на локальных участках пораженной кожи выше на 32,3% и на 8,6% в стадии ремиссии. В этот период у взрослых больных АтД увеличивается частота выделения *S. haemolyticus* с локальных биотопов пораженной кожи. Встречаемость *S. epidermidis* у взрослых с АтД на локальных участках кожи также была значимо снижена как в стадии обострения заболевания, так и в стадии ремиссии, что отражает отмеченные выше сдвиги в составе микробиоты кожи при формировании АтД. У взрослых пациентов с АтД на локальных участках кожи не встречались некоторые виды КОС; в частности, отсутствовал *S. hominis*, являющийся характерным видом локальных биотопов кожи у здоровых лиц контрольной группы. Значимое снижение представительства в составе микробиоты кожи комменсальных видов КОС (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*) у пациентов с АтД было отмечено не только в нашем исследовании, но и в работах зарубежных исследователей, изучающих микробиом кожи [286, 383].

Таким образом, можно констатировать, что при развитии АтД, как у детей, так и у взрослых отмечается дефицит видов комменсальных КОС (кроме *S. haemolyticus*) в составе микробиоты, что может приводить к снижению локального синтеза факторов, подавляющих рост и экспансию золотистого стафилококка, так как *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. carrae* являются активными продуцентами этих факторов [298]. В ряде экспериментальных работ установлен фактор, аутоиндуцирующий пептид, продуцируемый некоторыми видами КОС,

который блокирует гены глобального локуса *agr* в геноме *S. aureus*, контролирующего синтез факторов патогенности и других внеклеточных белков у этого вида [298].

В составе микробиоты кожи присутствуют представители не только бактериальных филумов, но и представители грибов, а проведенные микологические исследования кожи показали, что представители таких грибов, как *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Debaromyces*, *Cryptococcus*, а для некоторых участков грибов рода *Candida*, являются распространенными комменсалами кожи человека [182]. Проведенный нами анализ состояния видового состава грибов кожи, их встречаемости на локальных участках выявил значимые различия во встречаемости грибов семейств *Sacharomycetalis*, *Tremellaceae*. Так, *Candida albicans* у больных АтД детей в стадию обострения заболевания встречался чаще, чем у здоровых детей.

Отмечено также значимое снижение встречаемости вида *Malassezia capre* у больных детей возрастом 1–2 года с АтД как в стадии ремиссии заболевания, так и в стадии обострения. Напротив, у детей до 6 месяцев с АтД нами выявлено увеличение встречаемости *Malassezia caprae* после проведения местной топической терапии на участках пораженной кожи. Встречаемость других представителей дрожжеподобных грибов, в частности *Candida albicans* у взрослых в стадии обострения заболевания была выше, чем у здоровых лиц контрольной группы.

Таким образом, полученные нами данные отражают колебания в частоте встречаемости таких представителей липофильных дрожжеподобных грибов, как *Malassezia spp.* на локальных биотопах кожи при АтД, что может отражать изменение видового состава этих липофильных дрожжеподобных грибов при этом заболевании. В некоторых работах при проведении корреляционного анализа совместной встречаемости резидентных грибов и бактерий было показано, что представители *Ascomycota* и *Basidiomycota* положительно коррелировали с представителями бактериальных видов филума *Firmicutes* и *Proteobacteria* [71, 182]. Таким образом, можно констатировать, что при развитии АтД локальные участки

кожи преимущественно колонизируются представителями филума Firmicutes (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*), а также некоторыми представителями Proteobacteria, в частности сапрофитами, с которыми ассоциируются на этих участках представители грибов Ascomycota и Basidiomycota. Необходимо особо отметить, что при развитии АД и выраженном нарушении функции эпидермального кожного барьера у этих пациентов грибы рода *Malassezia* spp. могут обеспечивать дополнительную сенсибилизацию пациентов своими аллергенами, а в некоторых работах было показано, что при повышении показателя pH кожи, которое отмечается при АД, некоторые виды грибов рода *Malassezia* spp. (*Malassezia sympodialis*) способны к более активному высвобождению аллергокомпонентов [50].

Необходимо отметить значимость обладающих аллергенными свойствами компонентов, выделяемых грибами рода *Malassezia* spp., в патогенезе АД [51]. Установлено, что такие аллергокомпоненты *Malassezia* spp., как Mala s 6, (циклофилин), Mala s 13 (тиоредоксин), Mala s 11 (марганец-зависимая супероксиддисмутаза) принадлежат к филогенетически консервативным белкам и относятся к семейству паналлергенов, а самое главное, могут индуцировать, из-за высокой степени гомологии с белками организма человека, перекрестную реактивность, что обеспечивает длительное поддержание воспалительного процесса в коже при АД [71, 122].

Микробиота верхних дыхательных путей (носа), по данным ряда исследований, в значительной своей части представлена разными бактериальными видами, многие из которых требуют особых условий роста, а часть из них не могут быть культивированы *in vitro* [278].

Нами проведена оценка изменения встречаемости локальных бактериальных видов, как отражение изменений микробиоты ВДП у больных аллергическими заболеваниями ВДП, в том числе в сочетании с АБА. Показано, что у больных САР в стадии обострения заболевания возрастала частота выделения *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *Enterobacter ludwigii*, *Moraxella catarrhalis*, снижалась частота

встречаемости *S. epidermidis* и других КОС (*S. hominis*) на фоне снижения встречаемости комменсалов, таких как *Corynebacterium* spp. В стадии ремиссии заболевания после проведения базисной терапии состав микробиоты носа существенно не изменялся: сохранялось доминирование потенциально патогенных стафилококков *S. aureus*, *S. haemolyticus*, возрастала частота выделения *Moraxella catarrhalis* на фоне снижения комменсалов *S. epidermidis*, *S. hominis* и *Corynebacterium* spp. У больных в стадии ремиссии САР, получавших АСИТ, в отличие от пациентов, получивших базисную терапию, отмечено увеличение встречаемости комменсальных стафилококков (*S. epidermidis*), коринебактерий (*Corynebacterium* spp.). Такие же закономерности изменения локальных видов бактерий были нами отмечены и у пациентов с КАР, что отражает общую закономерность изменения микробиоты при развитии аллергического воспаления ВДП. При сравнительном анализе у здоровых лиц контрольной группы в составе микробиоты доминировали по встречаемости КОС (*S. epidermidis*, *S. hominis*) и *Corynebacterium* spp., а также отмечены сезонные колебания в составе выделяемых бактериальных видов назальной микробиоты, особенно при переходе от одного сезона года к другому (весна–лето, осень–зима), что также подтверждено в других исследованиях [150, 151]. Эта динамика свидетельствует о ключевой роли факторов окружающей среды, таких как температура и влажность, в формировании состава назальной микробиоты [263]. Учитывая состояние локальной микробиоты слизистой носа (ВДП) по предложенной классификации Liu С. М. и др., можно говорить о формировании первого типа микробного сообщества (CST1) с доминированием *S. aureus* при развитии АР, а у здоровых лиц, как правило, формируются микробные сообщества третьего (CST3), четвертого (CST4) или пятого типа (CST5) с преобладанием *S. epidermidis*, *Propionibacterium* spp., *Corynebacterium* spp. соответственно [263].

Таким образом, у больных атопическими заболеваниями выявлены выраженные количественные изменения локальной микробиоты (кожи при АД и слизистой носа – при АР), проявляющиеся в повышении степени бактериального

обсеменения патогенными штаммами *Staphylococcus* spp., снижении комменсальных видов КОС, *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* sp и появлением новых сапрофитных видов, не свойственных этому биотопу в норме.

В следующей части нашего исследования был изучен патогенный потенциал локально выделенных штаммов КОС и *S. aureus*, включающий протеолитическую активность и продукцию энтеротоксинов как значимых микробных факторов, влияющих на некоторые аспекты патогенеза АЗ. Так, нами было установлено, что более половины всех выделенных штаммов *S. aureus* характеризовались выраженной протеолитической активностью, встречаемость же протеолитически активных штаммов этого вида, выделяемых с кожи здоровых лиц, была меньше и составила не более 30,0%. Встречаемость протеолитической активности среди КОС кожи таких видов, как *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, выделенных от больных с АтД, была почти в 5 раз меньше, чем среди изолятов *S. aureus*, выделенных от этих пациентов в стадию обострения заболевания. Среди КОС *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, выделяемых с кожи пациентов, встречаемость протеолитически активных изолятов была почти в 3 раза меньше, чем среди изолятов *S. aureus*, выделенных с кожи здоровых лиц контрольной группы. При определении удельной протеолитической активности штаммов нами установлены следующие закономерности: при рН 7,4 иммуноглобулин-расщепляющая активность у исследованных штаммов снижалась в ряду от вида *S. aureus*→*S. epidermidis*→*S. haemolyticus*→*S. saprophyticus*; иммуноглобулин-расщепляющая активность у кожных штаммов *S. saprophyticus* была в 9–10 раз меньше, чем у *S. aureus*; иммуноглобулин-расщепляющая активность штаммов (рН 7,4) выделенных в стадию обострения АтД, для видов *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* была значимо выше, чем в стадии ремиссии. Учитывая полученные данные, можно предположить значимое влияние протеиназ «кожных» штаммов *S. aureus*, а также некоторых видов КОС на состояние КЭБ, вызванное воздействием ферментов и токсинов этих штаммов. Воздействие протеолитических ферментов на КЭБ приводит к массовому поступлению

аллергенов через кожу, что в последующем способствует поддержанию Т2-иммунного ответа. Как аллергены, протеиназы способны также нарушить целостность эпидермального барьера кожи, действуя через PAR2-рецепторы кератиноцитов. Эндогенные протеиназы (протеазы лейкоцитов, тучных клеток, эозинофилов, кератиноцитов, протеиназы, образуемые при фибринолизе), активируя PAR2-рецепторы на кератиноцитах и эндотелиальных клетках микрососудов кожи, приводят к усилению местной продукции медиаторов воспаления (цитокинов), в том числе стимулирующих выраженный зуд кожи [342]. В нашем исследовании установлено, что у больных АтД с генетическим полиморфизмом (мутацией) в гене SPINK5, кодирующем белок ингибитор протеиназ LETKI [296], у которых возможен дисбаланс между активностью протеиназ в коже и их ингибиторов, показана значимая колонизация штаммами *S. aureus*, которые дополнительно вносят вклад в протеолитическую активность, секретируя экзогенные протеиназы, тем самым усиливая повреждение КЭБ и аллергическое воспаление.

Нами также установлено, что при АтД пораженная кожа у пациентов колонизируется штаммами с выраженной способностью продуцировать лейкоцидины при тяжелой и среднетяжелой степени заболевания. В нашем исследовании показано, что способность образовывать энтеротоксины (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) среди кожных штаммов *S. aureus*, выделенных у детей, подростков и взрослых больных с АтД, проявлялась в несколько раз чаще, чем у штаммов, полученных от здоровых лиц. Также выявлена высокая распространенность продукции энтеротоксинов (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) среди штаммов *S. aureus*, выделенных со слизистой ВДП у пациентов с АР, где почти каждый пятый изолят продуцировал энтеротоксины.

Необходимо отметить, что суперантигены *S. aureus*, по мнению некоторых исследователей, могут вызывать развитие резистентности к ГКС у больных с тяжелым течением АтД, что может привести к снижению терапевтической

эффективности местных ГКС при лечении пациентов с АД, кожа которых колонизирована штаммами *S. aureus* продуцентами энтеротоксинов [203].

Нами показано, что более половины исследованных назальных изолятов *S. aureus*, выделенных от пациентов с КАР, способны расщеплять IgA человека, тогда как у здоровых лиц контрольной группы (транзиторные бактерионосители) встречаемость таких изолятов была в несколько раз меньше. У страдающих АР выделяется в 3 раза больше IgA-протеолитически активных изолятов *Staphylococcus spp.*, чем у здоровых бактерионосителей контрольной группы. Протеолитическая активность КЖ у выделенных штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* блокировалась ингибитором сериновых протеиназ.

Необходимо отметить, что многочисленные исследования на животных моделях, в которых исследователи определяли роль секретируемых протеаз *S. aureus* в развитии той или иной модели инфекции, убедительно продемонстрировали, что из группы сериновых протеиназ этого вида только эксфолиативные токсины способны вызвать развитие такого стафилококкового заболевания, как синдром ошпаренной кожи младенцев (SSSS-синдром) [145].

Однако прямые данные о роли других секретируемых протеиназ этого вида в развитии инфекционного процесса, вызванного *S. aureus*, противоречивы. Отмечено, что свойства штаммов *S. aureus*, не содержащих гены протеиназ (*aur*, *sspB*, *sspA*) либо двух генов (*sspB*, *sspA*), не сказывались на способности вызывать септический артрит на мышинной модели [149]. Другие исследователи подтвердили также отсутствие эффекта снижения вирулентности штаммов *S. aureus* при нокауте гена *sspA* *S. aureus* на крысиной модели [313].

В работе Coulter S. N. и др. установлен противоположный эффект: снижение вирулентности у штаммов *S. aureus* с мутациями в генах протеиназ *sspA* и *sspB* на мышинных моделях [160]. В других работах было показано, что удаление в геноме всего *spI*-оперона, кодирующего группу протеиназ, не сказывалось также на вирулентных свойствах, определяемых (LD₅₀) в животной модели [313]. Таким образом, значимость такого свойства, как протеолитическая активность в

патогенном потенциале штаммов *S. aureus*, остается дискуссионной, но при этом протеолитически активные штаммы могут участвовать или модулировать патогенез и течение уже имеющейся патологии; например, при развитии АЗ они могут дополнительно участвовать в повреждении кожного эпидермального барьера (КЭБ) или инактивировать защитные факторы слизистых оболочек или кожи, такие как АМП, IgA, а в некоторых случаях и протеолитически модифицировать клеточные рецепторы на иммунокомпетентных клетках. Сами секретируемые протеолитические ферменты штаммов *Staphylococcus spp.* при atopическом фенотипе могут выступать как аллергены, поступающие через кожу или слизистые ВДП, вызывая сенсibilизацию организма.

Полученные нами данные позволяют констатировать, что при развитии аллергического воспаления происходит смена конкурентных отношений между бактериальными видами в составе микробиоты, а также, возможно, открываются дополнительные сайты адгезии на эпителиальных клетках слизистой оболочки, что используют такие виды, как *S. aureus*. Почти все бактерии, колонизирующие слизистую носа, обладают эффективными механизмами адгезии, чтобы оставаться в контакте с эпителиальными клетками и не подвергнуться процессам элиминации посредством мукоцилиарного клиренса [330]. Отмечено, что *S. aureus* колонизирует оба типа эпителия, образуя адгезины для разных типов эпителиальных клеток [127]. Учитывая, что при развитии аллергического ринита нами выявлена экспансия слизистой носа ВДП *S. aureus*, хотелось бы отметить эволюционно сложившиеся у этого вида механизмы и факторы, позволяющие ему успешно закрепляться на слизистой ВДП. Прежде всего, *S. aureus* экспрессирует широкий спектр генов адгезинов, которые формируют белковые и небелковые адгезины, позволяющие бактериям избирательно связываться как с безъядерными корнеоцитами ороговевающего многослойного плоского эпителия (передняя часть носа), так и со столбчатым мерцательным эпителием (задняя часть носа). Сегодня открыты рецепторы на поверхности слизистой ВДП (носа) к стафилококковым адгезинам [330]. *S. aureus* использует несколько механизмов адгезии, которые

различаются в зависимости от слизистой оболочки передней и задней полости носа. Передняя часть полости носа, содержащая безъядерные корнеоциты ороговевшего многослойного плоского эпителия, богата такими белками, как лорикрин, цитокератин-10 и инволюкрин. Белковый адгезин ClfB *S. aureus* преимущественно связывается с лорикрином и цитокератином-10, тогда как адгезин IsdA – с инволюкрином [282].

Недавние работы показывают, что даже в пределах одного вида разные штаммы могут заметно отличаться по своему воздействию на организм человека [147]. Различия на уровне штаммов у бактерионосителей с АЗ в значительной степени изучены недостаточно. В связи с этим в проведенных нами исследованиях протеомного профиля изолятов, выделенных от здоровых бактерионосителей и от больных АЗ, были выявлены значимые отличия в экспрессии белков. Так, протеом изолятов, выделенных от больных АЗ и бактерионосителей без АЗ, различался по экспрессии секретируемых белков, прежде всего ферментов (Aur-, SplA-, SplE-, SspA-протеиназ, трансгликозилазы, липазы, термонуклеазы), токсинов (SSL7, SSL5), гемолизинов (Hla, Hlb), некоторых антигенных белков (антиген IsaA стафилококка), белков шаперонов и белков, ответственных за развитие множественной устойчивости к антимикробным препаратам, а также белков, связанных с клеточной оболочкой бактериальной клетки (Efb, SdrD).

Таким образом, по результатам проведенного нами исследования можно констатировать, что количественные изменения локальной микробиоты ассоциируются с усилением патогенного потенциала штаммов *S. aureus*, включая повышение протеолитической активности, а также продукцию широкого спектра экзотоксинов и протеиназ. Возможно предположить, учитывая данные других исследователей, что усиление патогенного потенциала золотистого стафилококка кожи обусловлено снижением блокирующего эффекта регуляторных факторов, образуемых комменсальными видами КОС и другими микроорганизмами вследствие дефицита этих представителей в составе микробиоты кожи и ее дисбиотической трансформации у больных с АЗ.

Повышение патогенного потенциала *S. aureus* свойственно определенным генотипам штаммов *S. aureus*, колонизирующих кожу у больных АтД и слизистые оболочки ВДП у больных с респираторной аллергией. Определение этих характерных генотипических профилей было изучено нами как логическое продолжение исследования фенотипических свойств (протеиназной активности и энтеротоксин-продуцирующей) штаммов этого вида как значимых микробных факторов для реализации влияния на патогенез АЗ.

Фактически не изучена распространенность генов, кодирующих протеиназы *spI*-оперона в клинических изолятах *S. aureus*. Только в одном исследовании было выявлено наличие кластера из четырех генов *spI*-оперона (*spIA-spID*) в 64,0% изолятов *S. aureus* [313]. В нашем исследовании было проведено сравнительное изучение распространенности этих генов среди штаммов *S. aureus*, входящих в состав микробиоты кожи и слизистых ВДП у пациентов с АЗ. По другим генам секретируемых протеиназ штаммы *S. aureus*, выделенные с кожи больных АтД и здоровых лиц контрольной группы, характеризовались тем, что гены *aug* (металлзависимая протеиназа – ауреолизин), *sspA* (сериновая протеиназа), *scpA* и *sspB* (тиоловые протеиназы – стафопаины А, В) выявлялись фактически во всех тестируемых изолятах, а значимых различий в частоте встречаемости штаммов, содержащих гены этих протеиназ и их комбинаций между изолятами, выделенными от больных АтД и здоровых лиц, не установлено. При изучении профиля генов этих протеиназ в изолятах *S. aureus*, выделенных со слизистой носа (ВДП) у больных аллергическим ринитом, было также показано, что гены *aug* (металлзависимая протеиназа – ауреолизин), *sspA* (сериновая протеиназа), *scpA* и *sspB* также детектировались у большей части исследованных изолятов (более 80,0%). Значимое различие было нами получено при изучении встречаемости генов *scpA*, *scpB* (кодирующих стафопаины) в назальных штаммах *S. aureus*. Так, у пациентов с АР нами установлено, что встречаемость штаммов с этим генотипическим профилем была более 80,0%, что в несколько раз выше, чем у

штаммов, выделенных от лиц контрольной группы бактерионосителей без аллергической патологии.

Гены *aur*, *sspA*, *scpA* и *sspB* встречаются фактически у большей части штаммов *S. aureus*, колонизирующих кожу и слизистые ВДП вне зависимости от каких групп исследуемых индивидуумов они были выделены. Нами установлено, что изоляты *S. aureus*, входящие в состав микробиоты кожи в стадию обострения АтД, характеризуются генотипическими профилями генов протеиназ, которые в основном встречаются только у больных с АтД в сравнении со здоровыми лицами группы сравнения. К этим характерным генотипическим профилям можно отнести следующие профили генов: *aur-sspB-splA*, *splA-splD*, *splB-splC-splE-splF*, *splA-splF-splC-splB*, а также *splE-splD*. В нашем исследовании показано, что гены *spl*-оперона в изолятах *S. aureus*, выделенных от пациентов с АтД в стадии обострения заболевания, встречаются в 2–3 раза чаще, чем в изолятах, выделенных в стадии ремиссии. Нами также выявлены существенные генотипические различия во встречаемости характерных генотипических профилей генов *spl*-оперона у изолятов *S. aureus*, выделенных от пациентов с АР и здоровых бактерионосителей группы сравнения. Выделены такие генотипические профили, как *aur-sspB-splA*, *splE-splD*, и *splB-splC-splE-splF*, *splA-splF-splC-splB*, которые были детектированы преимущественно в штаммах *S. aureus*, выделенных от больных. Полученные ранее данные по молекулярно-генетическому профилю генов, кодирующие стафилококковые протеиназы у штаммов *S. aureus*, показали, что ген *aur*, кодирующий металлзависимую протеиназу ауреолизин, присутствовал во всех исследованных клинических изолятах [323, 349], как и гены *scpA* и *sspB*, кодирующие цистеиновые протеазы, стафопаин А (*ScpA*) и стафопаин В (*SspB*) [191]. Отмечена также высокая (почти 100,0%) встречаемость *sspA* гена, кодирующего сериновую протеиназу (*SspA*) *S. aureus* в клинических изолятах, выделенных от человека [227, 346].

По данным Becker K. et al., гены (*etb*, *eta*) таких токсинов, как эксфолиативный токсин А и В, были определены не более чем у 1,2% штаммов

S. aureus, выделенных от человека, причем часть изолятов была получена из гемокультуры, другая часть – со слизистой оболочки носа [129]. Необходимо отметить, что эксфолиативные токсины ETA, ETB *S. aureus* содержат гомологичные SspA протеиназе (V8-протеиназе) *S. aureus* каталитические домены [116]. Предполагается, что передача этих генов возможна путем горизонтального переноса между штаммами.

По нашим данным, выявлены следующие особенности встречаемости генов, кодирующих эксфолиативные токсины у пациентов с АЗ: встречаемость штаммов, содержащих гены эксфолиативных токсинов, зависела от тяжести АД; независимо от степени тяжести АД все выделенные изоляты *S. aureus* с локальных биотопов пораженной кожи содержали ген *etb* (эксфолиативного токсина В), и эти изоляты были отнесены к MRSA штаммам с генотипом *mecA*, SCC*mec I* [105]. Сходные данные были получены в других исследованиях, где показано, что ген *etb* содержал в основном MRSA штаммы, выделенные с кожи у пациентов с импетиго, а ген *eta* чаще ассоциировался с изолятами, не содержащими *mecA* ген [290]. В других ранее проведенных работах отмечено, что штаммы *S. aureus*, содержащие ген *eta*, чаще колонизируют кожу пациентов с атопической экземой [277]. При тестировании изолятов *S. aureus*, выделенных со слизистой носа (ВДП) от пациентов с АР, штаммов, содержащих гены эксфолиативных токсинов (*etb*, *eta*, *etd*), не выявлено.

Таким образом, по полученным нами данным, штаммы *S. aureus*, выделяемые с кожи пациентов с АД, содержат гены эксфолиативных токсинов. Распространенность этих генов у данных изолятов высокая, назальные изоляты у пациентов с АР не содержат этих генов.

