

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Юдина Юлия Владимировна

**Особенности микробиоты кишечника у детей с атопическим
дерматитом**

3.1.21. Педиатрия

3.2.7. Аллергология и иммунология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Корсунский Анатолий Александрович

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Продеус Андрей Петрович

Москва – 2022

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Микробиота человека как часть организма.....	12
1.1.1. Состав микробиоты.....	13
1.1.2. Этапы развития и факторы, влияющие на микробиом	14
1.1.3. Функции кишечной микробиоты	19
1.2. Микробиота кишечника у детей при atopическом дерматите	22
1.3. Молекулярно - генетические методы исследования микробиоты кишечника.....	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.1. Дизайн исследования	33
2.2. Характеристика пациентов.....	34
2.3. Методы исследования.....	40
2.4. Методы статистической обработки данных	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	45
3.1. Состав микробиоты кишечника детей с atopическим дерматитом	45
3.2. Спектр микробиоты кишечника детей с atopическим дерматитом в зависимости от клинического течения.....	49
3.3. Спектр микробиоты кишечника детей с atopическим дерматитом от 1 года до 2х лет включительно и детей от 3х лет до 5 лет включительно	59
3.4. Определение таксономического состава микробиоты кишечника у пациентов контрольной группы.....	64
3.5. Сравнительный анализ спектра микробиоты кишечника пациентов с atopическим дерматитом и лиц контрольной группы	72
3.6. Корреляционный анализ бактерий микробиоты кишечника детей с atopическим дерматитом с анамнезом и клинико - лабораторными данными.....	79

3.6.1. Корреляционный анализ анамнестических и клинико - лабораторных данных.....	88
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ	102
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	104
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106
Приложение А.....	127
Приложение Б.....	128
Приложение В.....	130

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Атопический дерматит (АтД) — мультифакторное воспалительное заболевание кожи, характеризующееся зудом, хроническим рецидивирующим течением и возрастными особенностями локализации и морфологии очагов поражения [117, 137, 165].

Распространенность симптомов АтД в различных регионах Российской Федерации составляет от 6,2 до 15,5% (International Study of Asthma and Allergy in Childhood — Международное исследование астмы и аллергии у детей [66].

По данным многочисленных эпидемиологических исследований, установлено, что у 80-95 % больных АтД отмечаются нарушения спектра бактерий кишечника, при этом наряду со снижением лактобактерий и бифидобактерий наблюдается избыточный рост грибов рода *Candida*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* [46, 180]. Стоит отметить, что эти данные были получены с помощью бактериологических методов исследования. В иностранной литературе имеются данные о спектре микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом, установленные путем молекулярно - генетических методов исследования (16s секвенирование), выявлено снижение микробного разнообразия, а также преобладание патогенных микроорганизмов, таких как *Escherichia/Shigella*, *Veillonella*, *Faecalibacterium*, *Desulfovibrio*, *Paraprevotella*, *Parabacteroides*, *Porphyromonas*, *Rhizobium* и *Clostridium* у детей с атопическим дерматитом. По данным литературы у детей с атопическим дерматитом выявлено преобладание бактерии рода *Parabacteroides* и *Faecalibacterium*, таким образом, не исключается связь развития данного заболевания с увеличением численности этих бактерий [194].

Кишечная микробиота оказывает огромное влияние на состояние иммунной системы, а также формирование иммунной толерантности к большому количеству комменсальных бактерий [54]. Установлено, что нарушение состава кишечного микробиоценоза может быть причиной возникновения атопических заболеваний

(бронхиальная астма, атопический дерматит, аллергический ринит) [59]. Микробиота кишечника является одним из ключевых аспектов в модуляции иммунного ответа, с ее помощью можно объяснить факторы, определяющие аллергизацию детей. В последнее время роль гастроинтестинальной микробиоты и ее связь с атопическим дерматитом приобретает особый научный интерес. Доказано, что видовой состав кишечной микробиоты у детей, страдающих атопическим дерматитом, отличается от состава кишечной микрофлоры у здоровых детей [93, 160, 22].

С внедрением молекулярно-генетических методов исследования стало известно, что спектр микроорганизмов кишечной микробиоты значительно шире. Метод 16s-секвенирования позволяет достаточно точно определить таксономическое положение микроорганизма, не требует строгих условий сбора, транспортировки и длительного времени исполнения. В результате имеется возможность подробно изучить спектр микроорганизмов кишечника, а также выявить их связь с развитием различных заболеваний. Стоит отметить, что на территории РФ исследований микробиоты кишечника у детей с АтД не проводилось.

Степень разработанности темы исследования

В последние годы проявляется большой научный интерес к роли микробиоты кишечника в возникновении атопического дерматита. В зарубежной литературе имеется немало работ, касающихся изучения данной проблемы. В этих научных трудах выявлены различия в таксономическом составе детей с АтД и здоровых детей [62, 38, 89, 192]. Однако некоторые результаты противоречивы [70, 120, 161, 166, 193]. Помимо этого в научной литературе недостаточно данных по оценке спектра микробиоты кишечника в зависимости от клинического течения заболевания и возраста детей [153]. Кроме того, только в единичных работах проводился корреляционный анализ отдельных микроорганизмов с клиничко – лабораторными данными [102]. Стоит отметить, что на территории Российской Федерации исследование микробиоты кишечника детей с

атопическим дерматитом 1 года - 5 лет молекулярно-генетическими методами до настоящего времени не проводилось.

Цель исследования

Оценить значение спектра микробиоты кишечника и его различий у детей с атопическим дерматитом в возрастной группе от 1 года до 5 лет включительно в зависимости от клинического течения заболевания, возраста, а так же провести сравнительный анализ микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом и условно - здоровыми детьми методом секвенирования бактериальных генов 16S рРНК.

Задачи исследования

1. Изучить состав микробиоты кишечника у детей, страдающих атопическим дерматитом при различных клинических формах заболевания, с использованием молекулярно - генетических методов исследования (16s секвенирования).
2. Провести сравнительный анализ микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом в зависимости от возраста.
3. Оценить микробиоту кишечника детей с атопическим дерматитом в сравнении с микробиотой условно - здоровых детей.
4. Сопоставить особенности микробиоты кишечника с результатами клинико - лабораторных данных у детей с атопическим дерматитом.

Научная новизна

Впервые в России определён таксономический состав микробиоты кишечника у детей с атопическим дерматитом возрастной группы 1 года - 5 лет (включительно) методом секвенирования бактериальных генов 16S рРНК. Проведен сравнительный анализ микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом и условно - здоровых детей. Впервые установлены корреляционные связи бактерий кишечной микрофлоры с анамнестическими и клинико -

лабораторными данными. Впервые изучены особенности кишечной микробиоты у детей с атопическим дерматитом в зависимости от возраста, клинического течения, а также тяжести заболевания.

Теоретическая и практическая значимость работы

Практическая значимость исследования обоснована широким распространением заболевания, неуклонным ростом, снижением качества жизни, а также низкой диагностической ценностью традиционных методов исследования для характеристики микробиоты кишечника.

Полученные данные о спектре микробных сообществ у детей с атопическим дерматитом, вносят существенный вклад в понимание патогенеза заболевания.

Установленный таксономический состав кишечной микробиоты несомненно окажет помощь врачам первичного звена в назначении пробиотической и диетической терапии пациентам с атопическим дерматитом.

Для практического здравоохранения результаты о спектре микробиоты кишечника могут быть полезны для создания ПЦР диагностики больных атопическим дерматитом.

Методология и методы исследования

Проведено проспективное, одномоментное, нерандомизированное исследование с формированием двух независимых выборок — детей с АД и условно - здоровых детей. Объектом исследования послужили дети от 1 года до 5 лет включительно с различными клиническими формами атопического дерматита, а также здоровые дети той же возрастной группы. Предметом исследования является спектр микробиоты кишечника.

Всем детям проведена оценка клинического статуса, а также лабораторная диагностика, которая включала в себя: клинический и биохимический анализ крови, определение общего и специфических IgE, общий анализ мочи, клинический анализ кала, бактериологическое исследование кала, исследование кала методом 16s секвенирования бактериальных генов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом возрастной группы 1 года - 5 лет, имеет существенные различия в составе в зависимости от клинического течения. Количество бактерий и альфа - разнообразие снижено у детей в стадии обострения заболевания. Кроме того, у детей в стадии обострения и наличием признаков вторичного инфицирования атопического дерматита, выявлено снижение относительного количества бактерий типа *Actinobacteria* за счет класса *Actinobacteria* и вида *Bifidobacterium longum*, типа *Proteobacteria*, отряда *Oscillospirales* и семейства *Oscillospiraceae*, отряда *Lactobacillales*, *Bacteroidales*, семейства *Erysipelatoclostridiaceae*, рода *Roseburia*, *Anaerococcus*, *Eggerthella* в сравнении с детьми в стадии ремиссии заболевания.
2. Таксономический состав бактерий кишечника детей с атопическим дерматитом 1 года - 2 лет и 3 - 5 лет включительно имеет статистически значимые различия. У детей 1 года - 2 лет включительно установлено снижение общего количества бактерий, а также преобладание бактерии вида *Lactococcus lactis*. У детей 3 - 5 лет отмечается преобладание относительного количества бактерий *Gamma**proteobacteria* за счет семейства *Enterobacteriaceae*.
3. Микробиота кишечника детей с АД и микробиота условно - здоровых детей, имеет различия на всех таксономических уровнях. В альфа - разнообразии различий не получено. На уровне типа бактерий установлено повышение в метагеноме относительного количества *Proteobacteria* и снижение *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*. На уровне класса повышение в метагеноме относительного количества *Bacilli* и *Gamma**proteobacteria* и снижение *Actinobacteria* и *Bacteroidia*. На уровне отряда бактерий повышение *Oscillospirales* и снижение *Bacteroidales* и *Bifidobacteriales*. На уровне семейства повышение в метагеноме количества бактерий *Enterococcaceae*, *Veillonellaceae*, и снижение *Bifidobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Erysipelotrichaceae*. На уровне рода повышение в метагеноме количества *Dialister*, *Eggerthella* и *Enterobacter*, снижение, *Lachnoclostridium*, *Roseburia*, *Prevotella*, *Coprococcus*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*. На уровне вида снижение в

метагеноме относительного количества бактерий *Bifidobacterium longum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis*.

4. Особенности анамнестических, клинико - лабораторных данных находятся в причинно - следственной связи с качественным и количественным составом микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом в возрасте 1 года -5 лет включительно.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов, полученных в ходе исследования, определяется большим объемом данных клинического и лабораторного исследования, использованием современных высокотехнологичных методик. Выводы и практические рекомендации диссертационной работы логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам исследования.

Материалы диссертации доложены на V Общероссийской конференции <FLORES VITAE. Поликлиническая педиатрия>, 8 - 9 декабря 2020 года; а также на VII Общероссийской конференции с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству» 18 – 20 февраля 2021 года .

Апробация состоялась на межкафедральном заседании кафедры педиатрии и детских инфекционных болезней Клинического института здоровья детей им. Н.Ф.Филатова (руководитель – д.м.н., профессор Корсунский А.А.) ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и кафедры пропедевтики детских болезней клинического института детского здоровья им.Н.Ф.Филатова (руководитель – д.м.н., профессор Эрдес С.И.) ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 9 от 03 декабря 2021 года).

Личный вклад

Автором проведен обзор отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационного исследования, сформулированы цели и задачи работы.

Осуществлен набор исследуемой группы пациентов, обобщены и проанализированы результаты клинического и лабораторного обследования пациентов. Проведена статистическая обработка полученных результатов исследования, сделаны научные выводы, изложены практические рекомендации.

Внедрение результатов в практику

Практические рекомендации диссертационной работы внедрены в клиническую практику врачей педиатров, аллергологов - иммунологов Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского Департамента здравоохранения города Москвы»; поликлиническое педиатрическое отделение филиала №1 и Консультативно-диагностическую поликлинику Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Детская городская клиническая больница №9 имени Г.Н. Сперанского Департамента здравоохранения города Москвы».

Основные результаты, положения и выводы научной работы внедрены в учебный процесс кафедры педиатрии и детских инфекционных болезней Клинического института детского здоровья имени Н.Ф. Филатова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) (руководитель – д.м.н., профессор Корсунский А.А.) при изучении дисциплины «Педиатрия», читаемых студентам (аспирантам) по направлению подготовки (специальности) 3.1.21. Педиатрия.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспортам научных специальностей:

3.1.21. Педиатрия, в частности пунктам: п1 - изучение физиологических закономерностей и патологических отклонений, роста, физического, полового, нервно-психического и когнитивного развития, состояния функциональных систем детей в различные периоды жизни: внутриутробного периода,

новорожденности, раннего, дошкольного и школьного возраста; п.2 - совершенствование технологий вскармливания / питания, нутритивной, микронутриентной поддержки (в том числе с учетом микробиома), здоровых, детей с особыми потребностями; п.3 - оптимизация научно-исследовательских подходов и практических принципов ведения — диагностики, профилактики, лечения, абилитации и реабилитации, а также сопровождения детей с хроническими рецидивирующими болезнями, острой патологией, подвергшихся воздействию внешних факторов, в том числе экологических и социальных;

3.2.7. Аллергология и иммунология, а именно: п.5 - изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний и п. 6 - разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов.

Публикации

По результатам исследования автором опубликовано 7 работ, в том числе 6 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 кандидата наук (из них 5 статей, индексируемых в базе SCOPUS), 1 статья в иных изданиях.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста. Работа включает: введение, 4 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов), заключение, выводы и практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы, приложения. Список литературы содержит 195 источников (23 отечественных и 172 зарубежных авторов). Диссертация иллюстрирована 30 таблицами и 26 рисунками, содержит 1 схему.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Микробиота человека как часть организма

На протяжении многих лет ученые всего мира занимаются изучением микробиоценоза различных экологических ниш человека. Актуальность данной темы заключается в важности микробиоты для человека. Ведь кишечная микрофлора выполняет ряд важнейших функций, участвует в процессе пищеварения, синтезе витаминов, гормонов, а также биологически активных веществ, необходимых для жизнедеятельности нашего организма. Она определяет здоровье человека, его иммунный ответ на различные неблагоприятные факторы и формирование первичной профилактики заболеваний, начиная с перинатального периода [19].

Термин «микробиота» обозначает совокупность микробов (бактерий, архей, грибов, вирусов и простейших) в конкретной среде обитания, другими словами, таксономический состав и обилие членов сообщества, а «микробиом» - это совокупность геномов микробиоты [163]. Под термином «альфа - разнообразие» понимается степень видового богатства сообщества – количество различных видов микроорганизмов, которые населяют данное сообщество [15].

Благодаря техническому прогрессу в последние два десятилетия появились новые методы, позволяющие изучать спектр микроорганизмов без проведения микробиологического культивирования, т.к. 90% микроорганизмов не культивируются в лабораторных условиях. Молекулярно - генетические методы исследования дали возможность расширить знания касательно таксономического состава микробиомов организма человека и углубить понимание их роли.

Несомненно, что кишечник имеет наиболее разнообразный спектр микроорганизмов и требует пристального изучения [92, 101, 110, 19]. Кроме того, современные достижения медицинской науки позволяют рассматривать микробиотоп кишечника, как новый орган или систему организма, отвечающую

четырем основным признакам: целостность и делимость, наличие устойчивых связей, организация и эмерджентность [129, 28, 118].

Богатство таксономического состава, говорит о стабильности сообщества, причем снижение разнообразия микробиоты какого-либо из органов живого организма обычно свидетельствует о наличии в нем патологического процесса, чаще всего воспалительного характера [78, 191, 157].

Согласно уточненным подсчетам, общая масса микробиоты человека составляет приблизительно 0,2 кг [165, 19]. В организме человека содержится порядка $3.8 \cdot 10^{13}$ бактерий, что равно количеству собственных клеток организма, и выделяют несколько биотопов, имеющих микробное население [113].

В совокупном геноме кишечных микроорганизмов – метагеноме, насчитывается порядка 10 миллионов генов, что превосходит человеческий геном по объему более чем в 100 раз [117]. Стоит отметить, что микробиоте свойственна функциональная избыточность – многие из генов в метагеноме являются аналогами, содержащимися в геномах бактерий различных видов, поэтому реальное метаболическое превосходство несколько ниже [137].

1.1.1. Состав микробиоты

Микробиота желудочно-кишечного тракта представляет собой сложнейшую микробную экосистему [3].

Количество микробных клеток и видовое разнообразие различных отделов пищеварительной системы сильно различаются [12].

Желудочно-кишечный тракт наиболее населен микроорганизмами. Полость рта заселяется бактериями сразу после рождения и у взрослого человека может включать порядка 230 родов и более 600 различных видов бактерий [46]. Микробиота полости рта представлена в основном бактериями рода *Streptococcus*, *Veillonella*, *Selenomonas*, *Gemella*, *Fusobacterium* и *Prevotella* [54]. Микробиота пищевода характеризуется уникальным таксономическим составом с преобладанием стрептококков и превотелл [59]. Нормальную микрофлору желудка составляют *Streptococcus*, *Helicobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus* и

Veillonella [93]. Микробные сообщества также населяют желчный пузырь. В микробиоте желчного пузыря преобладают типы Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes и Actinobacteria [160]. На таксономический состав и разнообразие микробиоты желчи влияют пол, гельминтная инвазия, болезни печени и общее состояние желчевыводящей системы [149].

Однако наиболее важным биотопом человеческого организма является кишечник, в состав которого входит более 700 родов бактерий и 2500 различных видов микроорганизмов [67, 138, 152].

Результаты метагеномных исследований показали, что большинство кишечных микробов являются представителями типов Actinobacteria (род Bifidobacterium и Colinsella), Bacteroidetes (род Bacteroides и Prevotella), Firmicutes (род Lactobacillus, Clostridium, Eubacterium и Ruminococcus), Proteobacteria (Enterobacter spp.) [64].

Бактерии в кишечнике располагаются в строгой последовательности на расстоянии, равном размеру микробной клетки и группируются в отдельные функциональные группы благодаря специфической структуре пристеночного геля. Это и дает микробиоте сходство с системой или тканью организма [129]. Химус и слизистый слой являются питательным субстратом для бактерий. Роль соединительной ткани выполняет гликокаликс, он является сорбентом-катализатором, на котором происходит связывание нутриентов и их последующее химическое превращение с участием ферментов. Одновременно гликокаликс выполняет защитную роль, обеспечивая адгезию токсинов, антигенов, антител. Vegetирующие микробные популяции, входящие в состав пристеночного микробиотопа, не расположены в геле диффузно, в виде биопленки, а образуют отдельные микроколонии, которые неравномерно расположены в толще слизи [180, 19].

1.1.2. Этапы развития и факторы, влияющие на микробиом

Как и любая система организма, микробиота кишечника проходит определённые этапы развития и созревания [19].

Ранее считалось, что плод в утробе матери не встречается с миром микроорганизмов, то есть рождается полностью стерильным. Однако появились данные опровергающие эту теорию. Проведенные исследования показали, что в плаценте, околоплодных водах, пуповинной крови, меконии имеются бактерии родов *Enterococcus*, *Escherichia*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Photorhabdus* и *Tannerella* [24, 30, 79, 81, 134, 154].

Испанские ученые в образцах мекония 20 новорожденных обнаружили ДНК лактобактерий и *E. coli* [134].

Но все же более активное заселение кишечника происходит после рождения. В этом процессе выделяют четыре последовательные временные фазы:

- первая фаза длится от момента рождения до двух недель. Спектр микроорганизмов в этот период представлен в основном стрептококками и кишечной палочкой.
- вторая фаза зависит от вида вскармливания и длится до введения в рацион прикорма. В этой фазе происходит заселение бифидобактериями и лактобактериями, а также в небольших количествах представителями родов *Clostridium* и *Bacteroides*.
- третья фаза начинается с момента введения прикорма и длится до завершения грудного вскармливания. В это время возрастает численность представителей рода *Bacteroides*. По мере увеличения в рационе доли твердой пищи и снижения доли грудного молока, растет количество бактероидов и анаэробных грамположительных кокков (пептококков и пептострептококков).
- четвертая фаза начинается после окончания грудного вскармливания, характеризуется относительной стабильностью микробного состава, который сохраняется в течение всей жизни индивида [128].

На формирование микробиоты кишечника большое влияние оказывают следующие факторы: способ родоразрешения, вскармливание, перенесенные заболевания, прием антибиотиков, диета, условия жизни и др. [1, 6, 20, 84].

Ряд исследований показывает, что кишечная микробиота при естественном родоразрешении представлена бактериями рода *Escherichia coli* и другими энтеробактериями, энтерококками и стафилококками. При оперативном

родоразрешении новорожденный в первую очередь встречается с микрофлорой кожных покровов матери и медицинского персонала, это в основном бактерии рода *Propionibacterium*, *Corynebacterium* и *Streptococcus* [7, 97, 127]. С конца первой недели жизни ребенка в кишечной микробиоте начинают доминировать строгие анаэробы (бифидобактерии, бактероиды и клостридии), которые подавляют аэробную флору [5, 9, 26, 184].

Учеными из Швеции был проведен анализ микробиоты кишечника детей рожденных путем кесарева сечения и естественным путем. Результаты исследования показали, что у детей, рожденных путём кесарева сечения, в кишечнике не хватало представителей одной из основных групп кишечных бактерий, *Bacteroidetes*, которые присутствовали у всех рожденных естественным путем. Кроме того, у некоторых из этих младенцев бактерии группы *Bacteroidetes* так и не заселяли кишечник вплоть до 12-месячного возраста [97].

У детей, рожденных путем кесарева сечения, формирование кишечной микробиоты происходит дольше, и чаще обнаруживаются различные условно-патогенные микробы такие как *Clostridium difficile*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Haemophilus* и *Veilonella* [5, 9, 26, 61].

Несомненно, вскармливание также влияет на колонизацию микроорганизмов. При грудном вскармливании, микробиота кишечника представлена в основном молочнокислыми бактериями, такими как *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* и *Weissella*, а также некоторыми полезными видами *Bifidobacterium* [99, 172, 195].

Грудное молоко служит важным фактором в формировании микробиоценозов ребенка, поскольку содержит вещества с антимикробным и пребиотическим потенциалом (бета-лактоза, лактоферрин, олигосахариды, секреторные иммуноглобулины А, лейкоциты, лизоцим и др.) и является главным источником симбиотических микроорганизмов (бифидобактерий, лактобактерий, энтерококков) для грудного ребенка [17, 20, 77]. Грудное молоко содержит не менее 10^3 КОЕ/мл живых бактерий и широкий спектр бактериальных ДНК, включая ДНК бифидобактерий, которые могут программировать иммунную систему новорожденного [150]. Кишечная микрофлора ребенка, получающего

исключительно грудное вскармливание, характеризуется высоким популяционным уровнем бифидобактерий и низким содержанием *C. difficile* и *E. coli* [148].

Согласно новому исследованию Национального института продовольствия, технического университета Дании и Копенгагенского университета установлено, что грудное вскармливание оказывает значительное влияние на развитие кишечной флоры. Было проведено исследование фекалий, методом секвенирования 16S рРНК, 330 здоровых детей в возрасте 9, 18 и 36 месяцев. Исследование показало, что изменения энтеротипа происходит в период с 9 до 36 мес. В возрасте от 9 до 18 месяцев, после прекращения грудного вскармливания и введения прикорма, отмечалось преобладание *Clostridium* и *Bacteroides*. Считается, что прекращение грудного вскармливания после 18 месяцев жизни благоприятно сказывается на формировании здоровой микробиоты кишечника [106]. Доказано, что грудное вскармливание уменьшает тяжесть атопического дерматита, благодаря наличию в нем олигосахаридов, стимулирующих рост и активность *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, участвующих в формировании полноценного микробиома [13]. Кроме того, имеются данные о наличии грамотрицательной флоры: *Serratia*, *Pseudomonas*, а также же *Veillonella*, *Leptotrichia* и *Prevotella*. Вышеперечисленные бактерии встречаются в микробиоте кишечника детей, находящихся на грудном вскармливании [40].

Жирные кислоты в грудном молоке также влияют на развитие иммунной системы. Уровень TGF- β повышает содержание полиненасыщенных жирных кислот, так необходимых для развития пищеварительного тракта, иммунной и нервной системы. В некоторых когортных исследованиях показано, что полиненасыщенные жирные кислоты уменьшают риск развития атопии у детей [82, 112].

Грудное молоко содержит множество факторов, таких как IgA и IgG, антимикробные вещества – лизоцим и лактоферрин, иммунорегуляторные цитокины – TGF- β и интерлейкин 10, а также лимфоциты [96]. Бифидобактерии, входящие в состав грудного молока, способствуют увеличению IgA, который способен оказывать противовоспалительный эффект [99]. Другие исследования

показали, что микробиота детей, получающих молочные смеси, обогащена анаэробной флорой – *Bacteroides* и *Clostridium*, в то время, как микробиота детей на грудном вскармливании чаще колонизирована аэробными микроорганизмами [130]. Установлено, что грудное вскармливание уменьшает тяжесть атопического дерматита, благодаря наличию в нем олигосахаридов, стимулирующих рост и активность *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* [96].

Другие исследования показали, что у детей, получающих молочные смеси, в микробиоте преобладают энтерококки и клостридии и снижено количество бифидобактерий [35, 159]. Применение антибиотиков также оказывает существенное влияние на формирование кишечной микробиоты. Ненужный прием антибиотиков ускоряет развитие резистентности и вызывает рост доли штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и т.д. с множественной лекарственной резистентностью [190]. Антибактериальная терапия смещает состав микробиоты кишечника в сторону высокого содержания протеобактерий и низкого содержания актинобактерий [180], уменьшает общее разнообразие микробиома младенца [144,171].

После внутривенного введения цефтриаксона описаны случаи чрезмерного избыточного роста одной таксономической единицы бактерий, относительное количество содержания в кале которого могло достигать 92% [85].

Fouhy F и соавт. проводили исследование образцов кала 18 детей, 9 из которых получали парентерально комбинацию ампициллина и гентамицина в течение 48 часов после рождения. Было выявлено, что у детей, получающих антибактериальную терапию, наблюдалось значительное уменьшение потенциально полезных бактерий, принадлежащих к типу *Actinobacteria*, включая *Bifidobacterium*, а также некоторых представителей типа *Firmicutes*, включая *Lactobacillus*. Доминирование протеобактерий и общее снижение микробного разнообразия продолжали сохраняться даже через 8 недель после лечения антибиотиками, несмотря на то, что популяции потенциально полезных бактерий (включая бифидобактерии) несколько восстановились [73]. Нарушение экосистемы микробиоты кишечника в раннем возрасте в сочетании с

генетической предрасположенностью может оказывать долгосрочное влияние на иммунную систему, вызывая заболевания или предрасположенность к ним в более старшем возрасте. Действительно, было показано, что воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), метаболические расстройства (сахарный диабет 2-го типа, ожирение) и атопические заболевания связаны с изменением таксономического состава микробиома [109, 114, 174].

Процесс формирования микробиоты происходит параллельно и в тесной взаимосвязи с этапами созревания иммунной системы. В старости разнообразие состава микробиоты и ее функционирование снижается [1, 23].

1.1.3. Функции кишечной микробиоты

Как известно, орган - это часть тела, которая не только имеет определенную форму, строение, место расположения, но и выполняет несколько функций. Кишечная микробиота, как орган выполняет ряд важных функций [19].

В первую очередь, кишечные микроорганизмы участвуют в процессе пищеварения, расщепляя неперевариваемые пищевые волокна растительного происхождения [145]. Наибольшими возможностями гидролиза углеводов обладают бактерии родов *Bacteroides* (крахмал, ксилан), *Roseburia* (крахмал, ксилан, олигосахариды), *Ruminococcus* (крахмал, целлюлоза), *Bifidobacterium* (олигосахариды), *Fecalibacterium* и *Enterobacteria*. Бактерия *Akkermansia muciniphila*, составляющая около 3% от общего числа бактерий микробиоты человека, способны переваривать муцин – основной гликопротеид мукозного слоя кишечника [19, 58].

Продуктом данного процесса являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК) – бутират, ацетат, пропионат и другие [45]. КЖК выполняют множество функций в организме, а с точки зрения пищеварения являются одним из главных субстратов, которым питаются колоноциты кишечной стенки человека [156].

В одном из российских исследований, оценивались изменения метаболома сыворотки крови и показателей микробиоценоза кишечника у пациентов с

язвенным колитом и целиакией. Авторами впервые было показано значимое повышение общего количества бутират - продуцирующих бактерий, играющих ключевую роль в энергетическом обеспечении кишечного эпителия [11, 19].

Микробиота также участвует в трансформации желчных кислот, способствуя тем самым формированию мицелл, необходимых для переваривания жиров в кишечнике [57, 155].

Помимо этого, микробиота кишечника участвует в метаболизме липидов, подавляя ингибирование липопротеинлипазы в адипоцитах. *Bacteroides thetaiotaomicron* способствует гидролизу липидов, увеличивая экспрессию колипазы [88].

Спектр микроорганизмов обладает значительным потенциалом для гидролиза белков, утилизации и синтеза аминокислот. Многие представители микрофлоры кишечника, такие как *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Megasphaera elsdenii*, *Mitsuokella multacidus*, *Selenomonas ruminantium* и *Streptococcus bovis* несут в геноме множество дипептидилпептидаз и дипептидаз. Основные механизмы катаболизма свободных аминокислот сводятся к декарбоксилированию и деаминированию [19]. Продуктами бактериального гидролиза аминокислот являются азот и газы: водород (H_2), углекислый газ (CO_2), метан (CH_4) и сероводород (H_2S). Отдельные метаболиты могут быть включены в синтез бутирата, пропионата и ацетата, жирных кислот, органических кислот и так далее [56].

Потенциально микробиота способна гидролизовать все аминокислоты, но предпочтительными субстратами являются глутамин/глутамат, аспарагин/аспартат, лизин, аргинин, глицин, лейцин, валин и изолейцин [55].

Еще одной важной функцией микроорганизмов кишечника является секреторная функция. Кишечные бактерии синтезируют ряд витаминов и витаминоподобных веществ (витамины группы В, С, К, фолиевой, никотиновой кислоты), которые используются как организмом человека, так и микроорганизмами [71]. Только кишечная палочка синтезирует 9 витаминов. Микробиота производит также нейроактивные вещества: норадреналин, серотонин, гамма-аминомасляная кислота, оксид азота, сероводород [87, 182,

183]. Синтез гормонов и биологически активных веществ лежит в основе регуляторного действия микрофлоры на функции внутренних органов и ЦНС [18]. КЖК, в свою очередь, выполняют регуляторную функцию [19]. Так, было показано, что бутират и пропионат способны влиять на генетическую экспрессию в клетках организма-хозяина, взаимодействуя с ферментом гистондеацетилазой и посредством нее регулировать фосфорилирование гистонов [168].

Кишечные бактерии способны к синтезу антибактериальных веществ – бактериоцинов, а это необходимо для защиты организма от колонизации патогенными бактериями [51]. Например, КЖК, в частности бутират, оказывает противовоспалительный эффект на слизистую кишечника за счёт супрессии активации NF-κB, что позволяет поддерживать физиологический уровень воспаления, необходимый для защиты от патогенной флоры [80].

К другим полезным качествам бутирата относится потенцирование секреции муцина, снижение pH кишечника, усиление фагоцитоза, укрепление межклеточных соединений в эпителии, что позволяет снижать проницаемость кишечной стенки для бактерий и нарушать бактериальную адгезию к ней [68, 80, 100, 126].

КЖК являются единственными известными лигандами для рецептора GPR 43, который участвует в регуляции воспаления посредством ингибирования аденилатциклазы и активации фосфолипазы C [37]. Активация данного рецептора рассматривается как один из механизмов взаимодействия макроорганизма и микробиоты, нарушение работы которого приводит к дисбалансу иммунитета и провоспалительному фенотипу [29].

Микробиота кишечника играет важную роль в поддержании иммунной системы человека, устанавливая симбиотические отношения с хозяином. Известно, что состояние болезни часто характеризуется дисбиотическим состоянием микробиоты кишечника. Происходящее во всем мире снижение биоразнообразия, изменения в социальном поведении изменяют микробную экологию человека. Это приводит к глобальному росту воспалительных заболеваний, особенно «эпидемии аллергии» в раннем возрасте [1]. Слизистая оболочка кишечника обладает собственной лимфоидной тканью, известной как

GALT (gut-associated lymphoid tissue), которая является одним из значимых компонентов иммунной системы макроорганизма [19]. В слизистой оболочке кишечника локализовано около 80% иммунокомпетентных клеток, 25% слизистой оболочки кишечника состоит из иммунологически активной ткани. Таким образом, кишечник можно рассматривать как самый большой иммунный орган человека. Микрофлора участвует в формировании как местного (активация продукции IgA, фагоцитарной активности), так и системного иммунитета. Само наличие бактерий оказывает постоянное антигенное тренирующее действие [19, 162].

Стоит также отметить, что иммунная система сама по себе эволюционировала в постоянном присутствии микроорганизмов. В результате этого, даже наличие микрофлоры само по себе является одним из важнейших факторов, необходимых для становления иммунитета [176].

Кроме приведенных функций, известно также, что микробиота осуществляет взаимодействие с нервной системой человека. Данное взаимодействие рассматривается в рамках концепции «ось мозг-кишечник» (англ. Gut – Brain Axis) и заключается во взаимном влиянии в системе «микробиота - головной мозг», посредством секреции нейроактивных факторов, изменения напряжения иммунного ответа, регуляции работы кишечника, а также через n.vagus [60].

Ввиду активного участия микробиоты в физиологических процессах, протекающих в организме человека, ее тесной связью с иммунной системой и колонизацией бактерий, человек часто рассматривается в качестве «суперорганизма», а микробиота как квазиорган такого организма и неотъемлемая его часть [108].

1.2. Микробиота кишечника у детей при атопическом дерматите

Атопический дерматит (АтД) – мультифакторное воспалительное заболевание кожи, характеризующееся зудом, хроническим рецидивирующим

течением и возрастными особенностями локализации и морфологии очагов поражения [14, 83, 164].

Распространенность симптомов АтД в различных регионах Российской Федерации составляет от 6,2 до 15,5% (International Study of Asthma and Allergy in Childhood – Международное исследование астмы и аллергии у детей). По данным многочисленных эпидемиологических исследований, установлено, что у 80–95% больных АтД отмечаются нарушения спектра бактерий кишечника, при этом наряду со снижением лактобактерий и бифидобактерий наблюдается избыточный рост грибов рода *Candida*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* с измененными свойствами, в частности происходит образование биопленок [13, 20, 116].

Кишечная микробиота оказывает огромное влияние на состояние иммунной системы, а также формирование иммунной толерантности к большому количеству комменсальных бактерий [147]. Установлено, что нарушение состава кишечного микробиоценоза может быть причиной возникновения атопических заболеваний (бронхиальная астма, атопический дерматит, аллергический ринит) [9, 21]. Таким образом, кишечная микробиота является одним из ключевых аспектов в модуляции иммунного ответа, с ее помощью можно объяснить факторы, определяющие аллергизацию детей. В последнее время роль гастроинтестинальной микробиоты и ее связь с атопическим дерматитом приобретает особый научный интерес.