Изучение распространенности генов токсинов в доминирующих изолятах *S. aureus* кожи и ВДП у больных с АЗ позволило оценить их патогенный потенциал и возможность влиять на определенные стороны патогенеза АЗ, а также характеризовать их эпидемиологическое значение. Так, еще в ранних работах показано, что экзотоксины *S. aureus*, в которые были включены гены, кодирующие TSST-1, лейкоцидин PVL наиболее часто детектируется в штаммах, полученных из

клинического материала при различных инфекциях человека. Выделение штаммов *S. aureus*, продуцирующих лейкоцидины, наиболее характерно при некротических поражениях кожи и фурункулезе, что свидетельствуют о роли этих токсинов в вирулентности стафилококков, по крайней мере при кожных инфекциях [373]. В нашем исследовании показано, что лейкоцидин Luk состоит из субъединиц LukF (34 кДа) и LukS (33 кДа), и PVL состоит из LukF-PV (34 кДа) и LukS-PV (33 кДа), проявляют цитолитические свойства по отношению к нейтрофилам человека, синтез этих токсинов может усилить патогенный потенциал штаммов *S. aureus* [223]. Выделение штаммов *S. aureus*, содержащих гены лейкоцидинов, увеличивается в зависимости от тяжести АтД. Среди больных с АР штаммы, содержащие гены лейкоцидинов, были выделены от пациентов с КАР. Таким образом, при тяжелых формах АтД было выявлено больше всего штаммов *S. aureus*, содержащих гены лейкоцидинов, и чаще всего – у детей с пораженных участков кожи, со слизистой оболочки ВДП (носа), а также такие штаммы выделялись только у больных с КАР.

Анализ распространенности генов суперантигенов среди исследованных изолятов *S. aureus* кожи показал, что эти изоляты, выделенные с пораженной кожи при АтД со среднетяжелой и тяжелой степенью тяжести заболевания, почти в 90,0% случаев содержат гены энтеротоксинов. Наибольшее количество штаммов, содержащих гены энтеротоксинов, выявляется в стадию обострения заболевания. Профиль генов энтеротоксинов, детектируемый в полученных изолятах при легкой степени тяжести АтД, включал гены *sea*, *sec*, *sei*, *sej*, причем доминировали штаммы, содержащие ген *sea*.

Кроме этого, нами установлена высокая распространенность генов, кодирующих суперантигеноподобные белки штаммов *S. aureus*, выделенных от больных с АЗ, по сравнению с группой бактерионосителей без аллергической патологии. Изоляты *S. aureus*, выделенные с пораженной кожи у больных со среднетяжелой и тяжелой степенью тяжести АтД в $89,7 \pm 3,2\%$ до $98,0 \pm 2,0\%$ случаев содержат в своем геноме комбинации генов суперантиген-подобных белков, при

легкой форме АД эти гены выявляются у $67,7 \pm 6,1\%$ изолятов. У больных с проявлениями респираторной аллергии штаммы *S. aureus*, колонизирующие ВДП, также содержат в своем геноме кластеры генов, кодирующих суперантиген-подобных белки (SSL). Основной мишенью SSL белков являются факторы врожденного и адаптивного иммунного ответа, такие как белки системы комплемента человека (СКЧ), Fc-рецепторы нейтрофилов, иммуноглобулины и иммунокомпетентные клетки [209]. В некоторых работах показана значимая роль суперантиген-подобного белка (SSL7) *S. aureus* в модуляции эффектов СКЧ и мукозального иммунитета (МИ), этот мультисайтовый регуляторный бактериальный белок может связывать C5 компонент СКЧ и IgA, тем самым ингибируя СКЧ-обусловленный гемолиз и бактерицидную активность IgA [43].

Учитывая доминирование *S. aureus*, особенно при обострении АД, нами проведены исследования, направленные на определение роли генетических факторов организма человека, предрасполагающих к изменению эпидермального кожного барьера и способствующих экспансии этого вида стафилококка на различные топографические зоны пораженной и непораженной кожи. В данном случае мы оценивали значимость в этом процессе мутаций генов, кодирующих клеточные рецепторы, выполняющие сигнальную роль в иммунной системе организма, а также гена, контролирующего функцию эпидермального барьера. Изучена распространенность полиморфизмов в Toll-подобных рецепторах (TLR2- и TLR4-рецептора), которые составляют одну из групп рецепторов иммунной системы, участвующих в воспалительных ответах различных типов клеток на микробные антигены [232, 244]. Известно, что TLR2- и TLR4-рецепторы клеток участвуют в развитии врожденных и адаптивных иммунных ответов на тейхоевые кислоты, образующие клеточную стенку грамположительных бактерий. В нашей работе изучены распространенность мутаций (полиморфизмов) в генах TLR2- и TLR4-рецепторов и связь полиморфизмов с риском развития среднетяжелых и тяжелых форм АД и выраженности колонизации кожи и слизистых ВДП *S. aureus*. Проведенное ранее «изучение экспрессии TLR-рецепторов в коже при

АтД подтвердило, что TLR2-рецепторы являются специфическими рецепторами для *S. aureus*, а нарушение сигнальных функций этого рецептора может быть одним из значимых факторов, способствующих экспансии дермы видами *S. aureus*» [25]. «Установлено также, что TLR2-рецептор экспрессируется на поверхности кератиноцитов как у здоровых лиц, так и у больных с АтД, но на эпидермальных ДК его экспрессия определяется только в группе больных с АтД, с очень высоким уровнем общего IgE» [25]. Нами также показана экспрессия TLR2-рецепторов на эпителиальных клетках, полученных при исследовании назального содержимого у больных с АР, со стафилококковой колонизацией слизистой оболочки носа [83].

Нами выявлено достоверное снижение распространенности протективного генотипа GG в 1,2 раза и увеличение частоты генотипа GA (rs5743708, 2258G→A) TLR2-рецептора в 3,9 раза среди пациентов с АтД. Снижение встречаемости генотипа GG и увеличение генотипа GA является одним из значимых факторов риска АтД у пациентов с атопическим фенотипом (OR=4,7, 95% ДИ 1,7–13,0, p=0,002), а также одним из значимых факторов риска колонизации кожи патогенными *S. aureus* при АтД. Установлено, что у пациентов с АтД независимо от возрастной группы с наличием полиморфного генотипа (GA) (rs5743708, 2258G→A) TLR2-рецептора степень микробного обсеменения кожи *S. aureus* была достоверно выше в стадию обострения заболевания (p<0,05), при этом степень микробного обсеменения кожи достоверно была высокой (>5,0 Log₁₀ КОЕ/см²) как в стадии обострения, так и в ремиссии заболевания. Таким образом, повышенная колонизация биотопов кожи и слизистых оболочек у больных с атопическими заболеваниями ассоциируется с полиморфизмами (SNP) TLR2-, TLR4-рецепторов и гена SPINK5, участвующего в формировании кожно-эпителиальных защитных барьеров человека.

Установлены статистически значимая, более низкая, чем у здоровых лиц, концентрация сывороточного ИФН-γ у пациентов с АтД при выраженной колонизации кожи *S. aureus*, особенно в группе носителей гетерозиготных полиморфных генотипов (SNP: rs5743708, rs4986790) генов, кодирующих TLR2- и

TLR4-рецепторы. Таким образом, возможно, на фоне низких концентраций ИФН- γ у больных с АтД снижается стимулирующее действие цитокинов на систему макрофагов, что может обуславливать высокую восприимчивость к стафилококковому инфицированию кожи у этих пациентов, приводя к более тяжелому течению АтД. Снижение исходных концентраций этого цитокина, выявленное у больных АтД, может быть обусловлено дисбалансом в системе Th1/Th2-клеток с преобладанием Th2-активированных лимфоцитов при атопии. Генетический полиморфизм (rs5743708, 2258G \rightarrow A) гена TLR2-рецептора и (rs4986790, 896A \rightarrow G) TLR4-рецептора ассоциируется со снижением активации иммунокомпетентных клеток, что дополнительно модулирует супрессорный эффект на активацию Th1-лимфоцитов и обеспечивает подавление продукции некоторых провоспалительных Th1-цитокинов, необходимых для эффективной элиминации *S. aureus*.

У пациентов с АтД с генетическими полиморфизмами rs5743708, (2258G \rightarrow A) и rs4986790 (896A \rightarrow G) в генах TLR2- и TLR4-рецепторов соответственно нами выявлены высокие уровни Th2-клеточных активационных цитокинов (в частности ИЛ-4).

Выявленная высокая степень дисрегуляции продукции цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-17, ИЛ-1 β , ИФН- γ) у больных АтД с полиморфизмами в генах TLR2- и TLR4-рецепторов, характеризующихся гетерозиготными генотипами, может отражать дисбаланс Th1/Th2/Th17-клеток в регуляции иммунного ответа у этих пациентов, что в итоге отражается на составе локальной микробиоты кожи, а также способствует высокой степени колонизации ее *S. aureus* и грибами *Candida albicans*. Снижение как барьерной функции кожи, так и активности ее иммунных антимикробных факторов, установленное у пациентов с АтД, вызвано многочисленными генетическими мутациями, затрагивающими в том числе и гены, контролирующие синтез цитокинов и Toll-подобных рецепторов, и гены, регулирующие метаболизм важнейших белков и ферментов кожи.

В нашем исследовании была показана значимость мутации гена SPINK5, который кодирует ингибитор сериновых протеиназ и обеспечивает формирование эпидермального барьера кожи и слизистых, а также противовоспалительную и антимикробную защиту через механизм ингибирования протеиназ эпидермиса, а также интерлейкин-независимый контроль дифференцировки Th2-лимфоцитов. При полиморфном варианте rs2303067 (Glu420Lys) уровень активности SPINK5 в коже снижается. Полиморфизм rs2303067, Glu420Lys SPINK5 также ассоциирован со значимым риском формирования атопии у детей и, в частности, таких заболеваний, как АТД и АБА [228]. В нашем исследовании установлено, что Th1 цитокиновый профиль сыворотки крови у больных АТД характеризовался снижением концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-17 в группах больных с полиморфными аллелями (мутация) гена SPINK5 (rs2303067, 1258G \rightarrow A, Glu420 \rightarrow Lys), по сравнению с группой контроля и группой больных АТД с отсутствием полиморфного аллеля и генотипами GG SPINK5 (rs2303067, 1258G \rightarrow A, Glu420 \rightarrow Lys).

Таким образом, мутации (SNP) генов TLR2- (rs5743708), TLR4- (rs4986790) рецепторов и гена SPINK5 (rs2303067) ассоциируются с увеличением продукции цитокинов Т2-иммунного ответа, что может усугублять течение имеющегося АЗ и способствовать сенсibilизации к другим аллергенам.

Можно констатировать, что изменение защитных свойств кожного эпидермального барьера (КЭБ) обусловлено как генетическими факторами, способствующими экспансии *S. aureus* локальных участков пораженной кожи, так и фенотипическими проявлениями протеолитических свойств кожных штаммов.

С учетом этого нами было проведено углубленное исследование участия сериновых протеиназ и энтеротоксина А *S. aureus* в процессах сенсibilизации. Необходимо отметить, что среди распространенных аллергенов, участвующих в развитии АЗ, выделяют гликопротеины, содержащиеся не только в частицах вдыхаемого воздуха, но и в продуктах жизнедеятельности представителей микробиоты, колонизирующей кожу и слизистые оболочки, в т.ч. и ВДП.

Существенную роль в процессе сенсibilизации при АЗ могут играть протеиназы, которые могут облегчать доступ других аллергенов к АПК слизистых оболочек и кожи путем расщепления плотных соединений в эпителиальном покрове [175].

Среди таких протеолитических ферментов интерес как потенциальные аллергены представляют секретлируемые бактериальные протеиназы, прежде всего SspA (гены этого фермента распространены среди большинства штаммов стафилококков микробиоты кожи и слизистых) и протеиназы spl-оперона (один из переменных, оперонов протеиназ, который преимущественно представлен в штаммах, выделяемых от пациентов с АЗ). В ряде экспериментальных исследований было установлено, что сериновые Spl-протеиназы могут индуцировать Т2-иммунный ответ (на мышинной модели) при интратрахеальном введении, при этом показано развитие аллергического воспаления в легочной ткани и синтез в дренирующих лимфатических узлах специфических IgE и цитокинов Т2-иммунного ответа [344].

По нашим данным, при тестировании сыворотки крови, полученной от пациентов с респираторной аллергией (КАР и САР), было выявлено специфическое связывание IgE антител с белками секрета *S. aureus*, идентифицированных как Spl-протеиназы *S. aureus* [87].

С целью реализации дальнейших экспериментальных исследований нами были разработаны и получены генетические конструкции на основе экспрессионной кассеты плазмиды pASG-IBA23, позволившей осуществить экспрессию рекомбинантной формы SplA-протеиназы *Staphylococcus aureus* с С-концевой Strep-tag меткой в штаммах *E. coli*, гомогенные препараты которой сохранили свою каталитическую активность и были использованы в выявлении эффектов сенсibilизации этим ферментом у пациентов с респираторной аллергией в тестах с базофилами периферической крови и культуре мононуклеаров крови.

CD203c относится к специфическим маркерам активации базофилов человека и экспрессируется в ответ на перекрестное связывание аллергенов с FcεRI

клеточным рецептором [143]. У пациентов с АР и сочетанной респираторной аллергией (АР+АБА) воздействие на базофилы рекомбинантной rSplA-протеиназой *S. aureus* приводило к значимой активации экспрессии CD203c по сравнению с контролем ($p < 0,05$). У пациентов с респираторной аллергией (САР, КАР, САР+АБА) с титром IgE к rSplA-протеиназе более 7,0 МЕ/мл индекс активации (ИА) базофилов был в 3,0 раза выше, чем у несенсибилизированных здоровых бактерионосителей контрольной группы.

Таким образом, инкубация базофилов с рекомбинантной rSplA-протеиназой *S. aureus* (1 мкг/мл) приводила к значительной активации CD203c ($ИА \geq 2,0$) у всех пациентов с АР и сочетанной респираторной аллергией (АР+АБА) с уровнем специфических IgE ($> 5,0$ МЕ/мл) к этому ферменту по сравнению с контрольной группой. Нами также установлено, что титр специфических IgE к rSplA-протеиназе *S. aureus* при САР увеличивался в 4,3 раза у детей старше 7 лет и взрослых. У больных с КАР выявлено постепенное нарастание титра IgE к рекомбинантной SplA-протеиназе *S. aureus* с возрастом. Изучение уровня специфических IgE к рекомбинантной SplA-протеиназе *S. aureus*, а также тест активации базофилов могут использоваться для выявления дополнительной сенсибилизации у бактерионосителей *S. aureus* с респираторной формой аллергии (АБА и АР к белкам этого микроорганизма).

В тесте с МК периферической крови здоровых лиц контрольной группы, рекомбинантная SplA-протеиназа *S. aureus*, в отличие от белка А *S. aureus*, менее активно стимулировала продукцию Th1/Th17 цитокинов, чем белок А, при этом продукцию цитокинов (ИЛ-5, ИЛ-13) Т2-иммунного ответа она активировала более активно. При стимуляции рекомбинантной Spl-протеиназой МК периферической крови, полученной от больных с АР, установлена продукция преимущественно ИЛ-13, ИЛ-5, ИЛ-4, в отличие от стимуляции этих клеток белком А *S. aureus*. Таким образом, показано, что spl-протеазы как белки секрета *S. aureus* могут индуцировать у больных с АЗ дыхательных путей образование специфических IgE.

В следующей части исследования нами проведено изучение сенсibilизации пациентов с атопическим дерматитом к SspA протеиназе *S. aureus*. Учитывая, что фактически данные по уровню специфических IgE к белкам *S. aureus* у этих пациентов противоречивы [186, 225], а по данным современных исследований для больных АД характерна высокая частота развития сенсibilизации к *S. aureus* (более 50%) и формирование резистентности к топическим ГКС (в 55,0%) [22], было проведено исследование сывороток крови на определение титра IgE к SspA протеиназе *S. aureus* при разной тяжести АД, в том числе в группе лиц с осложненными формами АД. Нами выявлены высокие титры специфических IgE к SspA-протеиназе *S. aureus* у больных детей с АД (детская и младенческая форма заболевания), у больных с выраженной колонизацией кожи *S. aureus* высокая, а также показано, что после проведения противовоспалительной и антимикробной терапии происходит снижение уровня специфических антител к SspA-протеиназе *S. aureus*, что, возможно, отражает процесс санации кожных очагов и элиминацию штаммов *S. aureus*.

При КАР нами выявлена зависимость между сенсibilизацией к суперантигенам стафилококков (SEA) и локальным уровнем TSLP. Возможно, суперантигены стафилококков представляют собой один из стимулов местной гиперпродукции TSLP эпителием слизистой оболочки ВДП [92]. При КАР нами показана зависимость между локальным уровнем ГМ-КСФ и выраженностью сенсibilизации к стафилококковому энтеротоксину (SEB); возможно, стафилококковые суперантигены, в частности SEB, стимулируют синтез ГМ-КСФ Т-клетками локально. При круглогодичной форме аллергического ринита у пациентов с дополнительной высокой сенсibilизацией к SEs, в силу активации этими токсинами макрофагов, Т-клеток, наблюдается более высокий профиль продукции и TNF- α [92].

При сезонной форме аллергического ринита воспалительная реакция по времени, как правило, ограничена сезоном контакта с пыльцевыми аллергенами. При этой форме ринита выраженные нарушения микробиоты и барьерной функции

эпителия слизистой оболочки носа способствуют сенсibilизации этих больных аэроаллергенами из плесневых грибов, что подтверждает показанное нами увеличение уровня IgE к m3 компоненту *Aspergillus fumigatus*. При этом аллергены плесневых грибов могут также стимулировать продукцию эпителием TSLP цитокина [92]. Аллергены плесневых грибов при этой форме аллергического ринита могут дополнительно приводить к активации макрофагов, Т-лимфоцитов, что было подтверждено локальным повышенным уровнем TSLP и ГМ-КСФ. Нами также подтверждено существенное значение в сенсibilизации больных с круглогодичной формой аллергического ринита аллергенами микроклещей, обитающих в домашней пыли, у больных с круглогодичной формой аллергического ринита. При сенсibilизации к алергокомпонентам клещей *Dermatophagoides pteronyssinus* сохраняется активация продукции фактора ГМ-КСФ, который способен синтезировать макрофаги, эпителиальные клетки. Избирательная активация Толл-подобных рецепторов на эпителиальных клетках аллергенами бактерий, грибов и микроклещей может усиливать мобильность ДК в пределах слизистых дыхательных путей, а также их миграцию в нижние дыхательные пути, что расширяет процессинг антигенов с участием хемокинов (CCL17 и CCL22) и цитокинов (GM-CSF, TSLP) Т-2 иммунного ответа [248, 354].

Характеризуя цитокиновый профиль сыворотки крови, особенно при сезонной форме аллергического ринита, можно отметить, что иммуноопосредованная воспалительная реакция со стороны слизистых верхних дыхательных путей характеризуется более выраженной продукцией ИЛ-4. В большинстве случаев это происходит за счет селективного разнообразия Th2-лимфоцитов, которые секретируют кластер цитокинов, закодированных на хромосоме 5q31-33, включая интерлейкины ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-13 и ГМ-КСФ (колониестимулирующий фактор макрофагов гранулоцитов) [16]. При сезонной форме это можно объяснить более выраженными аллергенными свойствами пыльцы ветроопыляемых растений [92].

Таким образом, продукты жизнедеятельности штаммов *S. aureus*, заселяющих слизистые ВДП, в частности SplA-протеиназы, обладают аллергенными свойствами, вызывая IgE-опосредованную сенсibilизацию у больных с респираторными атопическими заболеваниями.

Учитывая формирующуюся сенсibilизацию к сериновым протеиназам spl- и ssp-оперона *S. aureus* локальной микробиоты, нами было проведено исследование на основе биоинформационного анализа первичной структуры данной группы бактериальных белков, которое позволило провести анализ эпитопной и белковой гомологии между SplA-, SspA-сериновыми протеиназами и другими антигенами/аллергокомпонентами клещей домашней пыли, микроорганизмов, грибов, а также тканевых антигенов человека, которые могут обуславливать перекрестную реактивность у пациентов с АЗ [332].

Результаты проведенных исследований показали высокую степень гомологии между бактериальной протеиназой SplA *S. aureus* и аллергокомпонентами Der p 4 (α -амилаза) из клещей ДП *Dermatophagoides pteronyssinus* и Der f 6 (химотрипсин) *Dermatophagoides farinae*, что может обуславливать формирование перекрестных реакций между ними. Необходимо отметить, что специфические IgE АТ к Der f 6 формируются почти у 40,0% пациентов, сенсibilизированных к клещам ДП [376]. При анализе аллергокомпонентов гомологичных SspA-протеиназе *Staphylococcus aureus* идентифицировано пять значимых аллергенов с высокой степенью гомологии (51–68%) с этим ферментом *S. aureus*. В ряду из пяти известных гомологичных аллергокомпонентов большей гомологией с SspA-протеиназой *S. aureus* характеризовался аллергокомпонент Der f 23 из клещей ДП *Dermatophagoides farinae*, по своей природе это перитрофиноподобный протеин.

Не менее интересен еще один гомологичный сериновой протеиназе *S. aureus* аллерген Der p 23 из клещей ДП *D. pteronyssinus*, он характеризуется 56,6%-й гомологией фрагмента из 53 а.о., представляет собой перитрофинподобный белковый домен и является основным аллергеном с высокой активностью, которая

коррелирует с повышенной экспрессией CD203c на базофилах у пациентов, сенсibilизированных *D. pteronyssinus* [376]. Из гомологичных SspA-протеиназе *S. aureus* растительных (пыльцевых) аэроаллергенов необходимо отметить мажорный аллерген березы Bet v 1 и аллерген амброзии Amb a 11. Почти у 95,0% сенсibilизированных пациентов с проявлениями респираторной аллергии на пыльцу березы образуются IgE АТ к Bet v 1. Аллерген амброзии Amb a 11 по природе относится к цистеиновым протеиназам и характеризуется 51,0% гомологией с SspA-протеиназой *S. aureus* в области, включающей 185 а.о. Гомологичных тканевых антигенов человека SspA- и SplA-протеиназам *S. aureus* нами в результате биоинформационного анализа белковой структуры не выявлено.

Таким образом, роль стафилококковой части микробиоты, и в частности *S. aureus*, его токсинов и протеолитических ферментов в патогенезе АЗ несомненна. При развитии и реализации «атопического» фенотипа колонизация локальных биотопов кожи и слизистых ВДП у пациентов с этими заболеваниями, штаммами *S. aureus*, с выраженным патогенным потенциалом, оказывает стимулирующее воздействие на иммунокомпетентные клетки, приводя к формированию Т2-иммунного ответа с образованием специфических IgE и развитием сенсibilизации к продуктам его жизнедеятельности, в частности к сериновым протеиназам и токсинам, при этом сами эти факторы способствуют изменению свойств эпидермальных и эпителиальных барьеров кожи и слизистых оболочек, способствуя интенсивному проникновению аллергенов и контакту иммунокомпетентных клеток с ними, что фактически формирует порочный патогенетический круг.

Отмечено, что реализация атопического фенотипа в форме АЗ в свою очередь способствует изменениям в составе микробиоты кожи и слизистых, что можно фактически определить принятыми методами микробиологического исследования по изменению встречаемости локальных культивируемых микроорганизмов, отражающих выраженный дисбаланс между комменсальными видами и потенциально патогенными. Происходит изменение и штаммовых свойств, в

частности, меняются штаммовые характеристики у доминирующих видов стафилококков, колонизирующих кожу и слизистые этих пациентов.

Существенное значение в реализации тяжести АЗ, эффективности терапии имеет не только характер взаимодействия иммунной системы организма с микробиотой и отдельными его представителями, но и мутации (полиморфизмы) в генах Толл-подобных рецепторов и в гене ингибитора протеиназ, участвующих в формировании эпидермального барьера кожи, которые могут усугублять течение заболевания на фоне изменения свойств микробиоты.

Результаты проведенных нами исследований представляют собой новые данные о важной роли *Staphylococcus aureus* в патогенезе аллергических заболеваний, раскрывают механизмы участия микробного фактора в их развитии и прогрессировании, а также открывают перспективные направления, нацеленные на совершенствование подходов к коррекции изменений микробиоты кожи и слизистых при ведении пациентов с АтД и АР.

ВЫВОДЫ

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

2. Для штаммов *S. aureus*, выделяемых с локальных биотопов кожи и слизистых оболочек верхних дыхательных путей у больных с аллергическим ринитом и атопическим дерматитом, характерно выявление в геноме «островков патогенности», кодирующих факторы вирулентности (гемолизины, эксфоликативные токсины, энтеротоксины, лейкоцидины, супераниген-подобные белки (SSL) и токсин EDIN-C), а также секретируемые протеиназы *spl*- и *scr*-оперона, что проявляется в повышенной продукции Ig-расщепляющих протеиназ и токсинов.