Доказано, что видовой состав кишечной микробиоты у детей, страдающих атопическим дерматитом, отличается от состава кишечной микрофлоры у здоровых детей [7, 13, 22]. Некоторые когортные исследования показали, что дети с атопическим дерматитом имеют низкое содержание *Bifidobacterium* и *Bacteroides* и высокое содержание *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* и *Parabacteroides* [22, 170]. В одном из рандомизированных плацебо-контролируемых исследований были взяты образцы фекалий 606 здоровых новорожденных с генетической предрасположенностью к атопии. Стул у детей был собран в возрасте пяти, тринадцати и тридцати одной недели соответственно. ДНК фекальных образцов подвергали ПЦР анализу в реальном времени для количественного определения *Bifidobacterium*, *E.coli*, *Clostridium difficile*,

Clostridium cluster, *Bacteroides fragilis group* и *Lactobacillus*. В результате исследования было выявлено, что повышенная колонизация кишечника *Clostridium cluster* в возрасте от пяти до тринадцати недель связана с повышенным риском развития атопического дерматита в последующие 6 месяцев жизни ребенка [147]. В 2016 году Zheng с соавт. провели исследование микробиоты кала у пациентов с атопическим дерматитом ($n = 50$) и здоровых лиц ($n = 51$) на китайской популяции с использованием метода 16S секвенирования бактериальных генов. В результате исследования установлено, что на уровне родов бактерий у пациентов с атопическим дерматитом в микробиоте кала увеличивается количество *Escherichia/Shigella*, *Veillonella*, *Faecalibacterium*, *Desulfovibrio*, *Paraprevotella*, *Porphyromonas*, *Rhizobium* и *Clostridium*, в то время как у контрольной группы отмечалось преобладание *Bifidobacterium*, *Megasphaera*, *Haemophilus* и *Streptococcus* [194].

Касательно рода *Bifidobacterium* имеются сведения о том, что разные виды данного рода показывают разнонаправленную ассоциацию с наличием атопического дерматита. В исследовании, проведенном Ismail и соавт. в 2016 году, с помощью ПЦР в реальном времени установлено, что *Bifidobacterium catenulatum* уменьшают тяжесть атопического дерматита, тогда как *Bifidobacterium breve* наоборот, отрицательно влияют на течение заболевания [95]. Положительно влияет на организм и *Bifidobacterium longum*. Эти бактерии особенно эффективны для защиты от инфекционных заболеваний и модуляции иммунного ответа. Статистический анализ показал, что дети с АД имеют более низкое содержание *B. Longum*, чем группа здоровых детей [22, 25].

В 2018 году Woregis с соавт. проведено исследование микробиоты кишечника у пациентов с атопическим дерматитом ($n=52$) и здоровых лиц ($n=86$). Работа включала в себя клиническое обследование и 16S секвенирование (V5-V6 фрагмента) микробиоты кала по технологии 454 Life Sciences на приборе FLX Titanium, Roche. В результате исследования на данной популяции выявлено увеличение бактерий рода *Parabacteroides* и *Enterobacter*, а у пациентов контрольной группы отмечалось большое содержание *Eubacterium* [189].

У детей с АД, находящихся на смешанном вскармливании, отмечалось снижение числа расщепляющих муцин бактерий, таких как *Akkermansia muciniphila* и *Ruminococcus gnavus*, которые снабжают колонии бактерий питательными веществами в период формирования микробиоты. Сокращение числа таких бактерий у детей с АД может привести к отсроченной бактериальной колонизации и нарушению созревания иммунной системы [50].

Также, согласно другим исследованиям, дети, генетически не предрасположенные к атопии, имели большее количество бифидо-/лактобактерий, в отличие от детей с отягощенным аллергоанамнезом [169].

В 2015 году Verni Canani и соавт. изучали микробиоту кишечника детей с пищевой аллергией (IgE - зависимая, к молоку, n=19) и здоровых лиц (n=20) на пациентах итальянской популяции. Работа включала в себя клиническое обследование и 16 S секвенирование бактериальных генов (V4 региона). В результате исследования на данной популяции отмечалось увеличение α -разнообразия (таксономического богатства) микробиоты кишечника у детей с атопией. На уровне родов у пациентов с пищевой аллергией в микробиоте кала повышается численность *Ruminococcus* и *Faecalibacterium*; в группе контроля отмечалось повышение *Bifidobacterium* и *Escherichia* [142].

В другом научном исследовании у детей с пищевой аллергией (IgE-зависимая и IgE-независимая, к молоку n=46) и группой здоровых детей были выявлены различия на уровне родов, у пациентов с IgE-независимой пищевой аллергией в микробиоте кала увеличено количество бактерий *Sarcina*, *Bacteroides* и *Alistipes*. У пациентов с IgE-зависимой пищевой аллергией по сравнению с пациентами с IgE-независимой аллергией в микробиоте кишечника на уровне родов увеличивалось содержание *Bacteroides*, *Alistipes*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium* и снижалась представленность *Akkermansia*, *Raoultella*, *Eubacterium*, *Blautia* [34].

В проведенном исследовании на китайской популяции у детей с аллергией на БКМ выявлено снижение α -разнообразия (таксономического богатства) микробиоты кишечника. На уровне родов различий в таксономическом составе микробиоты выявлено не было. На уровне семейств у пациентов с пищевой

аллергией отмечалось увеличение представленности Enterobacteriaceae и снижение содержания Bacteroidaceae [62],

Другое исследование показало снижение α -разнообразия у детей с атопией, а так же повышение бактерий рода Clostridium и Subdoligranulum [44]

В исследовании детей в возрасте 10 лет с экземой и астмой, наиболее выраженное снижение альфа - разнообразия выявлено в группе детей с экземой, а бета-разнообразие было ниже у детей с ингаляционной аллергией. Также установлено снижение видов бактерий Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, UCG-005 и Christensenellaceae R-7 group у детей с экземой [89].

В 2021г. Marrs T. и соавт. провели исследование микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом в возрастной группе 3 -12 мес. У детей на искусственном вскармливании после введения аллергенных продуктов выявлено значительное увеличение разнообразия Шеннона и повышение бактерий Prevotellaceae и Proteobacteria по сравнению с детьми на грудном вскармливании [132].

В польском исследовании группы детей от 0-6 мес с атопическим дерматитом и здоровых детей не обнаружено снижения альфа - разнообразия, однако выявлено преобладание Бактероидов у детей с АД, а у детей контрольной группы выявлено повышение Fusicatenuibacter saccharivorans, Lactococcus lactis, Serratia marcescens [120].

1.3. Молекулярно-генетические методы исследования микробиоты кишечника

В 2008 г. был запущен глобальный проект «Микробиом человека» (HMP), целью которого стала расшифровка генома бактерий организма человека. Появление молекулярно генетических методов исследования за последнее десятилетие коренным образом изменили подход в изучении бактериальных сообществ. Данные методы предоставляют полную характеристику спектра микробиоты, поскольку позволяют не только определять видовое разнообразие

микроорганизмов в исходном образце, но и оценивать их количественные соотношения. Уже расшифровано более 3 млн генов бактерий, что примерно в 150 раз больше набора генов человека [117, 158].

С внедрением в науку и практику молекулярно-генетических методов исследования стало понятно, что спектр микроорганизмов кишечной микробиоты значительно шире того, что был известен на основании результатов микробиологических методов исследования [74, 177, 121]

Данные методы позволяют:

- идентифицировать микроорганизмы до вида и даже штамма;
- идентифицировать некультивируемые виды микроорганизмов;
- выявлять патогенные микроорганизмы;
- расшифровывать геномы микроорганизмов;
- идентифицировать и расшифровывать геномы вирусов;
- оценивать устойчивость микроорганизмов к антибиотикам и выявлять ее причины на генетическом уровне;
- проводить оценку экспрессии генов (степень их активности) в норме и при различных патологических состояниях;
- осуществлять количественную оценку видов в сообществе;
- расшифровывать структуру сообществ микроорганизмов;
- выполнять мониторинг состояния сообществ во времени, быстро идентифицировать нарушения структуры микробиоценоза;
- проследить микроэволюцию микроорганизмов;
- изучать индивидуальные особенности взаимодействия организма с компонентами собственной микробиоты;
- оценивать специфические свойства отдельных микробных штаммов.

Учитывая все перечисленные сложности, для видовой идентификации на современном уровне развития науки все чаще применяют сочетание методов культивирования и визуального наблюдения с методами молекулярной биологии и генетики, позволяющими различать виды и штаммы микроорганизмов на уровне молекул нуклеиновых кислот.

На настоящий момент, одним из наиболее популярных методов исследования состава микробиоты кишечника является **ампликонное секвенирование** фрагментов гена 16S рРНК бактерий [139].

Благодаря тому, что главным геном, с фрагментом которого работают исследователи, является ген, кодирующий бактериальную 16S рибосомальную РНК (16S рРНК) данный метод зачастую называют 16S секвенированием.

16S секвенирование используется для оценки таксономического состава исследуемых сообществ (относительно бактерий и археев) и отвечает на вопрос: «Кто обитает в данном микробиоме?».

Основой использования 16S секвенирования для исследования таксономического состава микробиоты является применение оценки последовательностей маркерных генов – таких генов, структура которых отражает таксономическое положение микроорганизма. Наиболее часто в качестве маркерного гена используется ген 16S рРНК.

С методической точки зрения, 16S секвенирование состоит из нескольких этапов [91].

Первый этап заключается в создании библиотеки последовательностей для секвенирования. На этом этапе из биологического материала – тотальной бактериальной ДНК, амплифицируется целевая последовательность с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

На втором этапе происходит пришивание баркодов к амплификатам [107].

Баркоды представляют собой олигонуклеотидные ДНК, последовательность которых уникальна для каждого конкретного образца. Эти баркоды используются в качестве метки, которая позволяет дифференцировать прочтения одного образца от прочтений, полученных от другого образца.

После приготовления библиотек образцы направляют на секвенирование. Результатом проведения такого секвенирования являются прочтения выбранного фрагмента, представляющие собой файлы в формате fastq, в которых содержится буквенное описание прочитанных последовательностей, сопровождающееся информацией о качестве каждой из букв.

После фильтрации прочтений по качеству проводится идентификация и удаление химерных последовательностей – прочтений, являющихся результатом ошибки работы секвенатора. Прочтения, прошедшие проверку качества агрегируют в операционные таксономические единицы (ОТЕ). Существуют три основных стратегии идентификации операционных таксономических единиц при проведении исследования микробиоты при помощи высокопроизводительного ампликонного секвенирования бактериальных генов 16S рРНК: поиск *de novo*, поиск на основании референсной базы и гибридный подход [43].

После идентификации операционных таксономических единиц проводится определение их таксономического положения. Для этой цели существует целый ряд алгоритмов (RDP, blast, uclust, mothur и др.), которые можно разделить на две большие группы [185]. К первой группе относятся алгоритмы, которые определяют таксономическое положение последовательности на основании ее побуквенного сходства с центроидом – последовательностью, взятой из базы данных [65]. Принцип работы второй группы алгоритмов заключается в использовании подходов машинного обучения, относящих последовательности к определенному классу ОТЕ на основе ранее проведенного процесса обучения на тренировочной выборке [52].

После установления таксономического состава микробиоты обычно проводится оценка показателей, характеризующих сообщество с точки зрения разнообразия. Альфа - разнообразие (таксономическое богатство микробиоты) – описывает количество различных видов в одном образце стандартизированного размера. Для его оценки используется ряд индексов: Шеннона, Чао, Фэйта, Симпсона. Высокий уровень таксономического богатства говорит о стабильности сообщества, тогда как низкий уровень разнообразия ассоциирован с воспалительными процессами в прилежащем органе [157].

Бета - разнообразие является мерой попарного различия между образцами, оно показывает, насколько сильно один микробиом отличается от другого (или одна группа микробиомов от другой) по совокупному видовому составу. Для оценки бета - разнообразия образцы «размещают» в многомерном пространстве, с числом осей координат равным числу ОТЕ. Координатами на осях отображают

количество той или иной ОТЕ в образце, либо (для некоторых метрик) факт наличия ОТЕ. Расстояние между образцами, выражающее степень различий между микробиомами по таксономическому составу, определяют с учетом выбранной метрики. Для метагеномных исследований наиболее оптимальной метрикой является UniFrac (от англ. unique fraction - уникальная доля), которая учитывает степень филогенетических различий между микробиомами, а не только различия в количественной представленности или наличии определенных микроорганизмов [122].

После определения таксономического разнообразия проводится статистический анализ. Инструментарий и тактика анализа в первую очередь зависит от гипотезы, поставленной исследователем, однако при статобработке метагеномных данных следует принимать во внимание особенности распределения бактерий. Для аппроксимации зачастую используют распределение Пуассона, нольнасыщенное Гауссово распределение, биномиальное распределение. Статистический инструментарий, используемый для анализа микробиоты широко представлен в языке программирования R, в частности в пакетах metagenome Seq, DeSeq220, Maaslin и др. [136, 146].

16S секвенирование напрямую дает информацию только о таксономическом составе микробиоты, однако существуют подходы по реконструкции функционального потенциала исследуемых сообществ. К ним относится алгоритм PICRUSt, принцип работы которого основан на предположении о том, что геном микроорганизмов, определенных по последовательностям 16S не отличается от референсных последовательностей полных геномов данных микроорганизмов [115].

Этот алгоритм позволяет проводить ориентировочную оценку функционального потенциала микробиоты.

Таким образом, изучение роли микробиоты в жизнедеятельности организма человека позволило по - новому взглянуть на патогенез атопического дерматита. На сегодняшний день актуальность проблемы данного заболевания обусловлена не только его широкой и повсеместной распространенностью, но и ростом заболеваемости, а также низкой диагностической ценностью традиционных

методов исследования. В российской популяции недостаточно данных, характеризующих состав микробиоты кишечника у детей с атопическим дерматитом. Этим объясняется актуальность проведения новых научных исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена с ноября 2018г. по апрель 2021г на кафедре педиатрии и детских инфекционных болезней Клинического института детского здоровья им.Н.Ф.Филатова ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, на базе ГБУЗ ДГКБ № 9 им. Г.Н.Сперанского.

В соответствии с поставленной целью разработан протокол исследования, который одобрен Локальным этическим комитетом ГБУЗ «ДГКБ №9 им Г.Н. Сперанского» 18.09.18г №19/2, а также ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России 22.01.2021г. № 01–21.

Проведено проспективное, одномоментное, нерандомизированное исследование с формированием двух независимых выборок — детей с АтД и условно - здоровых детей в возрасте от 1 года до 5 лет включительно. Основная группа составила 60 детей с АтД, группа контроля включала 15 условно - здоровых детей. Объем выборки был ограничен финансовыми возможностями. Все дети находились на поликлиническом наблюдении в филиале №1 (Поликлиническое отделение) ГБУЗ ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского. Законные представители детей были приглашены принять участие в исследовании при плановом посещении врача аллерголога - иммунолога или педиатра, а также по телефону.

Перед проведением обследования у всех законных представителей пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии включения пациентов в экспериментальную группу.

- 1) Возраст от 1 года до 5 лет включительно.
- 2) Документально подтверждённый диагноз атопический дерматит.
- 3) Наличие подписанной формы информированного согласия на участие в данном исследовании.

Критерии исключения из исследования:

- 1) Проводимая антибактериальная/ пробиотическая терапия за 3 месяца до исследования.
- 2) Наличие сопутствующего хронического заболевания

2.1. Дизайн исследования

Перед проведением научной работы, для достижения поставленной цели и решения задач, создан дизайн исследования, который представлен на схеме 1.

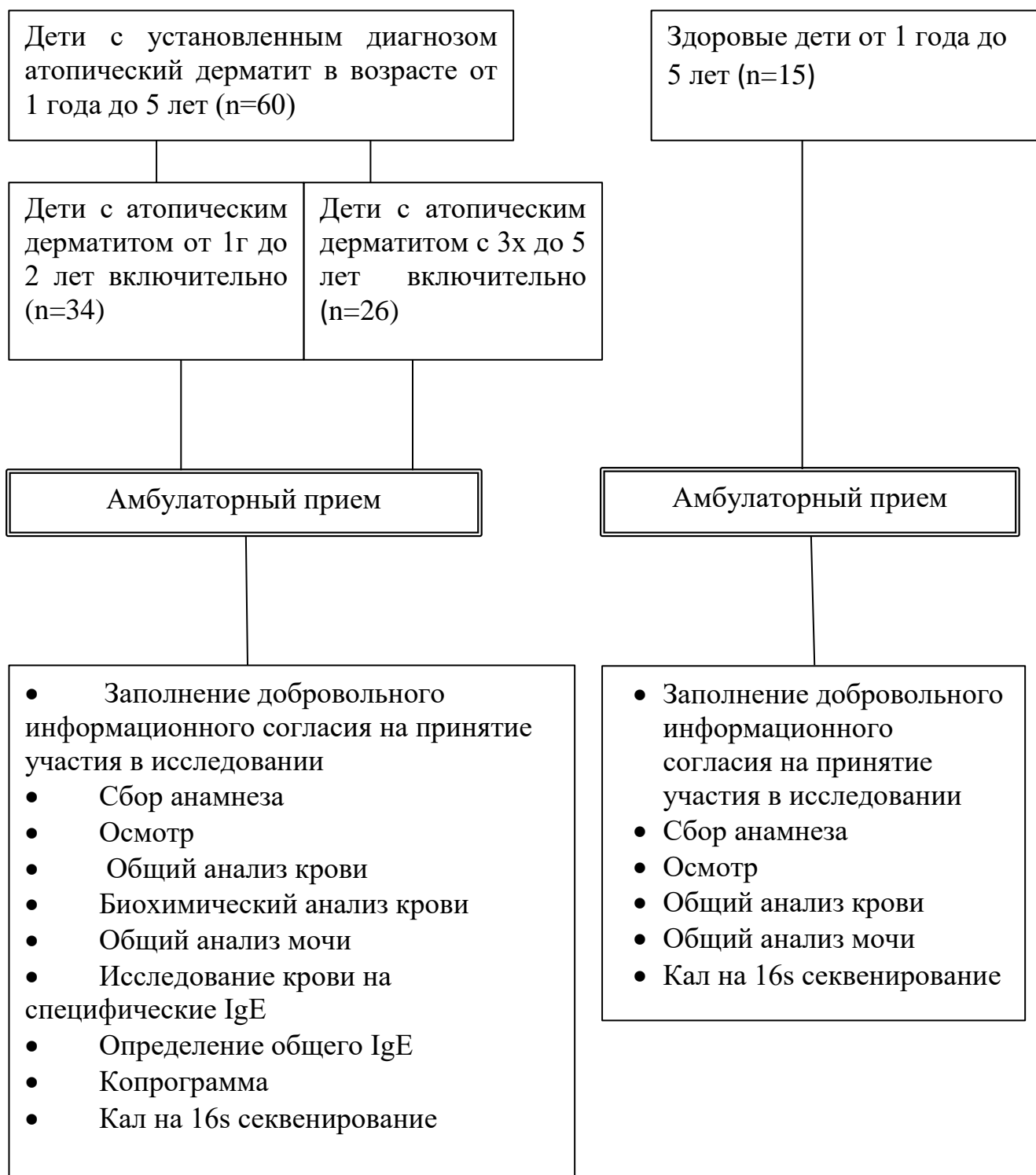


Схема 1 - Дизайн исследования

2.2. Характеристика пациентов

Основную группу составили 60 детей в возрасте от 1 года до 5 лет включительно, с установленным диагнозом атопический дерматит, из них 40 мальчиков (66%) и 20 девочек (34%), контрольная группа 15 условно - здоровых детей: 10 мальчиков (66%), 5 девочек (44%).

Основная группа и группа контроля были сопоставимы по полу и возрасту ($p > 0,05$).

Средний возраст пациентов с АД составил $2,37 \pm 0,19$ года, контрольной группы $3,53 \pm 0,12$ года.

После получения клинических данных, дети были разделены на подгруппы в соответствии с клиническими проявлениями заболевания:

1. N1= 60 человек (I группа) - дети, с установленным диагнозом атопический дерматит:

- 30 человек (50%) - дети с АД в стадии обострения (среднетяжелое течение), из них 15 детей (25%) с признаками вторичного инфицирования;
- 11 человек (19%) - дети с АД в стадии неполной ремиссии (легкое течение);
- 19 (31%) детей с АД в стадии ремиссии.

С целью сравнения результатов планируемого исследования создана контрольная группа условно - здоровых детей в возрасте от 1 года до 5 лет включительно:

2. N2= 15 человек (II группа) – контрольная группа.

Распределение больных с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения заболевания, а также по полу и возрасту, представлены в Таблице 1.

Установлено, что осложненное течение атопического дерматита, признаками вторичного инфицирования наблюдается у детей более раннего возраста по сравнению с детьми, находящимися в стадии ремиссии заболевания ($p < 0,05$).

Существенных различий по половому признаку у детей с АтД в зависимости от клинического течения заболевания не обнаружено ($p > 0,05$).

Таблица 1 - Распределение больных АтД по полу и возрасту в зависимости от течения заболевания

Показатель	Неполная ремиссия (n=11)	Обострение, неосложненное течение (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирования (n=15)	Ремиссия (n=19)	P
Возраст, Ме [Q1-Q3]	1,11 [1 - 1,95]	2,75 [1,1 - 4,5]	1 [1 - 1,8]	3 [1 - 4]	0,038*
Девочки. абс. (%)	1 (9,09)	5 (33,33)	7 (42,95)	7 (36,84)	0,223
Мальчики, абс. (%)	10 (90,91)	10 (66,67)	8 (47,05)	12 (63,16)	0,223

В результате сравнения показателя «возраст» в зависимости от проявления заболевания использован метод Краскела-Уоллиса. При сравнении показателя «пол» использован точный критерий Фишера для многопольных таблиц.

* p инфицирование / ремиссия $< 0,05$

Всем детям проведен анализ анамнестических данных, с определением факторов риска развития атопического дерматита (патологическое течение беременности, оперативные роды, искусственное вскармливание, отягощенный семейный анамнез по атопии).

Анализ анамнестических данных детей с АтД при различных клинических формах представлен в Таблице 2. Статистически значимых различий в исследуемых группах не выявлено ($p > 0,05$).

В основной группе 46 детей (77%) рождены естественным путем, а 14 детей (23%) - путем кесарева сечения. В контрольной группе 12 детей (80%) рождены естественным путем, а 3 ребенка (20%) – путем кесарева сечения.

Отношение шансов развития АтД в 1,7 раза выше у детей, рожденных путем кесарева сечения. Наблюдаемая зависимость является статистически значимой, так как 95% ДИ не включает 1.

Принимая во внимание значимую роль питания в развитии и реализации АтД, оценке характера вскармливания обследованных детей уделена большая роль в данном исследовании. В ходе сбора анамнеза, оказалось, что 28 детей

(47%) получали исключительно грудное вскармливание до 6 месячного возраста. 32 пациента (53%) на первом полугодии жизни получали искусственное питание адаптированными молочными смесями, из них 11 детей находились на смешанном вскармливании. До 1 года грудное молоко получали 9 детей (15%) и лишь 2 ребенка получали грудное вскармливание до 1,5 лет.

Адаптированные молочные смеси на основе цельного белка коровьего молока получали 28 детей (47%), 8 пациентов (13%) - смеси на основе частично гидролизованного сывороточного белка. Кроме того, 4 ребенка (7%) получали другие смеси: смеси на основе козьего молока, безлактозные, соевые. Стоит отметить, что только 3 человека (5%) получали смеси на основе высокогидролизованного белка, после установления диагноза АтД.

Отношения шансов развития АтД в 2,4 раза выше у детей на искусственном вскармливании. Наблюдаемая зависимость является статистически значимой, так как 95% ДИ не включает 1.

Средняя продолжительность грудного вскармливания составила 5 месяцев.

Средний возраст введения прикорма пациентам с АтД составил $5,5 \pm 0,53$ месяцев (88,3% детей прикорм введен в возрасте 4 - 6 месяцев). Чаще всего, в качестве продуктов первого прикорма использовались овощные пюре и каши, затем фрукты, соки. В возрасте 6-8 месяцев вводились мясные пюре, творог, кефиры.

В контрольной группе 9 детей (60%) находились на грудном вскармливании, а 6 детей (40%) получали искусственное питание адаптированными молочными смесями.

Отягощенный семейный анамнез по атопии отмечался у 21 ребенка с атопическим дерматитом (35%). У 15 детей атопическими заболеваниями страдал один из родителей - 30% (1е родство), у 6 детей (10%) аллергические заболевания имели оба родителя, кроме того у 5% детей атопией страдали бабушки или дедушки (2е родство). В группе контроля аллергические заболевания имели родители 2х детей (8%).

Отношение шансов развития АтД у детей с отягощенным семейным анамнезом по атопии в 3,6 раза выше. Данная зависимость является статистически значимой, так как 95% ДИ не включает 1.

Таблица 2 - Распределение больных АтД по анамнезу в зависимости от течения заболевания

Показатель, абс. (%)	Неполная ремиссия (n=11)	Обострение, неосложненное течение (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирования (n=15)	Ремиссия (n=19)	p
Роды самостоятельные	8 (72,73)	9 (60)	12 (80)	17 (89,47)	0,224
Кесарево сечение	3 (27,27)	6 (40)	3 (20)	2 (10,53)	0,242
Естественное вскармливание	5 (45,45)	7 (46,66)	5 (33,33)	11 (57,89)	0,585
Искусственное вскармливание	6 (54,54)	8 (53,33)	10 (66,67)	8 (42,10)	0,452
Семейный анамнез по атопии	3 (27,27)	7 (46,66)	8(53,33)	3(15,78)	0,222
Проявления атопии у обоих родителей	2 (13,33)	2 (13,33)	2 (13,33)	0	0,550

При сравнении показателя «анамнез» в зависимости от течения заболевания использован точный критерий Фишера для многопольных таблиц.

Средний возраст дебюта заболевания у обследованных пациентов составил $6,25 \pm 0,25$ месяцев.

У 8 детей (13%) первые проявления атопии возникли в 2 -3 месяца жизни, в большинстве случаев после введения в рацион молочной смеси, у 2х детей проявление аллергии отмечалось на грудном вскармливании. У 24 детей (40%) первые признаки аллергии появились в возрасте 3-6 месяцев и также ассоциировались с переходом на искусственное/смешенное вскармливание или введением прикорма. 25 детей (42%) имели проявление аллергии во втором полугодии жизни и у 3 детей (5%) первые симптомы заболевания появились на 2м году жизни.

В качестве основных объективных показателей тяжести течения АД использован индекс SCORAD, разработанный Европейской рабочей группой и рекомендованный Российской Ассоциацией Аллергологов и Клинических Иммунологов, Союзом Педиатров России и Ассоциацией Детских Аллергологов и Иммунологов России [53, 143].

Пациентам с АД проводилось клиническое обследование, с оценкой клинического статуса по шкале SCORAD (Приложение А, Таблица А.1, А.2).

При этом легкое течение АД диагностировалось при значении показателя SCORAD до 20 баллов, среднетяжелое течение – при значении 20 - 40 баллов, тяжелое – при значении более 40 баллов.

При оценке степени тяжести АД у детей преобладало среднетяжелое течение заболевания (30 детей- 50%), индекс SCORAD составил $33,66 \pm 1,2$ балла. У 11 человек (19%) было выявлено легкое течение заболевания, индекс SCORAD составил $10,88 \pm 0,68$ балла, а 19 пациентов (31%) находились в стадии ремиссии, индекс SCORAD составил 0 баллов (Рисунок 1).

Кроме того, использовалась шкала оценки степени тяжести (IGA) на момент проведения исследования (<https://www.eczemaouncil.org/research/investigator-global-assessment-scale/>). Поражение кожи оценивалось визуально и пальпаторно по 5-бальной шкале от 0 баллов до 4 баллов, где 0 баллов соответствовало чистой коже, а максимальная оценка в 4 балла соответствовала атопическому дерматиту тяжелой степени тяжести (Приложение В, Таблица В.1).

Стоит отметить, что детей с тяжелым течением атопического дерматита в данном исследовании не наблюдалось.

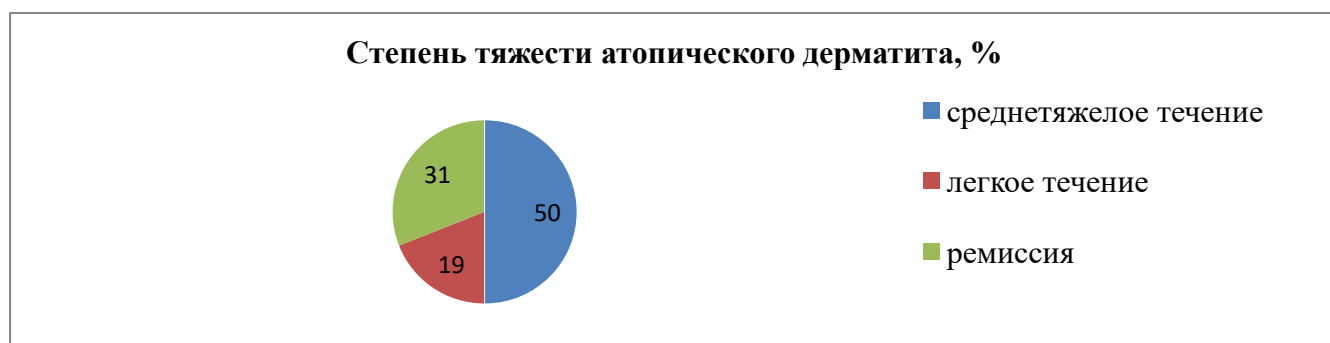


Рисунок 1 - Распределение детей с атопическим дерматитом по степени тяжести заболевания

Среди кожных проявлений АД у обследованных пациентов наиболее часто встречались сухость кожных покровов (в 68% случаев), участки шелушения (в 68% случаев), гиперемии (в 61% случаев), корочки (в 60% случаев), мокнутие (25% случаев), папулы (25% случаев), микровезикулы (25% случаев), эскориации (в 55% случаев), лихенификации (в 21% случаев), кожный зуд (68%).

Заболевание носило рецидивирующее течение у 58 пациентов (96,6%). При этом 33 ребенка (55%) имели не частые обострения, от 1 до 3 рецидивов АД в год, 25 детей (42%) – имели более 3 обострений в год, у 2х детей (3%) отмечалась длительная ремиссия (более 2х лет).

Признаки вторичного инфицирования с наличием пустул, везикул, мокнутия, серозно-кровянисто-гнойных корочек на пораженных участках кожи выявлены у 15 чел. (25%). Вышеперечисленные симптомы имели статистически значимые различия в зависимости от течения заболевания ($p < 0,05$, Таблица 3).

Таблица 3 - Анализ клинических данных в зависимости от течения атопического дерматита

Показатель абс. (%)	Неполная ремиссия (n=11)	Обострение, неосложненное течение (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирования (n=15)	Ремиссия (n=19)	P
Сухость	11 (100)	15 (100)	15 (100)	2 (10,53)	<0,001**
Шелушение	11 (100)	15 (100)	15 (100)	0	<0,001**
Гиперемия	9 (81,82)	12 (80)	15 (100)	0	<0,001**
Корки	8 (72,73)	12 (80)	15 (100)	0	<0,001**
Эскориации	3 (27,27)	14 (93,33)	15 (100)	0	<0,001**
Лихенификации	1 (9,09)	4 (26,67)	8 (53,33)	0	<0,001**
Зуд днем	6 (54,55)	15 (100)	15 (100)	0	0,026* < 0,001**
Зуд в ночное время	5 (45,45)	6 (40)	15 (100)	0	0,021* < 0,001**

Анализ данных проведен с использованием точного критерия Фишера для многопольных таблиц

* p неполная ремиссия/ ремиссия < 0,05

** p обострение, инфицирование / ремиссия < 0,05

2.3. Методы исследования

Всем детям основной группы проведена лабораторная диагностика, которая включала стандартные лабораторные исследования: клинический и биохимический анализ крови, общий анализ мочи, клинический анализ кала, бактериологическое исследование кала; иммунологическое исследование: определение эозинофильного катионного белка (ЭКБ), общего и специфических IgE; молекулярно – генетическое исследование: исследование образцов кала методом 16s секвенирования бактериальных генов .

Детям из группы контроля проведены стандартные лабораторные исследования: клинический анализ крови, общий анализ мочи и молекулярно – генетическое исследование: исследование образцов кала методом 16s секвенирования бактериальных генов.

Клиническое обследование включало проведение общего анализа крови, который проводился на гематологическом анализаторе CELL-DYN Ruby «АВОТТ» Laboratories, путем забора периферической крови, с определением основных показателей на медицинском гематологическом анализаторе. Эозинофилией периферической крови считали 4 % и более эозинофилов в лейкоцитарной формуле. Обследовано 75 детей (основная группа и группа контроля), повышение уровня эозинофилов обнаружено у 15 детей основной группы (25%).

Клинический анализ мочи проводился всем обследуемым детям, с использованием мочевого станция Siemens AUW Clinitek Atlas и UF-1000. Обследование проведено всем исследуемым детям (основная группа и группа контроля -100%), существенных изменений в данном анализе у исследуемых групп не получено.

Биохимический анализ крови проводился на автоматическом биохимическом анализаторе Architect c16000 «АВОТТ» Laboratories, путем забора венозной крови с определением аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), билирубина общего, глюкозы, общего белка.

Исследование проведено всем детям основной группы (60 человек). Значимых изменений данных показателей не получено.

Определение уровня общего IgE осуществлялось автоматическим биохимическим анализатором Architect c16000 «АВОТТ» Laboratories. Производили забор венозной крови, показатель выражался в МЕд/мл. Обследовано 50 детей основной группы (80%), повышение данного показателя выше 80 МЕд/мл обнаружено у 9 обследуемых детей (18%).

Для исследования аллерген - специфических IgE, производился забор венозной крови с использованием хемилюминесцентного метода с применением иммунохемилюминесцентного анализатора Immulite 2000XPi, Siemens Medical Solushins Diagnostics. Обследовано 50 детей основной группы (80%). Различная степень сенсибилизации к пищевым продуктам выявлена у 94% обследуемых больных (Таблица 4). Стоит отметить, что у большей части детей (88%) выявлена аллергия на белок коровьего молока (БКМ).

Таблица 4 - Определение сенсибилизации к различным аллергенам у детей с атопическим дерматитом (n=50)

№ п/п	Аллерген	Абсолютное количество детей, %	Относительное количество детей, %
1.	Молоко коровье	44	88
2.	Козье молоко	28	46
3.	Овес	6	12
4.	Гречневая крупа	3	6
5.	Сыр	29	56
6.	Говядина	15	30
7.	Пшено	8	16
8.	Куриное яйцо	11	22
9.	Кефир	17	34
10.	Свинина	6	12

Всем обследуемым детям с АтД проведено клиническое исследование кала с помощью микроскопа (с комплектами и камерой) Nikon Eclipse E200, Nikon Instech, которое показало наличие слизи у 16 детей (27%).

Определение ЭКБ выполнено 40 детям (66%) с АтД, из них у 17 человек (28%) отмечалось повышение данного показателя. Для исследования производили забор венозной крови и применяли твердофазный хемилюминесцентный иммуноферментный анализ ("сэндвич"- метод). Положительным считали результат более 24 Нг/мл.

Всем детям основной группы проведён бактериологический анализ кала на кишечную группу, с использованием бактериологического анализатора VITEK-2 bioMerieux. Бактерий тифо - паратифозной группы не обнаружено ни у одного пациента.

Секвенирование бактериальных генов 16S рРНК

Проведено исследование микробиоты кишечника у детей с атопическим дерматитом, а также условно – здоровых детей методом 16s секвенирования бактериальных генов (75 чел- 100%). У каждого пациента был собран биоматериал — кал, для проведения молекулярно - генетического исследования, который подвергся замораживанию до -20 С и доставлялся в лабораторию, где хранился до востребования при температуре -80 С.

Для исследования композиции микробиоты применяли ампликонное секвенирование маркерного переменного участка V3–V4 бактериальных генов 16S рРНК [91].

ДНК была выделена с помощью наборов D Neasy Power Lyzer Microbial Kit (QIAGEN) согласно инструкции производителя. Ампликонные библиотеки 16S рРНК были подготовлены с применением ПЦР с универсальными праймерами на регион V3-V4. Была использована следующая система праймеров: 515 F (5' - GTGBCAGCMGCCGCGGTAA - 3') [91] и Pro-mod-805 R (5'- GACTACNVGGGTMTCTAATCC - 3') [133]. Секвенирование было проведено на

приборе MiSeq (Illumina, США), в результате чего были получены прочтения длиной 150 пн с каждого конца ампликона. Целевое покрытие составило 10000 прочтений на образец.

Таксономическая классификация отфильтрованных ридов была проведена с помощью алгоритма QIIME2 naive-bayes classifier [39], обученного по подготовленной базе данных. Для анализа альфа - и бета - разнообразия, классифицированные риды были случайным образом прорежены до одинакового количества (3000 ридов на образец), для каждого образца. Оценка альфа - разнообразия каждого образца была проведена по мере разнообразия Шеннона. Число прочтений каждого микробного вида, рода и семейства было подсчитаны путем суммирования прочтений, отнесенных к ASV (ампликонным вариантам секвенирования), принадлежащих к соответствующему таксону.

2.4. Методы статистической обработки данных

Статистический анализ результатов проводился с помощью программы Statistica 12. Качественные признаки описывали при помощи абсолютных и относительных (%) величин. С помощью описательной статистики были рассчитаны средние значения и ошибка среднего (\pm). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению при помощи критерия Шапиро–Уилка. В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей [Q1–Q3].

Сравнительный анализ количественных данных осуществлялся при помощи t-критериев Стьюдента для независимых выборок. Сравнение процентных долей при анализе многопольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью точного критерия Фишера (при значениях ожидаемого явления менее 10). При сравнении количественных показателей двух независимых групп использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. При сравнении более двух независимых групп - критерий Краскела-Уоллиса. Значимость различий

оценивалась как вероятность совершить ошибку первого рода (p), при этом $p \leq 0,05$ считалось значимым. Корреляционный анализ количественных показателей выполнялся при помощи корреляции Спирмена (r_s). Тесноту связи между признаками меньше 0,3 – расценивается признаком слабой тесноты связи; значения более 0,3, но менее 0,7 - признаком умеренной тесноты связи, а значения 0,7 и более - признаком высокой тесноты связи. В большинстве случаев результаты работы продемонстрированы в виде таблиц и рисунков.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Состав микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом

Для оценки состояния микробиоты толстой кишки пациентам с атопическим дерматитом проводилось молекулярно - генетическое исследование методом секвенирования бактериальных генов 16S рРНК. Таксономическая классификация выделенных бактерий выполнена с использованием базы данных Национального центра биотехнологической информации США (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>) и представлена в Приложение Б (Таблица Б.1).

Количественный состав бактерий детей с атопическим дерматитом в среднем составил 7280 ± 737 микроорганизмов. Альфа - разнообразие составило $4,22 \pm 0,21$. На уровне типа бактерий от общего состава метагенома, наиболее представленными таксонами в микробиоте кишечника у пациентов с АД оказались Firmicutes $56,51 \pm 5,01\%$, затем Proteobacteria $14,17 \pm 2,52\%$ и Actinobacteria $8,17 \pm 1,41\%$ (Рисунок 2).

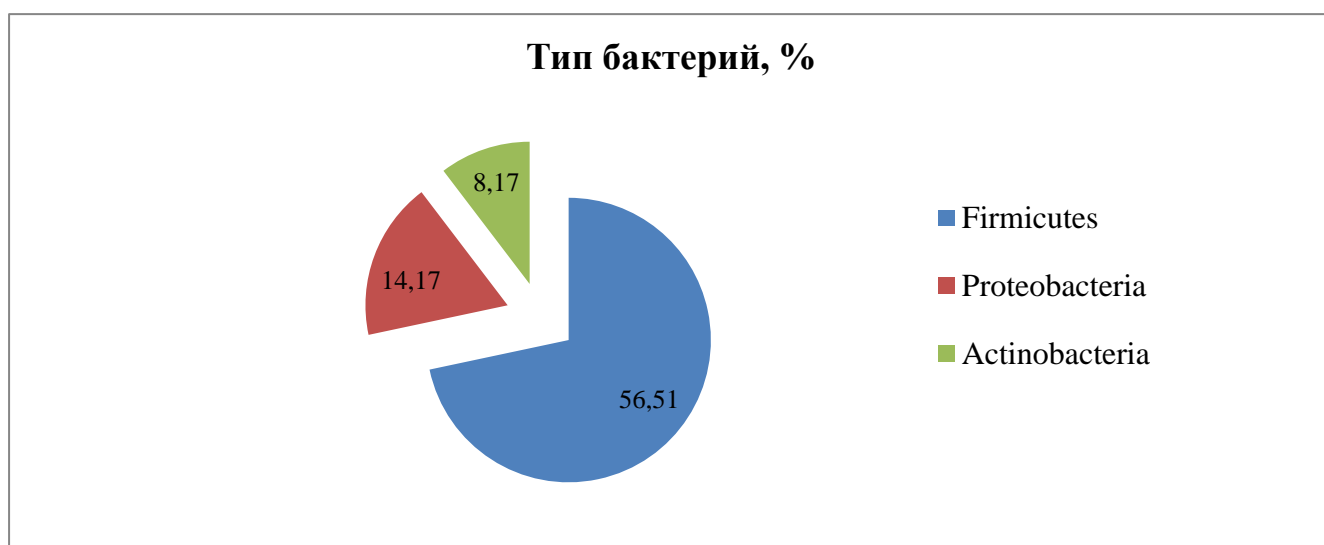


Рисунок 2 - Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом на уровне типа бактерий

На уровне класса бактерий (Рисунок 3) у детей основной группы в микробиоте преобладает относительное количество бактерий Clostridia ($45,47 \pm 2,57\%$ от состава метагенома). Кроме того, обнаружены Bacilli ($7,15 \pm 1,14\%$ от состава метагенома), Bacteroidia ($4,78 \pm 0,98\%$ от состава метагенома), Gammaproteobacteria ($3,53 \pm 0,94\%$ от состава метагенома) и Negativicutes ($1,25 \pm 0,33\%$ от состава метагенома).

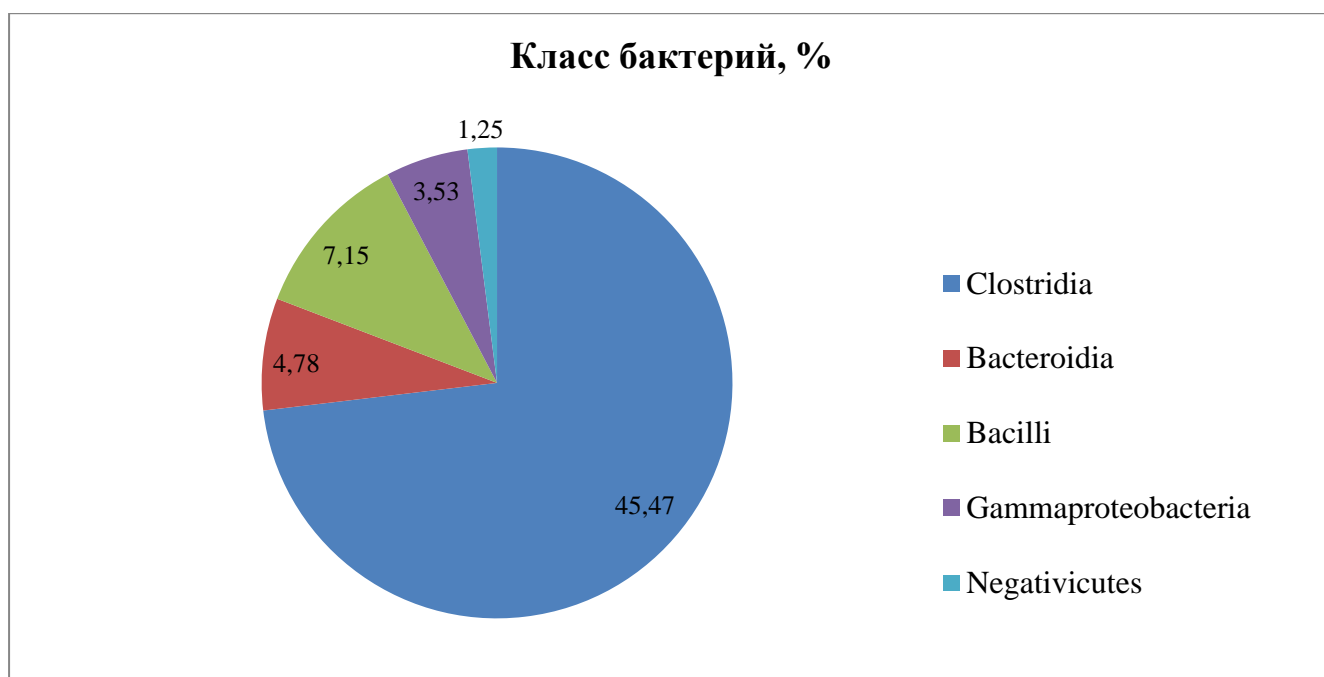


Рисунок 3 - Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом на уровне класса бактерий

На уровне отряда бактерий (Рисунок 4) в составе кишечной микробиоты были наиболее распространены Oscillospirales ($12,45 \pm 1,53\%$ от состава метагенома), Bacteroidales ($7,01 \pm 1,88\%$ от состава метагенома), Lactobacillales ($5,24 \pm 1,24\%$ от состава метагенома), Coriobacteriales ($2,2 \pm 0,9\%$ от состава метагенома), Erysipelotrichales ($1,15 \pm 0,21\%$ от состава метагенома) и Enterobacteriales ($1,6 \pm 1,7\%$ от состава метагенома).

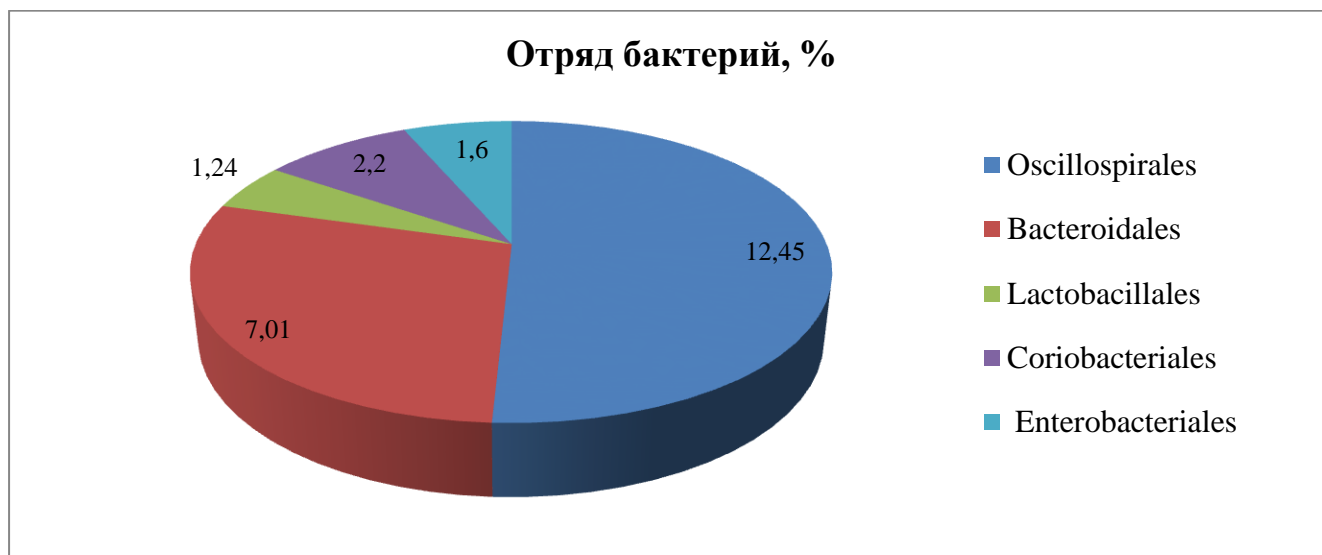


Рисунок 4 - Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом на уровне отряда бактерий

На уровне семейства бактерий в составе кишечной микробиоты обнаружены Ruminococcaceae ($15,53 \pm 1,72\%$ от состава метагенома), Enterobacteriaceae ($13,88 \pm 2,85\%$ от состава метагенома), Lactobacillaceae ($5,24 \pm 1,24\%$ от состава метагенома), Bifidobacteriaceae ($3,95 \pm 1,24\%$ от состава метагенома), Eggerthellaceae ($2,2 \pm 0,9\%$ от состава метагенома), Veillonellaceae ($1,72 \pm 0,36\%$ от состава метагенома), Peptostreptococcaceae ($1,6 \pm 1,7\%$ от состава метагенома), Prevotellaceae ($1,15 \pm 0,21\%$ от состава метагенома), Erysipelotrichaceae ($0,73 \pm 1,53\%$ от состава метагенома). Данные представлены на Рисунке 5.

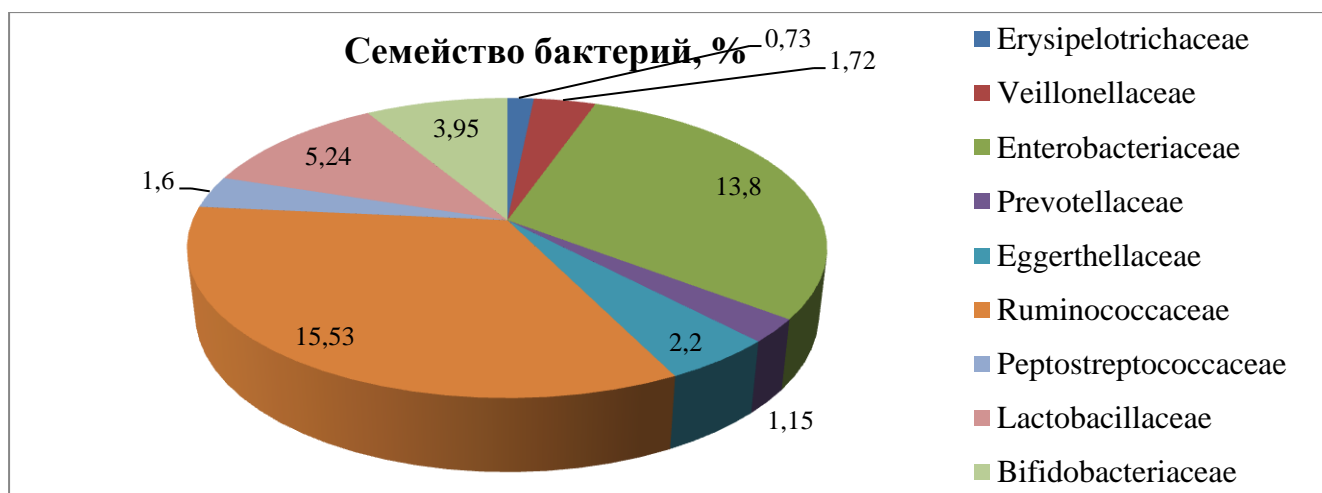


Рисунок 5 - Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом на уровне семейства бактерий

На уровне рода бактерий в метагеноме кишечной микробиоты чаще встречались *Blautia* $8,77 \pm 0,90\%$, *Faecalibacterium* $8,25 \pm 4,56\%$, *Escherichia-Shigella* $8 \pm 1,65\%$, *Bifidobacterium* $8,02 \pm 1,47\%$, *Enterobacter* $7,92 \pm 1,97\%$, *Bacteroides* $4,77 \pm 0,76\%$, *Ruminococcus* $2,32 \pm 0,57\%$, *Roseburia* $1,63 \pm 0,30\%$, *Lactobacillus* $1,16 \pm 0,56\%$, *Enterococcus* $1,32 \pm 0,58\%$, *Erysipelatoclostridium* $1,08 \pm 0,15\%$, *Veillonella* $1,18 \pm 0,34\%$, *Dorea* $0,71 \pm 0,12\%$ (Рисунок 6).

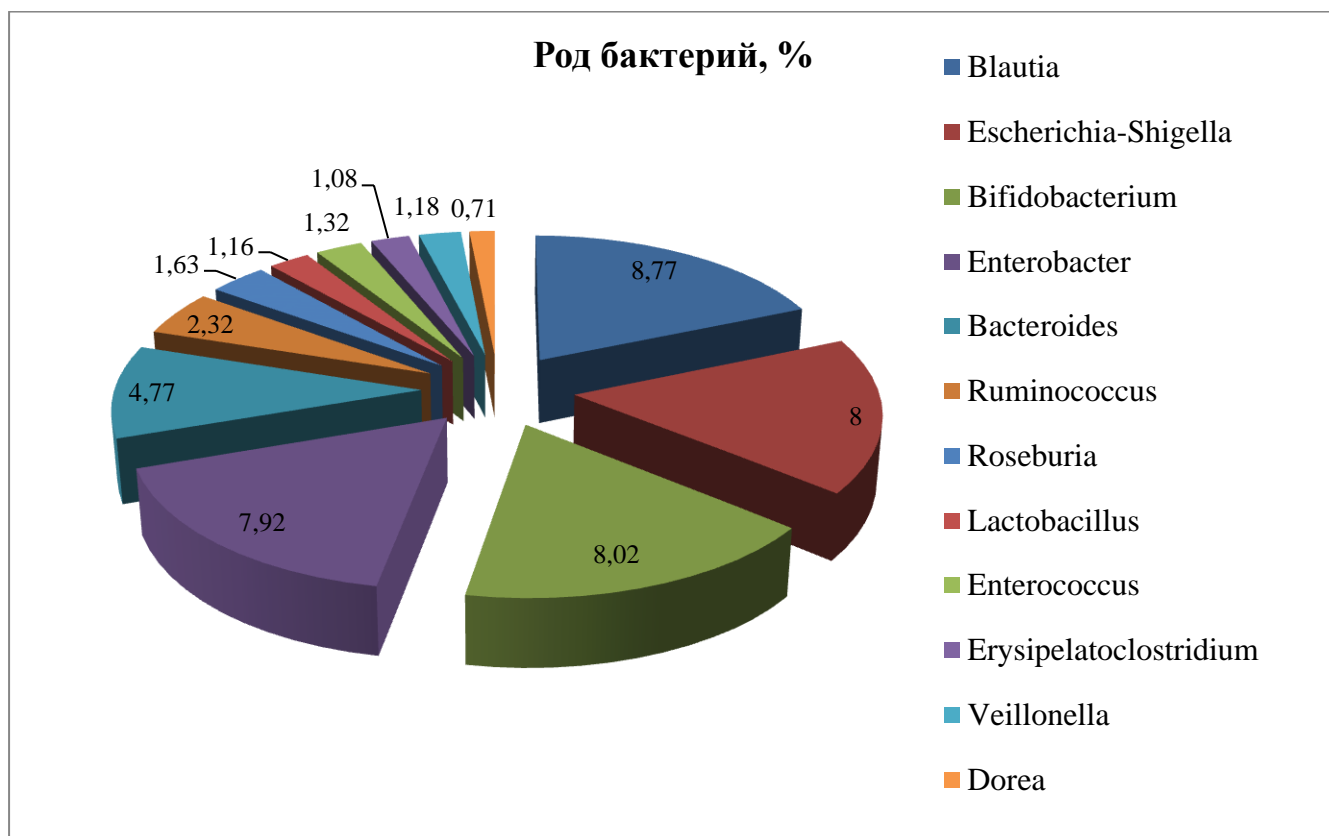


Рисунок 6 - Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом на уровне рода бактерий

На уровне вида бактерий в метагеноме микробиоты кишечника у детей с атопическим дерматитом наиболее часто встречались *Bifidobacterium longum* $1,98 \pm 0,67\%$, *Prevotella bivia* $0,38 \pm 0,04\%$, *Bacteroides fragilis* $1,25 \pm 0,16\%$, *Streptococcus salivarius* $2,49 \pm 0,59\%$, *Bifidobacterium bifidum* $1,23 \pm 0,51\%$, *Lactococcus lactis* $0,3 \pm 0,14\%$ (Рисунок 7).

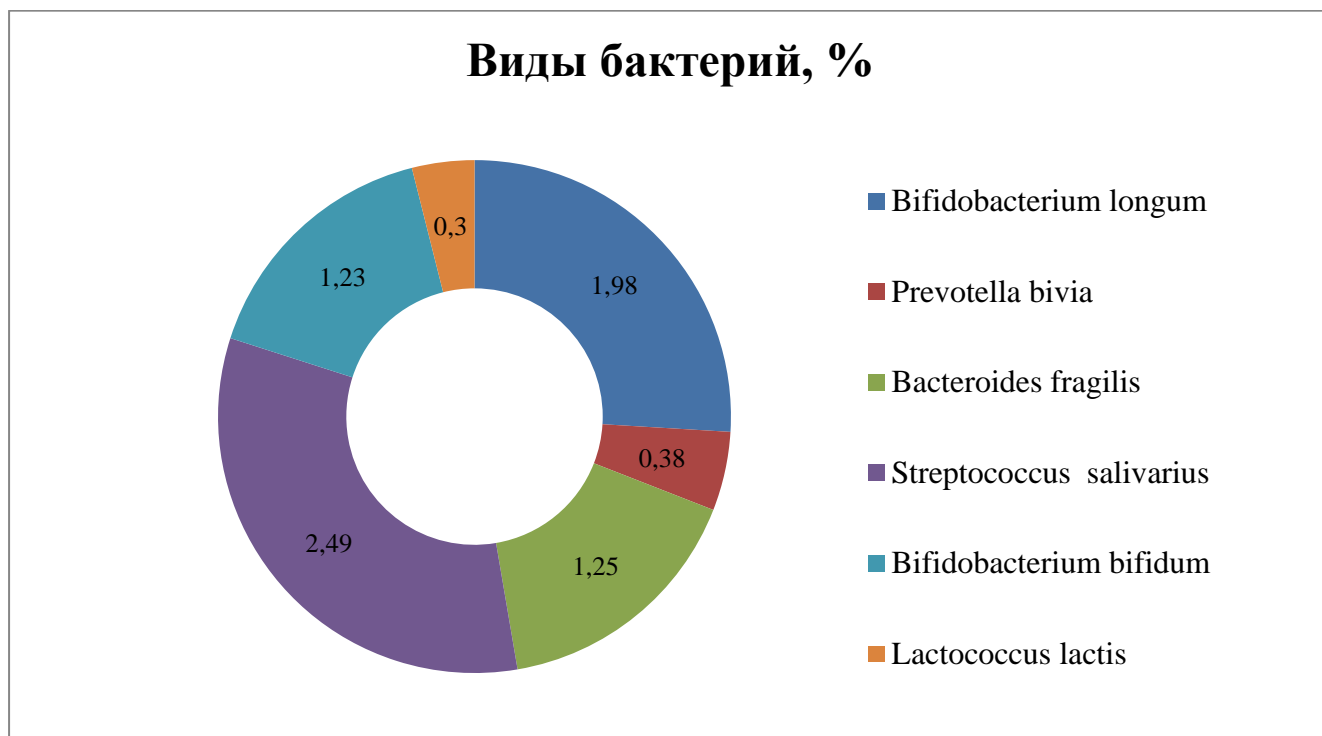


Рисунок 7 - Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом на уровне вида бактерий

3.2. Спектр микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения

Проведен сравнительный анализ микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения заболевания. Дети, в стадии обострения АД, а также имеющие осложненное течение заболевания, признаками вторичного инфицирования, имеют достоверные различия в количестве бактерий, а также в альфа - разнообразии, в сравнении с детьми, находящимися в стадии неполной и полной ремиссии ($p < 0,05$). Эти данные продемонстрированы в Таблице 5, а также на Рисунках 8 и 9.

Таблица 5 - Сравнительный анализ общего количества бактерий и альфа - разнообразия у детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения заболевания

Показатель, Me [Q1-Q3]	Альфа - разнообразие	Количество бактерий
Неполная ремиссия	4,86 [4,42 - 5,46]	6401 [5675- 12820,5]
Обострение	4,38 [3,58- 4,83]	3251 [2326 -5415,5]
Инфицирование	3,56 [1 - 4,86]	1613 [1207 - 5370]
Ремиссия	5,37 [4,94 -5,61]	10592 [9513,5- 14356]
P	P ремиссия /обострение = 0,012 P ремиссия/ инфицирование = 0,002	P инфицир./ неполная ремиссия = 0,01 P ремиссия/ обострение <0,01 P ремиссия/ инфицирование <0,01

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Краскела – Уоллиса

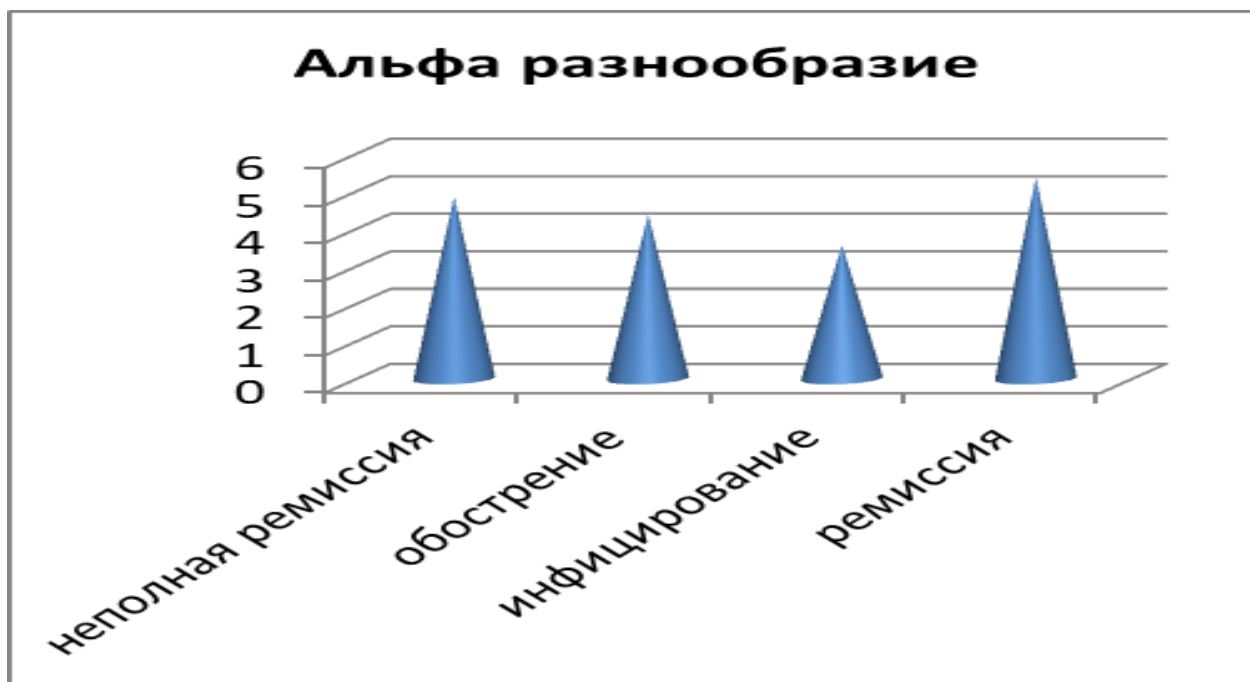


Рисунок 8 - Альфа – разнообразие у детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения заболевания



Рисунок 9 - Сравнительная характеристика количества бактерий у детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения заболевания

Кроме того, у детей с частыми обострениями заболевания (более 3 р/г) отмечается значительное снижение альфа - разнообразия в сравнении с детьми, у которых симптомы заболевания проявляются не чаще 3 раз в год ($p=0,031$, Таблица 6, Рисунок 10).

Таблица 6 - Сравнительный анализ альфа – разнообразия у детей с атопическим дерматитом в зависимости от частоты обострения заболевания

Показатель	Обострение АД 1-3 раза в год	Обострение АД более 3 раз в год	p
Альфа - разнообразие, M ± SD (95% ДИ)	5,08 ± 0,95 (4,13 – 6,03)	3,67 ± 1,31 (2,6 – 4,74)	0,031

Использован T критерий Стьюдента в модификации Уэлча.

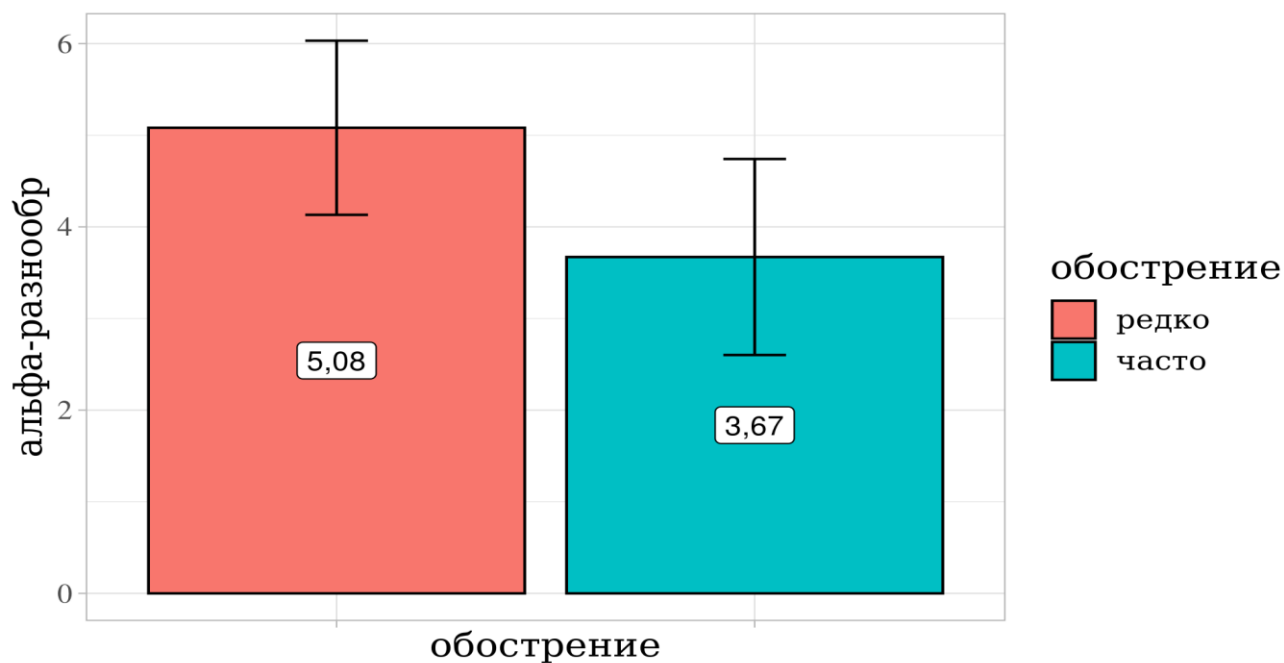


Рисунок 10 – Альфа - разнообразие в зависимости от частоты обострения атопического дерматита у детей

На уровне типа бактерий в микробиоте кишечника у пациентов с АД в зависимости от клинического течения установлено преобладание Firmicutes, которые обнаружены примерно в одинаковом количестве, как у детей в стадии обострения и наличием признаков вторичного инфицирования, так и у детей в стадии ремиссии ($p > 0,05$). Относительное количество типа Actinobacteria имело статистически значимое снижение у детей с признаками вторичного инфицирования АД в сравнении с детьми в стадии обострения заболевания и неполной ремиссии ($p < 0,05$). Тип Proteobacteria у детей в стадии обострения и признаками вторичного инфицирования был в наименьшем количестве в сравнении с детьми в стадии неполной ремиссии, так и с детьми без клинических проявлений заболевания ($p < 0,05$, Таблица 7).

Таблица 7 - Сравнительный анализ типа бактерий у детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения заболевания

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Неполная ремиссия, % (n=11)	Обострение неосложненное, % (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирования, % (n=15)	Ремиссия, % (n=19)	P
Firmicutes	55[30,5 - 57]	58 [49,5 - 78,5]	59 [44,5 - 85]	62[45,5 - 79]	0,539
Actinobacteria	8[0 - 11]	8[7,5 - 18,5]	0 [0 - 5,5]	5[4 - 7,5]	0,018*
Proteobacteria	11,75 [0 - 33,75]	5 [0 - 25,5]	0 [0 - 0,3]	11[1,1- 33]	< 0,05**

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Краскела – Уоллиса

**p*, инфицирование / обострение, неполная ремиссия < 0,05

***p* обострение, инфицирование / неполная ремиссия, ремиссия < 0,05

На уровне класса в микробиоте кишечника у пациентов в стадии обострения, неполной ремиссии и детей в стадии ремиссии АД преобладало относительное количество бактерий класса Clostridia, существенных отличий в данных подгруппах не получено ($p > 0,05$). Относительное количество бактерий класса Bacilli, Gammaproteobacteria, Negativicutes также не имели значимых различий у детей сравниваемых групп ($p > 0,05$). При анализе относительного количества бактерий класса Actinobacteria отмечается статистически значимое снижение у детей в стадии обострения заболевания и детей с признаками вторичного инфицирования, в сравнении с детьми в стадии неполной и полной ремиссии (Таблица 8).

Таблица 8 - Сравнительный анализ класса бактерий у детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения заболевания

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Неполная ремиссия, % (n=11)	Обострение неосложненное, % (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирования, % (n=15)	Ремиссия, % (n=19)	P
Clostridia	55 [28 - 58]	58[42 - 80]	59[36 - 85]	51[31- 60]	0,518
Bacilli	2 [2 - 3]	4 [0 - 6]	3[0,15-10,5]	5[2,5 15,5]	0,265

Продолжение Таблицы 8

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Неполная ремиссия, % (n=11)	Обострение неосложненн ое, % (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирован ия, % (n=15)	Ремиссия, % (n=19)	P
Negativicutes	0 [0 – 1,5]	0 [0 - 1]	0 [0 - 0]	0 [0 - 1]	0,54
Actinobacteria	5 [0 - 8]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	3 [0 - 7,5]	0,02*
Gammaproteobac teria	22 [3,5 - 43]	5 [0 - 24,5]	0 [0 - 7]	9[0,88 30,5]	0,243

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Краскела – Уоллиса

*p обострение, инфицирование / ремиссия, неполная ремиссия < 0,05

При рассмотрении отряда бактерий в зависимости от клинического течения АД отмечается статистически значимое уменьшение относительного количества бактерий Oscillospirales ($p < 0,05$) у детей в стадии обострения и признаками вторичного инфицирования в сравнии с детьми в стадии неполной и полной ремиссии. Относительное количество бактерий Lactobacillales и Bacteroidales достоверно превышает показатель в группе детей, находящихся в стадии ремиссии в сравнении с детьми, имеющих клинические признаки заболевания ($p < 0,05$). Такие бактерии, как Coriobacteriales, Erysipelotrichales, Pseudomonadales, Veillonellales не имели значимых различий в количественном показателе у детей в сравниваемых группах ($p > 0,05$, Таблица 9).