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

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

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

6. Мутации в генах TLR2- и TLR4-рецепторов, а также гена SPINK-5 ассоциируются с преобладанием продукции цитокинов T2-иммунного ответа, что может наряду с утяжелением основного аллергического заболевания приводить к расширению спектра сенсибилизации, в т.ч. к микробным аллергенам.

7. У больных атопическим дерматитом и аллергическим ринитом выявлена сенсибилизация к протеиназам Spl-оперона, что подтверждается обнаружением специфических IgE к SplA в сыворотке периферической крови, в тесте стимуляции базофилов периферической крови протеиназой, а также продукцией мононуклеарами периферической крови (при стимуляции SplA) преимущественно цитокинов Th2 профиля (ИЛ-13, ИЛ-5, ИЛ-4).

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При атопическом дерматите предложен к применению алгоритм выявления дисбиотических нарушений локальных биотопов кожи с включением культуральных, биохимических, масс-спектрометрических (MALDI-TOF MS) и количественных методов исследования микрофлоры локальных участков кожи, получаемой для анализа методом смыва и отпечатка в разные стадии заболевания или после проведенной топической терапии.

2. При аллергическом рините предложен к применению алгоритм выявления локального дисбиоза слизистых верхних дыхательных путей с включением культуральных, масс-спектрометрических методов исследования назальной микрофлоры в разные стадии заболевания, а также после проведения аллерген-специфической иммунной и базисной терапии с целью коррекции выявленных нарушений назальной микрофлоры.

3. Для больных с тяжелым резистентным к терапии АтД и АР с выраженными показателями бактериальной обсеменённости *S. aureus* предложено проведение скрининга на наличие генетических мутаций (полиморфизмов) в генах TLR2, TLR4 и SPINK5 – для коррекции антимикробной терапии.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АБА – атопическая бронхиальная астма
- АЗ – аллергическое заболевание
- АМП – антимикробные пептиды
- АПК – антиген презентирующая клетка
- АР – аллергический ринит
- АС-ПЦР – аллель-специфическая полимеразная цепная реакция
- АтД – атопический дерматит
- ВДП – верхние дыхательные пути
- ГКС – глюкокортикостероидные препараты
- ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- ДК – дендритная клетка
- ДП – домашняя пыль
- ИА – индекс активации
- ИЛ – интерлейкин
- ИФН – интерферон
- ИЭКРБ – иммуноэпитопный континуум родства белков
- КАР – круглогодичный аллергический ринит
- КЖ – культуральная жидкость
- КОС – коагулазоотрицательные стафилококки (коагулазонегативные)
- КЭБ – кожный эпидермальный барьер
- МИ – мукозальный иммунитет
- МК – клетки мононуклеары периферической крови
- М-ПЦР – мультипраймерная полимеразная цепная реакция
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПГ – простагландин

ПКРБ – пептидный континуум родства белков

САР – сезонный аллергический ринит

СКЧ – система комплемента человека

УК – урокановая кислота

ФЛГ – филлагрин

ФНО – фактор некроза опухоли

2D-DIGE – двумерный гель-электрофорез, при котором до трех различных образцов белка могут быть помечены флуоресцентными красителями

2D-PAGE – двумерный гель-электрофореза, где белки разделяются по двум свойствам на двумерных гелях

EDIN-C – фактор вирулентности штаммов золотистого стафилококка мишенью которого является RhoA ГТФаза

ETA – экфолиативный токсин А

ETB – эксфолиативный токсин В

FnBP – фибронектин-связывающий белок

ILC – врожденные лимфоидные клетки

KLK – калликреин

LC – клетки Лангерганса

ЛЕКТИ - лимфоэпителиальный ингибитор сериновых протеиназ

MFI – среднее значение интенсивности флуоресценции (Mean Fluorescent Intensity)

MRSA – метициллинрезистентный золотистый стафилококк

PAR2 – протеазоактивируемые рецепторы второго типа

PVL – лейкоцидин Пантона-Валентайна

SC – роговой слой кожи (stratum corneum)

SD – стандартное отклонение (показатель статистики)

SE – стафилококковый энтеротоксин

SG – зернистый слой кожи (stratum granulosum)

SNP – однонуклеотидные генетические полиморфизмы

SPINK5 – ген 5 хромосомы человека, кодирующий лимфо-эпителиальный ингибитор сериновых протеаз типа Kazal-5

SSL – суперантигено-подобный белок

TGF- β – трансформирующий фактор роста бета (transforming growth factor beta)

TJ – плотные клеточные соединения (tight junctions)

TLR-2 – Toll-подобные рецепторы второго типа

TLR-4 – Toll-подобные рецепторы четвертого типа

TLSP – тимический стромальный лимфопоэтин

YKL-40 – хитиназоподобный белок

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафонова, Е. В. Опыт изучения пищевой сенсibilизации к Bet v 1 гомологам у пациентов с аллергией на пыльцу семейства Betulaceae и клиническими проявлениями орального аллергического синдрома / Е. В. Агафонова, И. Д. Решетникова, Ю. А. Тюрин, Г. Ч. Гатина // Российский аллергологический журнал. – 2019. – Т. 16. – № 1S. – С. 13-15.
2. Арзуманян, В. Г. Дрожжевая микрофлора кожи и респираторного тракта человека при аллергических заболеваниях : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.07 / Арзуманян Вера Георгиевна. – М., 2002. – 54 с.
3. Арзуманян, В. Г. Новое в клинической лабораторной диагностике дерматофитных грибов у детей с атопическим дерматитом / В. Г. Арзуманян, И. В. Ильина, Г. В. Васильева, О. О. Магаршак, А. Ю. Миронов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64. – № 6. – С. 351-353.
4. Астафьева, Н. Г. Аллергический ринит / Н. Г. Астафьева, А. А. Баранов, Е. А. Вишнева, Н. А. Дайхес и др. // Российский аллергологический журнал. – 2022. – Т. 19. – № 1. – С. 100-141.
5. Багаутдинова, Э. Г. Роль полиморфного локуса rs3939286 гена IL33 в развитии аллергического ринита у работников аллергоопасных производств / Э. Г. Багаутдинова, Д. О. Каримов, Г. Ф. Мухаммадиева, А. У. Шагалина и др. // Иммунология. – 2016. – Т. 37. – С. 76-78.
6. База данных клинико-лабораторных характеристик пациентов с атопическим дерматитом бактерионосителей *Staphylococcus aureus* / Тюрин Ю. А. // № 2021623211. Дата гос. Регистрации в Реестре баз данных 27.12.2021.
7. Баранова, Н. И. Иммуные механизмы в патогенезе аллергических заболеваний дыхательных путей, обусловленных бактериальной сенсibilизацией, и их роль в оптимизации методов иммунотерапии : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 14.00.36 / Баранова Надежда Ивановна. – Пенза, 2009. – 39 с.

8. Баранова, Н. И. Клинические и иммунологические показатели лечебной эффективности различных видов иммунотерапии у больных аллергическими заболеваниями дыхательных путей с бактериальной сенсibilизацией / Н. И. Баранова, Б. А. Молотиллов, Е. М. Костина // Российский аллергологический журнал. – 2007. – № 4 (3). – С. 30-34.
9. Баязитова, Л. Т. Фенотипические характеристики кокковой микрофлоры кожи при атопическом дерматите / Л. Т. Баязитова, Ю. А. Тюрин, Е. О. Сукманская, С. Н. Куликов // Практическая медицина. – 2007. – № 23. – С. 41-43.
10. Баязитова, Л. Т. Вирулентные свойства стафилококковой микрофлоры кожи при атопическом дерматите : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Баязитова Ли́ра Табри́совна. – Уфа, 2009. – 24 с.
11. Баязитова, Л. Т. Эпидемиологические и микробиологические аспекты назофарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae* / Л. Т. Баязитова, А. З. Зарипова, О. Ф. Тюпкина, Т. А. Чазова, Ю.А. Тюрин, Г.Ш. Исаева // Астраханский медицинский журнал. 2022. Т. 17, № 1. С. 23-29.
12. Баязитова, Л. Т. Фенотипические особенности антибиотикорезистентности амбулаторных и госпитальный штаммов *Staphylococcus aureus* / Л. Т. Баязитова, О. Ф. Тюпкина, Т. А. Чазова, Ю. А. Тюрин, А. Ф. Шамсутдинов, И. Д. Решетникова, Н. Ю. Тюрина // Практическая медицина. – 2016. – № 5(97). – С. 25-29.
13. Белоглазов, В. А. Молекулярные механизмы роли Толл-подобных рецепторов 4-го типа и убиквитин-модифицирующего фермента А 20 в патогенезе бронхиальной астмы / В. А. Белоглазов, Б. И. Лугачев // Иммунология. – 2019. – № 1. – С. 62-67.
14. Богова, А. В. Тенденции в изучении эпидемиологии аллергических заболеваний в России за последние 10 лет / А. В. Богова, Н. И. Ильина, Л. В. Лусс // Российский аллергологический журнал. – 2008. – № 4. – С. 3-15.
15. Будихина, А. С. Роль антимикробных пептидов в патологии заболеваний верхних дыхательных путей / А. С. Будихина // Иммунология. – 2017. – № 4. – С. 234-238.

16. Быков, А. С. М-клетки один из важных компонентов в инициации иммунного ответа в кишечнике / А. С. Быков, А. В. Караулов, Д. А. Цомартова, Н. Л. Карташкина и др. // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8. – № 3. – С. 263–272.
17. Васильев, Д. А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д. А. Васильев, А. И. Калдыркаев, Н. А. Феоктистова, А. В. Алёшкин // Научное издание. – Ульяновск : НИИЦМиБ УЛГСХА им. П. А. Столыпина, 2013. – С. 51-69.
18. Гриценко, В. А. Генетический профиль *Staphylococcus aureus*, выделенных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительной патологией / В. А. Гриценко, А. Р. Мавзютов, Т. М. Пашкова, О. Л. Карташова и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 4. – С. 56-62.
19. Гусниев, С. А. Влияние экспрессии гена интерлейкина-33 на клинико-морфологические характеристики слизистой оболочки носа при аллергическом рините / С. А. Гусниев, С. А. Польшнер, Л. М. Михалева, Н. И. Ильина и др. // Иммунология. – 2021. – № 1. – С. 68-79.
20. Гуцин, И. С. Трансэпителиальный запуск аллергического ответа / И. С. Гуцин // Российский аллергологический журнал. – 2016. – № 3. – С. 3-10.
21. Гуцин, И. С. Преодоление аллергенами тканевого барьера – решающая форма предрасположения к аллергии / И. С. Гуцин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2009. – № 1. – С. 8-13.
22. Елисютина, О. Г. Определение эндотипов атопического дерматита на основании молекулярно-генетического исследования местного иммунного ответа / О. Г. Елисютина, М. Н. Болдырева, О. Ю. Реброва, Е. С. Феденко // Российский аллергологический журнал. – 2018. – № 6. – С. 33-44.
23. Елисютина, О. Г. Клинические особенности различных фенотипов атопического дерматита / О. Г. Елисютина, А. О. Литовкина, Е. В. Смольников, О. В. Штырбул и др. // Российский аллергологический журнал. – 2019. – Т. 16. – № 4. – С. 30-41.

24. Елисютина, О. Г. Особенности иммунного ответа и роль некоторых цитокинов при atopическом дерматите / О. Г. Елисютина, Е. С. Феденко, М. Н. Болдырева, Г. О. Гудима // Российский аллергологический журнал. – 2015. – Т. 12. – № 1. – С. 3-14.
25. Елисютина, О. Г. Клинические фенотипы и молекулярно-генетическая характеристика эндотипов atopического дерматита : дис. ... д-ра мед. наук : 14.03.09 / Елисютина Ольга Гурьевна. – Москва, 2019. – 287 с.
26. Заборова, В. А. Метод оценки микробиоценоза кожи у спортсменов / В. А. Заборова, В. Г. Арзуманян, Т. А. Артемьева, Л. М. Бутовченко и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2015. – № 2. – Т. 151. – С. 70-72.
27. Зарипова, Т. Н. Особенности течения бронхиальной астмы разных фенотипов / Т. Н. Зарипова, И. И. Антипова, Г. Г. Решетова // Терапевтический архив. – 2019. – Т. 91. – № 3. – С. 46-50.
28. Зарипова, А. З. IgA-протеазная активность клеточных ферментов различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей бактерионосителей / А. З. Зарипова, Ю. А. Тюрин, Л. Т. Баязитова, О. Ф. Тюпкина, Г. Ш. Исаева // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9. – № 5-6. – С. 680-686. – doi: 10,15789/2220-7619-2019-5-6-680-686.
29. Ильина, Н. И. Аллергический ринит : пособие для врачей общей практики и фармацевтов / Н. И. Ильина, Е. С. Феденко, О. М. Курбачева // Российский аллергологический журнал. – 2004. – № 3. – С. 1-12.
30. Информационно-методическое письмо: «Особенности микробиоты кожи человека при аллергической патологии» (Согласовано с МЗ РТ от 28.12.2020) / Ю. А. Тюрин, С. А. Лисовская, Г. Ш. Исаева, В. Б. Зиатдинов. – Казань, 2020. – 25 с.
31. Информационно-методическое письмо «Особенности микробного консорциума слизистых оболочек верхних дыхательных путей человека при аллергической патологии» (Согласовано с МЗ РТ от 28.12.2020) / Ю. А. Тюрин, Г. Ш. Исаева, В. Б. Зиатдинов. – Казань, 2020. – 22 с.

32. Ираклионова, Н. С. Некоторые особенности общегематологических показателей и продукции цитокинов, регулирующих воспаление, при аллергическом рините / Н. С. Ираклионова, Э. Б. Белан // Российский аллергологический журнал. – 2021. – Т. 18. – № 3. – С. 35-43.
33. Караулов, А. В. Является ли атопический дерматит фактором риска развития респираторных проявлений аллергии? / А. В. Караулов, И. В. Сидоренко, Т. В. Захаржевская // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2003. – № 3. – С. 37-41.
34. Клыкова, Т. В. Раннее выявление аллергических заболеваний среди школьников города Казани / Т. В. Клыкова, Р. С. Фассахов, И. Д. Решетникова // Практическая медицина. – 2010. – № 41. – С. 149-151.
35. Козлов, В. А. Регуляторные клетки-супрессоры в иммунопатогенезе аллергических заболеваний / В. А. Козлов, Д. В. Демина // Иммунология. – 2017. – Т. 38. – № 6. – С. 327-336.
36. Козулина, И. Е. Аллергия сегодня. Анализ новых эпидемиологических данных / И. Е. Козулина, О. М. Курбачева, Н. И. Ильина // Российский аллергологический журнал. – 2014. – Т. 11. – № 3. – С. 3-10.
37. Костина, Е. М. Специфическая и неспецифическая иммунотерапия некоторых клинико-патогенетических вариантов бронхиальной астмы : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.03.09 / Костина Елена Михайловна. – М., 2014. – 60 с.
38. Кренев, И. А. Антимикробные белки и пептиды нейтрофильных гранулоцитов как модуляторы системы комплемента / И. А. Кренев, М. Н. Берлов, Е. С. Умнякова // Иммунология. – 2021. – Т. 42. – № 4. – С. 426-433.
39. Кубанов, А. А. Атопический дерматит / А. А. Кубанов, Л. С. Намазова-Баранова, Р. М. Хайтов, Н. И. Ильина и др. // Российский аллергологический журнал. – 2021. – № 3. – С. 44-92.
40. Кудрявцева, А. В. Выделение различных видов стафилококка с пораженной кожи у детей и подростков с атопическим дерматитом / А. В. Кудрявцева, Ю. А. Саввина, О. А. Морозова // Российский аллергологический журнал. – 2015. – Т. 12.

– № 3. – С. 41-46.

41. Кудрявцева, А. В. Роль золотистого стафилококка при атопическом дерматите у детей / А. В. Кудрявцева, Л. К. Котосова, И. П. Балаболкин, В. Г. Асеева // Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского. – 2003. – № 6. – С. 32-36.

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

43. Лахтин, М. В. Кофункционирование защитных систем: мукозальный иммунитет и система комплемента человека / М. В. Лахтин, В. М. Лахтин, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин // Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal). – 2015. – № 5. – С. 113-122.

44. Лусс, Л. В. Актуальные направления и медико-социальные проблемы в клинической аллергологии: аллергены, скрытые аллергены, пищевые добавки. ГМО. Проблемы медицинские и не только / Л. В. Лусс, Н. И. Ильина // Российский аллергологический журнал. – 2018. – № 5. – С. 5-16.

45. Марданова, А. М. Новые протеиназы грамотрицательных и грамположительных бактерий: характеристика, свойства и практическое применение : дис. ... д-ра. биол. наук : 03.02.03 / А. М. Марданова. – Казань, 2020. – 263 с.

46. Макарова, С. Г. Кишечная микробиота и аллергия. Про- и пребиотики в профилактике и лечении аллергических заболеваний / С. Г. Макарова, Л. С. Намазова-Баранова, О. А. Ерешко, Д. С. Ясаков, П. Е. Садчиков // Педиатрическая фармакология. – 2019. – Т. 16. – № 1. – С. 7-18.

47. Маланичева, Т. Г. Атопический дерматит у детей, осложненный вторичной инфекцией / Т. Г. Маланичева, Л. А. Хаертдинова, С. Н. Денисова. – Казань : Медицина, 2007. – С. 123-142.

48. Методические рекомендации. Тестирование протеолитических свойств штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных от пациентов с атопическим дерматитом и аллергическим ринитом [утв. первым зам. министра

здравоохранения РТ от 21.12.2020] / Ю. А. Тюрин, Г. Ш. Исаева, В. Б. Зиятдинов, И. Д. Решетникова // Казань, 2020. – 29 с.

49. Мигачева, Н. Б. Нарушение эпидермального барьера у детей с атопическим дерматитом и его роль в развитии аллергической сенсибилизации и респираторной аллергии / Н. Б. Мигачева, А. В. Жестков, Т. И. Каганова, и др. // Российский аллергологический журнал. - 2015. - Т. 12. - №5. - С. 39-48.

50. Мокроносова, М. А. Грибы рода *Malassezia* и атопический дерматит / М. А. Мокроносова // Российский аллергологический журнал. – 2008. – Т. 5. – № 1. – С. 12-18.

51. Мокроносова, М. А. Клиническое значение IgE к *Malassezia* у детей с атопическим дерматитом / М. А. Мокроносова, Е. В. Турлапова, А. М. Глушакова, А. Н. Пампура и др. // Российский аллергологический журнал. – 2015. – Т. 12. – № 6. – С. 34-38.

52. Назарова, Е. В. Изменение климата и его воздействие на развитие аллергических заболеваний / Е. В. Назарова // Российский аллергологический журнал. – 2021. – № 4. – С. 7-18.

53. Наумкина, Е. В. Особенности микробиоты дыхательных путей при заболеваниях респираторного тракта / Е. В. Наумкина, Е. В. Матущенко, И. И. Калитина, О. А. Абросимова и др. // Бактериология. – 2017. – Т. 2. – № 3. – С. 16-20.

54. Павлова, К. С. Уход за кожей как способ восстановления микробиома у больных атопическим дерматитом / К. С. Павлова // Российский аллергологический журнал. – 2014. – Т. 11. – № 1. – С. 17-22.

55. Пат. 2373538 Российская Федерация, МПК G01N33/53, G01N33/573. Способ определения IgG-протеиназной активности / Ю. А. Тюрин, С. Н. Куликов, Р. С. Фассахов, Д. А. Долбин, Л. Т. Баязитова; заявитель и патентообладатель Государственное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Казанская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»,

Федеральное государственное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» – № 2008113407/13; заявл. 28.03.2008; опубл. 20.11.2009, Бюл. № 32.

56. Пат. 2423707 Российская Федерация, МПК G01N 33/53 (2006.01). Способ определения хитиназо-подобного белка YKL-40 в биоптатах и экскретах человека / С. Н. Куликов, Ю. А. Тюрин, Р. С. Фассахов; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора» – № 2009125104/15; заявл. 30.06.2009; опубл. 10.07.2011, Бюл. № 19.

57. Пат. 2426126 Российская Федерация, МПК G01N 33/53, G01N 33/573, G01N 33/543. Способ определения IgA-протеиназной активности / Ю. А. Тюрин, Р. С. Фассахов, И. Г. Мустафин, Л. Т. Баязитова; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора – № 2010121805/10; заявл. 28.05.2010; опубл. 10.08.2011, Бюл. № 22.

58. Пат. 2510026 Российская Федерация, МПК G01N 33/533 (2006.01). Способ определения протеолитической модификации клеточных рецепторов на модели выделенных лимфоцитов периферической крови / Ю. А. Тюрин, И. Г. Мустафин, Р. С. Фассахов; заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации – № 2012130109/15; заявл. 16.07.2012; опубл. 20.03.2014, Бюл. № 8.

59. Пат. 2532225 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68, C12Q 1/02, C12N 15/00, C12N 15/11. Способ идентификации генов стафилококковых экзотоксинов, с высокой структурной гомологией с суперантигенами, методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления / Ю. А.

Тюрин, Р. С. Фассахов; заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – № 2013121634/10; заявл. 07.05.2013; опубл. 27.10.2014, Бюл. № 30.

60. Пат. 2519071 Российская Федерация, МПК G01N33/573, G01N33/543. Высокочувствительный способ определения иммуноглобулин-протеиназной активности с использованием полимерных матриц / С. Н. Куликов, Д. А. Долбин, Ю. А. Тюрин, Р. М. Хайруллин, Р. С. Фассахов; заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, С. Н. Куликов, Р. С. Фассахов – № 2013117773/15; заявл. 17.04.2013; опубл. 10.06.2014, Бюл. № 16.

61. Петрова, С. Ю. Современная концепция патогенеза атопических заболеваний / С. Ю. Петрова, С. В. Хлгатын, В. М. Бержец, О. В. Радикова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2019. – № 1. – С. 72-79.

62. Петрунин, Д. Д. Микробиом человеческой кожи - иммуногемеостатическая роль и роль в патогенезе кожных болезней / Д. Д. Петрунин // Российский аллергологический журнал. – 2018. – Т. 15. – № 1. – С. 63-81.

63. Прияткин, Р. Г. Секретируемые белки *Staphylococcus aureus* / Р. Г. Прияткин, О. М. Кузменко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 4. – С. 118-124.

64. Просекова, Е. В. Структура цитокинового профиля назального секрета при аллергическом рините у детей / Е. В. Просекова, С. Ю. Нетесова, Н. Р. Забелина, В. А. Сабыныч // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2014. – № 1. – С. 38-41.

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

66. Сергеев, А. Ю. Атопический дерматит: от патогенеза к диагностике / А. Ю. Сергеев, Ю. В. Сергеев, А. В. Караулов, Е. В. Кудрявцева // Практическая пульмонология. – 2003. – № 4. – С. 35-39.
67. Скрыбин, Ю. П. Молекулярная характеристика штаммов *Staphylococcus aureus*, возбудителей токсикоинфекций, изолированных в разных регионах России : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03 / Скрыбин Юрий Павлович. – Оболенск, 2021. – 24 с.
68. Степанов, А. С. Новые возможности для идентификации и типирования *Staphylococcus spp.* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии / А. С. Степанов, Н. В. Васильева // Инфекция и иммунитет. - 2018. – Т. 8. – № 4. – С. 489-496.
69. Сизякина, Л. П. Иммунорегуляторные механизмы прогрессии сезонного аллергического ринита / Л. П. Сизякина, И. И. Андреева, Н. И. Семенова // Иммунология. – 2018. – Т. 39. – № 5-6. – С. 276-281.
70. Силина, Л. В. Структура, функции и значение микробиома кожи в норме и при патологических состояниях / Л. В. Силина, Т. В. Бибичева, Н. И. Мятенко, И. В. Переверзева // Русский медицинский журнал. – 2018. – № 8(II). – С. 92-96.
71. Смирнова, Г. И. Диагностика и лечение осложненных форм атопического дерматита у детей / Г. И. Смирнова // Российский аллергологический журнал. – 2014. – Т. 11. – № 2. – С. 59-66.
72. Тамразова, О. Б. Изменённый микробиом кожи – важнейший признак атопического дерматита / О. Б. Тамразова, Е. А. Глухова, А. В. Тамразова, Н. Ф. Дубовец // Российский аллергологический журнал. – 2021. – Т. 18. – № 4. – С. 107-115.
73. Татаурщикова, Н. С. Ключевые цитокины в клинико-иммунологической картине фенотипов аллергического ринита / Н. С. Татаурщикова // Аллергология и иммунология. – 2018. – Том 19. – № 2. – С. 96-99.
74. Тихомиров, Т. А. Альтернативный подход к топической терапии атопического дерматита, осложненного стафилококковой инфекцией / Т. А. Тихомиров, Н. И. Федорова, И. Р. Баскакова, А. А. Тихомиров и др. //

Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2018. – № 2. – С. 6-14.

75. Тренева, М. С. Динамика снижения чувствительности *Staphylococcus aureus* к антибактериальным препаратам у детей с атопическим дерматитом / М. С. Тренева, А. Н. Пампура, З. В. Запорожцева // Российский аллергологический журнал. – 2011. – № 3. – С. 37-40.

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

77. Тюрин, Ю. А. Роль бактериальных суперантигенов и плесневых грибов при различных формах аллергического ринита / Ю. А. Тюрин, Е. В. Агафонова, А.А. Шарифуллина // Материалы XI съезда ВНПОЭМП, Москва, 16–17 ноября 2017 года // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Приложение № S. – С. 306.

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

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

80. Тюрин, Ю. А. Протеолитические ферменты и белковые токсины золотистого стафилококка в патогенезе аллергических заболеваний человека / Ю. А. Тюрин, Л. Т. Баязитова, Р. З. Хайруллин. – Казань: [б. и.], 2016. – 114 с.

81. Тюрин, Ю. А., Микрофлора поражённой кожи у больных атопическим дерматитом с сенсибилизацией к консервативным эпитопам стафилококкового

энтеротоксина А (SEA) / Ю. А. Тюрин, Г. Ш. Исаева, Т. В. Григорьева, А. А. Ризванов // Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения : сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Под ред. д.м.н., проф. Е. И. Ефимова. – Н. Новгород : Ремедиум Приволжье, 2019. – С. 273-276.

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

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

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

85. Тюрин, Ю. А. Микробный состав различных участков кожи при развитии atopического дерматита по данным метода MALDI-TOF масс-спектрометрической идентификации / Ю. А. Тюрин, Р. С. Фассахов, Т. В. Григорьева, И. Г. Мустафин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 2. – С. 30-36.

86. Тюрин, Ю. А. Особенности микробиоты кожи у детей при atopическом дерматите / Ю. А. Тюрин, Г. Ш. Исаева, С. А. Лисовская // Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы. Сборник научных

трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 100-летию академика И. Н. Блохиной. Под ред. д.м.н., Н. Н. Зайцевой. – Н. Новгород : Медиаль, 2021. – С. 352-355.

87. Тюрин, Ю. А. Стимулирующая роль SplA-протеиназы *Staphylococcus aureus* в развитии аллергического типа иммунных реакций у бактерионосителей с аллергическим ринитом / Ю. А. Тюрин, Г. Ш. Исаева, Р. З. Хайруллин, А. А. Шарифуллина // Астраханский медицинский журнал. – 2020. – Т. 15. – № 4. – С. 89-97.

88. Тюрин, Ю. А. Хитиназоподобный белок YKL-40 назального секрета как потенциальный биомаркер при персистирующем аллергическом рините / Ю. А. Тюрин, Е. О. Сукманская, С. Н. Куликов, Р. С. Фассахов // Российский аллергологический журнал. – 2012. – № 4. – С. 13-17.

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

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

91. Тюрин, Ю.А. Изучение полиморфизма однонуклеотидных фрагментов аутогена металлзависимой протеазы штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных с кожи больных атопическим дерматитом / Ю. А. Тюрин, А. Ф. Шамсутдинов, Р. С. Фассахов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2014. – № 1. – С. 5-7.

92. Тюрин, Ю. А. Клинико-иммунологические особенности пациентов с различными формами аллергических ринитов при сенсibilизации микробными, бытовыми и пыльцевыми аллергенами / Ю. А. Тюрин, И. Д. Решетникова, А. А. Шарифуллина, Е. В. Агафонова и др. // Практическая медицина. – 2018. – Т. 16. –

№ 6. – С. 211-217.

93. Тюрин, Ю. А. Масс-спектрометрическая идентификация стафилококковых пептид-гидролаз / Ю. А. Тюрин, Р. З. Хайруллин, И. И. Салафутдинов // Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18. – № 16. – С. 287-290.

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

95. Тюрин, Ю. А. Природная устойчивость бактерий к факторам врождённой иммунной системы, обусловленная бактериальными протеазами / Ю. А. Тюрин, И. Г. Мустафин, Р. С. Фассахов // Практическая медицина. – 2010. – № 1 (40). – С. 7-14.

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

97. Фассахов, Р. С. Полиморфизм Toll-подобных клеточных рецепторов TLR2 и TLR4 и уровень цитокинов у больных атопическим дерматитом / Р. С. Фассахов, Ю. А. Тюрин, И.Д. Решетникова, Е.В. Агафонова и др. // Российский аллергологический журнал. – 2017. – Т. 14. – № 1S. – С. 151-152.

98. Феденко, Е. С. Тяжелый атопический дерматит: трудности лечения / Е. С. Феденко, О. Г. Елисютина, О. В. Штырбул // Российский аллергологический журнал. – 2012. – Т. 9. – № 4. – С. 33-38.

99. Федеральные клинические рекомендации «Аллергология» [утв. 23.12.2013] [Электронный ресурс] – М. : Фармарус Принт Медиа. – Режим доступа: http://www.nrcii.ru/docs/allerg_klinrek.pdf.

100. Федосенко, С. В. Особенности орофарингеальной микробиоты у больных бронхиальной астмой в зависимости от тяжести заболевания и уровня контроля / С. В. Федосенко, Л. М. Огородова, А. С. Попенко, В. А. Петров и др. // Российский аллергологический журнал. – 2015. – Т. 12. – № 2. – С. 29-36.

101. Хаитов, М. Р. ARIA 2019: алгоритмы оказания помощи при аллергическом рините в России / М. Р. Хаитов, Л. С. Намазова-Баранова, Н. И. Ильина, О. М. Курбачёва и др. // Российский аллергологический журнал. – 2020. – № 1. – С. 7-22.
102. Харсеева, Г. Г. Методы идентификации *Corynebacterium non diphtheriae* / Г. Г. Харсеева, Н. А. Воронина, А. Ю. Миронов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61. – № 4. – С. 245-249.
103. Харченко, Е. П. Иммуноэпитопный континуум родства белков и полиреактивность и аутореактивность антител / Е. П. Харченко // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. – № 4. – С. 335-346.
104. Шамсутдинов, А. Ф. Распространённость токсигенных штаммов *Staphylococcus aureus* при атопическом дерматите / А. Ф. Шамсутдинов, Ю. А. Тюрин, Л. Т. Баязитова, А. А. Ризванов, и др. // Практическая медицина. – 2016. – № 3 (95). – С. 68-72.
105. Шамсутдинов, А. Ф. Белковые токсины *Staphylococcus aureus* / А. Ф. Шамсутдинов, Ю. А. Тюрин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 2. – С. 113-120.
106. Шамсутдинов, А. Ф. Распространённость мобильных генетических элементов SCC mec-типа у штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных с кожи и слизистых пациентов с аллергической патологией / А. Ф. Шамсутдинов, А. А. Тойменцева, Ю. А. Тюрин, Л. Т. Баязитова // Гены и клетки. – 2014. – Т. 9. – № 3-2. – С. 284-288.
107. Шарифуллина, А. А. Микробиоценозы полости носа у детей с различными вариантами аллергического ринита и подходы к терапии : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.36, 03.00.07 / Казан. гос. мед. акад. – Уфа, 2007. – 21 с.
108. Щубелко, Р. В. Мукозальный иммунитет верхних дыхательных путей / Р. В. Щубелко, И. Н. Зуйкова, А. Е. Шульженко // Иммунология. – 2018. – Т. 39. – № 1. – С. 81-88.
109. Щурок, И. Н. Диагностика фенотипов аллергического ринита / И. Н. Щурок, Д. К. Новиков // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2018. – № 3. –

С. 69-77.

110. Юнкеров, В. И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований, 3-е изд., доп. / В. И. Юнкеров, С. Г. Григорьев, М. В. Резванцев. – СПб. : ВМедА, 2011. – С. 41-80.

111. Яруллина, Д. Р. Бактерии рода *Lactobacillus*: общая характеристика и методы работы с ними : учебно-методическое пособие / Д. Р. Яруллина, Р. Ф. Фахруллин. – Казань : Казанский университет, 2014 – С. 32-47.

112. Abdurrahman, G. Allergy a new role for T cell superantigens of *Staphylococcus aureus*? / G. Abdurrahman, F. Schmiedeke, C. Bachert, B. M. Bröker, S. Holtfreter // *Toxins (Basel)*. – 2020. – Vol. 12(3). – P. 176.

113. Abraham, S. N. The nature of immune responses to urinary tract infections / S. N. Abraham, Y. Miao // *Na Rev Immunol*. – 2015. – Vol. 15. – № 10. – P. 655-663.

114. Abu-Humaidan, A. H., Elvén M., Sonesson A., Garred P., Sørensen O. E. Persistent intracellular *Staphylococcus aureus* in keratinocytes lead to activation of the complement system with subsequent reduction in the intracellular bacterial load // *Front Immunol*. – 2018. – № 1 (9). – P. 396.

115. Al-Ghazzewi, F. H. Impact of prebiotics and probiotics on skin health / F. H. Al-Ghazzewi, R. F. Tester // *Benefic Microbes*. – 2014. – № 5. – P. 99-107.

116. Amagai, M. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1 / M. Amagai, N. Matsuyoshi, Z. H. Wang, C. Andl, J. R. Stanley // *Nat Med*. – 2000. – Vol. 6. – № 11. – P. 1275-7.

117. Anderson, A. E. Seasonal changes in suppressive capacity of CD4+ CD25+ T cells from patients with hayfever are allergen-specific and may result in part from expansion of effector T cells among the CD25+ population / A. E. Anderson, K. J. Mackerness, M. Aizen, V. A. Carr, et al. // *Clin Exp Allergy*. – 2009. – Vol. 39. – № 11. – P. 1693-1699.

118. Ant, K. Global map of the prevalence of symptoms of rhino-conjunctivitis in children. The International study of asthma and allergies in childhood ISAAC phase three / K. Ant, N. Pearce, H. R. Anderson, P. Ellwood, et al. // *Allergy*. – 2009. – Vol. 64. – P. 123-148.

119. Arbour, N. C. TLR4 mutations are associated with endotoxin hypo responsiveness in humans / N. C. Arbour, E. Lorenz, B. C. Schutte, et al. // *Nat Genet.* – 2000. – Vol. 25. – P. 187-190.

120. Argemi, X. Coagulase-negative Staphylococci pathogenomics / X. Argemi, Y. Hansmann, K. Prola, G. Prévost // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 11. – № 20(5). – P. 1215.

121. Askarian, F. The interaction between *Staphylococcus aureus* SdrD and desmoglein 1 is important for adhesion to host cells / F. Askarian, C. Ajayi, A. M. Hanssen, N. M. van Sorge, et al. // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 29. – № 6. – P. 22134.

122. Balaji, H. *Malassezia sympodialis* thioredoxin-specific T cells are highly cross-reactive to human thioredoxin in atopic dermatitis / H. Balaji, A. Heratizadeh, K. Wichmann, M. Niebuhr, R. Cramer // *J Allergy Clin Immunol.* – 2011. – Vol. 128. – P. 92–99.

123. Balenga, N. A. A fungal protease allergen provokes airway hyper-responsiveness in asthma / N. A. Balenga, M. Klichinsky, Z. Xie, E. C. Chan, et al. // *Nat. Commun.* – 2015. – № 6. – P. 6763.

124. Balma-Mena, A. Colonization with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with atopic dermatitis: a cross-sectional study / A. Balma-Mena, I. Lara-Corrales, J. Zeller, S. Richardson, et al. // *Int J Dermatol.* – 2011. – Vol. 50. – № 6. – P. 682-688.

125. Banfield, G. CC chemokine receptor 4 (CCR4) in human allergen-induced late nasal responses / G. Banfield, H. Watanabe, G. Scadding, M. R. Jacobson, et al. // *Allergy.* – 2010. – Vol. 65. – № 9. – P. 1126-1133.

126. Bastos, M. C. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications / M. C. Bastos, H. Ceotto, M. L. Coelho, J. S. Nascimento // *Curr Pharm Biotechnol.* – 2009. – Vol. 10. – P. 38-61.

127. Baur, S. A nasal epithelial receptor for *Staphylococcus aureus* WTA governs adhesion to epithelial cells and modulates nasal colonization / S. Baur, M. Rautenberg, M. Faulstich, T. Grau, Y. Severin, C. Unger, W. H. Hoffmann, T. Rudel, I. B. Autenrieth, C. Weidenmaier // *PLoS Pathog.* – 2014. – Vol. 1. – № 10(5). – e1004089.

128. Beck, K. Innate Lymphoid Cells: important regulators of host-bacteria interaction for border defense / K. Beck, H. Ohno, N. Satoh-Takayama // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – № 9. – P. 1342.

129. Becker, K. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens / K. Becker, A. W. Friedrich, G. Lubritz, M. Weilert, et al. // *J Clin Microbiol*. – 2003. – Vol. 41(4). – P. 1434-1439.

130. Begon, E. Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin / E. Begon, L. Michel, B. Flageul, I. Beaudoin, et al. // *Eur J Dermatol*. – 2007. – Vol. 17. – № 6. – P. 497-506.

131. Belkaid, Y. The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity / Y. Belkaid, S. Tamoutounour // *Nat. Rev. Immunol*. – 2016. – Vol. 16. – P. 353-366.

132. Belluzo, B. S. An experiment-informed signal transduction model for the role of the *Staphylococcus aureus* MecR1 protein in β -lactam resistance / B. S. Belluzo, L. A. Abriata, E. Giannini, D. Mihovilcevic, et al. // *Sci Rep*. – 2019. – Vol. 20. – № 9(1). – P. 19558.

133. Bettelli, E. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells / E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, et al. // *Nature*. – 2006. – Vol. 11. – № 441(7090). – P. 235-238.

134. Bien, J. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response / J. Bien, O. Sokolova, P. Bozko // *J Pathog*. – 2011. – P. 601905.

135. Biesbroek, G. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children / G. Biesbroek, E. Tsvitivadze, E. A. M. Sanders, R. Montijn, et al. // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2014. – Vol. 190. – P. 1283-1292.

136. Bloomfield, S. F. Time to abandon the hygiene hypothesis: new perspectives on

allergic disease, the human microbiome, infectious disease prevention and the role of targeted hygiene / S. F. Bloomfield, G. A. Rook, E. A. Scott, F. Shanahan, et al. // *Perspect Public Health*. – 2016. – Vol. 136(4). – P. 213-224.

137. Bonar, E. Identification of secreted exoproteome fingerprints of highly-virulent and non-virulent *Staphylococcus aureus* strains / E. Bonar, I. Wojcik, U. Jankowska, S. Kedracka-Krok, et al. // *Front Cell Infect Microbiol*. – 2016. – Vol. 6. – P. 51-56.

138. Boss, R. Bovine *Staphylococcus aureus*: subtyping, evolution, and zoonotic transfer / R. Boss, A. Cosandey, M. Luini, K. Artursson, et al. // *J Dairy Sci*. – 2016. – Vol. 99. – № 1. – P. 515-528

139. Brattsand, M. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum / M. Brattsand, K. Stefansson, C. Lundh, Y. Haasum, T. Egelrud // *J Invest Dermatol*. – 2005. – Vol. 124. – № 1. – P. 198-203.

140. Bröker, B. M. Immune control of *Staphylococcus aureus* – regulation and counter-regulation of the adaptive immune response / B. M. Bröker, S. Holtfreter, I. Bekeredjian-Ding // *Int J Med Microbiol*. – 2014. – Vol. 304. – № 2. – P. 204-214.

141. Brown, S. J. Eczema genetics: current state of knowledge and future goals / S. J. Brown, W. H. McLean // *J Invest Dermatol*. – 2009. – Vol. 129. – № 3. – P. 543-552.

142. Brunner, P. M. Councilors of the International Eczema Council. Increasing comorbidities suggest that atopic dermatitis is a systemic disorder / P. M. Brunner, J. I. Silverberg, E. Guttman-Yassky, A. S. Paller, et al. // *J Invest Dermatol*. – 2017. – Vol. 137. – № 1. – P. 18-25.

143. Bühring, H. J. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 / H. J. Bühring, M. Seiffert, C. Giesert, A. Marxer, et al. // *Blood*. – 2001. – Vol. 15. – № 97(10). – P. 3303-3305.

144. Bühring, H. J. The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis / H. J. Bühring, A. Streble, P. Valent // *Int Arch Allergy Immunol*. – 2004. – Vol. 133(4). – P. 317-329.

145. Bukowski, M. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus* / M. Bukowski, B.

Wladyka, G. Dubin // *Toxins (Basel)*. – 2010. – Vol. 2(5). – P. 1148-1165.

146. Bustamante, J. El polimorfismo R753Q del toll-like receptor 2 se asocia a un aumento en el riesgo de sufrir endocarditis infecciosa [Toll-like receptor 2 R753Q polymorphisms are associated with an increased risk of infective endocarditis] / J. Bustamante, E. Tamayo, S. Flórez, J. J. Telleria, et al. // *Rev Esp Cardiol*. – 2011. – Vol. 64. – № 11. – P. 1056-1059.

147. Byrd, A. L. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis / A. L. Byrd, C. Deming, S. K. B. Cassidy, O. J. Harrison, et al. // *Sci Transl Med*. – 2017. – Vol. 5. – № 9(397). – P. eaal4651.

148. Cafarchia, C. Advances in the identification of Malassezia / C. Cafarchia, R. B. Gasser, L. A. Figueredo, M. S. Latrofa, et al. // *Mol Cell Probes*. – 2011. – Vol. 25. – № 1. – P. 1-7. – doi: 10,1016/j.mcp.2010,12.003.

149. Calander, A. M. Impact of staphylococcal protease expression on the outcome of infectious arthritis / A. M. Calander, I. M. Jonsson, A. Kanth, S. Arvidsson, et al. // *Microbes Infect*. – 2004. – Vol. 6(2). – P. 202-206.

150. Camarinha-Silva, A. Comparing the anterior nares bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing / A. Camarinha-Silva, R. Jáuregui, D. Chaves-Moreno, A. P. A. Oxley, et al. // *Environ Microbiol*. – 2014. – Vol. 16. – P. 2939-2952.

151. Camarinha-Silva, A. The temporal dynamics of bacterial communities across human anterior nares / A. Camarinha-Silva, R. Jauregui, D. H. Pieper, M. L. Wos-Oxley // *Environ. Microbiol. Rep*. – 2012. – Vol. 4. – P. 126-132.

152. Celebi Sözener, Z. Environmental factors in epithelial barrier dysfunction / Z. Celebi Sözener, L. Cevhertas, K. Nadeau, M. Akdis, et al. // *J Allergy Clin Immunol*. – 2020. – Vol. 145. – № 6. – P.1517-1528.

153. Cho, S. H. Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of Staphylococcus aureus to atopic skin / S. H. Cho, I. Strickland, M. Boguniewicz, D. Y. Leung // *J Allergy Clin Immunol*. – 2001. – Vol. 108. – № 2. – P. 269-274.

154. Choi, G. S. Vascular endothelial growth factor in allergen-induced nasal

inflammation / G. S. Choi, H. J. Park, G. Y. Hur, S. J. Choi, et al. // *Clin Exp Allergy*. – 2009. – Vol. 39. – № 5. – P. 655-661.

155. Chou, H. Alkaline serine proteinase is a major allergen of *Aspergillus flavus*, a prevalent airborne *Aspergillus* species in the Taipei area / H. Chou, W. L. Lin, M. F. Tam, S. R. Wang, et al. // *Int Arch Allergy Immunol*. – 1999. – Vol. 119(4). – P. 282-290.

156. Chu, D. K. IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization / D. K. Chu, A. Llop-Guevara, T. D. Walker, K. Flader, et al. // *J Allergy Clin Immunol*. – 2013. – Vol. 131. – № 1. – P. 187-200, e1-8.

157. Chung, K. F. Airway microbial dysbiosis in asthmatic patients: a target for prevention and treatment? / K. F. Chung // *J Allergy Clin Immunol*. – 2017. – Vol. 139(4). – P. 1071-1081.

158. Cogen, A. L. Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin / A. L. Cogen, K. Yamasaki, K. M. Sanchez, R. A. Dorschner, et al. // *J Invest Dermatol*. – 2010. – Vol. 130(1). – P. 192-200.

159. Cornelissen, C. IL-31 regulates differentiation and filaggrin expression in human organotypic skin models / C. Cornelissen, Y. Marquardt, K. Czaja, J. Wenzel, et al. // *J Allergy Clin Immunol*. – 2012. – Vol. 129. – № 2. – P. 426-33, 433.e1-8.

160. Coulter, S. N. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments / S. N. Coulter, W. R. Schwan, E. Y. Ng, M. H. Langhorne, et al. // *Mol Microbiol*. – 1998. – Vol. 30. – № 2. – P. 393-404.

161. Creticos, P. Peptide leukotriene release after antigen challenge in patients sensitive to ragweed / P. Creticos, S. Peters, N. Adkinson, R. Naclerio, et al. // *N Engl J Med*. – 1984. – Vol. 310. – P. 1626-1630.

162. Cryer, J., Schipor I., Perloff J. R., Palmer J. N. Evidence of bacterial biofilms in human chronic sinusitis // *ORL J Otorhinolaryngology Relat Spec*. – 2004. – № 66(3). – P. 155-8.

163. Czarnowicki, T. Skin-homing and systemic T-cell subsets show higher activation in atopic dermatitis versus psoriasis / T. Czarnowicki, D. Malajian, A. Shemer, J. Fuentes-

Duculan, et. al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2015. – Vol. 136. – № 1. – P. 208-211.

164. Davis, M. F. Growing concerns with *Staphylococcus aureus* and asthma: new territory for an old foe? / M. F. Davis, M. C. McCormack, E. C. Matsui // *J Allergy Clin Immunol Pract.* – 2019. – Vol. 7(2). – P. 616-617.

165. de Steenhuijsen Piters, W. A. Dysbiosis of upper respiratory tract microbiota in elderly pneumonia patients / W. A. de Steenhuijsen Piters, E. G. Huijskens, A. L. Wyllie, G. Biesbroek, et al. // *ISME J.* – 2016. – Vol. 10. – № 1. – P. 97-108.

166. Deraison, C. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction / C. Deraison, C. Bonnart, F. Lopez, C. Besson, et al. // *Mol Biol Cell.* – 2007. – Vol. 18. – № 9. – P. 3607-3619.

167. Di, W. L. A heterozygous null mutation combined with the G1258A polymorphism of *SPINK5* causes impaired LEKTI function and abnormal expression of skin barrier proteins / W. L. Di, R. C. Hennekam, R. E. Callard, J. I. Harper // *Br J Dermatol.* – 2009. – Vol. 161. – № 2. – P. 404-412.

168. Dominguez-Bello, M. G. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns / M. G. Dominguez-Bello, E. K. Costello, M. Contreras, M. Magris, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – Vol. 107. – P. 11971-11975.

169. Drake, D. R. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface / D. R. Drake, K. A. Brogden, D. V. Dawson, P. W. Wertz // *J Lipid Res.* – 2008. – Vol. 49. – P. 4-11.

170. Durham, S. R. Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia / S. R. Durham, S. Ying, V. A. Varney, M. R. Jacobson, et al. // *J Immunol.* – 1992. – Vol. 148. – № 8. – P. 2390-2394.

171. Dzoro, S. House dust mites as potential carriers for IgE sensitization to bacterial antigens / S. Dzoro, I. Mittermann, Y. Resch-Marat, S. Vrtala, et al. // *Allergy.* – 2018. – Vol. 73(1). – P. 115-124.