Таблица 9 - Сравнительный анализ отряда бактерий у детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения заболевания

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Неполная ремиссия, % (n=11)	Обострение неосложненн ое, % (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирован ия, %(n=15)	Ремиссия, % (n=19)	P
Coriobacteriales	0 [0 – 1]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 – 0,7]	0,229
Oscillospirales	15 [5 - 20]	3 [0 - 12,5]	2 [0 - 23,5]	17 [8 - 25]	< 0,05*
Lactobacillales	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	3 [0 - 12,5]	< 0,05**

Продолжение Таблицы 9

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Неполная ремиссия, % (n=11)	Обострение неосложненн ое, % (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирован ия, %(n=15)	Ремиссия, % (n=19)	Р
Erysipelotrichal es	2 [0,5 - 2]	1 [0 - 2]	0 [0 - 0,5]	1 [0 - 2]	0,283
Pseudomonadal es	0 [0 - 0,4]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,557
Veillonellales	0 [0 - 0]	0 [0 - 0,5]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,904
Bacteroidales	0 [0 - 3]	0 [0 - 6]	0 [0 - 3]	4 [0,25 - 8,5]	0,032* *

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Краскела – Уоллиса

**p* обострение, инфицирование / неполная ремиссия, ремиссия < 0,05

***p* обострение, инфицирование, неполная ремиссия/ ремиссия < 0,05

На уровне семейства бактерий в метагеноме в зависимости от клинического течения АД в сравниваемых группах наиболее часто встречались бактерии Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Lactobacillaceae, Erysipelotrichaceae, Veillonellaceae, Bifidobacteriaceae, Eggerthellaceae, Enterobacteriaceae, которые не имели значимых различий в количественном показателе как у детей в стадии обострения, так и у детей в стадии ремиссии ($p > 0,05$). При оценке относительного количества бактерий Oscillospiraceae установлено снижение в группе детей в стадии обострения и детей с признаками вторичного инфицирования заболевания, по сравнению с детьми в стадии неполной и полной ремиссии АД ($p < 0,05$). У детей с признаками вторичного инфицирования заболевания, а также в стадии неполной ремиссии отмечалось снижение относительного количества бактерии Erysipelatoclostridiaceae (Таблица 10).

Таблица 10 - Сравнительный анализ семейства бактерий у детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения заболевания

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Неполная ремиссия, % (n=11)	Обострение неосложненно е, % (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирован ия, % (n=15)	Ремиссия % (n=19)	Р
Lachnospiracea e	23 [11 - 30]	23 [14 - 33]	24 [13 - 29]	27 [15 - 37]	0,771

Продолжение Таблицы 10

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Неполная ремиссия, % (n=11)	Обострение Неосложненн ое течение, % (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирован ия, % (n=15)	Ремиссия % (n=19)	P
Oscillospiraceae	1[0,12- 1,75]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0[0- 0,95]	< 0,05*
Ruminococcaceae	14 [5 - 18]	14,5 [13 - 29]	10 [1 - 24]	13 [5 - 22]	0,436
Lactobacillaceae	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0,1]	0,202
Erysipelotrichaceae	0 [0 - 0,4]	0[0- 0,75]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0,3]	0,547
Erysipelatoclostridiaceae	0 [0 - 0,5]	0,6 [0 - 1]	0 [0 - 0,6]	0,9 [0,35 - 1]	< 0,05**
Veillonellaceae	3[0 - 4]	0 [0 - 1]	0 [0 - 0,9]	0,4 [0 - 2,5]	0,23
Bifidobacteriaceae	0 [0 - 3]	0 [0 - 6]	0 [0 - 3]	0 [0 - 5,5]	0,717
Eggerthellaceae	0 [0 - 0]	0[0 - 0,45]	0 [0 - 0]	0,1 [0 - 0,55]	0,169
Enterobacteriaceae	0 [0 - 36,5]	8,5 [0,5 - 25]	0 [0 - 3]	2 [0 - 13]	0,279

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Краскела – Уоллиса

**p* обострение, инфицирование / неполная ремиссия, ремиссия < 0,05

***p* неполная ремиссия, инфицирование / ремиссия < 0,05

Проведя сравнительный анализ рода бактерий, установлено, что у детей с атопическим дерматитом в стадии обострения заболевания, наличием признаков вторичного инфицирования, а также в стадии неполной ремиссии выявлено статистически значимое снижение относительного количества бактерии *Roseburia*, в сравнении с детьми, находящимися в стадии ремиссии заболевания ($p < 0,05$). Кроме того, относительное количество бактерии *Anaerococcus* достоверно снижено у детей в стадии обострения заболевания и признаками вторичного инфицирования, в сравнении с детьми, находящимися в стадии ремиссии заболевания ($p < 0,05$). Количество бактерии *Eggerthella* преобладает у детей в стадии полной и неполной ремиссии, в сравнении с детьми в стадии обострения

заболевания и признаками вторичного инфицирования ($p < 0,05$). Вместе с тем, микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом представлена бактериями *Dialister*, *Blautia*, *Dorea*, *Sellimonas*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Erysipelatoclostridium*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Bifidobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Klebsiella*, *Bacteroides* и другими, которые не имели существенных различий в количественном показателе ($p > 0,05$, Таблица 11).

Таблица 11 - Сравнительный анализ рода бактерий у детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения заболевания

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Неполная ремиссия, % (n=11)	Обострение неосложненное, % (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирования, % (n=15)	Ремиссия % (n=19)	P
<i>Dialister</i>	0 [0 - 1]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,229
<i>Roseburia</i>	3 [0 - 5]	2 [0 - 6]	1 [0 - 4]	7 [4- 10]	<0,05* 0,02**
<i>Blautia</i>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0,1]	0,6 [0 - 2]	0,062
<i>Dorea</i>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0,9]	0,721
<i>Sellimonas</i>	0[0 - 1]	0 [0- 0,5]	1 [0- 2]	0 [0 - 1]	0,283
<i>Ruminococcus</i>	0 [0 - 0,4]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,557
<i>Faecalibacterium</i>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,904
<i>Anaerococcus</i>	1 [0 - 3]	0 [0 - 2]	0[0 - 2]	2 [2 - 5]	<0,05*
<i>Lactobacillus</i>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0[0 - 0]	0,457
<i>Enterococcus</i>	2 [0 - 2]	0 [0 - 1]	0 [0 - 1]	1[0 - 2]	0,517
<i>Lactococcus</i>	0 [0 - 0,4]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0[0 - 0,4]	0,623
<i>Staphylococcus</i>	0 [0 - 1]	0 [0 - 0,6]	0 [0 - 0,6]	0,9[0,3 - 1]	0,213
<i>Erysipelatoclostridium</i>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,78
<i>Streptococcus</i>	3 [0 - 4]	0 [0 - 0,9]	0 [0 - 0,9]	0,4 [0 - 3]	0,557
<i>Veillonella</i>	0 [0 - 0,8]	0 [0 - 1]	0 [0 - 0,5]	0 [0 - 0,6]	0,557
<i>Bifidobacterium</i>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,1[0 - ,7]	0,557
<i>Eggerthella</i>	1 [0 - 1,5]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0,6]	0,8[0- 1]	<0,05* **
<i>Enterobacter</i>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,67
<i>Escherichia-Shigella</i>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,541

Продолжение Таблицы 11

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Неполная ремиссия, % (n=11)	Обострение неосложне нное, % (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирован ия, % (n=15)	Ремиссия % (n=19)	P
Escherichia- Shigella	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,541
Klebsiella	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,468
Bacteroides	0 [0 - 2]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,65

**p* обострение, инфицирование / ремиссия < 0,05

***p* неполная ремиссия / ремиссия < 0,05

****p* обострение, инфицирование / ремиссия, неполная ремиссия < 0,05

На уровне вида бактерий у детей сравниваемых групп выделены следующие микроорганизмы: *Streptococcus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacteroides fragilis*. Виды вышеперечисленных бактерий не имели статистически значимых отличий ни у детей в стадии обострения, ни у детей в стадии ремиссии ($p > 0,05$). Количественный показатель вида *Bifidobacterium longum* существенно снижен в группе детей в стадии обострения и детей с признаками вторичного инфицирования, в сравнении с детьми в стадии полной и неполной ремиссии заболевания ($p \leq 0,05$, Таблица 12, Рисунок 11).

Таблица 12 - Сравнительный анализ вида бактерий у детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения заболевания

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Неполная ремиссия, % (n=11)	Обострение неосложнен ное, % (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирован ия, % (n=15)	Ремисси я, % (n=19)	P
<i>Streptococcus salivarius</i>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0[0 - 5]	0 [0 - 6]	0,107
<i>Lactococcus lactis</i>	0[0 - 0,9]	0[0- 0,15]	0[0 - 0]	0 [0 - 0]	0,094
<i>Bifidobacterium longum</i>	2 [0 - 3]	0[0-0,45]	0[0- 0,5]	2 [0,6 - 2]	0,05*
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0 [0 - 1]	0,085

Продолжение Таблицы 12

Показатель Me [Q1-Q3]	Неполная ремиссия, % (n=11)	Обострение неосложнен ное, % (n=15)	Обострение, с признаками вторичного инфицирован ия, % (n=15)	Ремиссия % (n=19)	P
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,	0[0-0,05]	0 [0 - 0]	0 [0- 0]	0 [0 - 0]	0,414
<i>Bacteroides fragilis</i>	0 [0 - 0]	0[0- 0,55]	0[0- 0,5]	0 [0 - 0]	0,181

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Краскела – Уоллиса
*р обострение, инфицирование/ неполная ремиссия, ремиссия < 0,05

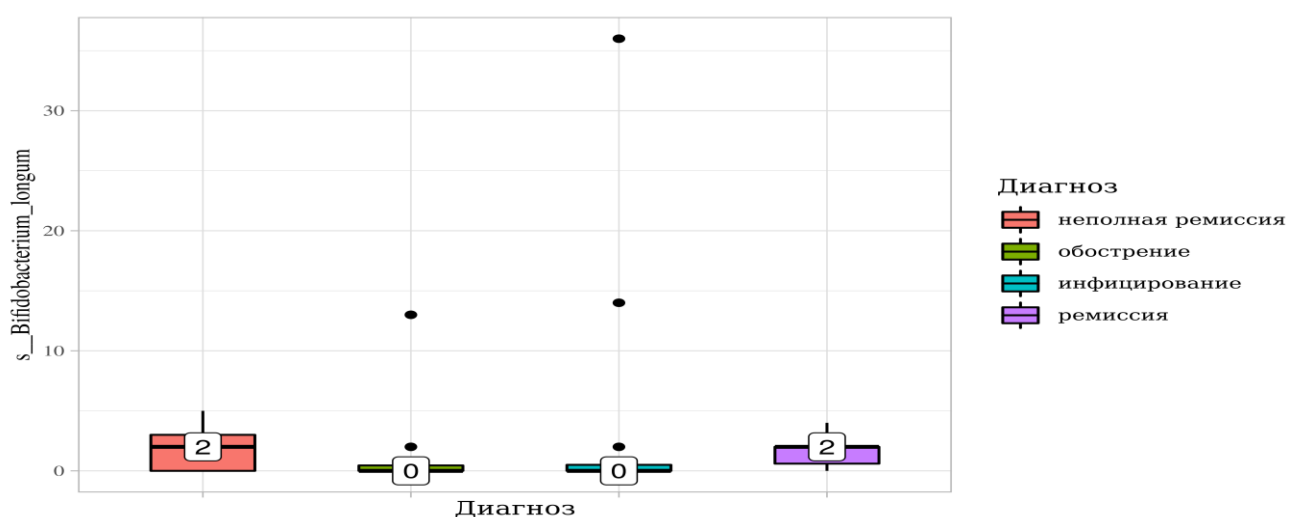


Рисунок 11 - Сравнительный анализ *Bifidobacterium longum* (%) у детей с атопическим дерматитом в зависимости от клинического течения заболевания

3.3. Спектр микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом от 1 года до 2х лет включительно и детей от 3х лет до 5 лет включительно

Проведен сравнительный анализ микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом в зависимости от возрастного периода. При оценке альфа - разнообразия у детей возрастной группы от 1 года до 2х лет включительно и от 3х до 5 лет включительно статистически значимых различий не получено. Количественный состав бактерий в данной возрастной группе имеет

существенные различия. У детей от 3х до 5 лет включительно преобладает общее количество бактерий в сравнении с детьми от 1 года до 2х лет включительно ($p=0,032$, Таблица 13, Рисунок 12, 13).

Таблица 13 - Сравнительный анализ альфа - разнообразия и количества бактерий детей с АтД в зависимости от возраста

Показатель Me [Q1-Q3], %	Дети от 1г до 2х лет, (n= 34)	Дети от 3х до 5 лет, (n= 26)	p
Альфа - разнообразие	4,61 [3,65 - 5,1]	5,38[5,38 - 5,38]	0,409
Бактерии	5415,5[2457,75- 8339,5]	25279 [25279 - 25279]	0,032

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Манна – Уитни

.

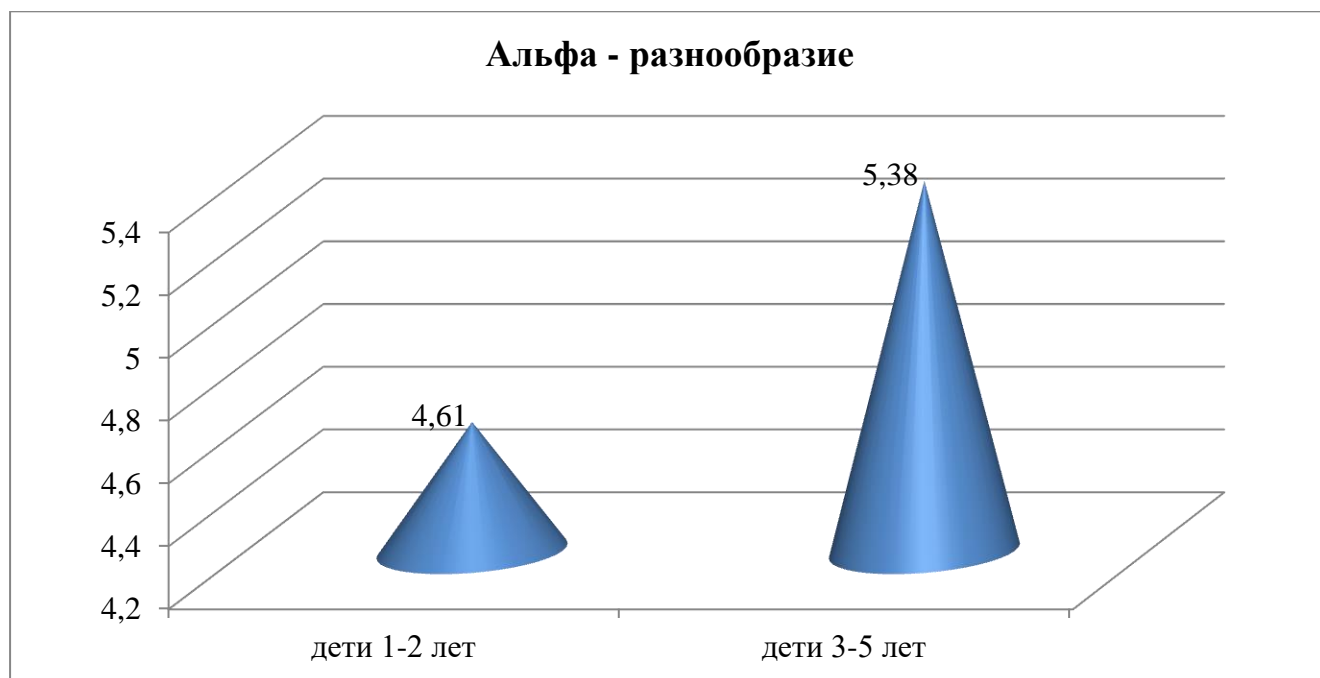


Рисунок 12 - Альфа - разнообразие у детей с АтД в зависимости от возрастного периода

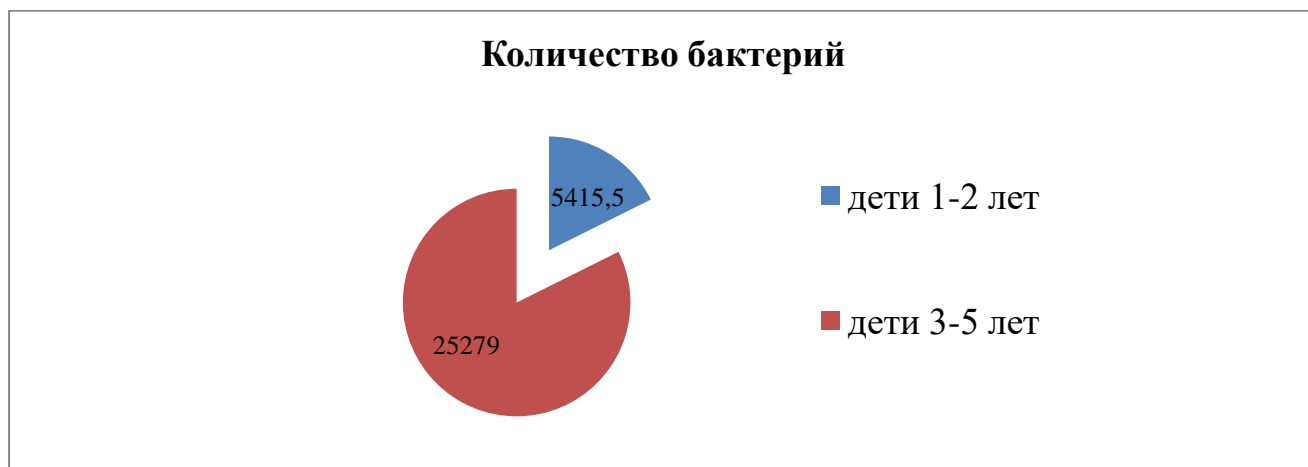


Рисунок 13 - Показатель общего количества бактерий в зависимости от возрастного периода

Кроме того проведена сравнительная оценка таксономического состава микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом возрастной группы от 1 года до 2х лет включительно и от 3х до 5 лет включительно, которая представлена в Таблице 14.

На уровне типа бактерий в микробиоте кишечника у пациентов сравниваемых групп наиболее часто встречались Firmicutes, Actinobacteriota, Proteobacteria. В возрастной группе детей от 1 года до 2х лет включительно отмечено преобладание относительного количества бактерий типа Firmicutes в сравнении с детьми возрастной группы 3 - 5 лет. Относительное количество бактерий типа Proteobacteria и Actinobacteria у детей сравниваемых групп не имеет существенных отличий в составе. Статистически значимых различий на данном уровне не получено.

На уровне класса бактерий наиболее часто встречались Clostridia, Bacilli, Actinobacteria, Bacteroidia, Gammaproteobacteria и не имели существенных различий в численности в сравниваемых возрастных группах, за исключением класса Gammaproteobacteria, относящегося к типу Proteobacteria, который преобладал в группе детей от 3х до 5 лет ($p \leq 0,05$).

При оценке отряда бактерий наиболее часто в микробиоте кишечника детей с АД от 1 года до 2х лет и детей от 3 лет до 5 лет встречались Oscillospirales, Erysipelotrichales, Lactobacillales, относящихся к типу Firmicutes, отряда

Coriobacteriales, относящегося к типу Actinobacteriota, отряда Bacteroidales относящегося к типу Bacteroidetes. Однако значимых различий между сравниваемыми группами не получено.

При сравнении относительного количества бактерий на уровне семейства отмечается преобладание относительного количества Enterobacteriaceae, относящегося к типу Proteobacteria, классу Gammaproteobacteria, в группе детей от 3 лет до 5 лет в сравнении с детьми от 1 года до 2х лет. Кроме того, выделены бактерии семейства Lachnospiraceae, Oscillospiraceae, Erysipelatoclostridiaceae, Ruminococcaceae, Veillonellaceae, относящиеся к типу Firmicutes, Bifidobacteriaceae, относящиеся к типу Actinobacteriota, однако достоверных различий в численности этих бактерий в сравниваемых группах не получено.

При оценке рода бактерий наиболее часто встречались Roseburia, Blautia, Dorea, относящиеся к типу Firmicutes, классу Clostridia, семейству Lachnospiraceae; род Ruminococcus и Faecalibacterium, относящиеся к семейству Ruminococcaceae того же типа и класса; род Erysipelatoclostridium так же относящегося к типу Firmicutes, классу Bacilli, отряду Erysipelotrichales; род Lactobacillus класса Bacilli, отряда Lactobacillales; род Veillonella класса Bacilli, семейства Veillonellaceae; род Bifidobacterium, относящийся к типу Actinobacteriota, классу Actinobacteria, семейству Bifidobacteriaceae; род Eggerthella отряда Coriobacteriales, того же типа; род Enterobacter и род Escherichia-Shigella типа Proteobacteria, класса Gammaproteobacteria, семейства Enterobacteriaceae; род Bacteroides типа Bacteroidia, класса Bacteroidia, отряда Bacteroidales. Статистически значимых различий в сравниваемых группах не выявлено.

На уровне вида отмечается достоверное повышение относительного количества бактерий Lactococcus lactis, относящихся к типу Firmicutes, классу Bacilli, отряду Lactobacillales, у детей 1 года-2 лет включительно в сравнении с детьми 3-5 лет. Кроме того, выделены бактерии вида Streptococcus salivarius (тип Firmicutes, класс Bacilli), Bifidobacterium longum и Bifidobacterium bifidum (тип Actinobacteriota, класс Actinobacteria, семейство Bifidobacteriaceae), не имеющие достоверных различий в численности у детей сравниваемых групп.

Таблица 14 - Сравнительный анализ таксономического состава микробиоты кишечника детей с АД в зависимости от возраста

Показатель Me [Q1-Q3], %	Дети от 1 года до 2х лет, (n= 34)	Дети от 3х до 5 лет, (n= 26)	p
Тип Firmicutes, %	54 [27 - 74]	20 [20 - 20]	0,43
Класс Clostridia	39,5 [25,25 -54,25]	17 [17 - 17]	0,40
Семейство Lachnospiraceae	16,5 [11,5 - 27,75]	12 [12 - 12]	0,21
Род Roseburia	0 [0 – 2,5]	0,5 [0 – 3]	0,98
Род Blautia	7 [3 – 13]	10 [4 – 15]	0,53
Род Dorea	0 [0 – 0,5]	0 [0 – 0,5]	0,50
Отряд Oscillospirales	4,5 [0 - 15,75]	3 [3 - 3]	0,61
Семейство Oscillospiraceae	0 [0 – 0,5]	0,5[0 - 15,75]	0,20
Семейство Ruminococcaceae	11 [2,25 - 25,25]	1 [1 - 1]	0,52
Род Ruminococcus	0 [0 – 3]	0 [0 – 2]	0,57
Род Faecalibacterium	0 [0 – 5]	0 [0 – 9]	0,92
Класс Bacilli	3,5 [2 - 6,5]	3,5 [2 - 6,5]	0,62
Отряд Erysipelotrichales	1,5 [0 - 2]	2 [2 - 2]	0,70
Семейство Erysipelatoclostridiaceae	1 [0 - 1]	0 [0 - 0]	0,41
Род Erysipelatoclostridium	0 [0 – 0,25]	0 [0 – 0,27]	0,98
Отряд Lactobacillales	0 [0 - 1]	0 [0 – 0,6]	0,42
Род Lactobacillus	0 [0 - 0]	0 [0 – 0,1]	0,07
Вид Streptococcus salivarius	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	0,21
Вид Lactococcus lactis	0 [0 – 0,15]	0 [0 - 0]	0,03
Семейство Veillonellaceae	0 [0 - 0]	1[0 - 1]	0,51
Род Veillonella			0,63
Тип Actinobacteriota	6,5 [1,25 - 9,75]	10 [10 - 10]	0,34
Класс Actinobacteria	0 [0 - 5,75]	9 [9 - 9]	0,22
Семейство Bifidobacteriaceae	1,5 [0 - 5,75]	0 [0 - 0]	0,47
Род Bifidobacterium	5,5 [0 – 8,75]	4 [0 - 6]	0,65
Вид Bifidobacterium longum	0 [0 - 2]	0,80 [0 - 2]	0,67
Вид Bifidobacterium bifidum	0 [0 - 1]	0 [0 - 1]	0,54

Продолжение Таблицы 14

Показатель Me [Q1-Q3], %	Дети от 1 года до 2х лет, (n= 34)	Дети от 3х до 5 лет, (n= 26)	p
Отряд Coriobacteriales	0 [0 - 1,75]	1 [1 - 1]	0,60
Род Eggerthella	0 [0 - 0,2]	0 [0 - 0,2]	0,52
Тип Proteobacteria	0,1 [0 - 28,5]	0 [0 - 1]	0,47
Класс Gammaproteobacteria	2,5 [0 - 27,75]	65 [60 - 67]	0,04
Семейство Enterobacteriaceae	1 [0 - 45]	65 [60 - 67]	0,05
Род Enterobacter	0 [0 - 19,5]	0 [0 - 4]	0,70
Род Escherichia- Shigella	4,5 [0 - 16,7]	0 [0 - 7]	0,46
Тип Bacteroidia	0	0	0
Класс Bacteroidia	4 [0 - 7,5]	0 [0 - 0]	0,15
Отряд Bacteroidales	2 [0 - 5,75]	1 [1 - 1]	0,23
Род Bacteroides	0,75 [0 - 4,75]	5,5 [0 - 6,25]	0,21

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Манна -Уитни

3.4. Определение таксономического состава микробиоты кишечника у пациентов контрольной группы

С целью проведения сравнительного анализа микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом, создана группа контроля, состоящая из 15 условно - здоровых детей. Данная группа сопоставима по возрасту с основной группой. Для оценки таксономического состава кишечника использовался метод секвенирования гена 16S рРНК бактерий в образцах кала.

У пациентов контрольной группы среднее значение альфа - разнообразия составило $4,59 \pm 0,32$ (Рисунок 14).

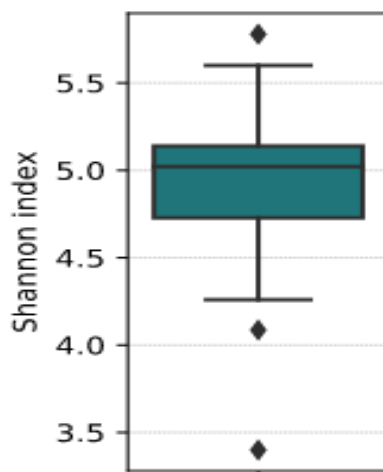
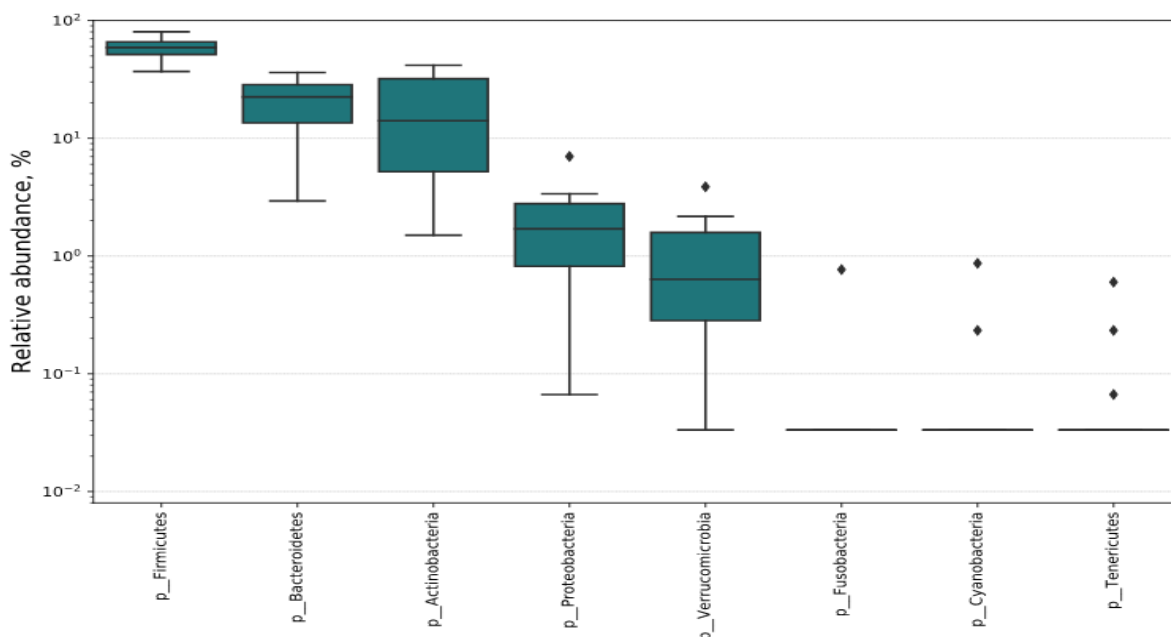


Рисунок 14 - Индекс бактериального разнообразия Шеннона у пациентов группы контроля

Оценка таксономического состава микробиоты кишечника осуществлялась при помощи интерактивной тепловой карты, которая представляет собой относительное обилие основных микробных таксонов в образцах (Рисунок 15 Б). Кроме того, использовались бокс-графики, отражающие распределение относительного обилия для 25 наиболее распространенных таксонов по всем выборкам (для каждого таксономического ранга). Для правильного отображения на логарифмической шкале нулевые значения заменялись псевдосчетом не выше минимального значения относительной численности основных таксонов (Рисунок 15 А).

На уровне типа бактерий в метагеноме выявлено преобладание бактерий Firmicutes $58,97 \pm 2,9\%$. Бактерии типа Bacteroidetes составили $22,4 \pm 2,56\%$, Actinobacteria $14,07 \pm 3,63\%$. В наименьшем количестве обнаружены бактерии типа Proteobacteria $1,7 \pm 0,46\%$, Verrucomicrobia $0,63 \pm 1,32$. (Рисунок 15).

А.



Б.

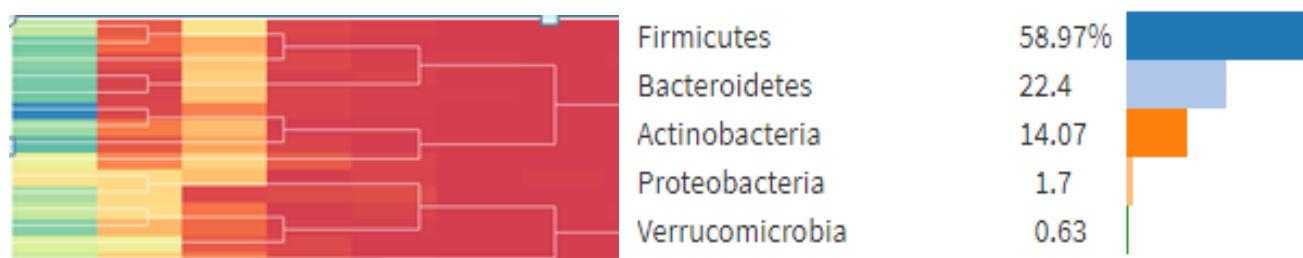
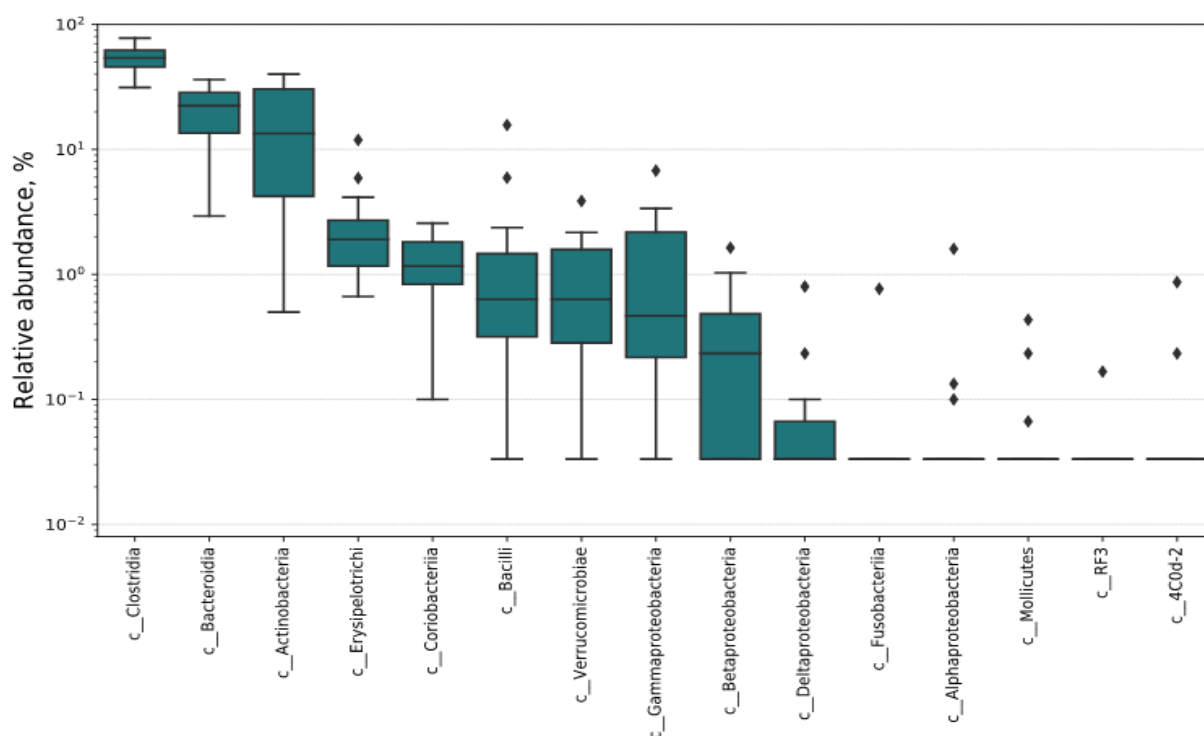


Рисунок 15 - Диаграмма распределения относительной численности наиболее распространенных таксонов на уровне типа (А) и тепловая карта основных микробных таксонов на уровне типа у детей группы контроля, % (Б)

На уровне класса в микробиоте кишечника детей контрольной группы преобладало относительное количество бактерий Clostridia $53,9 \pm 3,36\%$, Bacteroidia $22,4 \pm 2,56\%$, Actinobacteria $13,4 \pm 3,53\%$. В меньшем количестве выделены бактерии Erysipelotrichi $1,9 \pm 0,75\%$, Coriobacteriia $1,17 \pm 0,19\%$. Такие бактерии, как Bacilli $0,63 \pm 1,04\%$, Gammaproteobacteria $0,47 \pm 0,49\%$, Betaproteobacteria $0,23 \pm 0,32\%$, Verrucomicrobiae $0,63 \pm 0,27\%$ и Alphaproteobacteria составили менее 1% от общего количества бактерий (Рисунок 16).

А.



Б.