172. Egawa, G. Barrier dysfunction in the skin allergy / G. Egawa, K. Kabashima //

Allergol Int. – 2018. – Vol. 67. – № 1. – P. 3-11.

173. Egert, M. The microbiota of the human skin / M. Egert, R. Simmering // Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – Vol. 902. – P. 61-81.

174. Eifan, A. O. Reduced T-bet in addition to enhanced STAT6 and GATA3 expressing T cells contribute to human allergen-induced late responses / A. O. Eifan, K. Furukido, A. Dumitru, M. R. Jacobson, et al. // Clin Exp Allergy. – 2012. – Vol. 42. – № 6. – P. 891-900.

175. Eifan, A. O. Pathogenesis of rhinitis / A. O. Eifan, S. R. Durham // Clin Exp Allergy. – 2016. – Vol. 46. – № 9. – P. 1139-1151.

176. El-Helou, O. Functional assessment of Toll-like receptor 2 and its relevance in patients with Staphylococcus aureus infection of joint prosthesis / O. El-Helou, E. F. Berbari, R. A. Brown, J. H. Gralewski, et al. // Hum Immunol. – 2011. – Vol. 72. – № 1. – P. 47-53.

177. Expression and purification of proteins using Strep-tag and/or 6xHistidine-tag. A comprehensive manual – 2005, Version PR02–0007. P. 62 // IBA, BioTagnology, Headquarters IBA, IBA GmbH, Rudolf-Wissell-Str. 28, Göttingen, Germany.

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

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

180. Feng, Y. Streptococcus suis enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface / Y. Feng, X. Pan, W. Sun, C. Wang, H. Zhang, et al. // J Infect Dis. – 2009. – Vol. 200. – № 10. – P. 1583-1592.

181. Feng, Z. Epithelial innate immune response to Acinetobacter baumannii challenge / Z. Feng // Infect. Immun. – 2014. – Vol. 82. – P. 4458–4465.

182. Findley, K. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin / K. Findley, J. Oh, J. Yang, S. Conlan, C. Deming, J. A. Meyer, D. Schoenfeld, E.

Nomicos, M. Park // *Nature*. – 2013. – Vol. 20. – № 498(7454). – P. 367-370.

183. Fitzgerald, J. R. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the Staphylococcal exotoxin-like family of proteins / J. R. Fitzgerald, S. D. Reid, E. Ruotsalainen, T. J. Tripp, M. Liu, et al. // *Infect Immun*. – 2003. – Vol. 71. – № 5. – P. 2827-2838.

184. Fowler, T. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins / T. Fowler, E. R. Wann, D. Joh, S. Johansson, et al. // *Eur J Cell Biol*. – 2000. – Vol. 79. – № 10. – P. 672-679.

185. Franceschi, C. Inflammaging: an evolutionary perspective on immunosenescence / C. Franceschi, M. Bonafè, S. Valensin, F. Olivieri, M. De Luca, et al. // *Ann N Y Acad Sci*. – 2006. – Vol. 908. – P. 244-254.

186. Friedman, S. J. IgE antibodies to *Staphylococcus aureus*. Prevalence in patients with atopic dermatitis / S. J. Friedman, A. L. Schroeter, H. A. Homburger // *Arch Dermatol*. – 1985. – Vol. 121. – P. 869-872.

187. Fung, T. C. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease / T. C. Fung, C. A. Olson, E. Y. Hsiao // *Nat Neurosci*. – 2017. – Vol. 20. – P. 145-155.

188. Gariboldi, S. Low molecular weight hyaluronic acid increases the self-defense of skin epithelium by induction of beta-defensin 2 via TLR2 and TLR4 / S. Gariboldi, M. Palazzo, L. Zanobbio, S. Selleri, M. Sommariva, et al. // *J Immunol*. – 2008. – Vol. 181. – № 3. – P. 2103-2110.

189. Genuneit, J. Overview of systematic reviews in allergy epidemiology / J. Genuneit, A. M. Seibold, C. J. Apfelbacher, G. N. Konstantinou, et al. Task Force 'Overview of Systematic Reviews in Allergy Epidemiology (OSRAE)' of the EAACI Interest Group on Epidemiology // *Allergy*. – 2017. – Vol. 72. – P. 849-856/

190. Gollwitzer, E. S. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1 / E. S. Gollwitzer, S. Saglani, A. Trompette, K. Yadava, R. Sherburn, et al. // *Nat. Med*. – 2014. – Vol. 20. – P. 642-647.

191. Golonka, E. Genetic characterization of staphopain genes in *Staphylococcus aureus* / E. Golonka, R. Filipek, A. Sabat, A. Sinczak, J. Potempa // *Biol Chem.* – 2004. – Vol. 385. – P. 1059-67.
192. Gould, H. J. IgE in allergy and asthma today / H. J. Gould, B. J. Sutton // *Nat Rev Immunol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 205-217.
193. Graham-Rowe, D. When allergies go west / D. Graham-Rowe // *Nature.* – 2011. – Vol. 479. – S2-S4.
194. Grice, E. A. The skin microbiome / E. A. Grice, J. A. Segre // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2011. – Vol. 9(4). – P. 244-253.
195. Gygi, S. P. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology / S. P. Gygi, G. L. Corthals, Y. Zhang, Y. Rochon, R. Aebersold // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2000. – Vol. 97. – № 17. – P. 9390-9395.
196. Hachem, J. P. Sustained serine proteases activity by prolonged increase in pH leads to degradation of lipid processing enzymes and profound alterations of barrier function and stratum corneum integrity / J. P. Hachem, M. Q. Man, D. Crumrine, Y. Uchida, B. E. Brown, et al. // *J Invest Dermatol.* – 2005. – Vol. 125. – № 3. – P. 510-520.
197. Hallstrand, T. S. Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation / T. S. Hallstrand, T. L. Hackett, W. A. Altemeier, G. Matute-Bello, et al. // *Clin. Immunol.* – 2014. – Vol. 151. – P. 1-15.
198. Hammad, H. House dust mite allergen induces asthma via Toll like receptor 4 triggering of airway structural cells / H. Hammad, M. Chieppa, F. Perros, M. A. Willart, et al. // *Nat Med.* – 2009. – Vol. 15. – № 4. – P. 410-416.
199. Hansen, K. K. Proteinases as hormones: targets and mechanisms for proteolytic signaling / K. K. Hansen, K. Oikonomopoulou, A. Baruch, R. Ramachandran, et al. // *Biol Chem.* – 2008. – Vol. 389. – P. 971-982.
200. Hansson, L. Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis / L. Hansson, A. Ny A. Bäckman, M. Edlund, E. Ekholm, et al. // *J Invest Dermatol.* – 2002. – Vol. 118. – P. 444-449.
201. Hara, K. Airway uric acid is a sensor of inhaled protease allergens and initiates

type 2 immune responses in respiratory mucosa / K. Hara, K. Iijima, M. K. Elias, S. Seno, I. Tojima, et al. // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192. – P. 4032-4042.

202. Harkins, C. P. The microevolution and epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization during atopic eczema disease flare / C. P. Harkins, K. A. Pettigrew, K. Oravcová, J. Gardner, et al. // *J Invest Dermatol.* – 2018. – Vol. 138. – № 2. – P. 336-343.

203. Hauk, P. J. Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens / P. J. Hauk, Q. A. Hamid, G. P. Chrousos, D. Y. Leung // *J Allergy Clin Immunol.* – 2000. – Vol. 105. – P. 782-787.

204. Hauser, C. The immune response to *S. aureus* in atopic dermatitis / C. Hauser, B. Wuethrich, L. Matter, J. A. Wilhelm, K. Schopfer // *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* – 1985. – Vol. 114. – P. 101-104.

205. He, Y. Identification of Der f 23 as a new major allergen of *Dermatophagoides farinae* / Y. He, C. Dou, Y. Su, J. Chen, et al. // *Mol Med Rep.* – 2019. – Vol. 20. – P. 1270-1278.

206. Heijink, I. H. Epithelial cell dysfunction, a major driver of asthma development / I. H. Heijink, V. N. S. Kuchibhotla, M. P. Roffel, T. Maes, et al. // *Allergy.* – 2020. – Vol. 75. – № 8. – P. 1902-1917.

207. Hellings, W. P. W. Role of staphylococcal superantigens in airway disease huvenne / W. P. W. Hellings, C. Bachert // *Int Arch Allergy Immunol.* – 2013. – Vol. 161. – P. 304-314.

208. Hendricks, A. J. Skin bacterial transplant in atopic dermatitis: knowns, unknowns and emerging trends / A. J. Hendricks, B. W. Mills, V. Y. Shi // *J Dermatol Sci.* – 2019. – Vol. 95. – № 2. – P. 56-61.

209. Hermans, S. J. Structural and functional properties of staphylococcal superantigen-like protein 4 / S. J. Hermans, H. M. Baker, R. P. Sequeira, R. J. Langley, et al. // *Infect Immun.* – 2012. – Vol. 80. – P. 4004-4013.

210. Hirasawa, Y. *Staphylococcus aureus* extracellular protease causes epidermal barrier dysfunction / Y. Hirasawa, T. Takai, T. Nakamura, K. Mitsuishi, et al. // *J Invest Dermatol.* – 2010. – Vol. 130(2). – P. 614-617.

211. Hogan, S. P. Eosinophils: biological properties and role in health and disease / S. P. Hogan, H. F. Rosenberg, R. Moqbel, S. Phipps, P. S. Foster, et al. // *Clin Exp Allergy*. – 2008. – Vol. 38. – № 5. – P. 709-750.

212. Ho, H. E. Role of the microbiome in food allergy / H. E. Ho, S. Bunyavanich // *Curr Allergy Asthma Rep*. – 2018. – Vol. 18(4). – P. 27.

213. Hosoki, K. Innate responses to pollen allergens / K. Hosoki, I. Boldogh, S. Sur // *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. – 2015. – Vol. 15. – P. 79-88.

214. Hyun, D. W. Dysbiosis of inferior turbinate microbiota is associated with high total IgE levels in patients with allergic rhinitis / D. W. Hyun, H. J. Min, M. S. Kim, T. W. Whon, N. R. Shin, et al. // *Infect Immun*. – 2018. – Vol. 86. – № 4. – e00934-17.

215. Iwamoto, K. Staphylococcus aureus from atopic dermatitis skin alters cytokine production triggered by monocyte-derived Langerhans cell / K. Iwamoto, M. Moriwaki, Y. Niitsu, M. Saino, S. Takahagi, et al. // *J Dermatol Sci*. – 2017. – Vol. 88. – № 3. – P. 271-279.

216. Iwase, T. Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization / T. Iwase, Y. Uehara, H. Shinji, A. Tajima, et al. // *Nature*. – 2010. – Vol. 20. – P. 346-349.

217. Jarraud, S. Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease / S. Jarraud, C. Mougel, J. Thioulouse, G. Lina, et al. // *Infect Immun*. – 2002. – Vol. 70(2). – P. 631-641.

218. Jenul, C. Regulation of Staphylococcus aureus virulence / C. Jenul, A. R. Horswill // *Microbiol Spectr*. – 2018. – Vol. 6 (1). – P. 2-33.

219. Jeong, S. K. Mite and cockroach allergens activate protease-activated receptor 2 and delay epidermal permeability barrier recovery / S. K. Jeong, H. J. Kim, J. K. Youm, S. K. Ahn, E. H. Choi, et al. // *J Invest Dermatol*. – 2008. – Vol. 128. – № 8. – P. 1930-1939.

220. Jespersen, M. C. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes / M. C. Jespersen, B. Peters, M. Nielsen, P. Marcatili // *Nucleic Acids Res*. – 2017. – № 3. – Vol. 45(W1). – P. W24-W29.

221. Jutel, M. T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy / M. Jutel, C. A. Akdis // *Chem Immunol Allergy*. – 2008. – Vol. 94. – P. 158-177.

222. Kamata, Y. Neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for the breakdown of deiminated filaggrin into amino acids / Y. Kamata, A. Taniguchi, M. Yamamoto, J. Nomura, K. Ishihara, et al. // *J Biol Chem*. – 2009. – Vol. 284. – P. 12829-12836.

223. Kaneko, J. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes / J. Kaneko, Yi. Kamio // *Biosci Biotechnol Biochem*. – 2004. – Vol. 68. – P. 981-1003.

224. Kanzaki, H. Producibility of exfoliative toxin and staphylococcal coagulase types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from skin infections and atopic dermatitis / H. Kanzaki, M. Ueda, Y. Morishita, H. Akiyama, et al. // *Dermatology*. – 1997. – Vol. 195. – № 1. – P. 6-9.

225. Kapp, A. Spezifisches IgE gegen *Staphylococcus aureus* bei Patienten mit atopischer Dermatitis [Specific IgE to *Staphylococcus aureus* in patients with atopic dermatitis] / A. Kapp, E. Schöpf // *Hautarzt*. – 1989. – Vol. 40(1). – P. 19-22.

226. Karaulov, A. V. The role of innate immunity receptors in infectious diseases and maintenance of organism homeostasis / A. V. Karaulov, S. S. Afanasiev, V. A. Aleshkin, N. L. Bondarenko, et al. // *Infekc. bolezni (Infectious diseases)*. – 2018. – № 16(1). – P. 70–78. – DOI: 10,20953/1729-9225-2018-1-70-78.

227. Karlsson, A. Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor *sarA* / A. Karlsson, S. Arvidson // *Infect Immun*. – 2002. – Vol. 70(8). – P. 4239-4246.

228. Kato, A. Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population / A. Kato, K. Fukai, N. Oiso, N. Hosomi, et al. // *Br J Dermatol*. – 2003. – Vol. 148. – № 4. – P. 665-669.

229. Kato, A. TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells / A. Kato, S. Jr. Favoreto, P. C. Avila, R. P. Schleimer // *J Immunol*. – 2007. – Vol. 179. – P. 1080-1087.

230. Kato, T. Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes / T. Kato, T. Takai, T. Fujimura, H. Matsuoka, et al. // *Allergy*. – 2009. – Vol. 64. – P. 1366-1374.

231. Kawagoe, J. Effect of protease-activated receptor-2 deficiency on allergic dermatitis in the mouse ear / J. Kawagoe, T. Takizawa, J. Matsumoto, M. Tamiya, et al. // *Jpn J Pharmacol*. – 2002. – Vol. 88(1). – P. 77-84.

232. Kawai, T. TLR signaling / T. Kawai, S. Akira // *Semin Immunol*. – 2007. – Vol. 19. – № 1. – P. 24-32.

233. Kawasaki, H. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice / H. Kawasaki, K. Nagao, A. Kubo, T. Hata, et al. // *J Allergy Clin Immunol*. – 2012. – Vol. 129. – № 6. – P. 1538-1546. e6.

234. Knight, C. G. Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin / C. G. Knight, A. J. Barrett // *Biochem J*. – 1976. – Vol. 155. – P. 117-125.

235. Kobayashi, M. Expression of toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes / M. Kobayashi, R. Yoshiki, J. Sakabe, K. Kabashima, et al. // *Br J Dermatol*. – 2009. – Vol. 160. – № 2. – P. 297-304.

236. Kolata, J. B. The fall of a dogma? Unexpectedly high T cell memory response to *Staphylococcus aureus* in humans / J. B. Kolata, I. Kühbandner, C. Link, N. Normann, et al. // *J. Infect. Dis*. – 2015. – Vol. 212. – № 5. – P. 830-838.

237. Kong, H. H. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis / H. H. Kong, J. Oh, C. Deming, S. Conlan, et al. // *Genome Res*. – 2012. – Vol. 22. – № 5. – P. 850-859.

238. Kouzaki, H. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2 / H. Kouzaki, S. M. O'Grady, C. B. Lawrence, H. Kita // *J Immunol*. – 2009. – Vol. 183. – № 2. – P. 1427-1434.

239. Kubica, M. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages / M. Kubica, K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, et al. // *PLoS One*. – 2008. – Vol. 3(1). –

P. 1-16.

240.Kuhn, G. Evidence for clonal evolution among highly polymorphic genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / G. Kuhn, P. Francioli, D. S. Blanc // *J. Bacteriol.* – 2006. – Vol. 188(1). – P. 169-178.

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

242.Kuo, I. H. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis / I. H. Kuo, T. Yoshida, A. De Benedetto, L. A. Beck // *J Allergy Clin Immunol.* – 2013. – Vol. 131. – № 2. – P. 266-278.

243.Kupczyk, M. Targeting the PGD₂/CRTH2/DP1 signaling pathway in asthma and allergic disease: current status and future perspectives / M. Kupczyk, P. Kuna // *Drugs.* 2017. – Vol. 77. – № 12. – P. 1281-1294.

244.Lai, Y. Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections / Y. Lai, A. L. Cogen, K. A. Radek, H. J. Park, et al. // *J Invest Dermatol.* – 2010. – Vol. 130. – P. 2211-2221.

245.Lai, Y. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury / Y. Lai, A. Di Nardo, T. Nakatsuji, A. Leichtle, et al. // *Nat Med.* – 2009. – Vol. 15(12). – P. 1377-1382.

246.Lai, Y. Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases / Y. Lai, R. L. Gallo // *Infect Disord Drug Targets.* – 2008. – Vol. 8. – № 3. – P. 144-155.

247.Lal, D. Mapping and comparing bacterial microbiota in the sinonasal cavity of healthy, allergic rhinitis, and chronic rhinosinusitis subjects / D. Lal, P. Keim, J. Delisle, B. Barker, M. A. Rank, et al. // *Int Forum Allergy Rhinol.* – 2017. – Vol. 7. – № 6. – P. 561-569.

248.Lam, D. Airway house dust extract exposures modify allergen-induced airway hypersensitivity responses by TLR4-dependent and independent pathways / D. Lam, N. Ng, S. Lee, G. Batzer, A. A. Horner // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – № 4. – P. 2925-

2932.

249.Lambrecht, B. N. Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization / B. N. Lambrecht, H. Hammad // *J Allergy Clin Immunol.* – 2014. – Vol. 134. – P. 499-507.

250.Laursen, N. S. Structural basis for inhibition of complement C5 by the SSL7 protein from *Staphylococcus aureus* / N. S. Laursen, N. Gordon, S. Hermans, N. Lorenz, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – Vol. 107. – P. 3681-3686.

251.Le, K. Y. Quorum-sensing regulation in staphylococci – an overview / K. Y. Le, M. Otto // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1-8.

252.Lebre, M. C. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9 / M. C. Lebre, A. M. van der Aar, L. van Baarsen, T. M. van Capel, et al. // *J Invest Dermatol.* – 2007. – Vol. 127. – № 2. – P. 331-341.

253.Lee, H. M. Innate immune responses to *Mycobacterium ulcerans* via toll-like receptors and dectin-1 in human keratinocytes / H. M. Lee, D. M. Shin, D. K. Choi, Z. W. Lee, K. H. Kim, et al. // *Cell Microbiol.* – 2009. – Vol. 11. – № 4. – P. 678-692.

254.Lee, S. E. Protease and protease-activated receptor-2 signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis / S. E. Lee, S. K. Jeong, S. H. Lee // *Yonsei Med J.* – 2010. – Vol. 51(6). – P. 808-822.

255.Leitch, C. S. Filaggrin-null mutations are associated with increased maturation markers on Langerhans cells / C. S. Leitch, E. Natafji, C. Yu, S. Abdul-Ghaffar, N. Madarasingha, et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2016. – Vol. 138. – № 2. – P. 482-490, e7.

256.Leung, D. Y. Atopic dermatitis / D. Y. Leung, T. Bieber // *Lancet.* – 2003. – № 361(9352). – P. 151-160.

257.Levin, J. Atopic dermatitis and the stratum corneum: part 1: the role of filaggrin in the stratum corneum barrier and atopic skin / J. Levin, S. F. Friedlander, J. Q. Del Rosso // *J Clin Aesthet Dermatol.* – 2013. – Vol. 6. – № 10. – P. 16-22.

258.Leyvraz, C. The epidermal barrier function is dependent on the serine protease CAP1/Prss8 / C. Leyvraz, R. P. Charles, I. Rubera, M. Guitard, S. Rotman, et al. // *J Cell*

Biol. – 2005. – Vol. 170. – № 3. – P. 487-496.

259.Li, M. The regulation of thymic stromal lymphopoietin in gut immune homeostasis / M. Li, J. Zhang, Y. Wu, J. Li // *Dig Dis Sci.* – 2011. – Vol. 56(8). – P. 2215-2220.

260.Lina, G. International nomenclature committee for staphylococcal superantigens standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus* / G. Lina, G. A. Bohach, S. P. Nair, K. Hiramatsu, et al. // *J Infect Dis.* – 2004. – Vol. 189. – № 12. – P. 2334-2336.

261.Liang, C. *Staphylococcus aureus* proteome overview: shared and specific proteins and protein complexes from representative strains of all three clades / C. Liang, D. Schaack, M. Srivastava, S. K. Gupta, E. Sarukhanyan, et al. // *Proteomes.* – 2016. – Vol. 4. – № 1. – P. 8. – DOI: 10,3390/proteomes4010008.

262.Licona-Limón, P. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells / P. Licona-Limón, L. K. Kim, N. W. Palm, R. A. Flavell // *Nat Immunol.* – 2013. – Vol. 14. – № 6. – P. 536-542.

263.Liu, C. M. *Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome / C. M. Liu, L. B. Price, B. A. Hungate, A. G. Abraham, L. A. Larsen, et al. // *Sci Adv.* – 2015. – Vol. 1. – № 5. – P. e1400216. – DOI: 10,1126/sciadv.1400216.

264.Liu, Y. J. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation / Y. J. Liu, V. Soumelis, N. Watanabe, T. Ito, et al. // *Annu Rev Immunol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 193-219.

265.Lorenz, E. A novel polymorphism in the Toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection / E. Lorenz, J. P. Mira, K. L. Cornish, N. C. Arbour, et al. // *Infect Immun.* – 2000. – Vol. 68. – P. 6398-6401.

266.Lynch, S.V. Effects of early-life exposure to allergens and bacteria on recurrent wheeze and atopy in urban children / S. V. Lynch, R. A. Wood, H. Boushey, L. B. Bacharier, et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2014. – Vol. 134. – № 3. – P. 593-601.e12. – DOI: 10,1016/j.jaci.2014.04.018.

267.Margolis, D. J. Filaggrin-2 variation is associated with more persistent atopic

dermatitis in African American subjects / D. J. Margolis, J. Gupta, A. J. Apter, T. Ganguly, O. Hoffstad, et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2014. – Vol. 133. – № 3. – P. 784-789.

268. Marouga, R. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology / R. Marouga, S. David, E. Hawkins // *Anal Bioanal Chem.* – 2005. – Vol. 382. – P. 669-678.

269. Martínez-García, S. Extracellular proteases of *Staphylococcus epidermidis*: roles as virulence factors and their participation in biofilm / S. Martínez-García, S. Rodríguez-Martínez, M. E. Cancino-Díaz, J. C. Cancino-Díaz // *APMIS.* – 2018. – Vol. 126(3). – P. 177-185.

270. Martínez-González, I. Lung ILC2s link innate and adaptive responses in allergic inflammation / I. Martínez-González, C. A. Steer, F. Takei // *Trends Immunol.* – 2015. – Vol. 36. – P. 189-195.

271. Matsui, T. SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing / T. Matsui, K. Miyamoto, A. Kubo, H. Kawasaki, T. Ebihara, et al. // *EMBO Mol Med.* – 2011. – Vol. 3. – № 6. – P. 320-333.

272. Matsumura, Y. Role of allergen source-derived proteases in sensitization via airway epithelial cells / Y. Matsumura // *J Allergy (Cairo).* – 2012. – 2012903659. – DOI: 10.1155/2012/903659.

273. Mattar, E. H. Antimicrobial potentials and structural disorder of human and animal defensins / E. H. Mattar, H. A. Almehdar, H. A. Yacoub, V. N. Uversky, et al. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2016. – Vol. 28. – P. 95-111.

274. Medzhitov, R. Innate immune recognition: mechanisms and pathways / R. Medzhitov, C. Jr. Janeway // *Immunol Rev.* – 2000. – Vol. 173. – P. 89-97.

275. Mehraj, J. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal carriage patterns in the community / J. Mehraj, W. Witte, M. K. Akmatov, F. Layer, et al. // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2016. – Vol. 398. – P. 55-87.