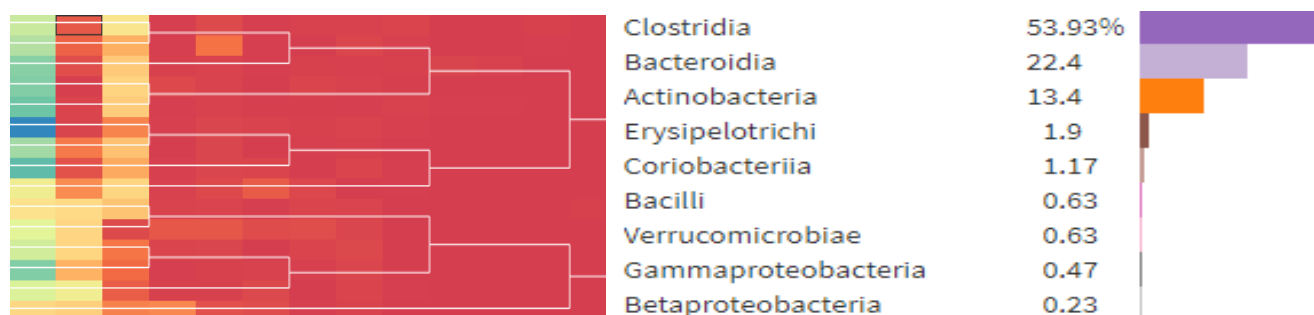
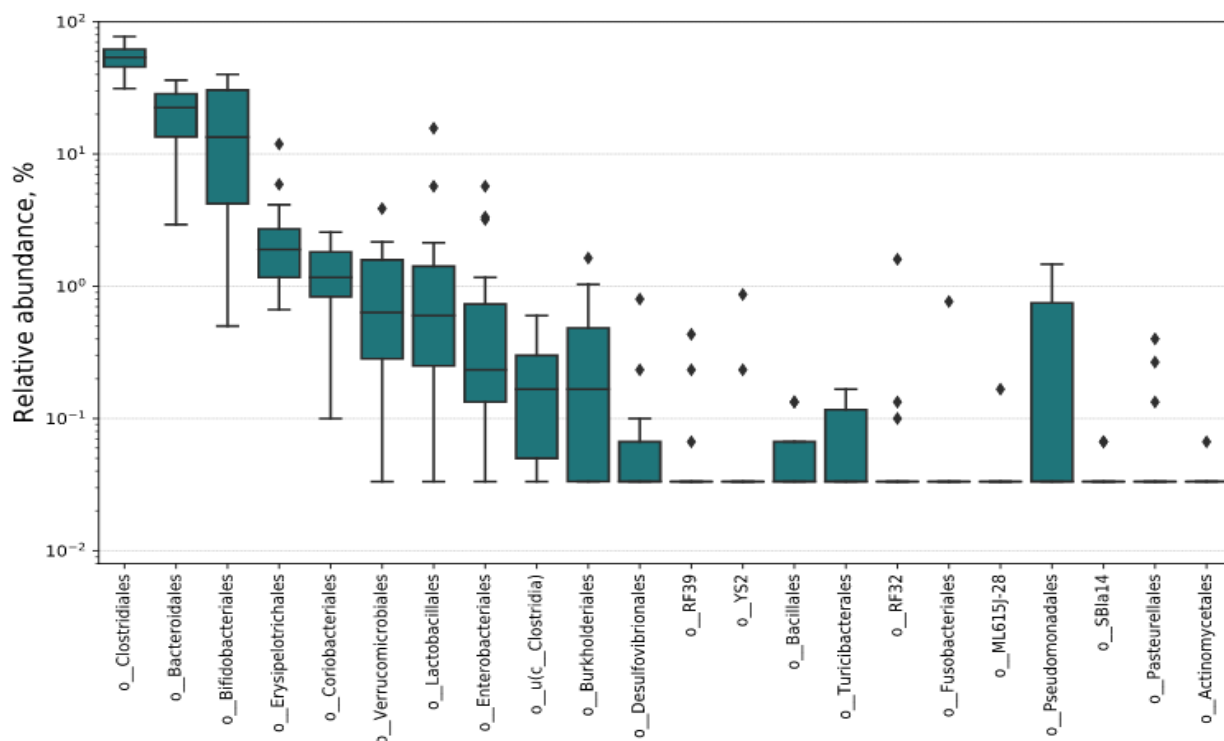


Рисунок 16 - Диаграмма распределения относительной численности наиболее распространенных таксонов на уровне класса (А) и тепловая карта основных микробных таксонов на уровне класса у детей группы контроля, % (Б)

На уровне отряда бактерий в кишечной микробиоте детей группы контроля были наиболее распространены Clostridiales $53,87 \pm 3,33\%$. Кроме того, отмечается высокий уровень бактерий отряда Bacteroidales $22,4 \pm 2,56\%$ и отряда Bifidobacteriales $13,4 \pm 3,53\%$. В наименьшем количестве встречались бактерии Lactobacillales $0,6 \pm 1,04\%$, Erysipelotrichales $1,9 \pm 0,75\%$, Coriobacteriales $1,17 \pm 0,19\%$, Verrucomicrobiae $0,63 \pm 0,27\%$ и Enterobacteriales $0,23 \pm 0,44\%$ и другие (Рисунок 17).

А.



Б.

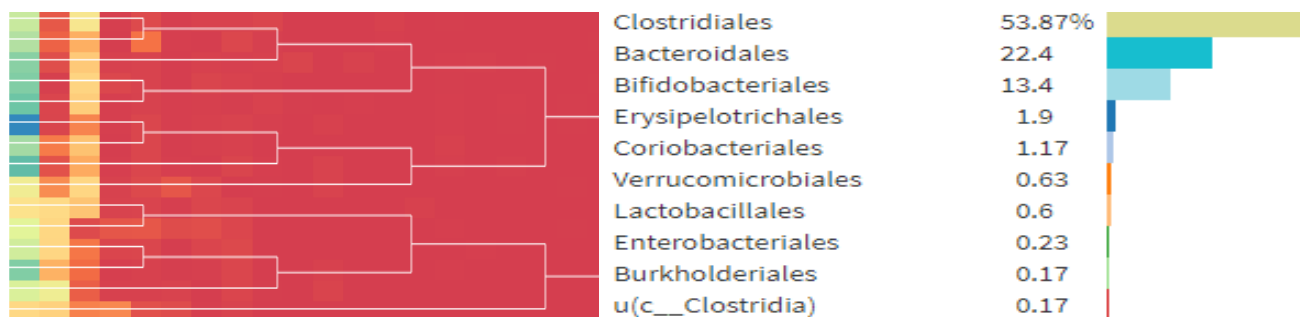
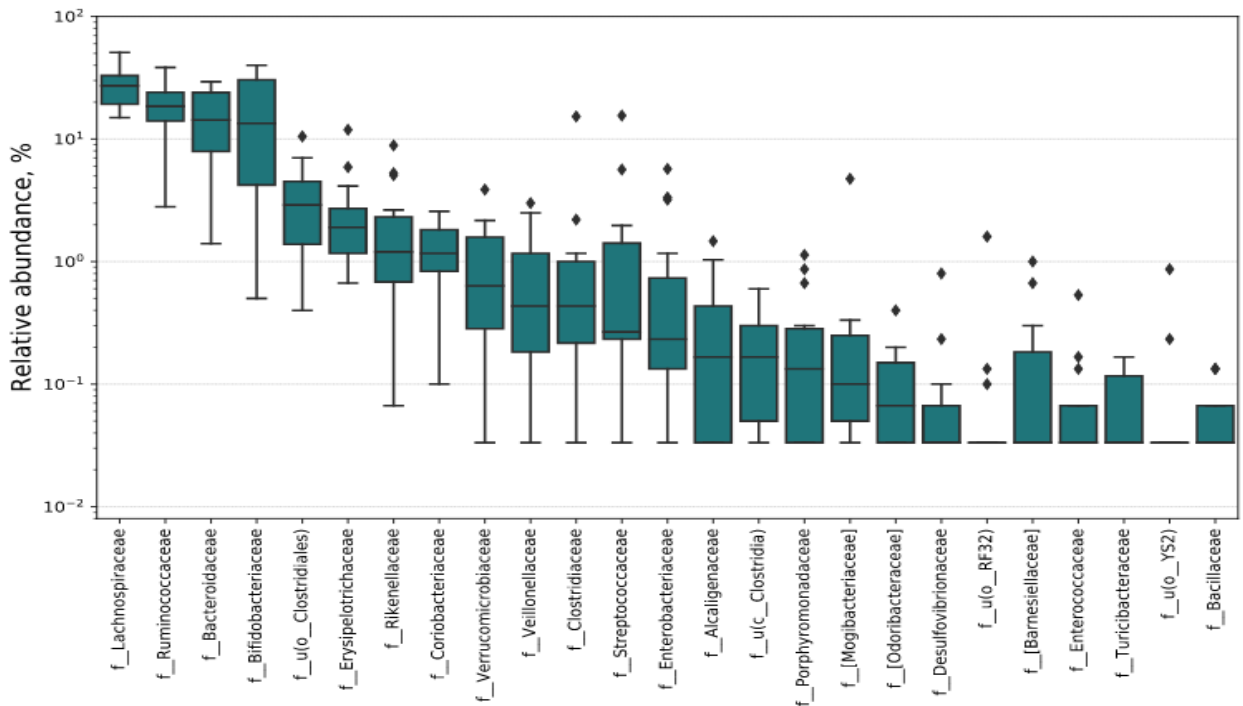


Рисунок 17 - Диаграмма распределения относительной численности наиболее распространенных таксонов на уровне отряда (А) и тепловая карта основных микробных таксонов на уровне отряда у детей группы контроля (Б)

При оценке таксономического состава на уровне семейства бактерий наиболее часто встречались бактерии *Lachnospiraceae* $27,2 \pm 2,61\%$, *Ruminococcaceae* $18,47 \pm 2,63\%$, *Bifidobacteriaceae* $13,4 \pm 3,53\%$, *Bacteroidaceae* $14,3 \pm 2,47\%$, *Erysipelotrichaceae* $1,9 \pm 0,75\%$, *Verrucomicrobiaceae* $0,63 \pm 0,27\%$, *Coriobacteriaceae* $1,17 \pm 0,19\%$, *Rikenellaceae* $1,2 \pm 1,26\%$. Численность других выделенных бактерий не превысила 0,5% (Рисунок 18).

А.



Б.

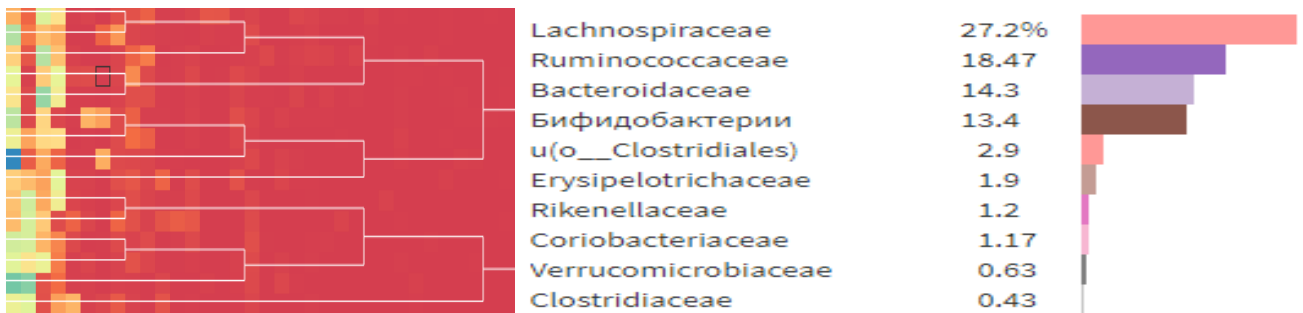
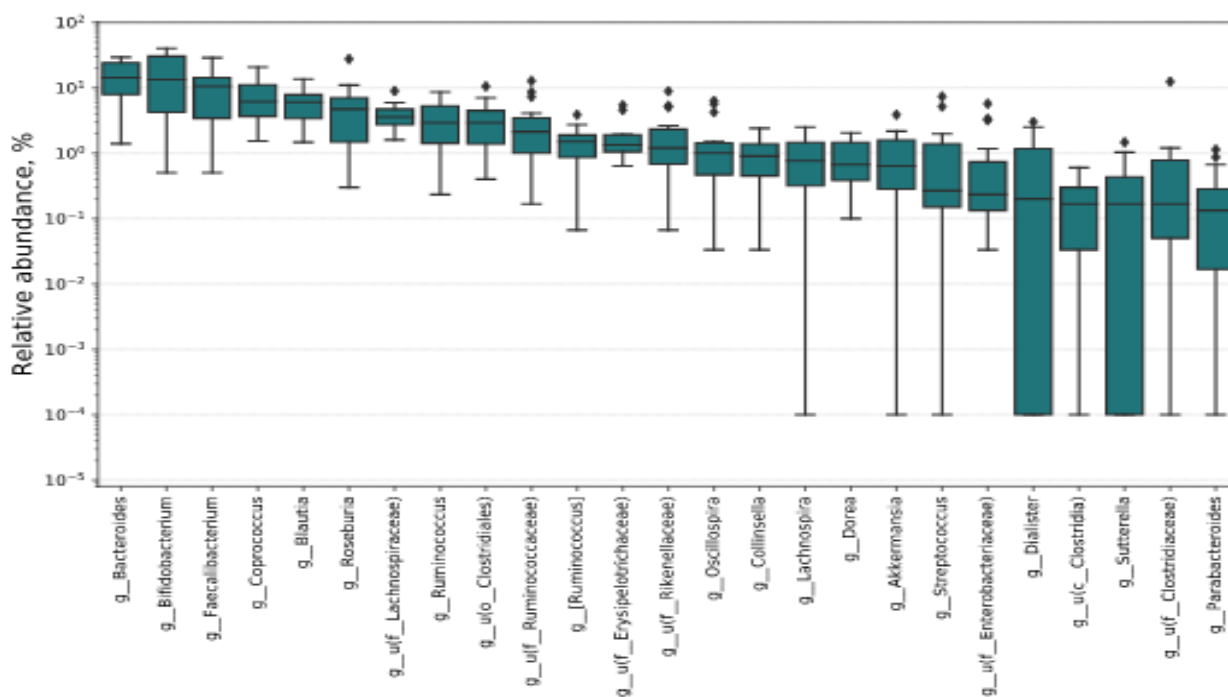


Рисунок 18 - Диаграмма распределения относительной численности наиболее распространенных таксонов на уровне семейства (А) и тепловая карта основных микробных таксонов на уровне семейства у детей группы контроля (Б)

При проведении анализа рода бактерий в метагеноме у детей группы контроля выделено большое количество бактерий. Наиболее часто встречались *Bifidobacterium* $13,4 \pm 3,53\%$, *Bacteroides* $14,3 \pm 2,47\%$, *Faecalibacterium* $10,53 \pm 2,16\%$, *Blautia* $6,0 \pm 0,85\%$, *Roseburia* $4,73 \pm 0,71\%$, *Lachnospiraceae* $3,57 \pm 0,49\%$, *Ruminococcus* $2,9 \pm 0,65\%$, *Oscillospira* $1,71 \pm 0,52\%$, *Ruminococcus gnavus* group (семейство *Ruminococcaceae*) $2,13 \pm 1,12\%$.

Кроме того, выделены бактерии *Escherichia-Shigella*, *Streptococcus*, *Akkermansia*, *Dorea*, *Enterobacter* и другие. Численность вышеперечисленных бактерий не превышала 1% (Рисунок 19).

А.



Б.

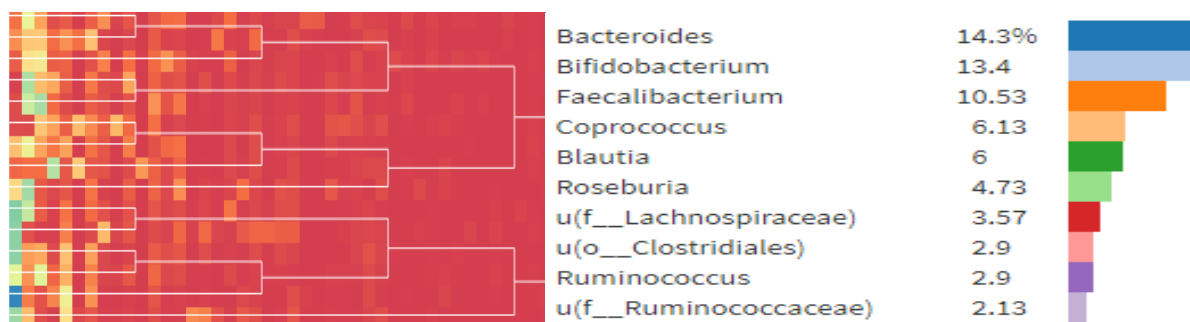
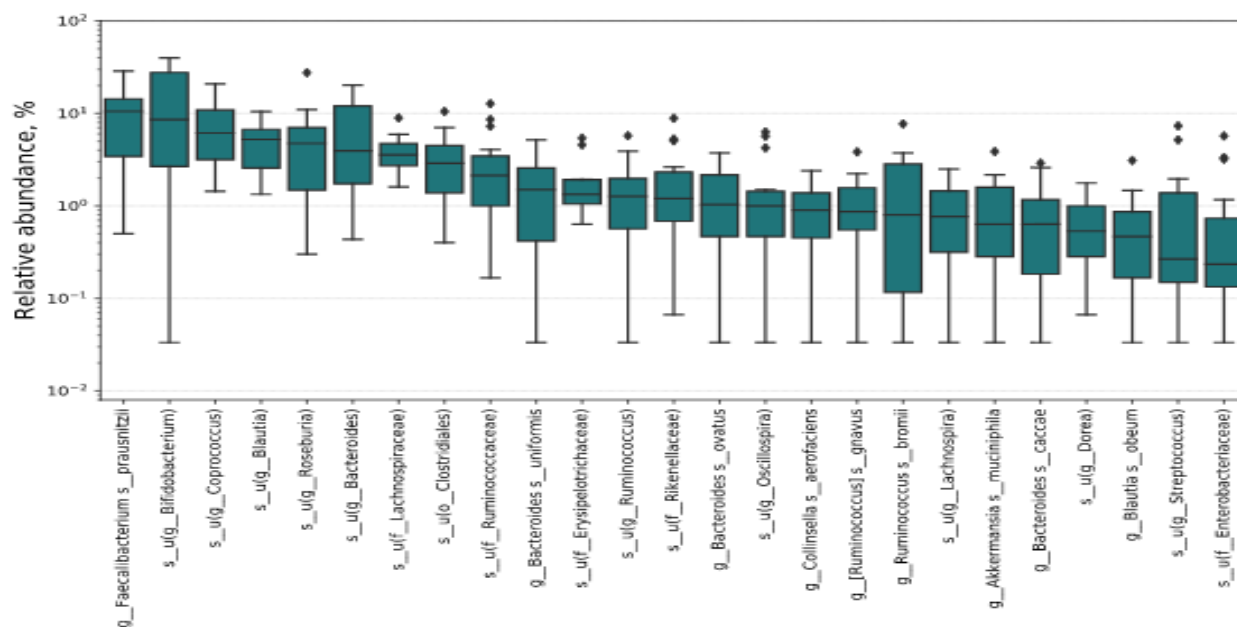


Рисунок 19- Диаграмма распределения относительной численности наиболее распространенных таксонов на уровне рода (А) и тепловая карта основных микробных таксонов на уровне рода у детей группы контроля (Б)

На уровне вида таксономический состав микробиоты кишечника детей группы контроля представлен множеством бактерий, часть из которых некультивированы. Отмечается преобладание бактерий вида *Faecalibacterium prausnitzii* $10,53 \pm 1,97\%$, *Bifidobacterium longum* $14,23 \pm 3,57\%$ и *Bifidobacterium*

bifidum $0,73 \pm 0,32\%$ (род *Bifidobacterium*), *Prevotella bivia* $7,26 \pm 1,79\%$ и *Bacteroides fragilis* $2,81 \pm 1,75\%$ (род *Bacteroides*), *Streptococcus salivarius* $1,29 \pm 0,55\%$ (род *Streptococcus*), *Lactococcus lactis* $0,63 \pm 0,54\%$ (род *Lactococcus*) (Рисунок 20).

А.



Б.

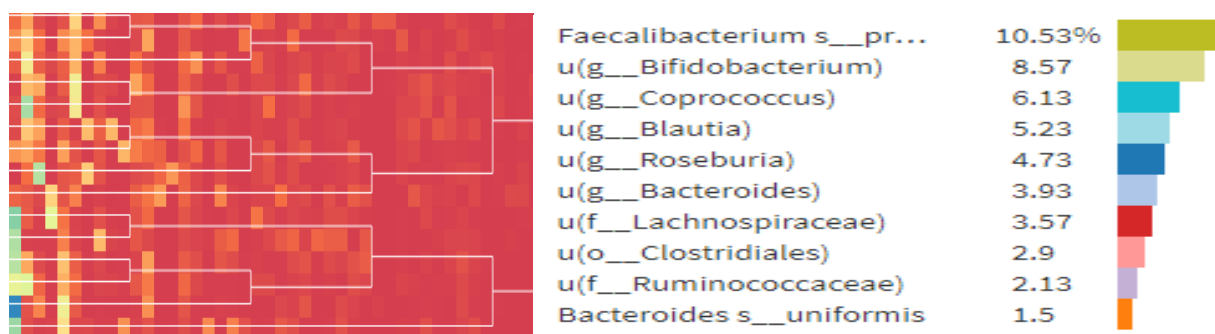


Рисунок 20 - Диаграмма распределения относительной численности наиболее распространенных таксонов на уровне вида (А) и тепловая карта основных микробных таксонов на уровне вида бактерий детей группы контроля (Б)

3.5. Сравнительный анализ спектра микробиоты кишечника пациентов с атопическим дерматитом и лиц контрольной группы

Проведен сравнительный анализ микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом и группы условно-здоровых детей.

Учитывая тот факт, что атопический дерматит является хроническим заболеванием, было предположительно возможность снижения альфа - разнообразия в образцах кала пациентов с атопическим дерматитом в сравнении с группой контроля. Однако в ходе исследования установлено, что микробиота кишечника у детей страдающих АД и микробиота условно - здоровых детей не имела существенных различий в данном показателе ($p > 0,05$, Таблица 15).

Таблица 15– Альфа - разнообразие у пациентов с атопическим дерматитом и группы контроля

Показатель, Me [Q1-Q3]	Атопический дерматит	Группа контроля	P
Альфа - разнообразие	4,80 [3,58 - 5,31]	5,02 [4,72 - 5,19]	0,30

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Манна – Уитни

При оценке типа бактерий выявлено преобладание численности филума Firmicutes у детей исследуемых групп. Данные бактерии находились в микробиоте кишечника примерно в одинаковом количестве у детей с АД и группой условно - здоровых детей и не имели значимых различий ($p > 0,05$). У детей основной группы по сравнению с группой контроля отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение относительного количества бактерий типа Actinobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, а также преобладание типа Proteobacteria (Таблица 16, Рисунок 21).

Таблица 16 – Сравнительный анализ типа бактерий детей с АтД и условно - здоровых детей

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Атопический дерматит, %	Группа контроля, %	P
Firmicutes	58 [36,0 - 79,0]	58,97 [51,13 – 66,03]	0,94
Actinobacteriota	5,5 [0 – 9,75]	14,06 [4,10 – 33,10]	0,01
Proteobacteria	2 [0 – 26,0]	0,7 [0 – 2,87]	0,04
Verrucomicrobia	0 [0 - 0]	0,63 [0,20 – 1,63]	0,01
Bacteroidetes	0 [0 - 0]	22,4 [12,53 – 28,93]	0,01

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Манна – Уитни

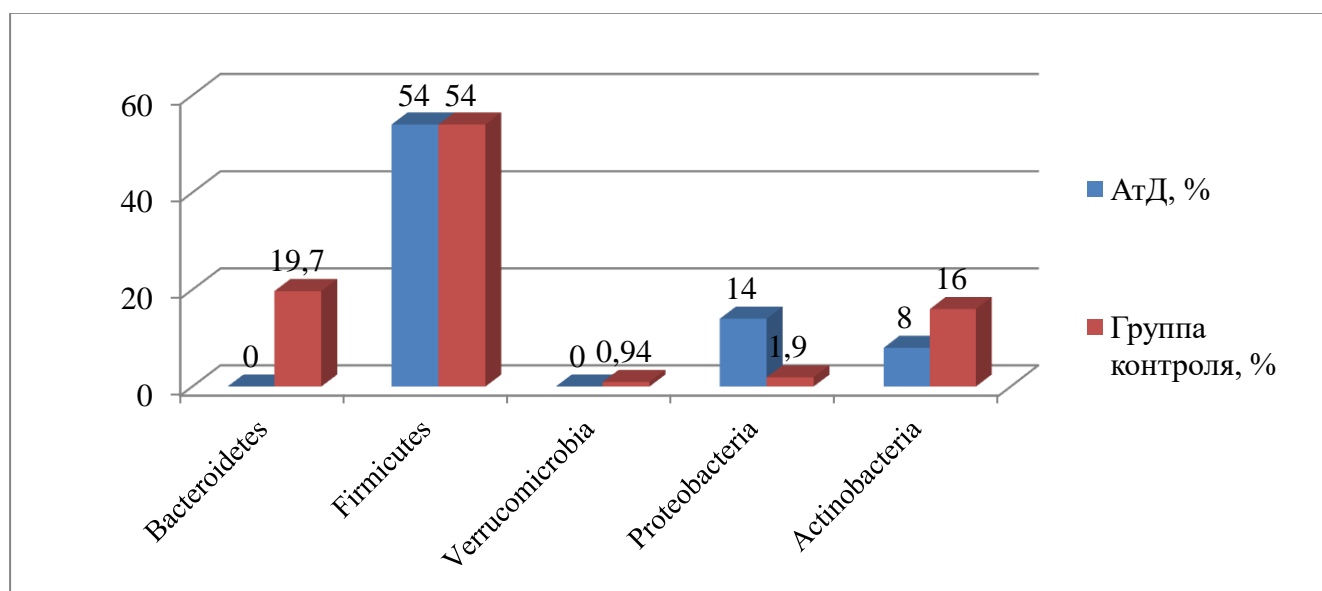


Рисунок 21 - Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом и группы контроля на уровне типа бактерий

При сравнении таксономического состава микробиоты кишечника на уровне класса у детей основной группы, так и детей из группы контроля, выявлено преобладание относительного количества бактерий класса Clostridia ($p > 0,05$). Пациенты с АтД в сравнении с группой контроля, имели статистически значимое ($p < 0,05$) повышение относительного количества бактерий класса Bacilli,

Gammaproteobacteria, а также снижение класса Actinobacteria, Bacteroidetes (Таблица 17, Рисунок 22).

Таблица 17 – Сравнительный анализ класса бактерий детей с АтД и группы контроля

Показатель Me [Q1-Q3]	Атопический дерматит, %	Группа контроля, %	p
Clostridia	48 [31,00-57,00]	53,93 [44,9-62,27]	0,16
Bacilli	3 [1,00-12,75]	0,63 [0,30-1,70]	0,01
Actinobacteria	0 [0,00-5,00]	13,40 [3,67-31,03]	0,01
Gammaproteobacteria	5,5 [0-28,00]	0,47 [0,17-2,63]	0,05
Bacteroidia	1,25 [0,00-6,75]	22,40 [12,53-28,93]	0,01

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Манна – Уитни

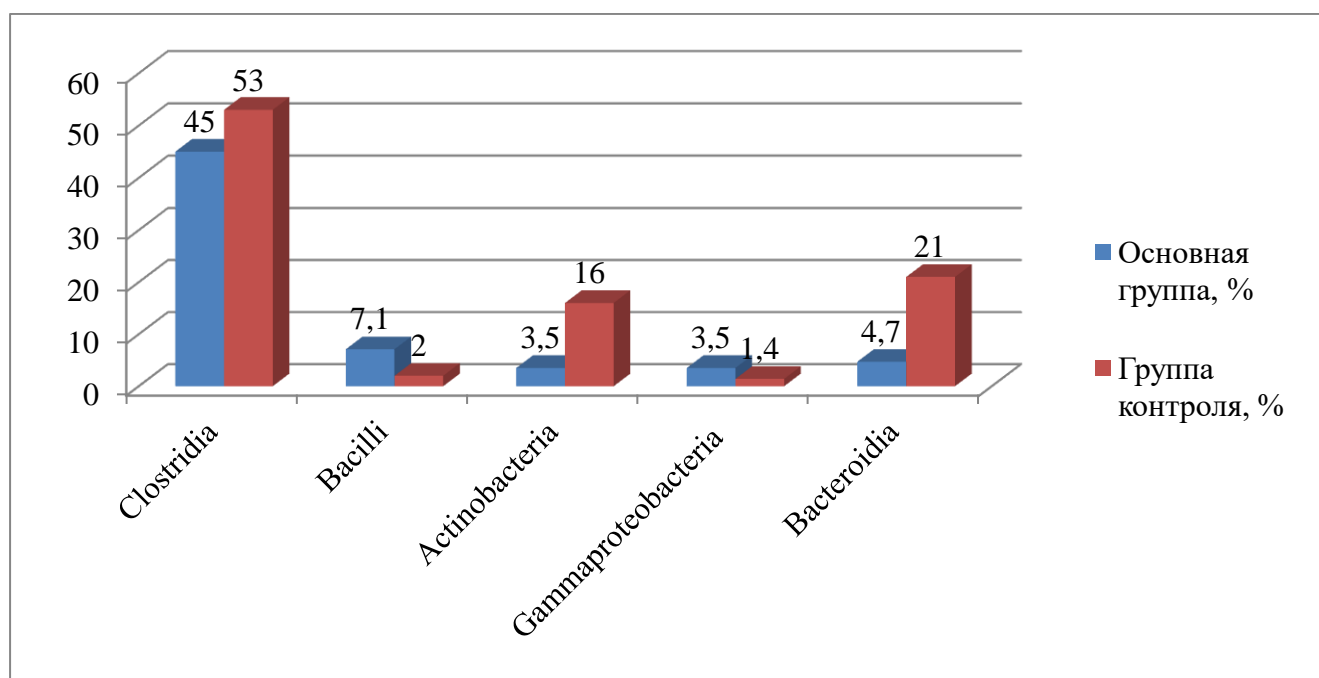


Рисунок 22 - Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом и детей группы контроля на уровне класса бактерий

Проведя сравнительный анализ отряда бактерий детей с АтД и детей из группы контроля, установлено статистически значимое снижение относительного количества бактерий Bacteroidales и Bifidobacteriales и повышение относительного количества Oscillospirales в основной группе ($p < 0,05$). Бактерии отряда

Coriobacteriales и Lactobacillales не имели существенных различий в составе у детей сравниваемых групп ($p > 0,05$). Данные представлены в Таблице 18 и на Рисунке 23.

Таблица 18 - Сравнительный анализ отряда бактерий детей с АД и условно - здоровых детей

Показатель Me [Q1-Q3]	Атопический дерматит, %	Группа контроля,%	p
Bacteroidales	1,50 [0,00-7,75]	22,40 [12,53-28,93]	0,01
Lactobacillales	0,60 [0,23-2,2]	0 [0,00-1,63]	0,086
Bifidobacteriales	1,25 [0,00-6,75]	13,40 [03,67-31,03]	0,01
Coriobacteriales	1,0[0,00-2,00]	1,1 [0,00-2,63]	0,83
Oscillospirales	10,00[0,00-23,50]	0 [0,00-0,10]	0,01

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Манна – Уитни

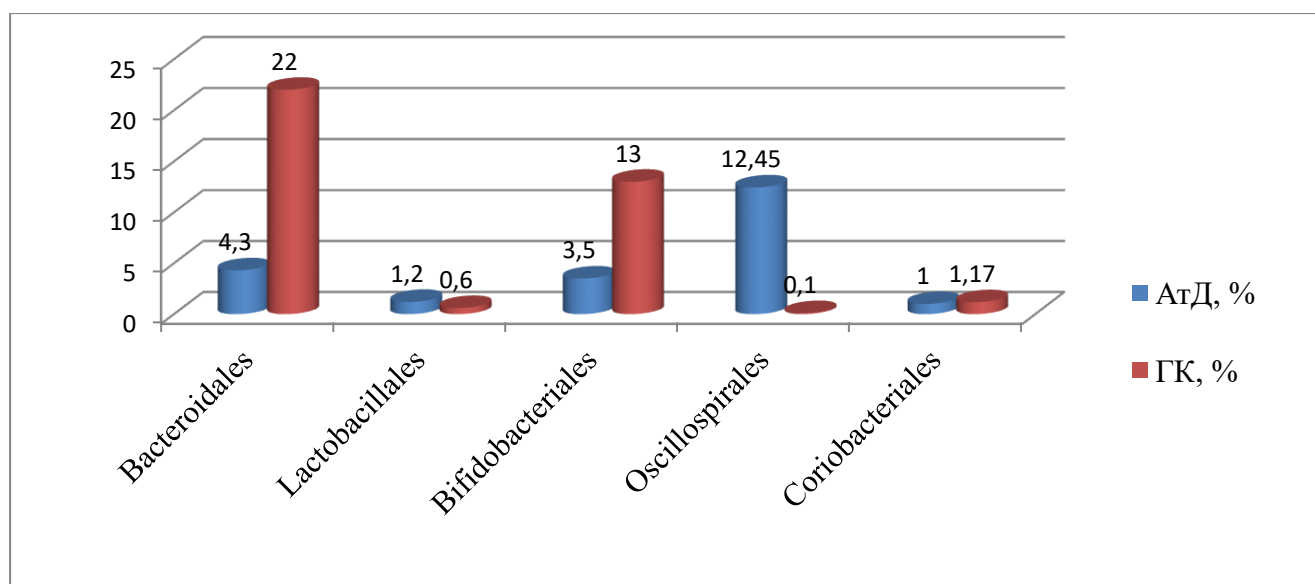


Рисунок 23 - Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом и детей группы контроля на уровне отряда бактерий

На уровне семейства бактерий у детей основной группы в сравнении с детьми из группы контроля отмечается достоверное снижение в метагеноме относительного количества бактерий Bifidobacteriaceae, Bacteroidaceae, Erysipelotrichaceae, а также повышение относительного количества бактерий Enterococcaceae и Veillonellaceae ($p < 0,05$). Бактерии Lachnospiraceae,

Enterobacteriaceae, Streptococcaceae, Ruminococcaceae не имели значимых различий в составе у детей сравниваемых групп ($p > 0,05$, Таблица 19, Рисунок 24).

Таблица 19 - Сравнительный анализ семейства бактерий детей с АД и группы контроля

Показатель, Me [Q ₁ -Q ₃]	Атопический дерматит, %	Группа контроля, %	p
Erysipelotrichaceae	0 [0 -4,0]	1,9[1,13 -2,8]	0,01
Lachnospiraceae	23,00 [13,25- 30,00]	27,2 [19,13- 34,13]	0,21
Enterococcaceae	0,3 [0 – 17]	0 [0 – 0,7]	0,01
Bifidobacteriaceae	0 [0 – 5,57]	13,4 [3,67 -31,03]	0,01
Enterobacteriaceae	0[0– 25,0]	0,23[0,1 – 1,17]	0,65
Streptococcaceae	0 [0 -1,2]	0,27 [0,23 -1,7]	0,07
Veillonellaceae	1,23 [0 – 3,0]	0,43 [0,17 – 1,3]	0,01
Ruminococcaceae	13 [4,5-24,0]	18,47 [13,9-27,53]	0,11
Bacteroidaceae	0 [0 – 0]	14,3 [6,93- 25,53]	0,01

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Манна – Уитни

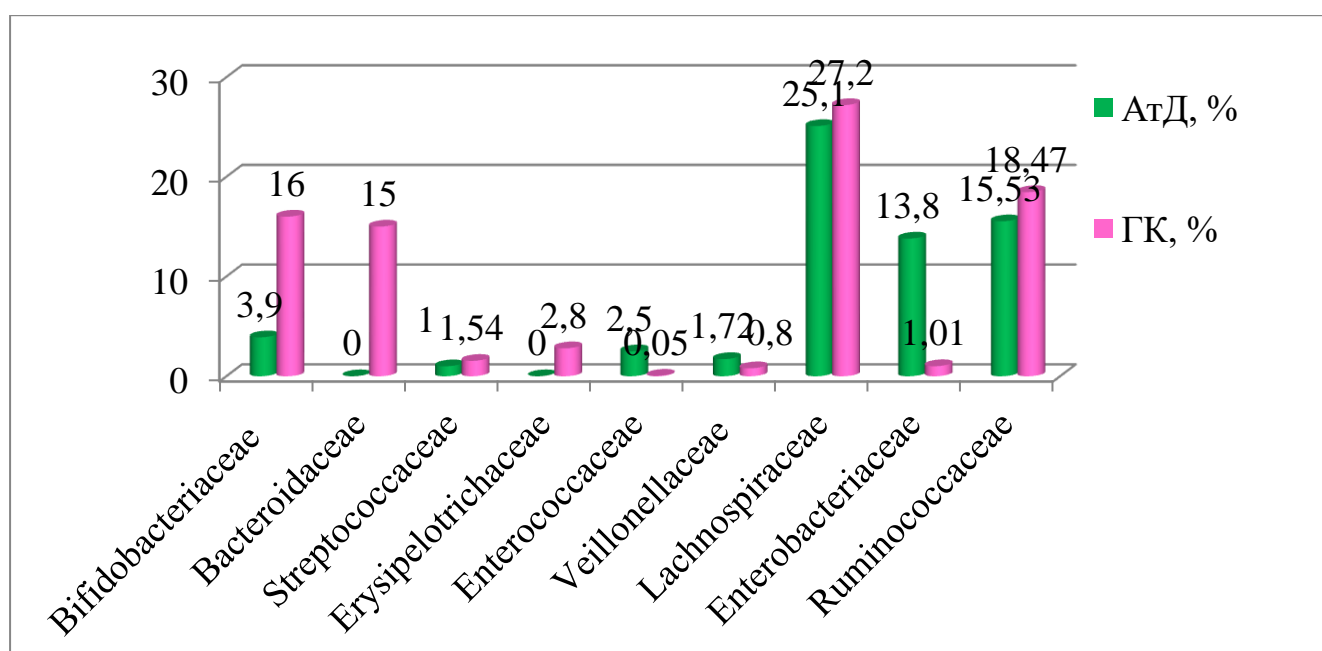


Рисунок 24 - Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом и детей группы контроля на уровне семейства бактерий

На уровне рода бактерий у детей основной группы в метагеноме отмечается множество статистически значимых различий, которые продемонстрированы в Таблице 20 и на Рисунке 25. Установлено достоверное снижение относительного количества бактерий *Lachnoclostridium*, *Roseburia*, *Prevotella*, *Coprococcus*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, а также повышение относительного количества бактерий *Dialister*, *Eggerthella*, *Enterobacter*, в сравнении с детьми из группы контроля. Такие бактерии, как *Streptococcus*, *Akkermansia*, *Dorea*, *Eubacterium*, *Escherichia-Shigella*, *Blautia* и другие, не имели значимых различий в сравниваемых группах ($p > 0,05$).

Таблица 20 - Сравнительный анализ рода бактерий у детей с АД и группы контроля

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Атопический дерматит, %	Группа контроля, %	p
Dialister	1,2 [0 – 5,4]	0,2 [0 – 1,3]	0,039
Lachnoclostridium	0 [0– 4,0]	3,57 [2,7– 4,93]	0,01
Akkermansia	0 [0– 5]	0,63 [0,20 – 1,63]	0,08
Dorea	0 [0 – 1,0]	0,67 [0,33 – 1,57]	0,79
Roseburia	0 [0 – 3,0]	4,73 [1,37 – 7,6]	0,01
Prevotella	0 [0– 5,0]	0,03 [0 – 1,2]	0,036
Eubacterium	0 [0 – 3,0]	0,13 [0,03 – 0,93]	0,72
Escherichia- Shigella	1,0 [0 – 10,75]	0,23 [0,1 – 1,17]	0,91
Eggerthella	0,2[0 – 1,0]	0 [0 – 0]	0,012
Blautia	8,5 [3,0 – 13,0]	6,00 [3,03 – 8,13]	0,24
Coprococcus	0 [0 – 3,0]	6,13 [3,4 – 11,73]	0,01
Streptococcus	0 [0 – 1,5]	0,27 [0,13 – 1,7]	0,1
Ruminococcus	1 [0 – 4,0]	2,9 [1,17 – 5,57]	0,01
Faecalibacterium	0 [0 – 8,75]	10,53 [3,17 – 14,53]	0,01
Bifidobacterium	4,0 [0 – 9,0]	13,4 [3,67 – 31,03]	0,01
Bacteroides	3 [0 – 9,7]	14,3 [6,93 – 25,53]	0,01
Enterobacter	0,5 [0 – 5,25]	0 [0 – 0]	0,047

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Манна – Уитни

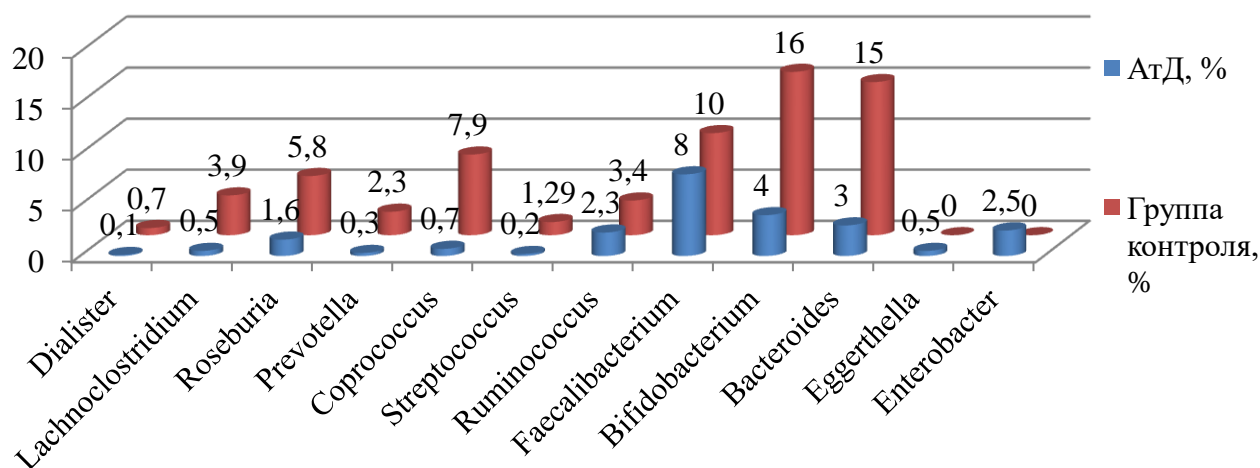


Рисунок 25 - Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом и детей группы контроля на уровне рода бактерий

Сравнительная оценка таксономического состава микробиоты кишечника на уровне вида бактерий представлена в Таблице 21 и на Рисунке 26. У детей с АТД в метагеноме установлено достоверное снижение ($p < 0,05$) относительного количества бактерий *Bifidobacterium longum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis* в сравнении с условно - здоровыми детьми. Относительное количество бактерий *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum* не имели существенных различий в численности у детей сравниваемых групп ($p > 0,05$).

Таблица 21- Сравнительный анализ вида бактерий детей с АТД и условно-здоровых детей

Показатель Me [Q ₁ -Q ₃]	Атопический дерматит, %	Группа контроля, %	p
<i>Lactococcus lactis</i>	0 [0 – 0]	0 [0 – 0,1]	0,24
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0 [0 – 0]	10,53[3,17 – 14,53]	0,01
<i>Bacteroides fragilis</i>	0 [0 – 0,5]	0,13 [0,03 – 0,97]	0,01
<i>Bifidobacterium longum</i>	0 [0 – 2,0]	7,56 [1,67– 22,07]	0,01
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0 [0 – 0]	0 [0 – 1,07]	0,2

Анализ данных проведен с применением непараметрического критерия Манна – Уитни

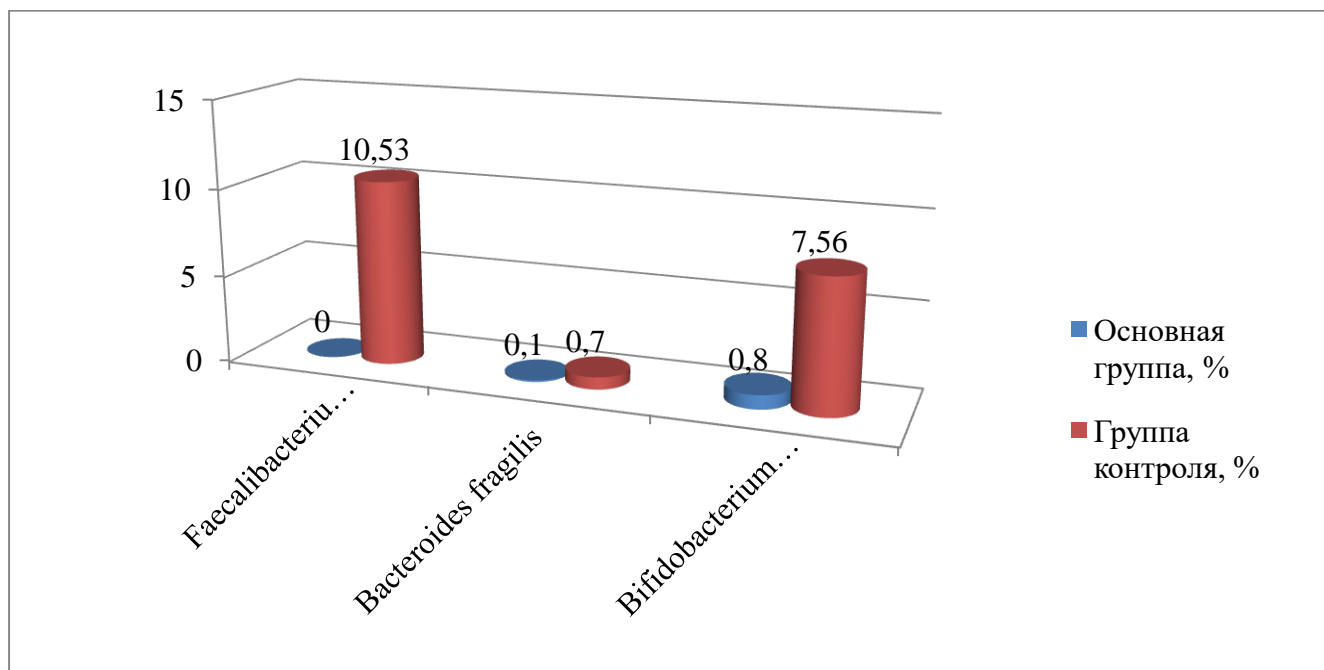


Рисунок 26 - Микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом и детей группы контроля на уровне вида бактерий

Таким образом, микробиота кишечника детей с атопическим дерматитом и микробиота условно - здоровых детей имеет достоверные различия в таксономическом составе на всех уровнях.

3.6. Корреляционный анализ бактерий микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом с анамнезом и клинико - лабораторными данными

Проведён корреляционный анализ таксономического состава бактерий, выявленных при секвенировании 16S рРНК образцов кала с анамнезом и клинико - лабораторными данными.

При оценке факторов риска развития атопического дерматита, таких как оперативные роды, искусственное вскармливание, отягощенный семейный анамнез по атопии были выявлены как положительные, так и отрицательные корреляционные связи разной силы. Данные представлены в Таблице 22.

У детей, рожденных путем кесарева сечения (23% обследуемых детей с АД), выявлена достоверно значимая прямая корреляционная связь умеренной силы с классом бактерий Gammaproteobacteria (0,47), родом Enterobacter (0,28),а

также статистически значимая обратная корреляционная связь с бактериями вида *Bifidobacterium bifidum* (-0,38).

При оценке таксономического состава бактерий и характера вскармливания установлены статистически значимые разнонаправленные корреляционные связи. Показатель «искусственное вскармливание» прямо коррелировал с бактериями класса *Gamma*proteobacteria (0,30), отрядом *Coriobacteriales* (0,32), отрядом *Pseudomonadales* (0,45), семейством *Erysipelotrichaceae* (0,31), семейством *Enterobacteriaceae* (0,41), видом *Bacteroides fragilis* (0,38) и обратно коррелировал с классом *Verrucomicrobiae* (-0,31) и видом *Bifidobacterium bifidum* (-0,30). Теснота связи между показателями умеренная.

Статистически значимая прямая корреляция умеренной силы получена между отягощенным семейным анамнезом по атопии и бактериями рода *Eggerthella* (0,26), *Dialister* (0,36) и отрицательная корреляция с отрядом *Lactobacillales* (-0,32) и родом *Lachnoclostridium* (-0,36).

Помимо этого установлена статистически значимая прямая корреляция умеренной силы рода бактерии *Eggerthella* с возрастом появления первых симптомов атопического дерматита (0,39).

Таблица 22 - Корреляции между отдельными бактериальными представителями кишечной микробиоты и факторами риска развития атопического дерматита

Показатель	Кесарево сечение	Искусственное вскармливание	Отягощенный аллергологический анамнез
Класс <i>Gamma</i> proteobacteria	0,47*	0,30*	0,08
Класс <i>Verrucomicrobiae</i>	0,15	-0,31*	-0,06
Отряд <i>Lactobacillales</i>	-0,04	-0,20	-0,32*
Отряд <i>Coriobacteriales</i>	0,27	0,32*	-0,03
Отряд <i>Pseudomonadales</i>	0,03	0,45*	-0,23
Семейство <i>Erysipelotrichaceae</i>	-0,25	0,31*	-0,25
Семейство <i>Erysipelatoclostridiaceae</i>	-0,28	-0,08	0,22
Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	0,28	0,41*	0,07

Продолжение Таблицы 22

Показатель	Кесарево сечение	Искусственное вскармливание	Отягощенный аллергологический анамнез
Род <i>Lachnoclostridium</i>	-0,24	-0,08	-0,36*
Род <i>Eggerthella</i>	0,17	-0,12	0,26*
Род <i>Dialister</i>	0,15	0,23	0,36*
Род <i>Enterobacter</i>	0,28*	0,26	0,22
Вид <i>Bifidobacterium bifidum</i>	-0,38*	-0,30*	-0,09
Вид <i>Bacteroides fragilis</i>	0,11	0,38*	-0,10

*Связь показателей статистически значима ($p \leq 0,05$)

При оценке таксономического состава бактерий и кожного синдрома установлено множество причинно – следственных связей с численностью бактерий микробиоты кишечника (Таблица 23). Клинический показатель «сухость кожных покровов» имеет статистически значимую обратную корреляцию с альфа - разнообразием (-0,46), количеством бактерий (-0,63), а также бактериями типа *Proteobacteria* (-0,40), класса *Actinobacteria* (-0,35), отряда *Lactobacillales* (-0,43), отряда *Bacteroidales* (-0,35), рода *Erysipelatoclostridium* (-0,37), *Lachnoclostridium* (-0,36), *Coprococcus* (-0,43), *Sellimonas* (-0,42), вида *Bifidobacterium bifidum* (-0,35).

При рассмотрении клинического показателя «шелушение кожных покровов», установлены статистически значимые обратные корреляционные связи с альфа - разнообразием (-0,41), количеством бактерий (-0,59), а также бактериями типа *Proteobacteria* (-0,40), отряда *Peptostreptococcales-Tissierellales* (-0,27), *Lactobacillales* (-0,40), семейства *Eggerthellaceae* (-0,29), рода *Erysipelatoclostridium* (-0,34), *Lachnoclostridium* (-0,33), *Coprococcus* (-0,40), *Sellimonas* (-0,40), вида *Bifidobacterium bifidum* (-0,32), *Bifidobacterium longum* (-0,30).

Клинический показатель «гиперемия кожных покровов» обратно коррелирует с такими показателями микробиоты кишечника, как: альфа - разнообразие (-0,29), количество бактерий (-0,48), так и бактериями типа *Proteobacteria* (-0,36), класса *Actinobacteria* (-0,29), отряда *Peptostreptococcales-Tissierellales* (-0,34), *Lactobacillales* (-0,44), семейства *Eggerthellaceae* (-0,33), рода

Erysipelatoclostridium (-0,31), *Lachnoclostridium* (-0,42), *Sellimonas* (-0,33) и вида *Bifidobacterium longum* (-0,33). Связь показателей является статистически значимой ($p \leq 0,05$).

Кожные проявления в виде корок достоверно обратно коррелировали с альфа - разнообразием (-0,29), количеством бактерий (-0,47), а также бактериями типа *Proteobacteria* (-0,33), класса *Actinobacteria* (-0,26), отряда *Peptostreptococcales-Tissierellales* (-0,32), *Lactobacillales* (-0,42), семейства *Eggerthellaceae* (-0,30), рода *Erysipelatoclostridium* (-0,28), *Lachnoclostridium* (-0,39), *Sellimonas* (-0,32), вида *Bifidobacterium longum* (-0,36).

Клинический показатель «эксфолиации» обратно коррелирует с альфа - разнообразием (-0,46), количеством бактерий (-0,63), а также бактериями класса *Actinobacteria* (-0,35), отряда *Peptostreptococcales-Tissierellales* (-0,40), *Lactobacillales* (-0,26), *Bacteroidales* (-0,35), семейства *Oscillospiraceae* (-0,39), рода *Erysipelatoclostridium* (-0,27), *Lachnoclostridium* (-0,30), *Sellimonas* (-0,29), вида *Bifidobacterium longum* (-0,46). Связь представленных показателей является статистически значимой ($p < 0,05$).

При анализе кожного проявления «лихенификация», установлены статистически значимые обратные корреляционные связи умеренной силы с общим количеством бактерий (0,42), а также слабая корреляция с классом *Actinobacteria* (-0,26), семейством *Oscillospiraceae* (-0,26), родом *Coprococcus* (-0,28).

При оценке зуда кожных покровов отмечаются достоверные обратные корреляции с альфа - разнообразием (-0,45), количеством бактерий (-0,60), а также бактериями класса *Actinobacteria* (-0,26), отряда *Oscillospirales* (-0,31), *Peptostreptococcales-Tissierellales* (-0,32), *Lactobacillales* (-0,27), *Bacteroidales* (-0,36), семейства *Oscillospiraceae* (-0,35), рода *Lachnoclostridium* (-0,33), *Coprococcus* (-0,32), *Sellimonas* (-0,33), *Bifidobacterium longum* (-0,40).

Таблица 23 - Корреляционный анализ микробиоты кишечника с кожными проявлениями АД

Показатель	Сухость	Шелушение	Гиперемия	Корки	Экскориации	Лихенификации	Зуд
альфа-разнообр	-0,41*	-0,41*	-0,29*	-0,29*	-0,46*	-0,25	-0,45*
Бактерии	-0,60*	-0,59*	-0,48*	-0,47*	-0,63*	-0,42*	-0,60*
Тип Proteobacteria	-0,28*	-0,40*	-0,36*	-0,33*	-0,08	-0,25	-0,23
Класс Actinobacteria	-0,29*	-0,26	-0,29*	-0,26*	-0,35*	-0,26*	-0,26*
Отряд Oscillospirales	-0,22	-0,26	-0,18	-0,20	-0,24	-0,26*	-0,31*
Отряд Peptostreptococales-Tissierellales	-0,29	-0,27*	-0,34*	-0,32*	-0,40*	-0,06	-0,32*
Отряд Lactobacillales	-0,43*	-0,40*	-0,44	-0,42*	-0,26*	0,02	-0,27*
Отряд Bacteroidales	-0,18	-0,21	-0,17	-0,22	-0,35*	-0,09	-0,36*
Семейство Oscillospiraceae	-0,26	-0,25	-0,12	-0,19	-0,39*	-0,26*	-0,35*
Семейство Eggerthellaceae	-0,26	-0,29*	-0,33*	-0,30*	-0,23	-0,17	-0,24
Род Erysipelatoclostridium	-0,37*	-0,34*	-0,31*	-0,28*	-0,27*	0,05	-0,21
Род Lachnoclostridium	-0,36*	-0,33*	-0,42*	-0,39*	-0,30*	-0,21	-0,33*
Род Coprococcus	-0,43*	-0,40*	-0,18	-0,22	-0,13	-0,28*	-0,32*
Род Sellimonas	-0,42*	-0,40*	-0,33*	-0,32*	-0,29*	-0,24	-0,33*
Вид Bifidobacterium bifidum	-0,35*	-0,32*	-0,21	-0,19	-0,21	-0,06	-0,25
Вид Bifidobacterium longum	-0,27	-0,30*	-0,33*	-0,36*	-0,46*	-0,22	-0,40*

*Связь показателей статистически значима ($p \leq 0,05$)

Кроме того, проведен корреляционный анализ таксономического состава микробиоты кишечника с бальной шкалой оценки тяжести атопического дерматита SCORAD и частотой обострения заболевания (Таблица 24). Установлены причинно – следственные связи индекса SCORAD с альфа - разнообразием (- 0,54) и количеством бактерий (-0,72), а также бактериями типа Proteobacteria (-0,38), класса Actinobacteria (-0,38), отряда Peptostreptococcales-Tissierellales (-0,36), Lactobacillales (-0,41), Bacteroidales (-0,38), семейства Oscillospiraceae (-0,31), рода Lachnoclostridium (-0,30), Coprococcus (-0,30), Sellimonas (-0,32), Butyricicoccus (-0,27) и рода Bacteroides (-0,28).

Между показателем «частота обострения» и спектром микробиоты кишечника выявлены достоверные обратные корреляции с альфа -разнообразием (- 0,45) и количеством бактерий (-0,51), а также бактериями типа Proteobacteria (- 0,25), отряда Peptostreptococcales-Tissierellales (-0,41), Lactobacillales (-0,34), Bacteroidales (-0,32), семейством Oscillospiraceae (-0,28), родом Lachnoclostridium (-0,33), Butyricicoccus (-0,35) и Bacteroides (-0,32).

Таблица 24 - Корреляционный анализ таксономического состава микробиоты кишечника с частотой обострения и индексом SCORAD

Показатель	Частота обострений АтД	Индекс SCORAD
альфа-разнообр	-0,45*	-0,54*
Бактерии	-0,51*	-0,72*
Тип Proteobacteria	-0,25*	-0,38*
Класс Actinobacteria	-0,18	-0,38*
Отряд Peptostreptococcales-Tissierellales	-0,41*	-0,36*
Отряд Lactobacillales	-0,34*	-0,41*
Отряд Bacteroidales	-0,32*	-0,38*
Семейство Oscillospiraceae	-0,28*	-0,31*
Род Lachnoclostridium	-0,33*	-0,30*
Род Coprococcus	-0,24	-0,30*
Род Sellimonas	-0,18	-0,32*
Род Butyricicoccus	-0,35*	-0,27*
Род Bacteroides	-0,32*	-0,28*

*Связь показателей статистически значима ($p \leq 0,05$)

Корреляционные связи таксономического состава микробиоты кишечника с лабораторными данными (эозинофильный катионовый белок, общий IgE, эозинофилы крови) представлены в Таблице 25.

Обнаружена статистически значимая прямая корреляционная связь ЭКБ с родом *Lachnoclostridium* (0,39), *Fusicatenibacter* (0,35), *Anaerococcus* (0,35) и родом *Veillonella* (0,37).

Показатель общего IgE достоверно обратно коррелировал с видом *Bifidobacterium bifidum* (-0,30). Сила корреляционной связи умеренная.

Эозинофилы крови напрямую коррелировали с типом Firmicutes (0,31). Данная связь была статистически значима ($p \leq 0,05$).

Таблица 25 - Корреляционный анализ таксономического состава микробиоты кишечника с лабораторными данными

Показатель	ЭКБ	Общий IgE	Эозинофилы крови
Тип Firmicutes	0,22	0,01	0,31*
Род <i>Lachnoclostridium</i>	0,39*	-0,21	0,26
Род <i>Fusicatenibacter</i>	0,35*	0,25	0,21
Род <i>Anaerococcus</i>	0,35*	-0,25	0,18
Род <i>Veillonella</i>	0,37*	0,12	0,01
Вид <i>Bifidobacterium bifidum</i>	0,11	-0,30*	0,22

*Связь показателей статистически значима ($p \leq 0,05$)

Кроме того определено множество причинно – следственных связей таксономического состава микробиоты кишечника и специфических IgE к различным пищевым аллергенам, которые продемонстрированы в Таблице 26.

Так специфические IgE к овсу достоверно прямо коррелировали с бактериями рода *Dorea* (0,28), *Monoglobus* (0,36), *Stenotrophomonas* (0,36).

Специфические IgE к гречке напрямую коррелировали с родом *Enterobacter* (0,32), родом *Peptoniphilus* (0,35), *Christensenellaceae R-7group* (0,41), и родом *Veillonella* (0,37). Связь показателей была статистически значима.

Установлена значимая прямая корреляционная связь специфических IgE к козьему молоку с родом *Erysipelatoclostridium* (0,43), *Dorea* (0,28), *Sellimonas*

(0,30), *Stenotrophomonas* (0,27) и обратная корреляционная связь слабой силы с родом *Enterobacter* (-0,25).

Специфические IgE к белку коровьего молока (БКМ) прямо коррелировали с классом *Clostridia* (0,26), отрядом *Oscillospirales* (0,41), родом *Dorea* (0,29). Также отмечается прямая корреляционная связь специфических IgE к кефиру и бактериями класса *Clostridia* (0,43), отряда *Oscillospirales* (0,27), семейства *Ruminococcaceae* (0,45), *Eggerthellaceae* (0,32), рода *Erysipelatoclostridium* (0,25), *Monoglobus* (0,39) и обратная корреляционная связь типа *Cyanobacteria* (-0,29) и рода *Escherichia-Shigella* (-0,31). Связь показателей считалась статистически значимой ($p \leq 0,05$)

Специфические IgE к говядине имели прямую значимую корреляционную связь с родом *Erysipelatoclostridium* (0,33), *Dorea* (0,38), *Coprococcus* (0,29) и обратную корреляционную связь с родом *Bifidobacterium* (-0,31).

Специфические IgE к свинине достоверно прямо коррелировали с родом *Erysipelatoclostridium* (0,28), *Dorea* (0,29), *Lachnoclostridium* (0,33), *Barnesiella* (0,68).

Специфические IgE к куриному яйцу достоверно прямо коррелировали с бактериями семейства *Ruminococcaceae* (0,33) и рода *Erysipelotrichaceae* (0,31).

В большинстве случаев сила корреляционной связи состава микробиоты кишечника с клинико - лабораторными проявлениями атопического дерматита умеренная ($0,3 \leq r_s \leq 0,7$).

Таблица 26 - Корреляционный анализ микробиоты кишечника со специфическими IgE

Показатель	Овес	Гречка	Молоко козье	Молоко коровье	Кефир	Говядина	Свинина	Куриное яйцо
Тип <i>Cyanobacteria</i>	-0,12	-0,16	-0,32*	0,20	-0,29*	0,11	-0,11	0,01
Класс <i>Clostridia</i>	-0,23	-0,19	0,23	0,26*	0,43*	0,17	0,22	0,14
Отряд <i>Oscillospirales</i>	-0,14	-0,05	0,09	0,41*	0,27*	0,14	0,11	0,18
Семейство <i>Ruminococcaceae</i>	-0,01	0,11	0,08	0,04	0,45*	0,21	0,01	0,33*

Продолжение Таблицы 26

Показатель	Овес	Гречка	Молоко козье	Молоко коровье	Кефир	Говядина	Свинина	Куриное яйцо
Семейство Ruminococcaceae	-0,01	0,11	0,08	0,04	0,45*	0,21	0,01	0,33*
Семейство Eggerthellaceae	-0,08	-0,12	0,25	0,12	0,32*	0,17	0,20	-0,22
Род Enterobacter	0,02	0,32*	-0,25*	0,08	-0,18	-0,14	0,22	0,26
Род Peptoniphilus	0,22	0,35*	0,06	-0,16	-0,05	0,24	0,25	0,12
Род Christensenellaceae R-7group	0,11	0,41*	0,12	-0,06	0,21	0,24	0,14	-0,01
Род Erysipelatoclostridium	0,15	0,18	0,43*	0,17	0,25*	0,33*	0,28*	0,15
Род Dorea	0,28*	-0,15	0,28*	0,29*	0,18	0,38*	0,29*	0,20
Род Monoglobus	0,36*	0,11	0,17	0,16	0,39*	0,08	0,14	-0,21
Род Lachnoclostridium	0,14	-0,12	0,06	0,18	0,25	0,17	0,33*	0,23
Род Erysipelotrichaceae	0,24	-0,12	-0,14	0,22	0,19	-0,16	0,25	0,31*
Род Coprococcus	-0,02	0,07	0,25	0,36*	0,13	0,29*	0,14	0,26
Род Veillonella	0,22	0,37*	0,14	-0,11	0,17	0,23	0,18	-0,18
Род Sellimonas	0,02	-0,14	0,30*	-0,11	0,18	0,22	0,14	0,11
Род Bifidobacterium	0,14	0,13	-0,17	-0,22	-0,25	-0,31*	0,18	0,23
Род Stenotrophomonas	0,36*	-0,24	0,27*	0,22	0,14	0,02	-0,24	-0,18
Род Escherichia-Shigella	0,12	-0,14	-0,23	-0,20	-0,31*	0,14	-0,04	-0,25
Род Barnesiella	0,02	0,06	0,11	-0,04	-0,13	0,16	0,68*	-0,17

*Связь показателей статистически значима ($p \leq 0,05$)

3.6.1. Корреляционный анализ анамнестических и клинико - лабораторных данных

Проведен корреляционный анализ анамнестических и клинико - лабораторных данных.

При оценке условных факторов риска развития атопического дерматита с клинико - анамнестическими данными, установлена причинно - следственная связь сроков появления первых симптомов атопического дерматита с искусственным вскармливанием ($r_s = -0,46$), оперативными родами ($r_s = -0,36$), а также частотой обострения заболевания ($r_s = -0,37$, $p \leq 0,05$) и признаками вторичного инфицирования ($r_s = -0,32$, $p \leq 0,05$).

Отягощенный семейный анамнез по атопии показал достоверные обратные корреляционные связи умеренной силы с ЭКБ и общим IgE ($r_s = -0,30$ и $r_s = -0,32$ соответственно, $p \leq 0,05$).

Частота обострения атопического дерматита прямо коррелирует с зудом кожи ($r_s = 0,80$), признаками вторичного инфицирования ($r_s = 0,71$) и показателем SCORAD (0,78) и обратно коррелирует с лабораторным показателем ЭКБ ($r_s = -0,39$). Связь показателей была статистически значимой ($p \leq 0,05$).

Вторичное инфицирование АД обратнo коррелирует с грудным вскармливанием ($r_s = -0,32$), а также с ЭКБ ($r_s = -0,32$). Связь показателей умеренная, статистически значимая, $p \leq 0,05$.

Показатель SCORAD имеет ассоциацию со снижением ЭКБ ($r_s = -0,32$, $p \leq 0,05$).

При повышении лабораторного показателя ЭКБ имеется ассоциация к повышению общего IgE ($r_s = 0,35$), специфических IgE к пшенице ($r_s = 0,32$) и снижению специфических IgE к телятине ($r_s = -0,27$) ($p \leq 0,05$). Связи между ЭКБ и эозинофилами крови не обнаружено.

Кроме того, увеличение эозинофилов крови ассоциируется со снижением специфических IgE к говядине ($r_s = -0,30$).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Роли микробиоты кишечника у детей с атопическим дерматитом уделяется огромный научный интерес. И это не случайно, ведь кишечная микрофлора выполняет ряд важнейших функций, участвует в процессе пищеварения, синтезе витаминов, гормонов, а также биологически активных веществ, так необходимых для жизнедеятельности нашего организма [19].

В научной литературе имеется множество данных о роли микробиоты в развитии аллергических заболеваний, в том числе атопического дерматита. Стоит отметить, что исследований, в которых бы изучалась корреляция основных клинико - лабораторных проявлений с изменением микробного пейзажа у детей возрастной группы 1-5 лет, в настоящее время недостаточно. Кроме того, изучение микробиоты кишечника молекулярно - генетическими методами на территории РФ до настоящего времени не проводилось.

Как известно, практически все заболевания имеют те или иные факторы риска. Атопический дерматит не исключение. По данным многочисленных исследований факторами риска развития атопического дерматита являются вскармливание, родоразрешение, отягощенный аллергологический семейный анамнез, питание и др. [1, 6, 19, 84, 140].

В нашем исследовании установлена причинно - следственная связь появления первых симптомов атопического дерматита со способом родоразрешения, характера вскармливания, а так же выраженностью процесса. Стоит отметить, что дети рожденные путем кесарева сечения и получавшие заменители грудного молока, имеют ассоциацию к раннему появлению первых симптомов атопического дерматита ($r_s = -0,46$, $r_s = -0,36$ соответственно, $p \leq 0,05$). Кроме того, грудное вскармливание ассоциировано с уменьшением случаев вторичного инфицирования ($r_s = -0,32$, $p \leq 0,05$).

Принимая во внимание вышеперечисленные факторы, выполнена оценка отношения шансов, которая показала, что шансы развития АД в 1,7 раза выше у детей, рожденных путем кесарева сечения, в 2,4 раза выше у детей на

искусственном вскармливании и в 3,6 раза выше у детей с отягощенным семейным анамнезом по атопии.

Таким образом, данные факторы могут стать предикторами атопического дерматита у детей. Несомненно, что оперативное родоразрешение, а также переход на искусственное вскармливание ребенка должны строго определяться врачом и проводиться только по показаниям, а не по желанию матери [16, 19, 23].

Как и многие заболевания атопический дерматит имеет свои клинико - лабораторные особенности.

Отмечается причинно – следственная связь частоты обострения атопического дерматита с кожным синдромом, в частности с зудом кожи ($r_s = 0,80$), вторичным инфицированием ($r_s = 0,71$) и показателем SCORAD ($r_s = 0,78$, $p \leq 0,05$).

По литературным данным установлено, что пациенты с атопическим дерматитом имеют высокий уровень общего Ig E в сыворотке крови [104, 141]. В настоящее время не вызывает сомнений, что более чем у 80% пациентов ведущую роль в патогенезе АД играет нарушение иммунорегуляции с развитием IgE-опосредованной сенсibilизации к различным аллергенам [181]. Данное исследование является необходимым для уточнения спектра сенсibilизации у детей с атопическим дерматитом, поскольку повышенный уровень специфических IgE является важным диагностическим критерием [10].

При оценке общего IgE в нашем исследовании, повышение выше 80 МЕд/мл обнаружено у 9 детей с АД из 50 обследованных. Данный показатель имеет взаимосвязь с отягощенным аллергологическим анамнезом ($r_s = -0,32$). Кроме того, отмечается причинно – следственная связь с эозинофильным катиононм белком ($r_s = -0,30$, $p \leq 0,05$).

В последнее время большое внимание уделяется значимости эозинофильного катиононм белка (ЭКБ) в диагностике аллергических заболеваний [2].

Ряд ученых указывают на то, что повышение ЭКБ обнаруживается в крови у пациентов с бронхиальной астмой, аллергическим ринитом, а также атопическим дерматитом и может быть использован для контроля тяжести воспаления [119,

131]. В исследовании R.Fölster-Holst, E. Papakonstantinou, U.Rüdrich и соавт. сывороточный ЭКБ прямо коррелировал с активностью заболевания и общим уровнем IgE [72].

В нашем исследовании также установлена прямая корреляционная связь ЭКБ с общим IgE ($r_s = 0,35$). Однако получены и противоречивые результаты. Так связи с тяжестью заболевания и выраженностью проявлений АтД не выявлено. Данный показатель обратно коррелировал с показателем SCORAD ($r_s = -0,32$) и клиническими признаками вторичного инфицирования АтД ($r_s = -0,32$). Таким образом, ЭКБ не имеет связи с тяжестью атопического дерматита в проведенном нами исследовании.

Кроме того, имеются сведения об ассоциации ЭКБ с количеством эозинофилов крови при аллергическом рините, аллергической астме, атопическом дерматите [2, 119]. Связи между ЭКБ и эозинофилами крови в нашем исследовании не обнаружено.