276. Melum, G. R. A thymic stromal lymphopoietin-responsive dendritic cell subset mediates allergic responses in the upper airway mucosa / G. R. Melum, L. Farkas,

C. Scheel, B. Van Dieren, et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2014. – Vol. 134. – № 3. – P. 613-621.e7.

277. Mempel, M. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema / M. Mempel, G. Lina, M. Hojka, C. Schnopp, et al. // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2003. – Vol. 22. – P. 306-309.

278. Misic, A. M. The shared microbiota of humans and companion animals as evaluated from *Staphylococcus* carriage sites / A. M. Misic, M. F. Davis, A. S. Tyldsley, B. P. Hodkinson, et al. // *Microbiome.* – 2015. – Vol. 23. – № 3.2. – DOI: 10,1186/s40168-014-0052-7.

279. Moriwaki, M. *Staphylococcus aureus* from atopic dermatitis skin accumulates in the lysosomes of keratinocytes with induction of IL-1 α secretion via TLR9 / M. Moriwaki, K. Iwamoto, Y. Niitsu, A. Matsushima, Y. Yanase, et al. // *Allergy.* – 2019. – Vol. 74. – № 3. – P. 560-571.

280. Mrabet-Dahbi, S. The Toll-like receptor 2 R753Q mutation modifies cytokine production and Toll-like receptor expression in atopic dermatitis / S. Mrabet-Dahbi, A. H. Dalpke, M. Niebuhr, M. Frey, C. Draing, et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2008. – Vol. 121. – № 4. – P. 1013-1019.

281. Mukherjee, S. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: a review / S. Mukherjee, S. Huda, S. P. Sinha Babu // *Scand J Immunol.* – 2019. – Vol. 90. – № 1. – P. e12771. – DOI: 10,1111/sji.12771.

282. Mulcahy, M. E. Nasal colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin / M. E. Mulcahy, J. A. Geoghegan, I. R. Monk, K. M. O'Keeffe, et al. // *PLoS Pathog.* – 2012. – Vol. 8. – № 12. – P. e1003092 – DOI: 10,1371/journal.ppat.1003092

283. Naik, S. Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature / S. Naik, N. Bouladoux, J. L. Linehan, S. J. Han, O. J. Harrison, et al. // *Nature.* – 2015. – Vol. 520(7545). – P. 104-108.

284. Nakaminami, H. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibilities of 273

exfoliative toxin-encoding-gene-positive *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo in Japan / H. Nakaminami, N. Noguchi, M. Ikeda, M. Hasui, M. Sato, et al. // *J Med Microbiol.* – 2008. – Vol. 57(Pt 10). – P. 1251-1258.

285. Nakatsuji, T. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis / T. Nakatsuji, T. H. Chen, S. Narala, K. A. Chun, A. M. Two, et al. // *Sci Transl Med.* – 2017. – Vol. 9(378). – eaah4680. – DOI: 10,1126/scitranslmed.aah4680.

286. Nakatsuji, T. The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin / T. Nakatsuji, H. I. Chiang, S. B. Jiang, H. Nagarajan, et al. // *Nat Commun.* – 2013. – Vol. 4. – P. 1431. – DOI: 10,1038/ncomms2441.

287. Nance, C. L. The role of the microbiome in food allergy: a review / C. L. Nance, R. Deniskin, V. C. Diaz, M. Paul, et al. // *Children (Basel).* – 2020. – Vol. 7(6). – P. 50.

288. Neill, D. R. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity / D. R. Neill, S. H. Wong, A. Bellosi, R. J. Flynn, M. Daly, et al. // *Nature.* – 2010. – Vol. 29. – № 464(7293). – P. 1367-1370.

289. Nishio, Y. Association between polymorphisms in the SPINK5 gene and atopic dermatitis in the Japanese / Y. Nishio, E. Noguchi, M. Shibasaki, M. Kamioka, E. Ichikawa, et al. // *Genes Immun.* – 2003. – Vol. 4. – № 7. – P. 515-517.

290. Noguchi, N., Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome / N. Noguchi, H. Nakaminami, S. Nishijima, I. Kurokawa, et al. // *J Clin Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – P. 2119-2125.

291. Nomura, T. Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis / T. Nomura, A. Sandilands, M. Akiyama, H. Liao, A. T. Evans, et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2007. – Vol. 119. – № 2. – P. 434-440.

292. Novick, R. P. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of staphylococcus / R. Novick, A. Subedi // *Chem Immunol Allergy.* – 2007. – Vol. 93. – P. 42-57.

293. Ohnmacht, C. Mucosal immunology. The microbiota regulates type 2 immunity

through ROR γ t⁺ T cells / C. Ohnmacht, J. H. Park, S. Cording, J. B. Wing, K. Atarashi, et al. // *Science*. – 2015. – Vol. 28. – № 349(6251). – P. 989-993.

294. Ohshima, Y. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4⁺ T cells into high IL-4-producing effectors / Y. Ohshima, L. P. Yang, T. Uchiyama, Y. Tanaka, P. Baum, et al. // *Blood*. – 1998. – Vol. 92. – P. 3338-3345.

295. Okuma, K. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community / K. Okuma, K. Iwakawa, J. D. Turnidge, W. B. Grubb, J. M. Bell, et al. // *J Clin Microbiol*. – 2002. – Vol. 40. – № 11. – P. 4289-4294.

296. Ovaere, P. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis / P. Ovaere, S. Lippens, P. Vandenabeele, W. Declercq // *Trends Biochem. Sci*. – 2009. – Vol. 34. – P. 453-463.

297. Ozdemir, C. T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation / C. Ozdemir, M. Akdis, C. A. Akdis // *Clin Exp Allergy*. – 2009. – Vol. 39. – № 5. – P. 626-639.

298. Paharik, A. E. Coagulase-negative *Staphylococcal* strain prevents *Staphylococcus aureus* colonization and skin infection by blocking quorum sensing / A. E. Paharik, C. P. Parlet, N. Chung, D. A. Todd, E. I. Rodriguez, et al. // *Cell Host Microbe*. – 2017. – Vol. 13. – № 22(6). – P. 746-756.e5. – DOI: 10,1016/j.chom.2017.11.001.

299. Paternoster, L. Multi-ancestry genome-wide association study of 21,000 cases and 95,000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis / L. Paternoster, M. Standl, J. Waage, H. Baurecht, M. Hotze, et al. // *Nat Genet*. – 2015. – Vol. 47. – № 12. – P. 1449-1456.

300. Paller, A. Major comorbidities of atopic dermatitis: beyond allergic disorders / A. Paller, J. C. Jaworski, E. L. Simpson, M. Boguniewicz, J. J. Russell, et al. // *Am J Clin Dermatol*. – 2018. – Vol. 19. – № 6. – P. 821-838.

301. Perros, F. Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation / F. Perros, H. C. Hoogsteden, A. J. Coyle, B. N. Lambrecht, H. Hammad

// Allergy. – 2009. – Vol. 64. – № 7. – P. 995-1002.

302.Pilette, C. Aberrant dendritic cell function conditions Th2-cell polarization in allergic rhinitis / C. Pilette, M. R. Jacobson, C. Ratajczak, B. Detry, G. Banfield, et al. // Allergy. – 2013. – Vol. 68. – № 3. – P. 312-321.

303.Plata, K. Staphylococcus aureus as an Infectious Agent: Overview of Biochemistry and Molecular Genetics of Its Pathogenicity / K. Plata, A.E. Rosato, G. Wegrzyn // Acta Biochimica Polonica – 2009. – V. 56. – P. 597-612.

304.Plewako, H. A follow-up study of immunotherapy-treated birch-allergic patients: effect on the expression of chemokines in the nasal mucosa / H. Plewako, K. Holmberg, I. Oancea, T. Gotlib, et al. // Clin Exp Allergy. – 2008. – Vol. 38. – P. 1124-1131.

305.Plowgian, C. A pilot study on the comparative minimum inhibitory and mutant prevention concentration values for moxifloxacin and pradofloxacin against canine and human isolates of Staphylococcus pseudintermedius and S. schleiferi / C. Plowgian, J. M. Blondeau, M. Levinson, W. Rosenkrantz // Vet Dermatol. – 2019. – Vol. 30(6). – P. 481-e142.

306.Polkowska-Pruszyńska, B. The gut microbiome alterations in allergic and inflammatory skin diseases - an update / B. Polkowska-Pruszyńska, A. Gerkowicz, D. Krasowska // J Eur Acad Dermatol Venereol. – 2020. – Vol. 34(3). – P. 455-464.

307.Probst, A. J., Auerbach, A. K., Moissl-Eichinger, C. Archaea on human skin // PLoS One. – 2013. – № 8. – p. e65388.

308.Puhvel, S. M. Analysis of lipid composition of isolated human sebaceous gland homogenates after incubation with cutaneous bacteria thin-layer chromatography / S. M. Puhvel, R. M. Reisner, M. Sakamoto // J Invest Dermatol. – 1975. – Vol. 64. – P. 406-411.

309.Quaresma, J. A. S. Organization of the skin immune system and compartmentalized immune responses in infectious diseases / J. A. S. Quaresma // Clin Microbiol Rev. – 2019. – Vol. 32. – P. e00034-18. – DOI: 10.1128/CMR.00034-18.

310.Ramsey, M. M. Staphylococcus aureus shifts toward commensalism in response to Corynebacterium species / M. M. Ramsey, M. O. Freire, R. A. Gabrilska, K. P.

Rumbaugh, K. P. Lemon // *Front Microbiol.* – 2016. – Vol. 17. – P. 1230-1237.

311. Ramsland, P. A. Structural basis for evasion of IgA immunity by *Staphylococcus aureus* revealed in the complex of SSL7 with Fc of human IgA1 / P. A. Ramsland, N. Willoughby, H. M. Trist, W. Farrugia, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – Vol. 104(38). – P. 15051-15056.

312. Rattenholl, A. Proteinase-activated receptor-2 in the skin: receptor expression, activation and function during health and disease / A. Rattenholl, M. Steinhoff // *Drug News Perspect.* – 2008. – Vol. 21. – P. 369-381.

313. Reed, S. B. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon / S. B. Reed, C. A. Wesson, L. E. Liou, W. R. Trumble, et al. // *Infect Immun.* – 2001. – Vol. 69(3). – P. 1521-1527.

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

315. Reshetnikova, I. Characteristics of antibiotic resistance nasopharyngeal strains of *Streptococcus pneumoniae* in children suffering from respiratory pathologies / I. Reshetnikova, L. Bayazitova, O. Tupkina, Y. Tyurin, et al. // *Bio Nano Sci.* – 2017. – № 7. – P. 182–185. – [https://doi.org/10,1007/s12668-016-0324-8](https://doi.org/10.1007/s12668-016-0324-8).

316. Reithofer, M. Allergens with protease activity from house dust mites / M. Reithofer, B. Jahn-Schmid // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol. 18. – № 7. – P. 136-138.

317. Rippke, F. Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with *Staphylococcus aureus* / F. Rippke, V. Schreiner, T. Doering, H. I. Maibach // *Am J Clin Dermatol.* – 2004. – vol.5., N. 4. – P.217-223.

318. Roelandt, T. Proteolytically active allergens cause barrier breakdown / T. Roelandt, C. Heughebaert, J. P. Hachem // *J Invest Dermatol.* – 2008. – vol. 128(8). – P. 1878-1880,

319. Romagnani, S. Regulation of the T cell response / S. Romagnani // *Clin Exp Allergy.* – 2006. – vol. 36. – P.1357-1366

320. Rosenthal, M. Skin microbiota: microbial community structure and its potential

association with health and disease / M. Rosenthal, D. Goldberg, A. Aiello, E. Larson, B. Foxman // *Infect Genet. Evol.* – 2011. – vol.11. – P.839-848

321.Round, J. L. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease / J. L. Round, S. K. Mazmanian // *Nat Rev Immunol.* – 2009. – vol.9. N.5. – P.313-323.

322.Runswick, S. Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions / S. Runswick, T. Mitchell, P. Davies, C. Robinson, D. R. Garrod // *Respirology.* – 2007. – Vol. 12. – P. 834-842.

323.Sabat, A. J. Polymorphism, genetic exchange and intragenic recombination of the aureolysin gene among *Staphylococcus aureus* strains / A. J. Sabat, B. Wladyka, K. Kosowska-Shick, H. Grundmann, J. M. van Dijl, et al. // *BMC Microbiol.* – 2008. – Vol. 29. – P. 128-129.

324.Sakaguchi, S. Regulatory T cells and immune tolerance / S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono // *Cell.* – 2008. – Vol. 133. – P. 775-787.

325.Salvensen, G. S. Chapter 5. Inhibition of proteolytic enzymes / G. S. Salvensen, H. Nagase // *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*; 2-nd edition, R. Beynon, J. S. Bond, eds. – Oxford University Press: Oxford, UK, 2001. – P. 105-130.

326.Sasaki, T. A homozygous nonsense mutation in the gene for Tmem79, a component for the lamellar granule secretory system, produces spontaneous eczema in an experimental model of atopic dermatitis / T. Sasaki, A. Shiohama, A. Kubo, H. Kawasaki, et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2013. – Vol. 132. – № 5. – P. 1111-1120,e4.

327.Saunders, S. P. Spontaneous atopic dermatitis is mediated by innate immunity, with the secondary lung inflammation of the atopic march requiring adaptive immunity / S. P. Saunders, T. Moran, A. Floudas, F. Wurlod, A. Kaszlikowska, et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2016. – Vol. 137. – № 2. – P. 482-491.

328.Saunders, S. P. Tmem79/Matt is the matted mouse gene and is a predisposing gene for atopic dermatitis in human subjects / S. P. Saunders, C. S. Goh, S. J. Brown, C. N. Palmer, R. M. Porter, et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2013. – Vol. 132. – № 5. – P. 1121-1129.

329.Scadding, G. W. Local and systemic effects of cat allergen nasal provocation / G. W. Scadding, A. Eifan, M. Penagos, A. Dumitru, A. Switzer, et al. // *Clin Exp Allergy*. – 2015. – Vol. 45. – № 3. – P. 613-623.

330.Schade, J. Cell wall glycopolymers of Firmicutes and their role as nonprotein adhesins / J. Schade, C. Weidenmaier // *FEBS Lett*. – 2016. – Vol. 590. – P. 3758-3771.

331.Schenck, L. P. Composition and immunological significance of the upper respiratory tract microbiota / L. P. Schenck, M. G. Surette, D. M. E. Bowdish // *FEBS Lett*. – 2016. – Vol. 590. – P. 3705-3720.

332.Schmid-Grendelmeier, P. IgE-mediated and T cell-mediated autoimmunity against manganese superoxide dismutase in atopic dermatitis / P. Schmid-Grendelmeier, S. Flückiger, R. Disch, A. Trautmann, B. Wüthrich, et al. // *J Allergy Clin Immunol*. – 2005. – Vol. 115. – № 5. – P. 1068-1075.

333.Seltmann, J. IL-33 impacts on the skin barrier by downregulating the expression of filaggrin / J. Seltmann, L. M. Roesner, F.W. von Hesler, M. Wittmann, T. Werfel // *J Allergy Clin Immunol*. – 2015. – Vol. 135. – № 6. – P. 1659-1661.e4.

334.Shilts, M. H. Minimally Invasive sampling method identifies differences in taxonomic richness of nasal microbiomes in young infants associated with mode of delivery / M. H. Shilts, C. Rosas-Salazar, A. Tovchigrechko, E. K. Larkin, M. Torralba, et al. // *Microb Ecol*. – 2016. – Vol. 71. – P. 233-242.

335.Shirakawa, I. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signaling / I. Shirakawa, K. A. Deichmann, I. Izuhara, I. Mao, et al. // *Immunol Today*. – 2000. – Vol. 21. – P. 60-64.

336.Shu, S. A. Microbiota and food allergy / S. A. Shu, A. W. T. Yuen, E. Woo, K. H. Chu, H. S. Kwan, et al. // *Clin Rev Allergy Immunol*. – 2019. – Vol. 57(1). – P. 83-97.

337.Simon, H. U. The cellular functions of eosinophils: Collegium Internationale Allergologicum (CIA) Update 2020 / H. U. Simon, S. Yousefi, N. Germic, I. C. Arnold, et al. // *Int Arch Allergy Immunol*. – 2020. – Vol. 181. – № 1. – P. 11-23.

338.Soroush, S. Investigation of biofilm formation ability, antimicrobial resistance and the staphylococcal cassette chromosome mec patterns of methicillin resistant

Staphylococcus epidermidis with different sequence types isolated from children / S. Soroush, F. Jabalameli, M. Taherikalani, N. Amirmozafari, A. A. Fooladi, et al. // *Microb Pathog.* – 2016. – Vol. 93. – P. 126-130.

339. Smagur, J. Staphylococcal cysteine protease staphopain B (SspB) induces rapid engulfment of human neutrophils and monocytes by macrophages / J. Smagur, K. Guzik, M. Bzowska, M. Kuzak, M. Zarebski, et al. // *Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 390. – P. 361-371.

340. Smyth, D. S. Occurrence of *ssl* genes in isolates of *Staphylococcus aureus* from animal infection / D. S. Smyth, W. J. Meaney, P. J. Hartigan, C. J. Smyth // *J Med Microbiol.* – 2007. – Vol. 56(Pt 3). – P. 418-425.

341. Stec-Niemczyk, J. Structural and functional characterization of SplA, an exclusively specific protease of *Staphylococcus aureus* / J. Stec-Niemczyk, K. Pustelny, M. Kisielewska, M. Bista, K. T. Boulware, et al. // *Biochem J.* – 2009. – Vol. 419. – № 3. – P. 555-564.

342. Steinhoff, M. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response / M. Steinhoff, J. Buddenkotte, V. Shpacovitch, A. Rattenholl, et al. // *Endocr Rev.* – 2005. – Vol. 26. – № 1. – P. 41-43.

343. Stentzel, S. Staphylococcal serine protease-like proteins are pacemakers of allergic airway reactions to *Staphylococcus aureus* / S. Stentzel, A. Teufelberger, M. Nordengrün, J. Kolata, F. Schmidt, et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2017. – Vol. 139. – № 2. – P. 492-500, e8.

344. Stentzel, S. Spls are pacemakers of allergic airway reactions to *Staphylococcus aureus* / S. Stentzel, A. Teufelberger, M. Nordengrün, J. Kolata, F. Schmidt, et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2016. – DOI: 10,1016/j.jaci.2016.03.045.

345. Stewart, M. E. Sebaceous gland lipids / M. E. Stewart // *Semin Dermatol.* – 1992. – Vol. 11. – № 2. – P. 100-105.

346. Sudağidan, M. Biyomalzeme yüzeylelerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında virülans genlerinin araştırılması [Investigation of the virulence genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from

biomaterial surfaces] / M. Sudağidan, C. Cavuşoğlu, F. Bacakoğlu // *Mikrobiyol Bul.* – 2008. – Vol. 42. – № 1. – P. 29-39.

347. Szafraniec, G. M. A review of current knowledge on *Staphylococcus agnetis* in Poultry / G. M. Szafraniec, P. Szeleszczuk, B. Dolka // *Animals (Basel)*. – 2020. – Vol. 14. – № 10(8). – P. 1421.

348. Takai, T. Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases / T. Takai, S. Ikeda // *Allergol Int.* – 2011. – Vol. 60. – № 1. – P. 25-35.

349. Takeuchi, S. Genetic and enzymatic analyses of metalloprotease (aureolysin) from *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals / S. Takeuchi, M. Saito, K. Imaizumi, T. Kaidoh, et al. // *Vet Microbiol.* – 2002. – Vol. 84(1-2). – P. 135-142.

350. Tauber, M. *Staphylococcus aureus* density on lesional and nonlesional skin is strongly associated with disease severity in atopic dermatitis / M. Tauber, S. Balica, C. Y. Hsu, C. Jean-Decoster, C. Lauze, et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2016. – Vol. 137. – № 4. – P. 1272-1274.e3.

351. Tizaoui, K. Association of single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor genes with asthma risk: a systematic review and meta-analysis / K. Tizaoui, W. Kaabachi, K. Hamzaoui, A. Hamzaoui // *Allergy Asthma Immunol. Res.* – 2015. – Vol. 7. – № 2. – P. 130-140.

352. Towne, J. E. Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs / J. E. Towne, K. E. Garka, B. R. Renshaw, G. D. Virca, J. E. Sims // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 13677-13688.

353. Turner, N. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research / N. A. Turner, B. K. Sharma-Kuinkel, S. A. Maskarinec, E. M. Eichenberger, P. P. Shah, et al. // *Nat Rev Microbiol.* – 2019. – Vol. 17(4). – P. 203-218.

354. Tyurin, Y. A. Cytokine Profile of Patients with Allergic Rhinitis Caused by Pollen, Mite, and Microbial Allergen Sensitization / Y. A. Tyurin, S. A. Lissovskaya, R. S. Fassahov, I. G. Mustafin, et al. // *Hindawi; J Immunology Research.* – 2017. – Article

ID 3054217. – DOI: 10,1155/2017/3054217.

355. Tyurin, Y. A. Innate and adaptive immunity cytokines in nasal mucosa and blood serum of allergic rhinitis patients / Y. A. Tyurin, I. D. Reshetnikova, S. N. Kulikov // Russian Journal of Infection and Immunity. – 2018. – V. 8. – I.4. – P. 600.

356. Tyurin Y. Increased production of YKL-40 in the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis / Tyurin Y., Kulikov S., Sukmanskaya E., Reshetnikova I., Fassakhov R. // Allergy. – 2011. – Vol. 66., Suppl. 94. – P. 488-488.

357. Tyurin, Y. A. Association of Toll-like cell receptors TLR2 (p.Arg753Gln) and TLR4 (p.Asp299Gly) polymorphisms with indicators of general and local immunity in patients with atopic dermatitis / Y. A. Tyurin, A. F. Shamsutdinov, N. N. Kalinin, A. A. Sharifullina, I. D. Reshetnikova // Hindawi; J Immunology Research. – 2017 – Режим доступа: doi: 10.1155/2017/8493545. Epub 2017 May

358. Tyurin, J. A. A study of single nucleotide polymorphism fragments of the aur gene metalloprotease strains of *Staphylococcus aureus* isolated from the skin of patients with atopic dermatitis / J. A. Tyurin, A. F. Shamsutdinov, R. S. Fassahov // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2014. – V. 29. – № 1. – P. 4-7.

359. Tyurin, Yu. A. Nucleotide polymorphism in the iron utilization system gene *isdB* neat domain affects heme binding ability of *IsdB* protein in various human strains of *Staphylococcus aureus* / Yu. A. Tyurin, S. A. Lysovskaya, S. N. Kulikov, I. D. Reshetnikova, et al. // Bio Nano Sci. – 2018. – DOI:10,1007/S12668-018-0501-Z.

360. Vasilopoulos, Y. The 3'-UTR AACCins5874 in the stratum corneum chymotryptic enzyme gene (SCCE/KLK7), associated with atopic dermatitis; causes an increased mRNA expression without altering its stability / Y. Vasilopoulos, N. Sharaf, F. di Giovine, M. Simon, et al. // J Dermatol Sci. – 2011. – Vol. 61. – № 2. – P. 131-133.

361. Vercelli, D. Microbiota and human allergic diseases: the company we keep / D. Vercelli // Curr Opin Immunol. – 2021. – Vol. 72. – P. 215-220.

362. Vissing, N. H. Increased risk of pneumonia and bronchiolitis after bacterial colonization of the airways as neonates / N. H. Vissing, B. L. K. Chawes, H. Bisgaard // Am J Respir Crit Care Med. – 2013. – Vol. 188. – P. 1246-1252.

363. Voegeli, R. Increased stratum corneum serine protease activity in acute eczematous atopic skin / R. Voegeli, A. V. Rawlings, M. Breternitz, S. Doppler, et al. // *Br J Dermatol.* – 2009. – Vol. 161. – P. 70-77.

364. Vuononvirta, J. Nasopharyngeal bacterial colonization and gene polymorphisms of mannose-binding lectin and toll-like receptors 2 and 4 in infants / J. Vuononvirta, L. Toivonen, K. Gröndahl-Yli-Hannuksela, A. M. Barkoff, et al. // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – № 10. – P. e26198. – DOI: 10,1371/journal.pone.0026198.

365. Walley, A. J. Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease / A. J. Walley, S. Chavanas, M. F. Moffatt, R. M. Esnouf, B. Ubhi, et al. // *Nat Genet.* – 2001. – Vol. 29. – № 2. – P. 175-178.

366. Wan, H. The transmembrane protein occludin of epithelial tight junctions is a functional target for serine peptidases from faecal pellets of *Dermatophagoides pteronyssinus* / H. Wan, H. L. Winton, C. Soeller, G. W. Taylor, D. C. Gruenert, et al. // *Clin Exp Allergy.* – 2001. – Vol. 31. – № 2. – P. 279-294.

367. Wanke, I. Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways / I. Wanke, H. Steffen, C. Christ, B. Krismer, et al. // *J Invest Dermatol.* – 2011. – Vol. 131. – № 2. – P. 382-390.

368. Weghofer, M. Identification of Der p 23, a peritrophin-like protein, as a new major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen associated with the peritrophic matrix of mite fecal pellets / M. Weghofer, M. Grote, Y. Resch, A. Casset, M. Kneidinger, et al. // *J Immunol.* – 2013. – Vol. 190. – № 7. – P. 3059-3067.

369. Wertheim, H. F. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections / H. F. Wertheim, D. C. Melles, M. C. Vos, W. van Leeuwen, et al. // *Lancet Infect Dis.* – 2005. – Vol. 5. – № 12. – P. 751-762.

370. West, H. C. Redefining the role of Langerhans cells as immune regulators within the skin / H. C. West, C. L. Bennett // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 5. – № 8. – P. 1941. – DOI: 10,3389/fimmu.2017.01941.

371. Wollenberg, M. S. Propionibacterium-produced coproporphyrin III induces *Staphylococcus aureus* aggregation and biofilm formation / M. S. Wollenberg, J. Claesen,

I. F. Escapa, K. L. Aldridge, et al. // *mBio*. – 2014. – Vol. 5. – № 4. – P. e01286-14. – DOI: 10,1128/mBio.01286-14.

372. Xhindoli, D. The human cathelicidin LL-37- a pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator / D. Xhindoli, S. Pacor, M. Benincasa, M. Scocchi, et al. // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. – Vol. 1858. – № 3. – P. 546-566.

373. Yamasaki, O. Distribution of the exfoliative toxin D gene in clinical *Staphylococcus aureus* isolates in France / O. Yamasaki, A. Tristan, T. Yamaguchi, M. Sugai, et al. // *Clin Microbiol Infect*. – 2006. – Vol. 12. – № 6. – P. 585-588.

374. Yan, M. Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *S. aureus* carriage / M. Yan, S. J. Pamp, J. Fukuyama, P. H. Hwang, et al. // *Cell Host Microbe*. – 2013. – Vol. 14. – P. 631-640.

375. Yang, T. Epidermal detachment, desmosomal dissociation, and destabilization of corneodesmosin in *Spink5*^{-/-} mice / T. Yang, D. Liang, P. J. Koch, D. Hohl, et al. // *Genes Dev*. – 2004. – Vol. 18. – № 19. – P. 2354-2358.

376. Yasueda, H. Allergens from *Dermatophagoides* mites with chymotryptic activity / H. Yasueda, H. Mita, K. Akiyama, T. Shida, et al. // *Clin Exp Allergy*. – 1993. – Vol. 23. – № 5. – P. 384-390.

377. Yuki, T. Activation of TLR2 enhances tight junction barrier in epidermal keratinocytes / T. Yuki, H. Yoshida, Y. Akazawa, A. Komiya, et al. // *J Immunol*. – 2011. – Vol. 187. – P. 3230-3237.

378. Zdzalik, M. Prevalence of genes encoding extracellular proteases in *Staphylococcus aureus* - important targets triggering immune response in vivo / M. Zdzalik, A.Y. Karim, K. Wolski, P. Buda, K. Wojcik, et al. // *FEMS Immunol Med Microbiol*. – 2012. – Vol. 66(2). – P. 220-229.

379. Zhang, Y. DC-derived TSLP promotes Th2 polarization in LPS-primed allergic airway inflammation / Y. Zhang, X. Zhou, B. Zhou // *Eur J Immunol*. – 2012. – Vol. 42. – P. 1735-1743.

380. Zhou, B., Comeau M. R., De Smedt T., Liggitt H. D., et al. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice // *Nat Immunol*.

– 2005. – № 6(10). – P. 1047-53.

381. Zhu, T. H. Epithelial barrier dysfunctions in atopic dermatitis: a skin-gut-lung model linking microbiome alteration and immune dysregulation / T. H. Zhu, T. R. Zhu, K. A. Tran, R. K. Sivamani, V. Y. Shi // *Br J Dermatol.* – 2018. – Vol. 179(3). – P. 570-581.

382. Zielinski, C. E. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β / C. E. Zielinski, F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, et al. // *Nature.* – 2012. – Vol. 26. – № 484(7395). – P. 514-518.

383. Zipperer, A. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization / A. Zipperer, M. C. Konnerth, C. Laux, A. Berscheid, et al. // *Nature.* – 2016. – Vol. 535(7613). – P. 511-516.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Перечень депонированных штаммов *Staphylococcus aureus* в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ

№	Название штамма	Регистрационный № и дата	Источник штамма	Депозитор
1	<i>Staphylococcus aureus</i> KZ03	В-9285 11.01.2021	Выделен с пораженной кожи пациента с АД, экзема	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора
2	<i>Staphylococcus aureus</i> KZ12-32	В-9286 11.01.2021	Выделен с пораженной кожи ребёнка с АД (детская форма), экзема	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора
3	<i>Staphylococcus aureus</i> KZ12-33	В-9287 11.01.2021	Выделен со слизистой носа ребенка с аллергическим риноконъюнктивитом	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора
4	<i>Staphylococcus aureus</i> KZ12-36	В-9288 11.01.2021	Выделен со слизистой носа ребенка с аллергическим риноконъюнктивитом	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора
5	<i>Staphylococcus aureus</i> KZ12-46	В-9289 11.01.2021	Выделен со слизистой носа пациента с САР	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора
6	<i>Staphylococcus aureus</i> KZ18-34	В-9290 11.01.2021	Выделен с пораженной кожи пациента с АД	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора
7	<i>Staphylococcus aureus</i> KZ22	В-9291 11.01.2021	Выделен со слизистой носа пациента с КАР	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора
8	<i>Staphylococcus aureus</i> KZ28	В-9292 11.01.2021	Выделен со слизистой носа пациента с САР	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора
9	<i>Staphylococcus aureus</i> KZ45	В-9293 11.01.2021	Выделен с пораженной кожи ребенка с АД (детская форма), экзема	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора

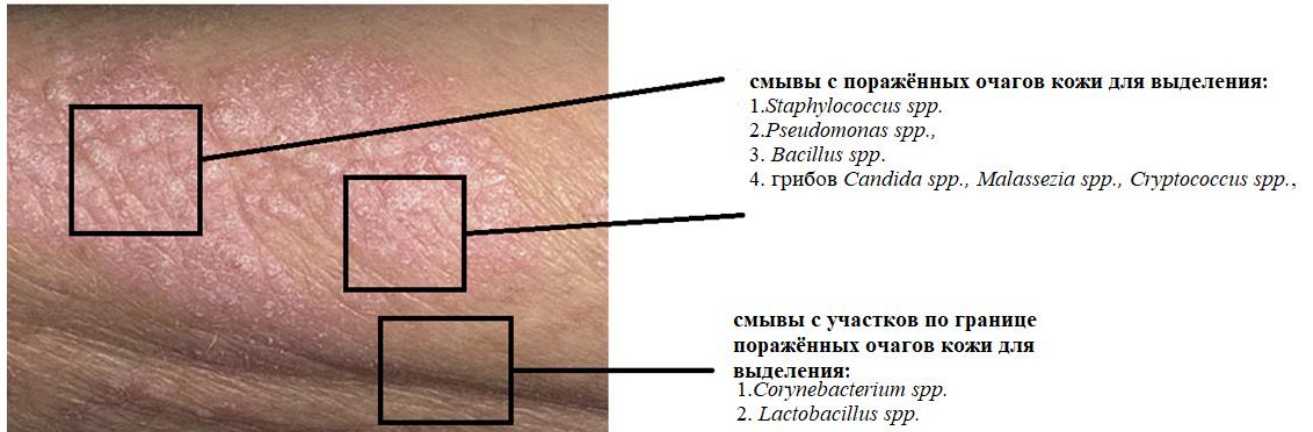
Продолжение Таблицы А.1

10	Staphylococcus aureus KZ49-01	В-9294 11.01.2021	Выделен со слизистой носа пациента с САР	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора
11	Staphylococcus aureus KZ 103-18-10	В-9295 11.01.2021	Выделен с пораженной кожи ребенка с АтД (детская форма), экзема	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора
12	Staphylococcus aureus KZ108	В-9296 11.01.2021	Выделен с пораженной кожи пациента с АтД	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора
13	Staphylococcus aureus KZ188	В-9297 11.01.2021	Выделен с пораженной кожи пациента с АтД	ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора

Таблица А.2 – Перечень аннотированных драфт геномов штаммов *Staphylococcus aureus* в NCBI GenBank

№	Штамм	GenBank accessions	Источник	Размер генома (genome length), bp	Кол-во кодирующих белки генов (genes coding)	Кол-во контигов (contigs)
1	<i>S. aureus</i> KZ187	JAIUGC000000000.1	Пациент с аллергическим ринитом. Штамм выделен со слизистой носа	2747016	2616	5
2	<i>S. aureus</i> KZ188	JAGGIM000000000.1	Пациент с атопическим дерматитом. Штамм выделен с пораженной кожи	2809071	2691	76
3	<i>S. epidermidis</i> KZ197	JAIUGO000000000.1	Пациент с атопическим дерматитом. Штамм выделен с пораженной кожи	2644005	2599	328
4	<i>S. aureus</i> KZ 190	JAKXMJ000000000.1	Выделен от женщины с маститом из грудного молока	2810590	2684	43

ПРИЛОЖЕНИЕ Б



а) стадия обострения АтД



б) стадия ремиссии АтД

Рисунок Б.1 – Схема локальных участков кожи при заборе материала для выделения представителей культивируемых микроорганизмов

ПРИЛОЖЕНИЕ В

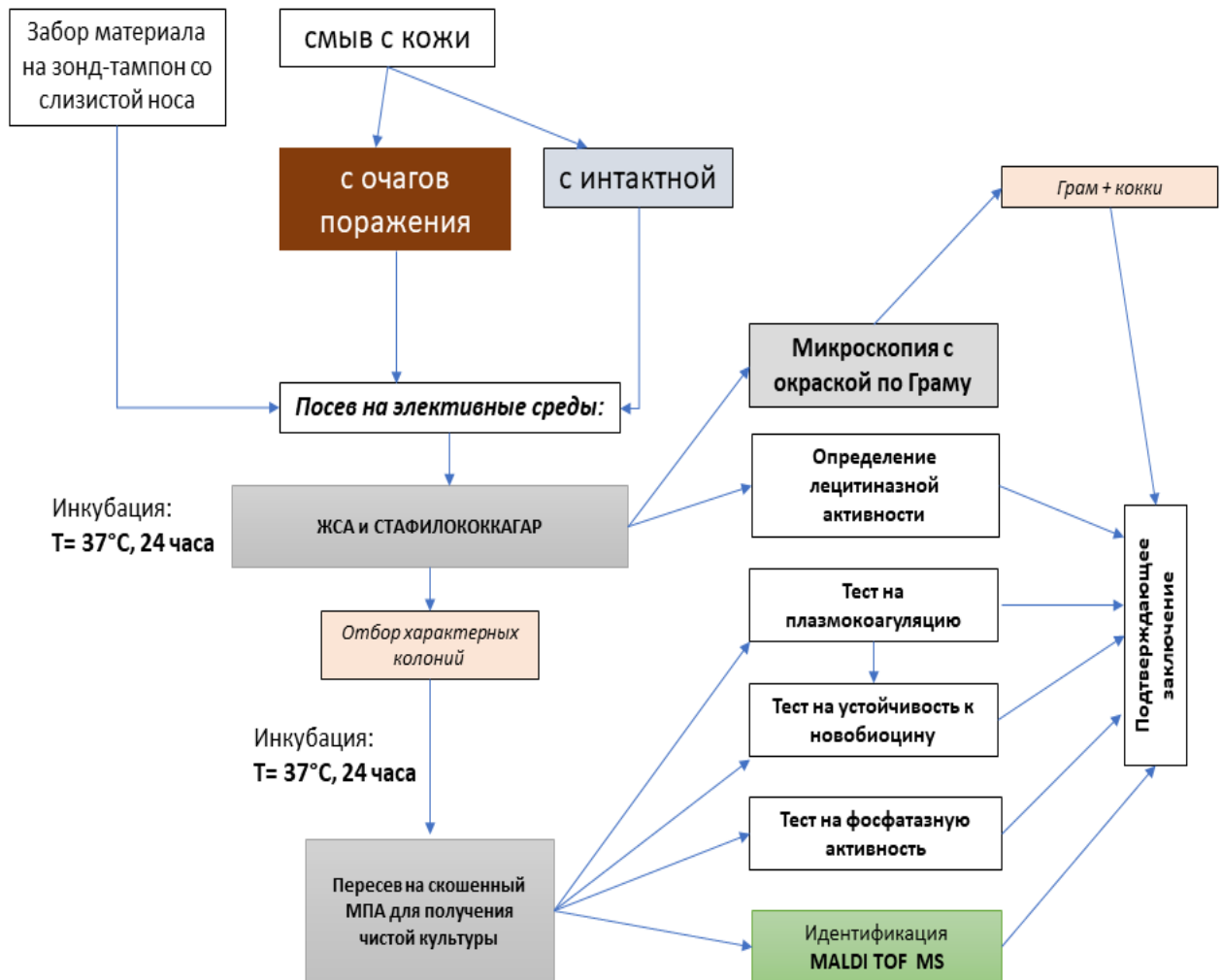


Рисунок В.1 – Блок-схема выделения и идентификации бактерий *Staphylococcus* spp.

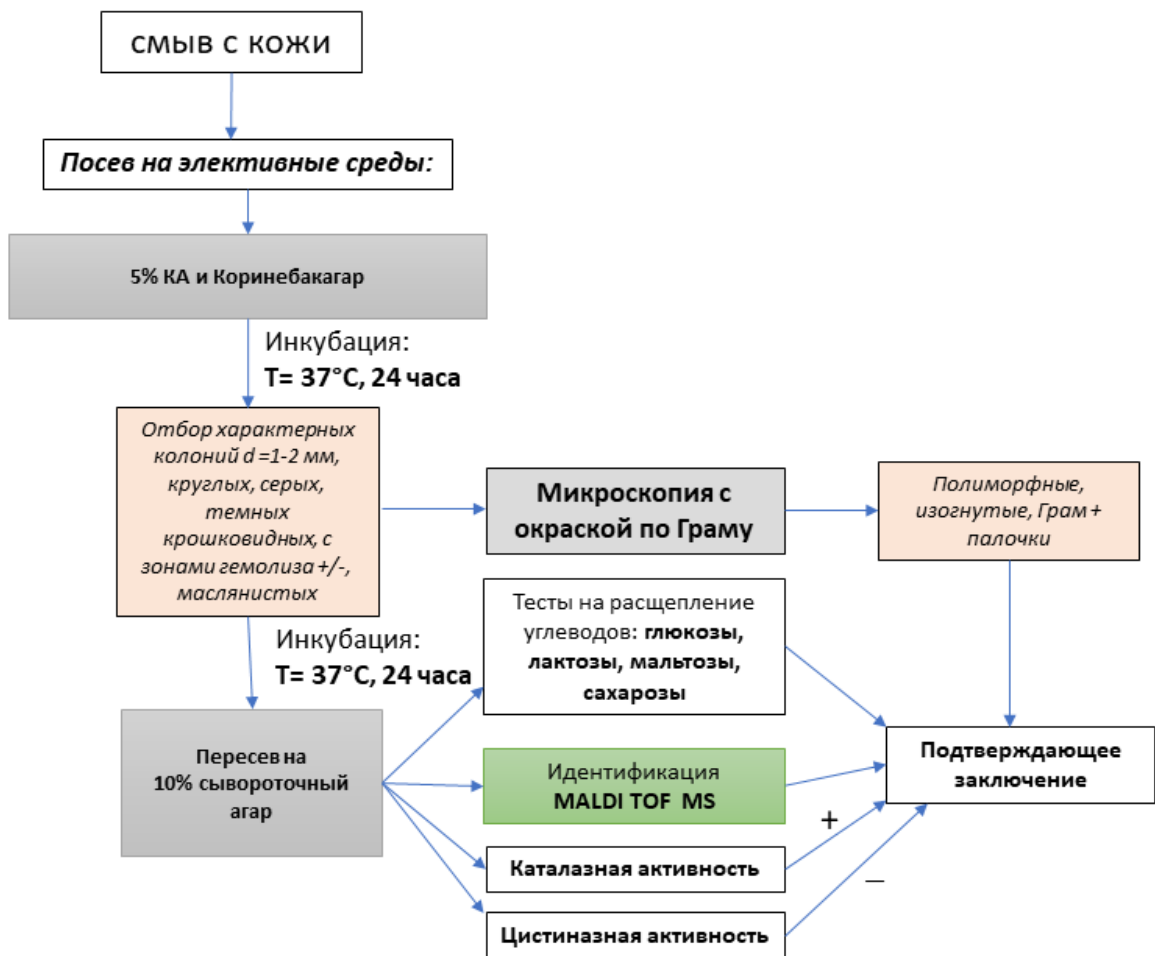


Рисунок В.2 – Блок-схема выделения и идентификации *Corynebacterium* spp.

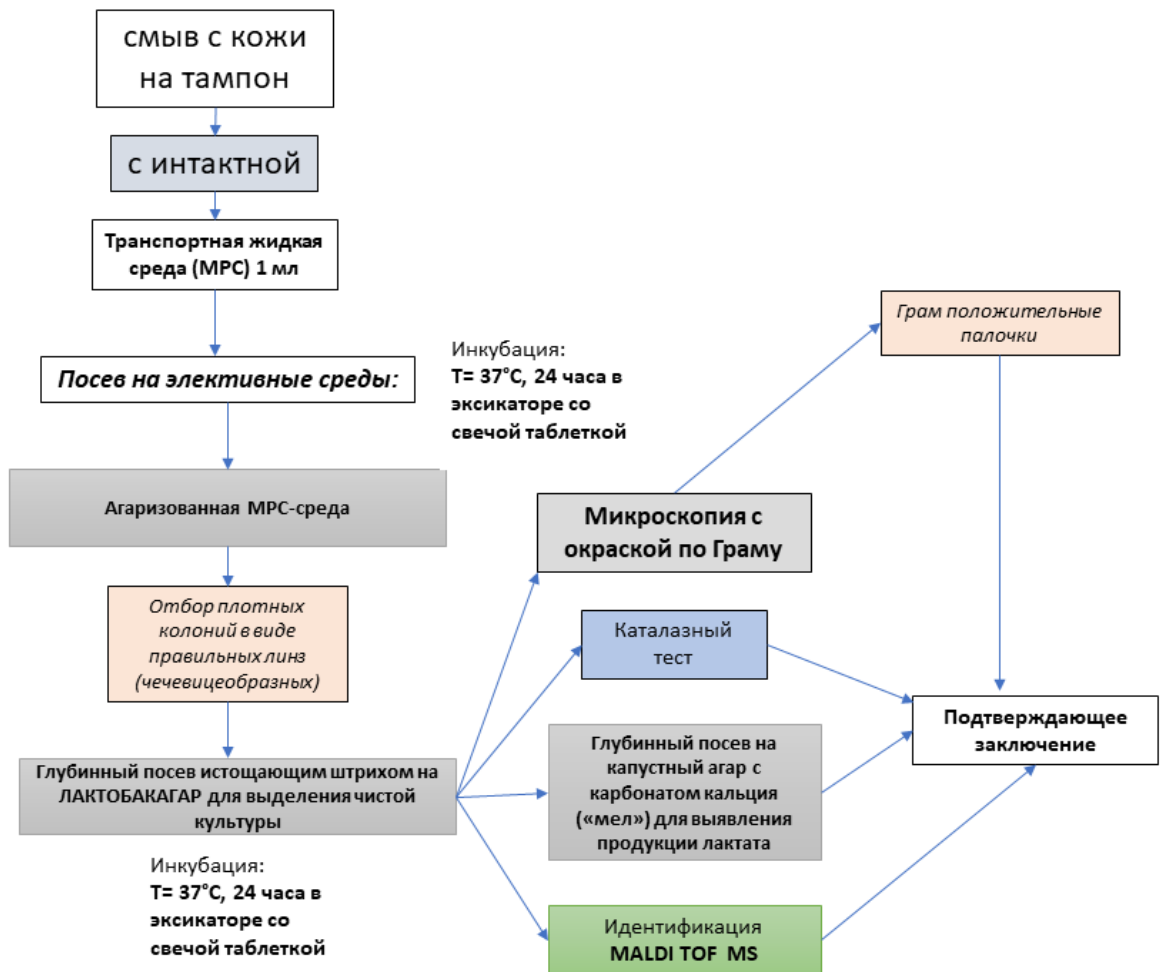


Рисунок В.3 – Блок-схема выделения и идентификации бактерий *Lactobacillus* spp

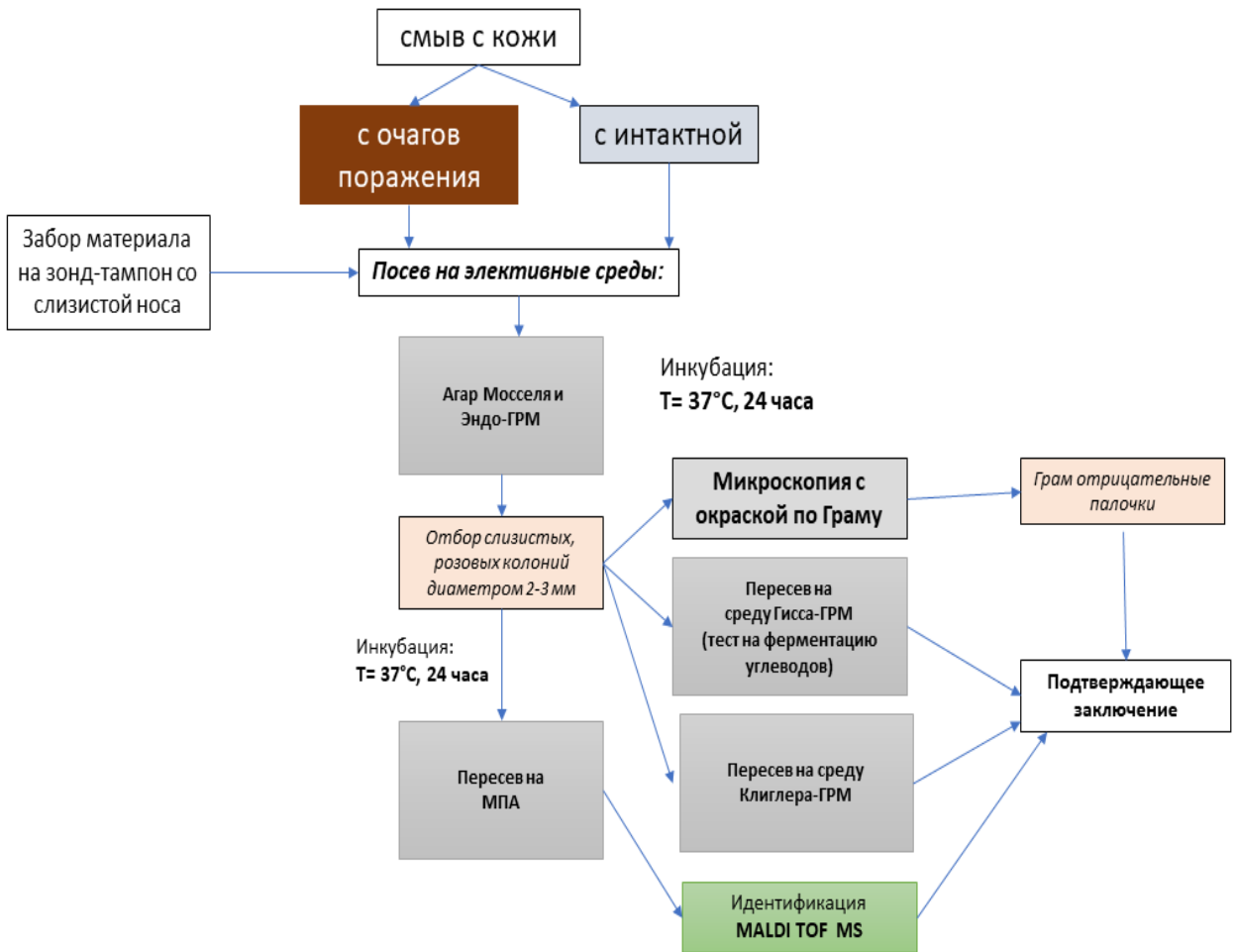


Рисунок В.4 – Блок-схема выделения и идентификации бактерий семейства Enterobacteriaceae