Анализ микробиоты кишечника у детей с атопическим дерматитом в данной работе проведен с использованием метода секвенирования бактериальных генов 16S рРНК в образцах кала.

При изучении кишечной микробиоты детей с АтД в зависимости от клинического течения заболевания, установлены статистически значимые различия в количестве бактерий и альфа – разнообразии. У детей в стадии обострения АтД, а также имеющих осложненное течение заболевания, признаками вторичного инфицирования эти показатели существенно снижены, в сравнении с детьми, находящимися в стадии неполной и полной ремиссии ($p < 0,05$) [21].

Широкий спектр таксономического состава свидетельствует стабильности микробных сообществ, а снижение разнообразия бактерий «говорит» о наличии в нем патологического процесса [78, 191, 157]. Кроме того, снижение альфа - разнообразия кишечной микробиоты может наблюдаться при воспалительных заболеваниях кишечника, ожирении, атопии, а также у людей, в рационе которых преобладают жиры и легкоусвояемые углеводы [123].

При анализе отдельных групп бактерий у детей в зависимости от клинического течения заболевания в проведенном нами исследовании, отмечается снижение относительного количества бактерий типа *Proteobacteria* у детей в стадии обострения в сравнении с детьми в стадии неполной и полной ремиссии ($p < 0,05$). Данные изменения вероятно связаны с вялотекущим процессом у детей в стадии неполной ремиссии и находящихся в ремиссии, а снижение данных бактерий у детей с обострением заболевания объяснимо скудностью видового богатства и количественного состава бактерий.

Относительное количество типа бактерий *Actinobacteria* имеет статистически значимое снижение у детей с признаками вторичного инфицирования заболевания в сравнении с детьми в стадии обострения и неполной ремиссии АтД ($p = 0,05$) [21].

Этот тип представлен в большей мере *Bifidobacterium spp.* Известно, что данные бактерии преобладают в детской популяции и знамениты пробиотическими свойствами [153]. Стоит также отметить снижение относительного количества вида *Bifidobacterium longum*, относящегося к типу *Actinobacteria*, в группе детей в стадии обострения и детей с признаками вторичного инфицирования в сравнении с детьми, находящихся в стадии ремиссии ($p < 0,05$). Эти бактерии особенно эффективны для защиты от инфекционных заболеваний и модуляции иммунного ответа [21, 48].

В литературе также описаны и отрицательные свойства бифидобактерии. Например, *Bifidobacterium breve* негативно влияет на течение атопического дерматита [95]. В нашем исследовании не отмечалось существенных различий в численности данной бактерии у детей сравниваемых групп.

На уровне семейства бактерий в зависимости от клинического течения АтД, обнаружено снижение бактерий *Oscillospiraceae* и *Erysipelatoclostridiaceae* ($p=0,03$; $0,034$), в группе детей в стадии обострения и детей с признаками вторичного инфицирования. Бактерия *Oscillospiraceae* и *Erysipelatoclostridiaceae* относится к типу *Firmicutes*, классу *Clostridium*. Эти бактерии способны оказывать положительное влияние на слизистую оболочку ЖКТ, благодаря производству масляной кислоты, которая является основным источником энергии для клеток

эпителия кишечника, тем самым предотвращает развитие воспалительного процесса [22, 135]. В исследовании S. Mondot и соавт., обнаружено большое количество Oscillospiraceae у здоровых людей, чем у пациентов с диагнозом болезнь Крона [135].

Таким образом, установлены значительные изменения в количественном и качественном составе микробиоты кишечника при различных клинических формах атопического дерматита.

Таксономический состав кишечной микрофлоры имеет определенные различия у детей в зависимости от возраста [20]. Нами проведён анализ микробиоты кишечника у детей с АД от 1 года до 2х лет включительно и от 3 х до 5 лет включительно, который показал статистически значимые различия в спектре микроорганизмов. У детей от 3х до 5 лет включительно количественный показатель бактерий значительно превышал показатель детей 1 года - 2х лет включительно ($p < 0,05$). Вероятно это связано с возрастными особенностями питания, ведь рацион детей старшего возраста намного богаче детей раннего возраста. Также данные изменения могут быть связаны с течением заболевания, т.к. осложненное течение АД, признаками вторичного инфицирования, наличие частых обострений чаще встречается у детей возрастной группы 1-2 лет.

При оценке бактерий на разных таксономических уровнях в кишечной микробиоте детей с АД данной возрастной группы в нашем исследовании получены статистически значимые различия на уровне класса бактерий. Установлено повышение относительного количества бактерий Gammaproteobacteria в возрастной группе детей от 3х до 5 лет, в сравнении с детьми от 1 года до 2х лет. ($p = 0,048$). Повышение данного класса наблюдается за счет семейства Enterobacteriaceae. Gammaproteobacteria принадлежит филуму Proteobacteria. В научной литературе повышение Gammaproteobacteria отмечается при бронхиальной астме, ВЗК, СД 2 типа, а также инфекционных заболеваниях различной локализации [4, 86, 188].

Данные бактерии имеют в своем строении липополисахаридный комплекс, который через Toll-подобные рецепторы способен повысить выработку ряда

цитокинов (фактора некроза опухоли- α и интерлейкина-6), тем самым запустив иммунный ответ [27, 32, 33, 151].

Кроме того, в микробиоте кишечника пациентов с атопическим дерматитом 1-2х лет включительно отмечается преобладание вида *Lactococcus lactis* в сравнении с детьми 3-5лет. В мировой литературе имеются сведения, что штамм *Lactococcus lactis* содержится в коровьем молоке [8]. Стоит отметить, что в нашем исследовании у детей возрастной группы 1-2х лет чаще остальных наблюдалась аллергия на БКМ.

С другой стороны *Lactococcus lactis* является молочно - кислой бактерией и может передаваться от матери ребенку при грудном вскармливании, что также характерно для данной возрастной группы детей. В некоторых исследованиях показано, что бактерии *Lactococcus lactis* обладают пробиотическими свойствами и уменьшают тяжесть атопического дерматита, а также снижают аллергенность к БКМ [103, 105].

Таким образом, связь бактерии *Lactococcus lactis* с наличием аллергии у детей 1-2 лет требует дальнейшего изучения.

Нами проведен сравнительный анализ микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом и группы условно - здоровых детей, который выявил статистически значимые различия между данными группами на всех таксономических уровнях [22].

В ходе изучения научной литературы, имеются противоречивые данные, касающиеся альфа - разнообразия микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом. Одни исследования показали снижение данного показателя [89, 62, 192], другие не выявили значимых изменений у детей с атопическим дерматитом в сравнении со здоровыми детьми [120, 193, 166, 70, 161, 22].

В нашем исследовании микробиота кишечника детей страдающих АтД и микробиота условно - здоровых детей, характеризовалась достаточно разнообразным таксономическим составом метагенома. Статистически значимых различий в альфа - разнообразии между данными группами не получено ($p=0,30$).

У детей основной группы по сравнению с группой контроля отмечено существенное повышение относительного количества типа *Proteobacteria* за счет класса *Gamma*proteobacteria и рода *Enterobacter* ($P \leq 0,05$).

Согласно литературным данным, протеобактерии неблагоприятно влияют на здоровье человека из-за наличия в клеточной стенке эндотоксина [151]. К этому типу принадлежит класс *Gamma*proteobacteria, который также был значительно повышен у детей с АтД в нашем исследовании. Данные бактерии обладают патогенными свойствами. Их повышение отмечается при бронхиальной астме, воспалительных заболеваниях кишечника, сахарном диабете 2-го типа, инфекционных заболеваниях различной локализации, а также при АтД у детей [4, 22, 86]. Тем самым как тип протеобактерий, так и его представители могут участвовать в патогенезе развития АтД.

Кроме того, отмечается снижение относительного количества бактерий типа *Actinobacteria* за счет снижения класса *Actinobacteria*, семейства, рода *Bifidobacteria* и вида *Bifidobacteria longum*, относящихся к данному типу ($p \leq 0,05$).

По данным литературных источников, тип актинобактерии является одним из основных типов кишечной микробиоты и играет важную роль в поддержании постоянства внутренней среды кишечника [36]. Классы этого типа, особенно бифидобактерии, широко используются в качестве пробиотиков и благоприятно влияют на слизистую оболочку желудочно - кишечного тракта [36]. Снижение относительного количества данных бактерий у детей с АтД подтверждено и другими исследованиями [62]. В исследовании Акау Н.К.и соавт., установлено снижение количества *B. Longum* у детей с атопическим дерматитом в сравнении с группой здоровых детей [25], что пересекается с результатами нашего исследования.

Помимо этого, нами также установлено снижение типа *Bacteroidetes* у детей с атопическим дерматитом, в сравнении с детьми из группы контроля ($p \leq 0,05$). Уменьшение данного типа отмечается за счет класса *Bacteroidia*, отряда *Bacteroidales*, семейства *Bacteroidaceae*, рода *Bacteroides* и вида *Bacteroides fragilis*.

В научной литературе имеются сведения о снижении данного типа бактерий у детей с АтД [7], что подтверждено и нашим исследованием [22].

Встречаются и противоречивые данные. Например, в исследованиях H. Wopereis и соавт. и R. Verni Canani и соавт. обнаружено повышение бактериоидов у детей с аллергией [189, 34].

Стоит отметить, что Бактероиды способны оказывать положительное влияние на микрофлору кишечника. Они участвуют в снабжении организма энергией, которую получают путем переработки неперевариваемых полисахаридов, в результате чего происходит продукция короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) так необходимых для нормального питания колоноцитов кишечной стенки [38, 19].

Имеются научные труды, которые показали, что Бактероиды способствуют повышению уровня Т-регуляторных клеток, так необходимых для формирования толерантности к пищевым аллергенам [175]. Таким образом, подтверждается участие микробиоты кишечника в патогенезе развития АД.

Вместе с тем, на уровне типа у детей с АД снижено относительное количество бактерии *Verrucomicrobia*.

Бактерии типа *Verrucomicrobia* улучшают функцию кишечного барьера, обеспечивая важнейшие иммунологические реакции организма человека [125]. Основным представителем данного вида бактерии является *Akkermansia muciniphila*, снижение которой установлено у детей с АД в исследовании R. Verni Canani и соавт. в 2018 г. [34] и подтверждено нашим исследованием.

На уровне класса бактерий у детей основной группы в нашем исследовании отмечается достоверное повышение относительного количества бактерий *Bacilli*, которые принадлежат типу *Firmicutes*. Данный класс бактерий повышен за счет семейства *Enterococcaceae*. В литературе описаны патогенные свойства этих бактерий. Они способны продуцировать внеклеточный супероксид, который может приводить к повреждению ДНК в эпителиальных клетках толстой кишки и вызывать развитие местного воспаления с изменением питательных свойств слизистой оболочки кишечника [173]. Повышение количества данных бактерий описаны при воспалительных заболеваниях кишечника, болезни Крона и язвенном колите [75]. Таким образом, повышение указанных выше бактерий может неблагоприятно влиять на слизистую оболочку пищеварительного тракта и

провоцировать развитие воспалительного процесса, запуская иммунный механизм, тем самым способствуя развитию аллергии.

Кроме того, на уровне семейства в проведенном нами исследовании установлено повышение относительного количества бактерий Veillonellaceae, относящегося к типу Firmicutes, классу Negativicutes, а также принадлежащего к данному семейству рода Dialister. Анализ литературных данных показал, что повышение Veillonellaceae у детей с АТД отмечается и в других научных исследованиях [194, 188]. Вместе с тем имеются сведения о неблагоприятном влиянии данной бактерии на слизистую оболочку кишечника [173], тем самым не исключается ее роль в развитии АТД.

На уровне рода бактерий у детей основной группы отмечается снижение бактерий Lachnoclostridium, Roseburia, Prevotella, Coprococcus, Ruminococcus, Faecalibacterium, а также повышение бактерий Eggerthella в сравнении с детьми из группы контроля ($p \leq 0,05$).

Бактерии Eggerthella относятся к типу Actinobacteria, классу Coriobacteria. В научной литературе описаны патогенные свойства этой бактерии, кроме того имеются данные о повышении численности этих бактерий у больных бронхиальной астмой [187]. Таким образом, возможно участие бактерии Eggerthella в развитии аллергических заболеваний.

Бактерии Faecalibacterium, Roseburia, Coprococcus, Lachnoclostridium. Faecalibacterium относятся к типу Firmicutes, классу Clostridium. В литературе описано их положительное влияние на слизистую оболочку желудочно - кишечного тракта. Данные бактерии производят масляную кислоту, которая является основным источником энергии для клеток эпителия кишечника и тем самым предотвращает развитие воспалительного процесса [135]. Бактерии Faecalibacterium и Roseburia в научной литературе ассоциировались с меньшим риском развития атопии [76, 22].

Бактерии Prevotella, относятся к типу Bacteroidetes и в проведенном нами исследовании снижено в сравнении с детьми из группы контроля. В зарубежной научной литературе о роли данной бактерии в течении атопического дерматита имеются противоречивые данные. Так в исследовании микробиоты кишечника на

китайской популяции отмечается повышение бактерии *Prevotella* у детей с атопическим дерматитом, тем самым авторы не исключают негативное влияние бактерии на течение заболевания [192]. Другое исследование, проведенное на мышах, говорит о положительном, пребиотическом влиянии бактерии *Prevotella* на течение атопического дерматита и указывают, что данная бактерия может играть защитную роль в Th2 - опосредованном заболевании [111].

На уровне вида бактерий в нашем исследовании, кроме снижения бактероидов и бифидобактерий, также наблюдается снижение *Faecalibacterium prausnitzii* у детей с АД в сравнении с группой условно - здоровых детей. *Faecalibacterium prausnitzii* являются одними из основных бактерий микробиоты кишечника, продуцирующих КЖК и обладающими пробиотическими и противовоспалительными свойствами [169].

Таким образом, микробиота кишечника детей с АД и микробиота условно - здоровых детей, имеет множество различий на всех таксономических уровнях.

Нами проведён корреляционный анализ таксономического состава бактерий микробиоты кишечника с анамнезом и клинико - лабораторными данными, который показал разнонаправленные корреляции разной силы.

Корреляционный анализ анамнестических данных продемонстрировал прямую корреляцию кесарева сечение с классом бактерий *Gamma*proteobacteria и обратную с бактериями вида *Bifidobacterium bifidum*. Искусственное вскармливание ассоциировано с повышением отряда *Pseudomonadales*, семейством *Enterobacteriaceae* ($p \leq 0,05$). Таким образом, подтверждается значимость факторов риска в развитие атопического дерматита [19].

При оценке клинического течения, в частности кожного синдрома, установлено множество достоверных ($p \leq 0,05$) обратных корреляционных связей умеренной силы. При выраженности кожного синдрома отмечается ассоциация к снижению численности многих бактерий. Наиболее значимыми были обратные корреляции с альфа - разнообразием, количеством бактерий и видом *Bifidobacterium longum*. Данные результаты свидетельствуют о важности оценки спектра микробиоты кишечника в активную фазу заболевания.

Кроме того, выявлена сильная статистически значимая обратная корреляция общего количества бактерий с бальной шкалой оценки тяжести атопического дерматита SCORAD и умеренная обратная корреляция с частотой обострения заболевания. Альфа - разнообразие показало умеренную обратную корреляционную связь с бальной шкалой SCORAD и частотой обострения заболевания ($P \leq 0,05$, корреляция Спирмена). Таким образом, тяжесть атопического дерматита имеет причинно – следственную связь со скудностью таксономического состава микробиоты кишечника.

Другие исследования на категории людей возрастной группы 6 - 70 лет также показали отрицательную корреляционную связь альфа - разнообразия и показателя SCORAD ($p \leq 0,05$) [102].

Корреляционный анализ лабораторных данных и таксономического состава микробиоты кишечника установил немало значимых взаимосвязей с численностью отдельных бактерий.

Стоит отметить, что при увеличении общего IgE в нашем исследовании отмечается ассоциация к уменьшению вида *Bifidobacterium bifidum* ($p \leq 0,05$). В научной литературе имеются сопоставимые результаты. Авторы отмечают отрицательную корреляционную связь общего IgE с бифидобактериями [1, 63].

Различная степень сенсibilизации к пищевым продуктам выявлена у 94% обследуемых больных в данном исследовании. Нами установлена прямая корреляционная связь специфических IgE к белку коровьего молока (БКМ) с классом *Clostridia*, отрядом *Oscillospirales* и родом *Dorea* ($p \leq 0,05$).

Также значимыми были прямая корреляция бактерий семейства *Ruminococcaceae* со специфическими IgE к кефиру и прямая корреляция бактерий рода *Barnesiella* со специфическими IgE к свинине ($p \leq 0,05$). В мировой литературе недостаточно данных, затрагивающих корреляционные связи микробиоты кишечника и клинико – лабораторные показатели у детей с АД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые на территории РФ выполнено исследование микробиоты кишечника детей возрастной группы 1 года - 5 лет включительно с атопическим дерматитом методом секвенирования бактериальных генов 16S рРНК.

Определён таксономический состав микробного пейзажа кишечника у детей с атопическим дерматитом при разных клинических формах заболевания. Выявлены существенные различия в количественном и качественном составе микробиоты ($p < 0,05$). Общее количество бактерий и альфа - разнообразие значительно снижены у детей в стадии обострения и имеющих признаки вторичного инфицирования в сравнении с детьми в стадии неполной и полной ремиссии заболевания, что ассоциируется с ухудшением кожных проявлений, увеличением частоты обострений и отягощением течения АД. Кроме того, отмечается снижение относительного количества бактерий класса Actinobacteria за счет вида *Bifidobacterium longum*, отряда Oscillospirales и семейства Oscillospiraceae, отряда Lactobacillales, Bacteroidales, семейства Erysipelatoclostridiaceae, рода Roseburia, Anaerococcus, Eggerthella у детей в стадии обострения и признаками вторичного инфицирования АД. Большинство этих бактерий обладают пробиотическими свойствами, производят жирные кислоты, в том числе и масляную, которые так необходимы для нормального функционирования и защиты эпителия кишечника.

Оценка микробиоты кишечника детей возрастной группы 1 года - 2 лет включительно и 3 - 5 лет включительно, показала незначительные различия в численности бактерий. У детей 1 года - 2х лет включительно количественный показатель бактерий в несколько раз меньше, чем у детей 3 - 5 лет включительно. Кроме того, установлено преобладание класса Gammaproteobacteria и семейства Enterobacteriaceae у детей 3 - 5 лет, а у детей 1 года - 2 лет выявлено преобладание вида *Lactococcus lactis*. В научной литературе недостаточно сведений посвящённых этому вопросу.

Проведен сравнительный анализ микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом и условно - здоровых детей, в результате чего, обнаружено множество различий на всех филогенетических уровнях. Выявлено повышение относительного количества бактерий типа Proteobacteria, класса Gammaproteobacteria и Bacilli, отряда Oscillospirales, семейства бактерий Enterococcaceae и Veillonellaceae, рода бактерий Eggerthella, Dialister и Enterobacter, а также снижение бактерий типа Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Actinobacteria, класса Actinobacteria и Bacteroidia, отряда Bacteroidales и Bifidobacteriales, семейства Bifidobacteriaceae, Bacteroidaceae, Erysipelotrichaceae, рода Lachnoclostridium, Roseburia, Prevotella, Coprococcus, Ruminococcus, Faecalibacterium, Bifidobacterium, Bacteroides и вида Bifidobacterium longum, Faecalibacterium prausnitzii, Bacteroides fragilis.

Полученные результаты диссертационной работы пересекаются с научными данными и имеют важное значение в понимании патогенеза атопического дерматита. Повышение бактерии рода Eggerthella, Dialister и Enterobacter могут быть рассмотрены в качестве биомаркера заболевания.

Установленные в данном исследовании корреляционные связи анамнестических, клиничко – лабораторных данных со спектром микробиоты кишечника, а также выявленные различия в спектре микроорганизмов у сравниваемых групп, подтверждают современные представления о роли таксономического состава микробиоты в развитии и течении АД.

Таким образом, данная тема актуальна и требует дальнейшего изучения с целью уточнения биомаркеров атопического дерматита. Это в свою очередь окажет существенную помощь в поиске новых пробиотических штаммов, тем самым повысит эффективность лечения.

ВЫВОДЫ

1. Установлены различия в таксономическом составе микробиоты кишечника детей с атопическим дерматитом возрастной группы 1 года – 5 лет включительно в зависимости от клинического течения у детей. Количественный состав бактерий и альфа - разнообразие снижено у детей в стадии обострения АД. Дети, находящиеся в стадии обострения АД и имеющие признаки вторичного инфицирования имеют снижение относительного количества типа бактерий Actinobacteria, Proteobacteria, класса Actinobacteria, отряда Oscillospirales, Lactobacillales, Bacteroidales, семейства Oscillospiraceae, Erysipelatoclostridiaceae, рода Roseburia, Anaerococcus, Eggerthella и вида Bifidobacterium longum в сравнении с детьми в стадии ремиссии.
2. Микробиота кишечника детей возрастной группы 1 года - 2 лет и 3 - 5 лет включительно имеет существенные различия в общем количестве бактерий ($p < 0,05$). Кроме того, у детей 3 - 5 лет отмечено преобладание класса Gammaproteobacteria за счет семейства Enterobacteriaceae, а у детей 1 года - 2 лет преобладает вид Lactococcus lactis ($p < 0,05$).
3. Анализ микробиоты кишечника детей с АД и условно-здоровых детей, выполненный методом секвенирования 16S рРНК бактериальных генов, позволил установить множество различий на всех таксономических уровнях. В альфа - разнообразии различий у сравниваемых групп не получено. У детей с атопическим дерматитом установлено достоверное повышение относительного количества бактерий типа Proteobacteria, класса Gammaproteobacteria и Bacilli, семейства бактерий Enterococcaceae и Veillonellaceae, рода бактерий Eggerthella, Dialister, Enterobacter. Кроме того, установлено снижение относительного количества бактерий Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Actinobacteria и Bifidobacteria, Lachnoclostridium, Roseburia, Prevotella, Coprococcus, Ruminococcus, Faecalibacterium.

4. Увеличение численности бактерии рода *Eggerthella*, *Dialister* и *Enterobacter* в группе детей с АтД может быть рассмотрено в качестве биомаркера заболевания, так как способны обладать патогенными свойствами.
5. Установлены причинно - следственные связи анамнестических и клинико - лабораторных данных. Возраст появления первых симптомов атопического дерматита имеет ассоциацию с искусственным вскармливанием ($r_s = -0,46$) и оперативными родами ($r_s = -0,36$), а также частотой обострения заболевания ($r_s = -0,37$) и признаками вторичного инфицирования ($r_s = -0,32$). Кроме того, тяжесть заболевания взаимосвязана с количеством обострений ($r_s = 0,78$). Отягощенный аллергологический анамнез, тяжесть АтД ассоциированы со снижением уровня ЭКБ ($r_s = -0,30$ и $r_s = -0,32$). Повышение ЭКБ ассоциировано с повышением общего Ig E в сыворотке крови ($r_s = 0,35$) и специфических IgE к пшенице ($r_s = 0,32$), а также со снижением специфических IgE к телятине ($r_s = -0,27$). Связи между ЭКБ и эозинофилами крови не обнаружено.
6. Выявлено множество достоверных взаимосвязей анамнестических, клинико - лабораторных данных с присутствием отдельных бактерий таксономического состава в микробиоте кишечника, что подтверждает участие микробиоты кишечника в патогенезе атопического дерматита.
7. Принимая во внимание выявленные изменения микробиоты кишечника у детей с атопическим дерматитом, обоснована необходимость создания диагностической модели с применением методов секвенирования нового поколения с целью разработки стратегий контроля развития АтД путем диетической или пробиотической коррекции микробного пейзажа кишечника.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Изменение таксономического состава микробиоты кишечника является значимым фактором в развитии и течении атопического дерматита. Пациентам с тяжелым течением данного заболевания может быть рекомендовано применение метода секвенирования бактериальных генов 16S рРНК с диагностической целью, это позволит произвести дифференцированный подход к коррекции микробного пейзажа.
2. Повышение бактерий рода *Eggerthella*, *Dialister* и *Enterobacter* в микробиоте кишечника детей с атопическим дерматитом, могут быть рассмотрены в качестве биомаркера заболевания.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АтД – атопический дерматит.

БК - болезнь Крона

БКМ - белок коровьего молока

ВЗК - воспалительные заболевания кишечника

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Рецептор GPR- рецептор, связанный с белком G адгезии

рРНК - рибосомная рибонуклеиновая кислота

РФ - Российская Федерация

СД- сахарный диабет

ЦНС – центральная нервная система

ЭКБ - эозинофильный катионный белок

ЯК - язвенный колит

GALT - gut-associated lymphoid tissue (лимфоидная ткань кишечника)

Ig A - иммуноглобулин А

IGA – Investigator Global Assessment (общая оценка тяжести атопического дерматита исследователем)

IgE - иммуноглобулин Е

NF-κB - универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла

SCFA- короткоцепочечные жирные кислоты

SCORAD - Scoring Atopic Dermatitis (шкала балльной оценки атопического дерматита)

T reg-клетки- Т регуляторные клетки

Th – Т-хелпер

TNF – фактор некроза опухоли

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаева Г. Д., Аминова А. И., Продеус А. П., Кильдиярова Р. Р., Корсунский А. А., Юдина Ю. В., Гумбатова З. Ф., Ерюшова Т. Ю. О роли микробиоты кишечника в развитии пищевой аллергии с позиций современной интестинальной микробиологии. Вопросы детской диетологии. 2019; 17(5): 62–69.
2. Абдуллаева Г. Д., Аминова А. И., Юдина Ю. В., Продеус А. П., Ерюшова Т.Ю., Гумбатова З. Ф. Эозинофильный катионный белок – спорные вопросы диагностической ценности при аллергических заболеваниях. Вопросы практической педиатрии. 2019; 14(5): 71–77.
3. Бондаренко В. М., Мацулевич Т. В. Дисбактериоз кишечника как клинико – лабораторный синдром: современное состояние проблемы. Москва: ГЭОТАР-Медиа 2007; 300. [Bondarenko V.M., Maculevich T.V. Dysbacteriosis of the intestine as a clinical and laboratory syndrome: the current state of the problem. Moscow: GEOTAR-Media 2007; 300. (in Russ)]
4. Зольникова О. Ю. Микробиота кишечника и дыхательных путей как патогенетическое звено бронхиальной астмы. М., 2020, с. 209.
5. Кафарская Л. И., Ефимов Б. А., Шкопоров А. Н., Голубцова Ю. М., Шуникова М. Л. Пробиотики в педиатрической практике. Эффективная фармакотерапия 2011;5: 44–48. [Kafarskaja L. I., Efimov B. A., Shkoporov A. N., Golubcova Yu. M., Shunikova M. L. Probiotics in pediatric practice. Jeffektivna jafarmakoterapija 2011;5: 44–48. (in Russ)]
6. Мазанкова Л. Н., Захарова И. Н., Дмитриева Ю. А. Концептуальный подход к назначению пробиотиков-синбиотиков у детей. Детские инфекции 2010; 1: 27–32. [Mazankova L.N., Zaharova I.N., Dmitrieva Ju.A. A conceptual approach to prescribing probiotics-synbiotics in children. Detskie infekcii 2010; 1: 27–32. (in Russ)]
7. Максимова О. В., Гервазиева В. Б., Зверев В. В.. Микробиота кишечника и аллергические заболевания. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014;3:49-60. [Maximova S, Gervazieva WB, Zverev VV. Gut

microbiota and allergic disease. *Journal of Microbiology, epidemiology and Immunobiology*. 2014;3:49-60. (inRussian)].

8. Моисеева Е. В., Устюгова Е. А., Семушина С. Г., Аронов Д. А., Стоянова Л. Г. Влияние культуры *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 194-k на проявление симптомов спонтанного хронического дерматоза // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 6 - 2. – с. 333 - 337

9. Николаева И. В., Царегородцев А. Д., Шайхиева Г. С. Формирование кишечной микробиоты ребенка и факторы, влияющие на этот процесс. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2018;63(3):13-8. [Nikolaev And in, Tsaregorodtsev A.D., Shaikhieva G. S. Formation of intestinal microbiota of the child and the factors influencing this process. *Russian journal of Perinatology and Pediatrics*. 2018; 63 (3) : 13 - 8. (inRussian)].

10. Рёкен М., Греверс Г., Бургдорф В. *Наглядная аллергология*. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. — 238 с

11. Ситкин С. И., Вахитов Т. Я., Ткаченко Е. И., Орешко Л. С., Жигалова Т. Н., Радченко В. Г., Селиверстов П. В., Авалуева Е. Б., Суворова М. А., Утсаль В. А. Дисбиоз кишечника при язвенном колите и целиакии и его терапевтическая коррекция с помощью масляной кислоты в комбинации с инулином. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2017;(6):77-98.

12. Ситкин С. И., Ткаченко Е. И., Вахитов Т. Я. Филометаболическое ядро микробиоты кишечника. *Альманах клинической медицины*. 2015;40: 12–34

13. Смирнова Г. И., Манкуте Г. Р.. Микробиота кишечника и атопический дерматит у детей. *Российский педиатрический журнал*. 2015;18(6):46-53.

14. Смирнова Г. И. Управление течением болезни: атопический дерматит у детей. *Российский педиатрический журнал*. 2014;17(6):45-53.

15. Стома И. О. *Микробном человека* / И. О. Стома, И. А. Карпов; Белорусский государственный медицинский университет, Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии. - Минск: Доктор Дизайн, 2018. - 122 с.: ил. - ISBN 978-985-6913-91-7.

16. Украинцев С. Е., Захарова И. Н., Заплатников А. Л., Белоусова Т. В., Белоцерковцева Л. Д., Овсянников Д. Ю., Горев В. В., Рожко Ю. В. Ребенок,

рожденный путем операции кесарева сечения: риски для здоровья и возможности их минимизации // Неонатология: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 8, № 2. С. 28–38.

17. Урсова Н. И. Значение грудного вскармливания для роста и развития младенца. Альманах клинической медицины 2015; 42: 23–37. [Ursova N.I. The significance of breastfeeding for the infant growth and development. Al'manah klinicheskoy mediciny 2015; 42: 23–37(in Russ)]

18. Шендеров Б. А. Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома. М.: ДеЛиПринт, 2008. 319 с.

19. Юдина Ю. В., Корсунский А.А., Аминова А. И., Абдуллаева Г. Д., Продеус А. П. Микробиота кишечника как отдельная система организма. Доказательная гастроэнтерология. 2019;8(4):36-43.

20. Юдина Ю. В., Аминова А. И., Продеус А. П., Абдуллаева Г. Д., Авдеенко Н. В., Лазарев В. В., Смирнова Г. И., Корсунский А. А., Осовецкая Ю. Л., Гумбатова З. Ф. Особенности микробиоты кишечника у детей в возрасте 1–5 лет с атопическим дерматитом. Вопросы детской диетологии. 2021; 19(2): 5–13.

21. Юдина Ю.В., Аминова А.И., Продеус А.П., Абдуллаева Г.Д., Смирнова Г.И., Корсунский А.А., Осовецкая Ю.Л., Гумбатова З.Ф., Иванова Ю.В. Микробиота кишечника и «аллергологический портрет» ребенка. Вопросы практической педиатрии. 2021; 16(2): 35–43.

22. Юдина Ю. В., Аминова А. И., Продеус А. П., Корсунский А. А. Изменение композиции кишечной микробиоты у детей с атопическим дерматитом 1–5 лет: одномоментное исследование. Педиатрическая фармакология. 2021; 18 (5): 377–384.

23. Юдина Ю. В., Корсунский А. А., Аминова А. И., Еремеева А. В., Колотилина А. И., Абдуллаева Г. Д., Продеус А. П. Современные представления о нарушениях микробиоты кишечника как факторах развития атопического дерматита у детей. Вопросы практической педиатрии. 2019; 14(4): 44–50.

24. Aagaard K., Ma J., Antony K. M., Ganu R., Petrosino J., Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. Sci Transl Med. 2014 May 21; 6 (237):237 ra65.

25. Akay H. K., Bahar Tokman H., Hatipoglu N., Hatipoglu H., Siraneci R., Demirci M., Borsa B. A., Yuksel P., Karakullukcu A., Kangaba A. A., et al: The relationship

- between bifidobacteria and allergic asthma and/or allergic dermatitis: A prospective study of 0–3 years-old children in Turkey. *Anaerobe*. 2014; 28:98–103.
26. Alderberth I., Lindberg E., Aberg N., Hesselmar B., Saalman R., Strannegard I. L., et al. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? *Pediatr Res*. 2006 Jan;59(1):96-101.
27. Allaire J., Crowley Sh., Law H., Chang S-Y., Ko H., Vallance B. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. // *Trends in Immunology*. - 2018.
28. Andoh A. [The gut microbiota is a new organ in our body]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 2015 Nov;112(11):1939-46. Japanese.
29. Ang Z., Ding J. L. GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation – Protective or Causative? *Front Immunol*. 2016;7:28.
30. Ardisson A. N., de la Cruz D. M., Davis-Richardson A.G., Rechcigl K.T., Li N., Drew J. C., Murgas-Torrazza R., Sharma R., Hudak M. L., Triplett E. W., Neu J. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One*. 2014 Mar 10;9(3):e90784.
31. Asja Stipić Marković, Irena Ivković Jureković, Slavica Dodig , Irena Batišta, Renata Zrinski Topić, Monika Barberić, Iva Topalušić, Željka Bukovec Megla, I Vesna. Croatian guidelines for in vitro diagnosis of ige mediated hypersensitivity. *Acta Med Croatica*. 2015;69(2):75-96.
32. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Whitman W.B.) ISBN: 9781118960608, September 2015
33. Bernasconi E., Pattaroni C., Koutsokera A. Airway microbiota determines innate cell inflammatory or tissue remodeling profiles in lung transplantation. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. – 2016. - Vol. 194. – P. 1252 – 1263.
34. Berni Canani R., De Filippis F., Nocerino R., Paparo L. , Di Scala C. , Cosenza L. , Della Gatta G., Calignano A., De Caro C., Laiola M., Gilbert J., Ercolini D. Gut microbiota composition and butyrate production in children affected by non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Sci Rep*. 2018;8(1):12500.