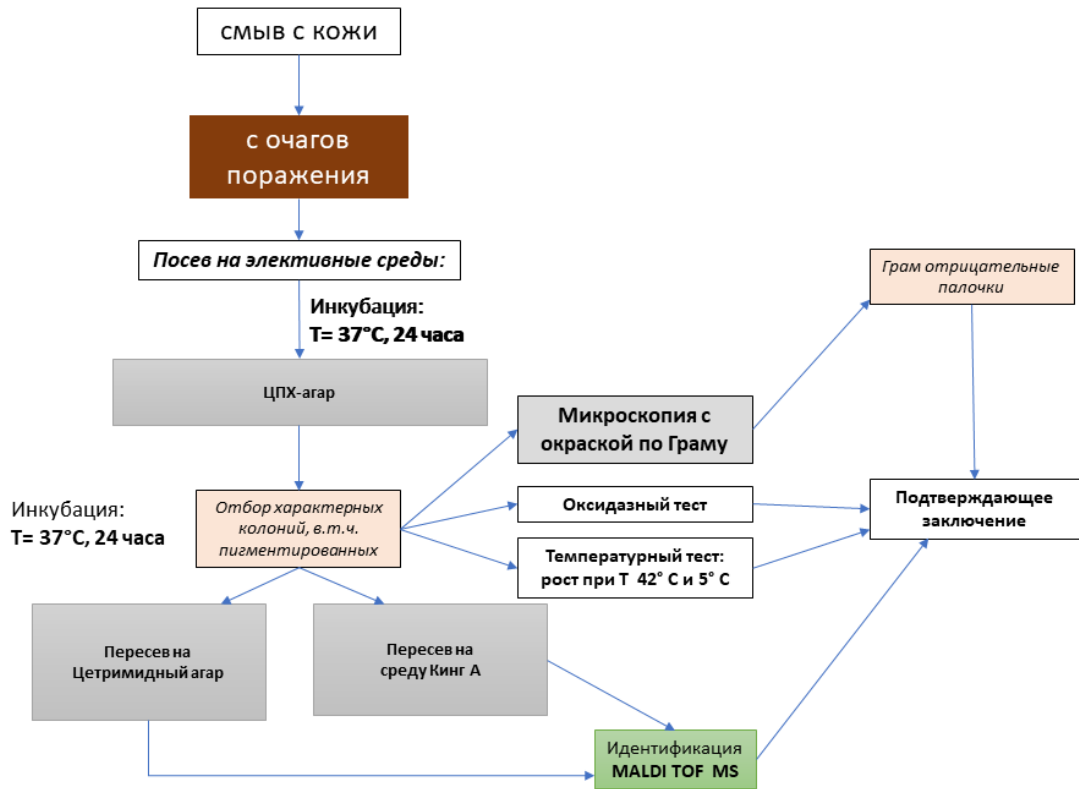


Рисунок В.5 – Блок-схема выделения и идентификации *Pseudomonas* spp

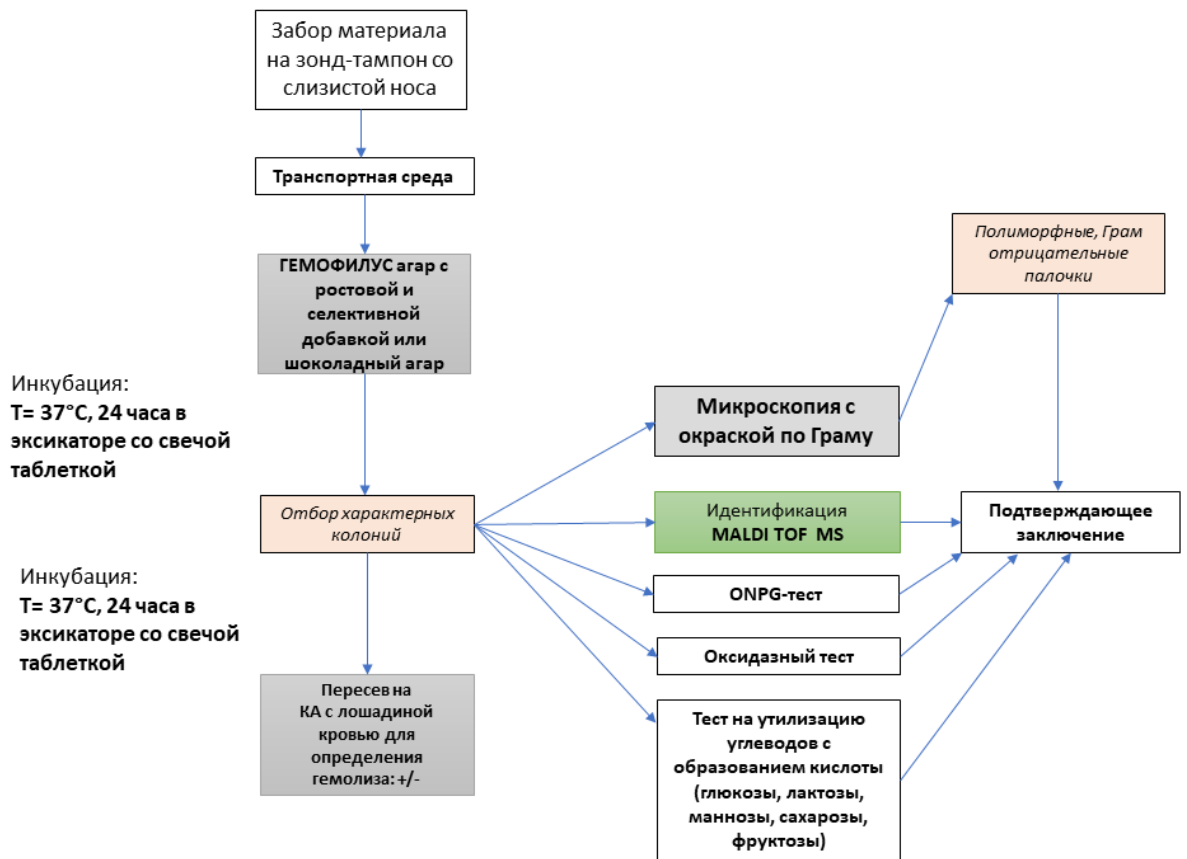


Рисунок В. 6 – Блок-схема выделения и идентификации *Haemophilus* spp

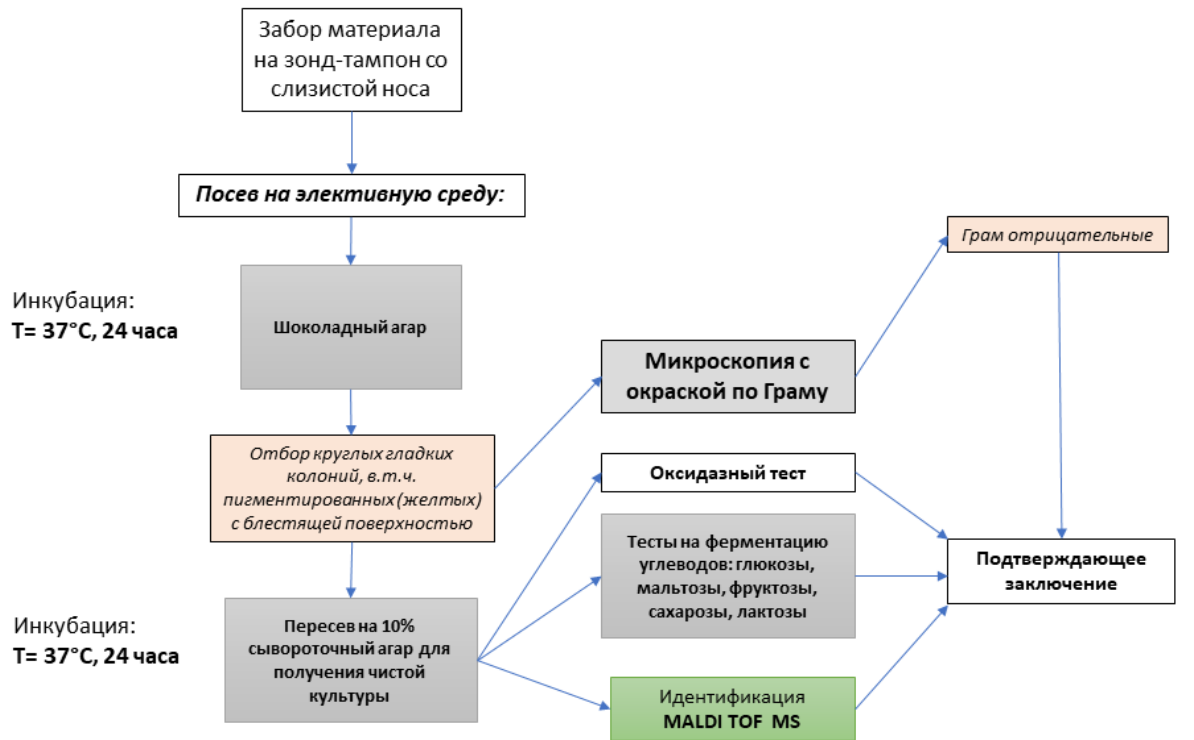


Рисунок В. 7 – Блок-схема выделения и идентификации непатогенных *Neisseria* spp

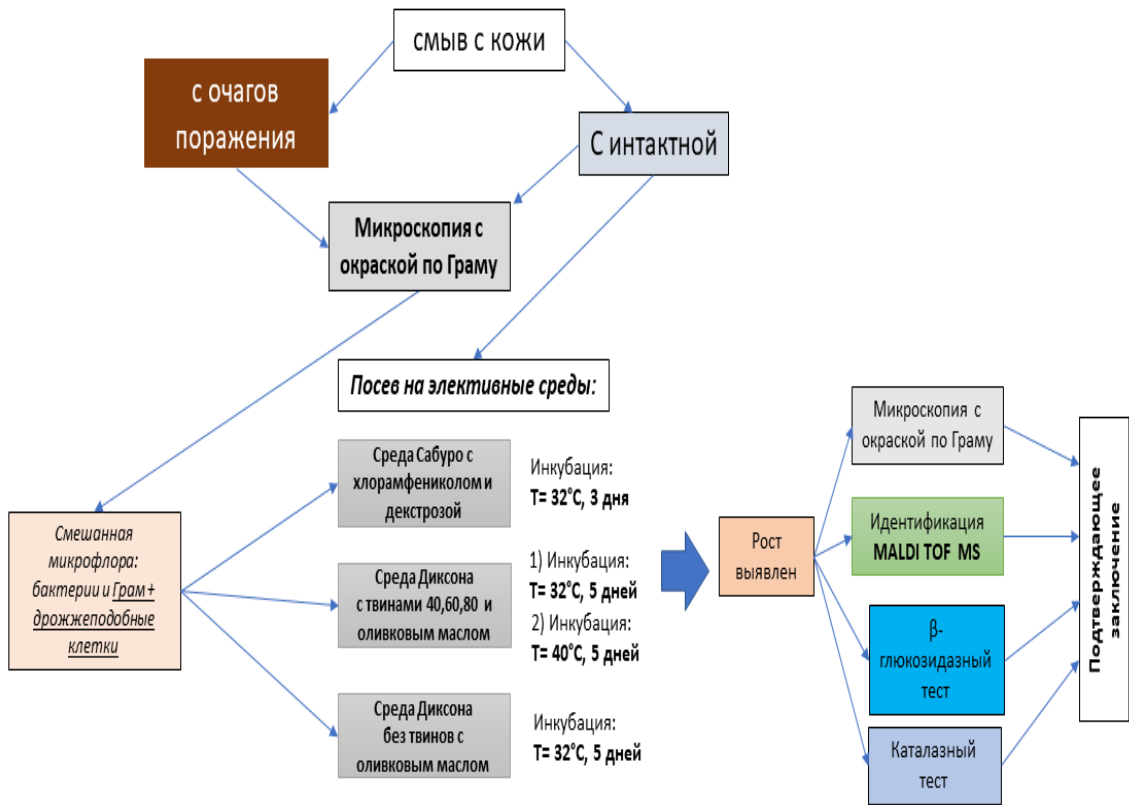


Рисунок В. 8 – Блок-схема выделения и идентификации грибов *Candida* spp., *Malassezia* sp., *Cryptococcus* sp

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Дети от 1 года до 12 лет

Подростки от 12 лет и взрослые

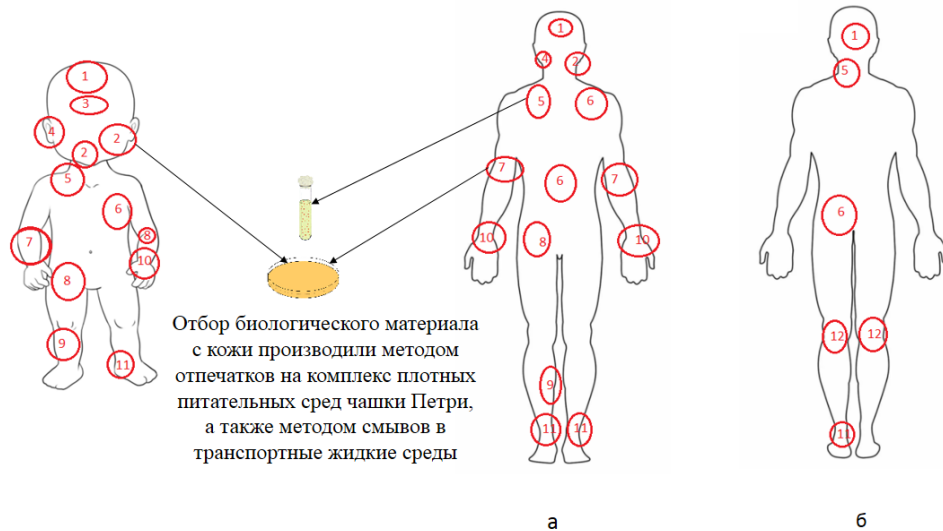


Схема участков локальных биотопов пораженной кожи у больных АтД, а также участки интактной кожи в группе здоровых лиц, с которых проводился забор материала для проведения бактериологического и микологического исследования (схема представлена для детей от 1 года до 12 лет, а также подростков и взрослых). Для подростков и взрослых показана **а)** передняя часть тела; **б)** задняя часть. У детей забор материала с задней части тела проводился с ягодичной области туловища (на рисунке не показано).

Рисунок Г.1 – Схема участков кожи при микробиологическом обследовании

Продолжение Таблицы Д.1

2 – лицо (носогубная область, щечная область)		<p>S. aureus S. epidermidis другие КОС (коагулаза-отрицательные) Corynebacterium spp. Lactobacillus spp. Pseudomonas spp. Candida albicans другие виды Candida Cryptococcus sp. Malassezia spp Bacillus spp.</p>		
3 – лицо (область лба)		<p>S. aureus S. epidermidis другие КОС (коагулаза-отрицательные) Corynebacterium spp. Lactobacillus spp. Pseudomonas spp.</p>		
и.т.д.				
Всего обследовано биотопов		Всего выделено видов		

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Таблица Е.1 – Пример расчета встречаемости культивируемых микроорганизмов кожи, обследованных у больных АтД и в группах контроля и сравнения

Методология и формулы расчета встречаемости	Пример расчета
<p>1. Расчет частоты (P_i) встречаемости культивируемого микроорганизма по формуле:</p> $P_i = \frac{n_i}{N} \times 100\%,$ <p>где n_i – число биотопов по данным «Карты результатов микробиологического исследования», где выявлен микроорганизм (+), N – общее количество обследованных локальных биотопов у больного.</p> <p>2. В результате расчета частоты (P_i) встречаемости культивируемых микроорганизмов по каждому индивидууму формировались ряды данных частот встречаемости конкретных видов микроорганизмов. Для определения средней частоты встречаемости микроорганизма в группе больных, распределенных по стадиям заболевания, а также в контрольной и группе сравнения рассчитывали Me (медиану) из полученных вариационных рядов индивидуальных частот.</p> <p>3. Рассчитывали Q_1 (первый квартиль или 25% процентиль) и Q_3 (третий квартиль или 75% процентиль) в ряду частот встречаемости микроорганизмов в группах</p>	<p>1. Больной Т., 3,5 года: АтД (стадия обострения), <i>S. aureus</i> по данным анализа «Карты результатов микробиологического исследования», выявлен на коже лица, волосистой части головы, конечностях. Обследовано 8 локальных участков кожи, из них с 5 локальных биотопов кожи выделен <i>S. aureus</i>.</p> $P_i = \frac{5_{S.aureus}}{8} \times 100\%$ <p>Таким образом, встречаемость <i>S. aureus</i> у данного ребенка составляет $P_i = 62,5\%$</p>

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

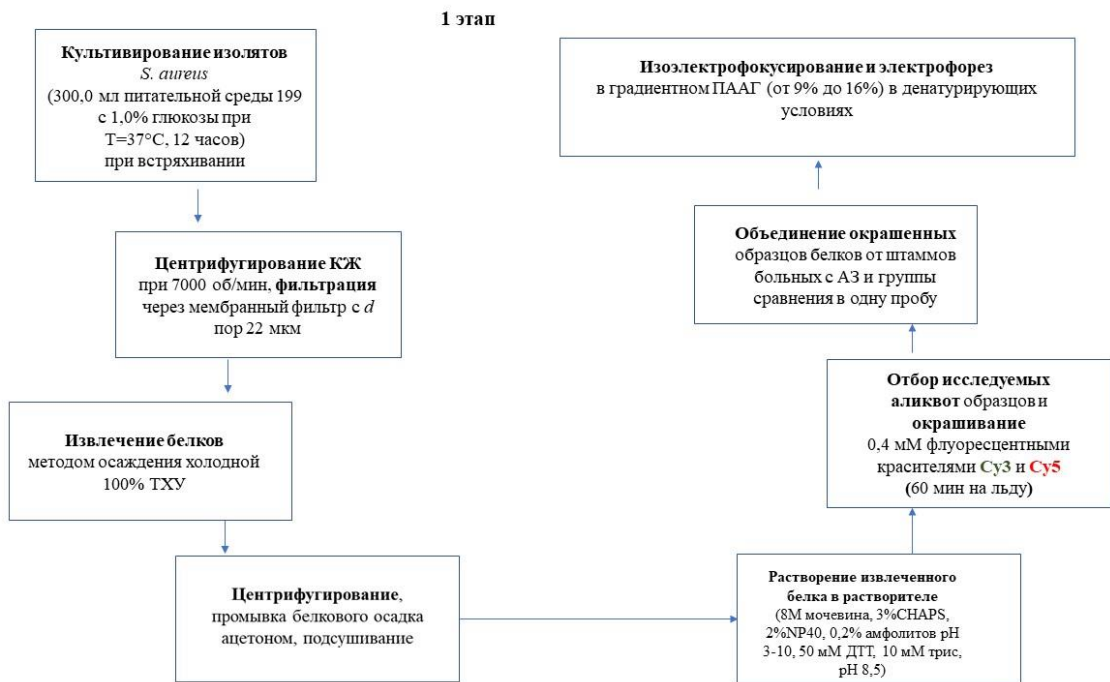


Рисунок Ж.1 – Схема первого этапа исследования протеома (белкового комплимента генома) изолятов *S. aureus*, выделенных от больных с АЗ и бактерионосителей без аллергической патологии

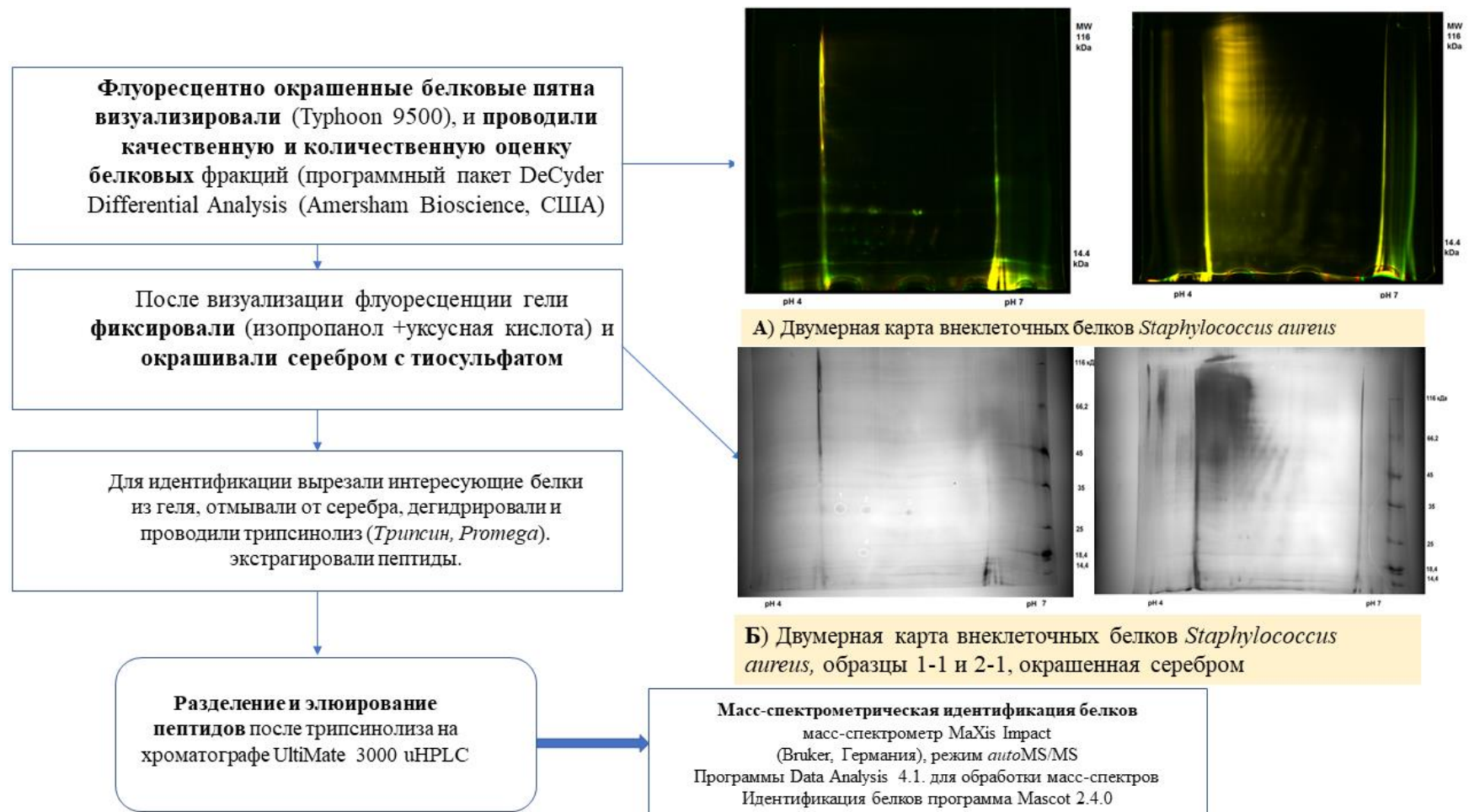


Рисунок Ж.2 – Схема второго этапа исследования протеома (белкового комплимента генома) изолятов *S. aureus*, выделенных от больных с АЗ и бактерионосителей без аллергической патологии