35. Bezirtzoglou E., Tsiotsias A., Welling G.W. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe* 2011; 17 (6): 478–482.
36. Binda C., Lopetuso L. R., Rizzatti G., Gibiino G., Cennamo V., Gasbarrini A. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Dig Liver Dis.* 2018 May;50(5):421-428.
37. Bindels L. B., Dewulf E. M., Delzenne N. M. GPR43/FFA2: physiopathological relevance and therapeutic prospects. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(4):226-232.
38. Björkander S., Carvalho-Queiroz C., Hallberg J., Persson J. O., Johansson M. A., Nussbaum B., Jenmalm M. C., Nilsson C., Sverremark-Ekström E. Childhood allergy is preceded by an absence of gut lactobacilli species and higher levels of atopy-related plasma chemokines. *Clin Exp Immunol.* 2020 Dec;202(3):288-299.
39. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 2019, 37, 852–857.
40. Cabrera-Rubio R., Collado M. C., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E., Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr.* 2012 Sep;96(3):544-51.
41. Canani R., Nocerino R., Leone L., Di Costanzo M., Terrin G., Passariello A., Cosenza L., Troncone R. Tolerance to a new free amino acid-based formula in children with IgE or non-IgE-mediated cow's milk allergy: a randomized controlled clinical trial. *BMC Pediatr.* 2013 Feb 18;13:24.
42. Canani R. B., Sangwan N., Stefka A. T., Nocerino R., Paparo L., Aitoro R., Calignano A., Khan A. A., Gilbert J. A., Nagler C. R. *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J.* 2016;10(3):742-750.
43. Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., Fierer N., Peña A. G., Goodrich J. K., Gordon J. I., Huttley G. A., Kelley S. T., Knights D., Koenig J. E., Ley R. E., Lozupone C. A., McDonald D., Muegge B. D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J. R., Turnbaugh P. J., Walters W. A.,

- Widmann J., Yatsunenکو T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010 May;7(5):335-6.
44. Chen C. C., Chen K. J., Kong M. S., Chang H. J., Huang J. L. Alterations in the gut microbiotas of children with food sensitization in early life. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27(3):254-262.
45. Chen T., Long W., Zhang C., Liu S., Zhao L., Hamaker B. R. Fiber-utilizing capacity varies in *Prevotella*- versus *Bacteroides*-dominated gut microbiota. *Sci Rep*. 2017;7(1):2594.
46. Chen T., Yu W. H., Izard J., Baranova O. V., Lakshmanan A., Dewhirst F. E. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Data base*. 2010; 2010(0).
47. Chichlowski M, Lartigue GD, German JB, Raybould HE, Mills DA. Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012 Sep; 55(3):321-7.
48. Chichlowski M., Shah N., Wampler J. L., Wu S. S., Vanderhoof J. A. *Bifidobacterium longum* Subspecies *infantis* (*B. infantis*) in Pediatric Nutrition: Current State of Knowledge. *Nutrients*. 2020 May 28;12(6):1581.
49. Chung L., Thiele Orberg E., Geis A. L., Chan J. L., Fu K., DeStefano Shields C. E., Dejea C. M., Fathi P., Chen J., Finard B. B., Tam A. J., McAllister F., Fan H., Wu X., Ganguly S., Lebid A., Metz P., Van Meerbeke S. W., Huso D. L., Wick E. C., Pardoll D. M., Wan F., Wu S., Sears C. L., Housseau F. *Bacteroides fragilis* Toxin Coordinates a Pro-carcinogenic Inflammatory Cascade via Targeting of Colonic Epithelial Cells. *Cell Host Microbe*. 2018 Feb 14;23(2):203-214.e5.
50. Clausen Maja-Lisa, Agner Tove, Lilje Berit, Edslev Sofie M., Johannesen Thor Bech, Andersen Paal Skytt. Association of Disease Severity With Skin Microbiome and Filaggrin Gene Mutations in Adult Atopic Dermatitis. *JAMA Dermatol* 2018 Jan *JAMA Dermatol* 2018 Mar 1;154(3):293-300
51. Cohen L. J., Han S., Huang Y. H., Brady S. F. Identification of the Colicin V Bacteriocin Gene Cluster by Functional Screening of a Human Microbiome Metagenomic Library. *ACS Infect Dis*. 2018;4(1):27-32.

52. Cole J. R., Wang Q., Fish J. A., et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42 (Database issue): D 633-42.
53. Consensus report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. Severity of scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. *Dermatology.* 1993; 186: 25 - 51.
54. Costalonga M., Herzberg M. C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett.* 2014;162(2):22-38.
55. Dai Z. L., Wu G., Zhu W. Y. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. *Front Biosci (Landmark Ed.)* 2011;16:1768-1786.
56. Davila A. M., Blachier F., Gotteland M., Andriamihaja M., Benetti P. H., Sanz Y., Tomé D. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacol Res.* 2013;68(1):95-107.
57. De Aguiar Vallim T. Q., Tarling E. J., Edwards P. A. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* 2013;17(5):657-669.
58. Derrien M., Collado M. C., Ben-Amor K., Salminen S., de Vos W. M. The Mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(5):1646-1648.
59. Di Pilato V., Freschi G., Ringressi M. N., Pallecchi L., Rossolini G. M., Bechi P. The esophageal microbiota in health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1381(1):21-33.
60. Dinan T. G., Cryan J. F. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2017;46(1):77-89.
61. Dogra S., Sakwinska O., Soh S. E., Ngom-Bru C., Brück W. M., Berger B., Brüssow H., Lee Y. S., Yap F., Chong Y. S., Godfrey K. M., Holbrook J. D. Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *MBio.* 2015 Feb 3;6(1).
62. Dong P., Feng J. J., Yan D. Y., Lyu Y. J., Xu X. Early-life gut microbiome and cow's milk allergy- a prospective case - control 6-month follow-up study. *Saudi J Biol Sci.* 2018;25(5):875-880.
63. Du Z., Gao X., Yin J. Gut microbiome alterations in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Int Immunopharmacol.* 2020 Jul; 84:106557.

64. Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308 (5728):1635–1638.
65. Edgar R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010;26(19):2460-2461.
66. Ellwood P., Asher M. I., Beasley R., Clayton T. O., Stewart A. W. ISAAC Steering Committee. The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): phase three rationale and methods. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005 Jan;9(1):10-6.
67. Falony G., Joossens M., Vieira-Silva S., Wang J., Darzi Y., Faust K., Kurilshikov A., Bonder M. J., Valles-Colomer M., Vandeputte D., Tito R. Y., Chaffron S., Rymenans L., Verspecht C., De Sutter L., Lima-Mendez G., D'hoel K., Jonckheere K., Homola D., Garcia R., Tigchelaar E. F., Eeckhaut L., Fu J., Henckaerts L., Zhernakova A., Wijmenga C., Raes J. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* (80-). 2016; 352 (6285) : 560-564.
68. Fernando M. R., Saxena A., Reyes J. L., McKay D. M. Butyrate enhances antibacterial effects while suppressing other features of alternative activation in IL-4-induced macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016; 310(10):G822-31.
69. Ferreira-Halder C. V., Faria A. V. S., Andrade S. S. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017 Dec; 31(6):643-648.
70. Fieten K. B., Totté J. E. E., Levin E., Reyman M., Meijer Y., Knulst A., Schuren F., Pasmans S. G. M. A. Fecal Microbiome and Food Allergy in Pediatric Atopic Dermatitis: A Cross-Sectional Pilot Study. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 2018;175:77–84.
71. Fischbach M. A., Segre J. A. Signaling in Host-Associated Microbial Communities. *Cell*. 2016;164(6):1288-1300.
72. Fölster-Holst R., Papakonstantinou E., Rüdrieh U., Buchner M., Pite H., Gehring M., et al. Childhood atopic dermatitis–Brain-derived neurotrophic factor correlates with serum eosinophil cationic protein and disease severity. *Allergy*. 2016 Jul;71(7):1062-5.

73. Fouhy F., Guinane C. M., Hussey S., Wall R., Ryan C. A., Dempsey E. M., et al. Highthroughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Nov;56(11):5811-20.
74. Fournier P. E., Raoult D., Drancourt M., « New species announcement », a new format to prompt the description of new human microbial species, *New Microbes and New Infections* (2016).
75. Furrie E., Macfarlane S., Cummings J. H., Macfarlane G. T. 2004. Systemic antibodies towards mucosal bacteria in ulcerative colitis and Crohn's disease differentially activate the innate immune response. *Gut* 53:91-8.
76. Galazzo G., Van Best N., Bervoets L., Dapaah I. O., Savelkoul P. H., Hornef M. W., Lau S., Hamelmann E., Penders J. Development of the Microbiota and Associations With Birth Mode, Diet, and Atopic Disorders in a Longitudinal Analysis of Stool Samples, Collected From Infancy Through Early Childhood. *Gastroenterology.* 2020 May;158(6):1584-1596.
77. Garrido D., Ruiz-Moyano S., Mills D. A. Release and utilization of N-acetyl-D-glucosamine from human milk oligosaccharides by *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis Anaerobe* 2012; 18 (4): 430–435.
78. Giloteaux L., Goodrich J. K., Walters W. A., Levine S. M., Ley R. E., Hanson M.R. Reduced diversity and altered composition of the gut microbiome in individuals with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome // *Microbiome.* 2016; 4 (1): 1.
79. Gosalbes M. J., Llop S., Vallès Y., Moya A., Ballester F., Francino M.P. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy* 2013; 43 (2): 198–211.
80. Hamer H., Jonkers D., Venema K., Vanhoutvin S., Troost F., Brummer R. J. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;27(2):104-119.

81. Hansen R., Scott K. P., Khan S., Martin J. C., Berry S. H., Stevenson M. et al. First-Pass Meconium Samples from Healthy Term Vaginally-Delivered Neonates: An Analysis of the Microbiota. *PLoS ONE* 2015; 10 (7).
82. Hanson L. A., Korotkova M., Telemo E. Breast-feeding, infant formulas, and the immune system. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003 Jun;90(6 Suppl 3):59-63.
83. Heratizadeh A., Werfel T. Anti-inflammatory therapies in atopic dermatitis. *Allergy.* 2016 Dec;71(12):1666-1675.
84. Hesla H. M., Stenius F., Jäderlund L., Nelson R., Engstrand L., Alm J. et al. Impact of lifestyle on the gut microbiota of healthy infants and their mothers—the ALADDIN birth cohort. *Microbiol Ecol* 2014; 90 (3):791–801.
85. Hildebrand F., Moitinho-Silva L., Blasche S., et al. Antibiotics-induced monodominance of a novel gut bacterial order. *Gut* 2019 ; 68 : 1781–90
86. Ho T. T. B., Groer M. W., Kane B., Yee A. L., Torres B. A., Gilbert J. A., Maheshwari A. Dichotomous development of the gut microbiome in preterm infants. *Microbiome.* 2018 Sep 12;6(1):157.
87. Holzer P., Farzi A. Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis. *Adv Exp Med Biol.* 2014;817:195-219.
88. Hooper L. V., Wong M. H., Thelin A., Hansson L., Falk P. G., Gordon J. I. Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science* 2001;291(5505):881-884.
89. Hu C., van Meel E. R., Medina-Gomez C., Kraaij R., Barroso M., Jong J. K., Radjabzadeh D., Pasmans SGMA, De Jong N. W., De Jongste J. C., Moll H. A., Nijsten T., Rivadeneira F., Pardo L. M., Duijts L. A population-based study on associations of stool microbiota with atopic diseases in school-age children. *J Allergy Clin Immunol.* 2021 Apr 13:S0091-6749(21)00563-7.
90. Hu J., Nomura Y., Bashir A., Fernandez-Hernandez H., Itzkowitz S., Pei Z., Stone J., Loudon H., Peter I. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PLoS One.* 2013 Nov 6;8(11):e78257.
91. Hugerth L. W., Andersson A. F. Analysing Microbial Community Composition through Amplicon Sequencing: From Sampling to Hypothesis Testing. *Front Microbiol.* 2017;8:1561.

92. Human Microbiome Project . The NIH Common Fund. Retrieved 8 March 2012
93. Ianiro G., Molina-Infante J., Gasbarrini A. Gastric Microbiota. *Helicobacter*. 2015;20:68-71.
94. Indiani C. M. D. S. P, Rizzardi K. F., Castelo P. M., Ferraz L. F. C., Darrieux M., Parisotto T. M. Childhood Obesity and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut Microbiota: A Systematic Review. *Child Obes*. 2018 Nov/Dec;14(8):501-509.
95. Ismail I. H., Boyle R. J., Licciardi P. V., et al. Early gut colonization by *Bifidobacterium breve* and *B. catenulatum* differentially modulates eczema risk in children at high risk of developing allergic disease. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27(8):838-846.
96. Iyengar S. R., Walker W. A. Immune factors in breast milk and the development of atopic disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012 Dec;55(6):641-7.
97. Jakobsson H. E., Abrahamsson T. R., Jenmalm M. C., Harris K., Quince C., Jernberg C., et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed bacteroidetes colonisation and reduced th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*. 2014 Apr; 63(4):559-66.
98. Johnson E. L., Heaver S. L., Walters W. A., Ley R. E. Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *J Mol Med (Berl)*. 2017 Jan;95(1):1-8.
99. Jost T., Lacroix C., Braegger C., Chassard C. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br J Nutr*. 2013 Oct;110(7):1253-62.
100. Jung T. H., Park J. H., Jeon W. M., Han K. S. Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway. *Nutr Res Pract*. 2015;9(4):343-349.
101. Kåhrström C.T., Pariente N., Weiss U. Intestinal microbiota in health and disease. // *Nature*. – 2016. – Vol. 535 (7610). - P. 47.
102. Kang M. J., Lee S. Y., Park Y. M., Kim B. S., Lee M. J., Kim J. H., Jeong S., Lee S. H., Park M. J., Rhee E. S., Jung S., Yoon J., Cho H. J., Lee E., Yang S. I., Suh D. I., Kim K. W., Sheen Y. H., Ahn K., Hong S. J. Interactions Between IL-17 Variants and

Streptococcus in the Gut Contribute to the Development of Atopic Dermatitis in Infancy. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2021 May;13(3):404-419.

103. Kazemi R., Taheri-Kafrani A., Motahari A., Kordesedehi R. Allergenicity reduction of bovine milk β -lactoglobulin by proteolytic activity of *Lactococcus lactis* BMC12C and BMC19H isolated from Iranian dairy products. *Int J Biol Macromol.* 2018 Jun;112:876-881.

104. Kim B. E., Leung D. Y. Epidermal barrier in atopic dermatitis // *Allergy Asthma Immunol. Res.* - 2012. - Vol. 4, № 1. - P. 12-16.

105. Kim H. K., Rutten N. B., Besseling-van der Vaart I., Niers L. E., Choi Y. H., Rijkers G. T., van Hemert S. Probiotic supplementation influences faecal short chain fatty acids in infants at high risk for eczema. *Benef Microbes.* 2015;6(6):783-90.

106. Kim Stewart. Breastfeeding & Intestinal Microbiota in Infants. *Today's Practitioner.* August 14, 2014.

107. Kozich J. J., Westcott S. L., Baxter N. T., Highlander S. K., Schloss P. D. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(17):5112-5120.

108. Kramer P., Bressan P. Humans as Superorganisms: How Microbes, Viruses, Imprinted Genes, and Other Selfish Entities Shape Our Behavior. *Perspect Psychol Sci.* 2015;10(4):464-481.

109. Kronman M. P., Zaoutis T. E., Haynes K., Feng R., Coffin S. E. Antibiotic exposure and iBD development among children: A population-based cohort study. *Pediatrics* 2012;130: e794–e803.

110. Kumar M., Babaei P., Ji B., Nielsen J. Human gut microbiota and healthy aging: recent developments and future prospective. // *Nutr. Healthy Aging.* -2018. - N. 4. – P. 3 – 16.

111. Laigaard A., Krych L., Zachariassen L. F., Ellegaard-Jensen L., Nielsen D. S., Hansen A. K., Hansen C. H. F. Dietary prebiotics promote intestinal *Prevotella* in association with a low-responding phenotype in a murine oxazolone-induced model of atopic dermatitis. *Sci Rep.* 2020 Dec 3;10(1):21204.

112. Laiho K., Lampi A. M., Hamalainen M., Moilanen E., Piironen V., Arvola T., et al. Breast milk fatty acids, eicosanoids, and cytokines in mothers with and without allergic disease. *Pediatr Res.* 2003 Apr;53(4):642-7.
113. Landman C., Quévrain E. Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications *Rev Med Interne* 2016; 37 (6): 418–423.
114. Langdon A., Crook N., Dantas G. The effects of antibiotics on the microbiome through out development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med.* 2016 Apr 13;8(1):39.
115. Langille M. G. I., Zaneveld J., Caporaso J. G., et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol.* 2013;31(9):814-821.
116. Legatzki A., Rösler B., von Mutius E. Microbiome diversity and asthma and allergy risk. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014 Oct;14(10):466.
117. Li J., Jia H., Cai X., Zhong H., Feng Q., Sunagawa S., Arumugam M., Kultima J. R., Prifti E., Nielsen T., Juncker A. S., Manichanh C., Chen B., Zhang W., Levenez F., Wang J., Xu X., Xiao L., Liang S., Zhang D., Zhang Z., Chen W., Zhao H., Al-Aama J. Y., Edris S., Yang H., Wang J., Hansen T., Nielsen H. B., Brunak S., Kristiansen K., Guarner F., Pedersen O., Doré J., Ehrlich S. D. Meta HIT Consortium, Bork P, Wang J; MetaHIT Consortium. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):834-841.
118. Li X., Liu L., Cao Z., Li W., Li H., Lu C., Yang X., Liu Y. Gut microbiota as an "invisible organ" that modulates the function of drugs. *Biomed Pharmacother.* 2020 Jan;121:109653.
119. Lodin K., Lekander M., Syk J., Alving K., Andreasson A. Associations between self-rated health, sickness behaviour and inflammatory markers in primary care patients with allergic asthma: a longitudinal study. *NPJ Prim Care Respir Med.* 2017 Dec 18;27(1):67.
120. Łoś-Rycharska E., Gołębiowski M., Sikora M., Grzybowski T., Gorzkiewicz M., Popielarz M., Gawryjolek J., Krogulska A. A Combined Analysis of Gut and Skin Microbiota in Infants with Food Allergy and Atopic Dermatitis: A Pilot Study. *Nutrients.* 2021 May 15;13(5):1682.

121. Louis S., Tappu R. M., Damms-Machado A., Huson D. H., Bischoff S. C. Characterization of the gut microbial community of obese patients following a weight-loss intervention using whole metagenome shotgun sequencing. *PLoS One* 2016; 11(2): e0149564.
122. Lozupone C., Knight R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(12):8228-8235.
123. Lozupone C. A., Stombaugh J. I., Gordon J. I., Jansson J. K., Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.* 2012; Sep., 13, 489(7415):220-230.
124. Luisa W. Hugerth, Hugo A. Wefer, Sverker Lundin, Hedvig E. Jakobsson, Mathilda Lindberg, Sandra Rodin, Lars Engstrand, F. Anders, Andersson DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies *Appl. Environ. Microbiol.*, 80 (16) (2014), pp. 5116-5123
125. Macchione I. G., Lopetuso L. R., Ianiro G., Napoli M., Gibiino G., Rizzatti G., Petito V., Gasbarrini A., Scaldaferri F. *Akkermansia muciniphila*: key player in metabolic and gastrointestinal disorders. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019 Sep;23(18):8075-8083.
126. Macfarlane G. T., Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J AOAC Int.* 2012;95(1):50-60.
127. MacIntyre D. A., Chandiramani M., Lee Y. S., Kindinger L., Smith A., Angelopoulos N, et al. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Sci Rep.* 2015 Mar 11;5:8988.
128. Mackie R. I., Sghir A., Gaskins H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *In American Journal of Clinical Nutrition* 69(5):1035S-1045S · June 1999 with 629 Reads;
129. Marchesi J. R., Adams D. H., Fava F., Hermes G. D., Hirschfield G. M., Hold G. et al. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier *Gut* 2016; 65: 330–339.
130. Marcobal A., Barboza M., Sonnenburg E. D., Pudlo N., Martens E. C., Desai P., et al. *Bacteroides* in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host Microbe.* 2011 Nov 17;10(5):507-14.

131. Marković A. S., Ivković-Jureković I., Dodig S., Batišta I., Zrinski-Topić R., Barberić M., et al. Croatian guidelines for in vitro diagnosis of ige mediated hypersensitivity. *Acta Med Croatica*. 2015;69(2):75-96.
132. Marrs T., Jo J. H., Perkin M. R., Rivett D. W., Witney A. A., Bruce K. D., Logan K., Craven J., Radulovic S, Versteeg S. A., van Ree R., McLean W. H. I., Strachan D. P., Lack G., Kong H. H., Flohr C. Gut microbiota development during infancy: Impact of introducing allergenic foods. *J Allergy Clin Immunol*. 2021 Feb;147(2):613-621.e9.
133. Merkel A. Yu., Tarnovetskii I. Yu., Podosokorskaya O. A., Toshchakov S. V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities *Microbiology*, 88 (6) (2019), pp. 671-680
134. Moles L., Gómez M., Heilig H., Bustos G., Fuentes S., de Vos W., Fernández L., Rodríguez J. M., Jiménez E. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*. 2013 Jun 28;8(6):e66986.
135. Mondot S., Kang S., Furet J. P., Aguirre de Carcer D., McSweeney C., Morrison M., Marteau P., Doré J., Leclerc M. Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Jan;17(1):185-92. doi: 10.1002/ibd.21436. Epub 2010 Aug 18. PMID: 20722058.
136. Morgan X. C., Tickle T. L., Sokol H., et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. 2012;13(9):R79.
137. Moya A., Ferrer M. Functional Redundancy-Induced Stability of Gut Microbiota Subjected to Disturbance. *Trends Microbiol*. 2016;24(5):402-413.
138. Munyaka P. M., Khafipour E., Ghia J. External Influence of Early Childhood Establishment of Gut Microbiota and Subsequent Health Implications. *Front Pediatr* 2014; 2: 109–117.
139. Myer P. R., Kim M., Freetly H. C., Smith T. P. L. Evaluation of 16S rRNA amplicon sequencing using two next-generation sequencing technologies for phylogenetic analysis of the rumen bacterial community in steers. *J Microbiol Methods*. 2016;127:132-140.

140. Ng Y. T., Chew F. T. A systematic review and meta-analysis of risk factors associated with atopic dermatitis in Asia. *World Allergy Organ J.* 2020 Nov 2;13(11):100477.
141. Novak N., Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases // *Allergy Clin. Immunol.* - 2003;112:252-62
142. Ocvirk S., Sava I. G., Lengfelder I., Lagkouvardos I., Steck N., Roh J. H., Tchaptchet S., Bao Y., Hansen J. J., Huebner J., Carroll I. M., Murray B. E., Sartor R. B., Haller D. Surface-Associated Lipoproteins Link *Enterococcus faecalis* Virulence to Colitogenic Activity in IL-10-Deficient Mice Independent of Their Expression Levels. *PLoS Pathog.* 2015 Jun 12;11(6):e1004911.
143. Oranje A. P., Glazenburg E. J., Wolkerstorfer A., de Waard-van der Spek F. B. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. *Br J Dermatol.* 2007 Oct;157(4):645-8.
144. Panda S., El khader I., Casellas F., López Vivancos J., García Cors M., Santiago A., Cuenca S., Guarner F., Manichanh C. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS One.* 2014 Apr 18;9(4):e95476.
145. Patrascu O., Béguet-Crespel F., Marinelli L., et al. A fibrolytic potential in the human ileum mucosal microbiota revealed by functional metagenomic. *Sci Rep.* 2017;7(1):40248.
146. Paulson J. N., Stine O. C., Bravo H. C., Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat Methods.* 2013;10(12):1200-1202.
147. Penders J., Gerhold K., Stobberingh E. E., Thijs C., Zimmermann K., Lau S., Hamelmann E. Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Sep;132(3):601-607. e8.
148. Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F. F., Snijders B., Kummeling I. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118 (2): 511–521.
149. Pereira P., Aho V., Arola J., Boyd S., Jokelainen K., Paulin L., Auvinen P., Färkkilä M. Bile microbiota in primary sclerosing cholangitis: Impact on disease

- progression and development of biliary dysplasia. Alpini GD, ed. PLoS One. 2017;12(8):e0182924.
150. Perez P. F., Doré J., Leclerc M., Levenez F., Benyacoub J., Serrant P. et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 2007; 119 (3): 724–732.
151. Pussinen P. J., Havulinna A. S., Lehto M., Sundvall J., Salomaa V. Endotoxemia Is Associated With an Increased Risk of Incident Diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34:392-397.
152. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K. S., Manichanh C. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. MetaHIT Consortium. *Nature* 2010; 464 (7285): 59–65.
153. Rajilić-Stojanović M., de Vos W. M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38(5): 996-1047.
154. Rautava S., Kainonen E., Salminen S., Isolauri E. Maternal probiotic supplementation during pregnancy and breast-feeding reduces the risk of eczema in the infant. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130, 1355–1360.
155. Ridlon J. M., Kang D. J., Hylemon P. B., Bajaj J. S. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014;30(3):332-338.
156. Ríos-Covián D., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Gueimonde M., de los Reyes-Gavilán C.G., Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol.* 2016;7:185.
157. Ritari J., Salojärvi J., Lahti L & de Vos WM. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database // *BMC Genomics*. 2015; Dec., 12, 16 (1): 1056.
158. Robles-Alonso V., Guarner F. From basic to applied research: lessons from the human microbiome projects // *J ClinGastroenterol.* 2014 Nov-Dec. Vol. 48. Suppl 1. P. 3–4.
159. Rutayisire E., Huang K., Liu Y., Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterology* 2016; 16: 86.

160. Saltykova I. V., Petrov V. A., Logacheva M. D., Ivanova P. G., Merzlikin N. V., Sazonov A. E., Ogorodova L. M., Brindley P. J. Biliary Microbiota, Gallstone Disease and Infection with *Opisthorchis felinus*. Mitreva M, ed. PLoSNegl Trop Dis. 2016;10(7):e0004809.
161. Savage J. H., Lee-Sarwar K. A., Sordillo J., Bunyavanich S., Zhou Y., O'Connor G., Sandel M., Bacharier L. B., Zeiger R., Sodergren E., et al. A Prospective Microbiome-Wide Association Study of Food Sensitization and Food Allergy in Early Childhood. *Allergy*. 2018;73:145–152.
162. Schiffrin E. J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschlimann J. M., Donnet-Hughes A. Immunomodulation of blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria // *J. Dairy Sci*. 1995. Vol. 78. P. 491–497.
163. Schlaeppi K.; Bulgarelli D. The plant microbiome at work. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2015, 28, 212–217
164. Schnopp C., Mempel M. Atopic dermatitis in children. New aspects. *Hautarzt*. 2015 Apr;66(4):245-51.
165. Sender R., Fuchs S., Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016;14(8):e1002533.
166. Shen X., Wang M., Zhang X., He M., Li M., Cheng G., Wan C., He F. Dynamic construction of gut microbiota may influence allergic diseases of infants in southwest China. *BMC Microbiol*. 2019;19:123.
167. Sindher S. B., Long A., Acharya S., Sampath V., Nadeau K. C. The Use of Biomarkers to Predict Aero-Allergen and Food Immunotherapy Responses. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018 Oct;55(2):190-204.
168. Sivaprakasam S., Bhutia Y. D., Ramachandran S., Ganapathy V. Cell-Surface and Nuclear Receptors in the Colon as Targets for Bacterial Metabolites and Its Relevance to Colon Health. *Nutrients*. 2017;9(8):856.
169. Sjögren Y. M., Jenmalm M. C., Böttcher M. F., Björkstén B, Sverremark-Ekström E. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clin Exp Allergy*. 2009 Apr;39(4):518-26.

170. Song H., Yoo Y., Hwang J., Na Y.C., Kim H. S. Faecali bacterium prausnitzii subspecies – level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Mar;137(3):852-60.
171. Sonnenburg J. L., Sonnenburg E. D. Vulnerability of the industrialized microbiota. *Science* 2019 ; 366 : eaaw9255
172. Soto A., Martín V., Jiménez E., Mader I., Rodríguez J. M., Fernández L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014 Jul;59(1):78-88.
173. Sroka-Oleksiak A., Młodzińska A., Bulanda M., et al. Metagenomic Analysis of Duodenal Microbiota Reveals a Potential Biomarker of Dysbiosis in the Course of Obesity and Type 2 Diabetes: A Pilot Study. *J Clin Med.* 2020;9(2):369.
174. Stark C. M., Susi A., Emerick J., Nylund C. M. Antibiotic and acid-suppression medications during early childhood are associated with obesity. *Gut* 2019 ; 68 : 62–9
175. Stephen-Victor E., Chatila T. A. Regulation of oral immune tolerance by the microbiome in food allergy. *Curr Opin Immunol.* 2019 Oct;60:141-147.
176. Stiemsma L., Reynolds L., Turvey S., Finlay B. The hygiene hypothesis: current perspectives and future therapies. *Immuno Targets Ther.* 2015;4:143.
177. Takami H., Taniguchi T., Moriya Y., Kuwahara T., Kanehisa M., Goto S. Evaluation method for the potential functionome harbored in the genome and metagenome. *BMC Genomics* 2012; 13:699.
178. Tana C., Umesaki Y., Imaoka A. Handa T., Kanazawa M., Fukudo S. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2010;22(5):512-519, e114-5.
179. Tanaka S., Kobayashi T., Songjinda P., Tateyama A., Tsubouchi M., Kiyohara C., et al. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009 Jun;56(1):80-7.
180. Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* 2017;474(11):1823-1836.
181. Tichota D. M., Silva A. C., Sousa Lobo J. M., Amaral M. H. Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to

improve skin hydration // *International Journal of Nanomedicine*. - 2014. – Vol. 11, N. 9. – P. 3855 - 3864.

182. Tiso M., Schechter A. N. Nitrate Reduction to Nitrite, Nitric Oxide and Ammonia by Gut Bacteria under Physiological Conditions. Jourdeuil D, ed. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119712.

183. Tomasova L., Konopelski P., Ufnal M. Gut Bacteria and Hydrogen Sulfide: The New Old Players in Circulatory System Homeostasis. *Molecules*. 2016;21(11):1558.

184. Vaishampayan P. A., Kuehl J. V., Froula J. L., Morgan J. L., Ochman M. H., Francino P. Comparative Metagenomics and Population Dynamics of the Gut Microbiota in Mother and Infant. *Genome Biol. Evol* 2010; 2: 53–66.

185. Velsko I. M, Frantz L.A.F, Herbig A., Larson G., Warinner C. Selection of Appropriate Metagenome Taxonomic Classifiers for Ancient Microbiome Research. Sharpton TJ, ed. *mSystems*. 2018; 3(4).

186. Wang X. Allen T. D., May R. J., Lightfoot S., Houchen C. W., Huycke M. M. 2008. *Enterococcus faecalis* induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect. *Cancer Res* 68:9909-9917.

187. Wang Q., Li F., Liang B., Liang Y., Chen S., Mo X., Ju Y., Zhao H., Jia H., Spector T. D., Xie H., Guo R. A metagenome-wide association study of gut microbiota in asthma in UK adults. *BMC Microbiol*. 2018 Sep 12;18(1):114.

188. Warner B. B, Deych E., Zhou Y., Hall-Moore C., Weinstock G. M, Sodergren E, et al. Gut bacteria dysbiosis and necrotising enterocolitis in very low birthweight infants: A prospective case-control study. *Lancet*. 2016;387:1928-1936.

189. Wopereis H., Sim K., Shaw A., Warner J. O. Knol J., Kroll J. S. Intestinal microbiota in infants at high risk for allergy: Effects of prebiotics and role in eczema development. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(4):1334-1342.e5.

190. World Health Organization. WHO report on surveillance of antibiotic consumption : 2016-2018 early implementation. Geneva; 2018.p.128

191. Wright E. K., Kamm M. A., Teo S. M., Inouye M., Wagner J., Kirkwood C.D. Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: a systematic review // *Inflamm Bowel Dis*. 2015; Jun., 21(6): 1219–1228.

192. Ye S., Yan F., Wang H., Mo X., Liu J., Zhang Y., Li H., Chen D. Diversity analysis of gut microbiota between healthy controls and those with atopic dermatitis in a Chinese population. *J Dermatol.* 2021 Feb;48(2):158-167.
193. Yu L., Deng Y. H., Huang Y. H., Ke H. J., Guo Y., Wu J. L. Comparison of Gut Microbiota Between Infants with Atopic Dermatitis and Healthy Controls in Guangzhou, China. *J Asthma Allergy.* 2021 May 10;14:493-500.
194. Zheng H., Liang H., Wang Y., Miao M., Shi T., Yang F., et al. Altered Gut Microbiota Composition Associated with Eczema in Infants. *PLoS One.* 2016 Nov 3;11(11): e0166026.
195. Zivkovic A. M., German J. B., Lebrilla C. B., Mills D. A. Human milk glycobioime and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108 (1): 4653– 4661.

Приложение А

Шкала оценки тяжести клинических проявлений SCORAD

Таблица А. 1 - Площадь проявлений атопического дерматита на отдельных участках тела

Участки тела	Площадь поражения
Передняя поверхность головы (4,5%)	
Задняя поверхность головы (4,5%)	
Передняя поверхность туловища (18%)	
Задняя поверхность туловища (18%)	
Гениталии (1%)	
Передняя поверхность левой руки (4,5%)	
Задняя поверхность левой руки (4,5%)	
Передняя поверхность правой руки (4,5%)	
Задняя поверхность правой руки (4,5%)	
Передняя поверхность левой ноги (9%)	
Задняя поверхность левой ноги (9%)	
Передняя поверхность правой ноги (9%)	
Задняя поверхность правой ноги (9%)	

Показатель А = _____

Таблица А. 2 - Интенсивность клинических проявлений (оценивается врачом)

Клинические проявления	Оценка в баллах
Эритема	
Отек или папулезность	
Мокнутье/корки	
Расчесы	
Лихенификация	
Сухость	
Итого	

Показатель В = _____

Способ оценки
0= отсутствие проявлений
1=легкие проявления
2=умеренные проявления
3= тяжелые проявления

С. Выраженность субъективных симптомов (оценивается пациентом)

Субъективные симптомы — зуд кожных покровов и нарушение сна — оценивают только у детей старше 7 лет.

У детей до 7 лет для определения интенсивности клинических проявлений может быть использован модифицированный индекс SCORAD — TIS (The Three Item Severity), который определяется по аналогичным SCORAD параметрам А и В и рассчитывается по формуле $A/5 + 7B/2$.

При значении индекса SCORAD до 20 баллов течение АД определяют как легкое, от 20 до 40 баллов как средней тяжести, выше 40 баллов - тяжелое.

Приложение Б

Таксономическая классификация бактерий

Таблица Б.1 - Таксономическая классификация бактерий, выделенных методом секвенирования 16S рРНК бактериальных генов

Тип	Класс	Отряд	Семейство	Род	Вид
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales			
	Gamma proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas spp	
		Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	
				Stenotrophomonas	Stenotrophomonas maltophilia
			Moraxellaceae	Acinetobacter	
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus spp	
		Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus spp	
			Lactobacillaceae	Lactobacillus	
			Streptococcaceae	Streptococcus Lactococcus	Streptococcus salivarius Lactococcus lactis
	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Blautia Eubacterium hallii group Roseburia Anaerostipes Dorea Coprococcus Fusicatenibacter Lachnoclostridium Tyzzerella Sellimonas	[Eubacterium]_hallii

Продолжение Таблицы Б. 1

				Christensenellaceae R-7group	
			Ruminococcaceae	Faecalibacterium	Faecalibacterium prausnitzii
				Ruminococcus	
				Butyricoccus	
		Oscillospirales	<u>Oscillospiraceae</u>	Monoglobus Subdoligranulum Romboutsia	
	<u>Erysipelotrichia</u>	<u>Erysipelotrichales</u>	<u>Erysipelotrichaceae</u>	Dielma Catenibacterium	
		Peptostreptococcales	Peptostreptococcaceae	Romboutsia Peptostreptococcus Peptoniphilus	Clostridioides difficile group
	Negativicutes	Veillonellales	Veillonellaceae	Dialister Veillonella Phascolarctobacterium	
	Tissierellia	Tissierellales		Anaerococcus spp	
Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	Bifidobacterium longum Bifidobacterium bifidum
	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	Eggerthella Collinsella	
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	Bacteroides fragilis
			Prevotellaceae	Prevotella	Prevotella bivia
				Parabacteroides	
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	Akkermansia	
Cyanobacteria					

Приложение В

Общая оценка тяжести атопического дерматита исследователем (IGA)

Таблица В. 1 – Шкала оценки степени тяжести атопического дерматита

Баллы	Категория	Описание
0	Чистая кожа	Проявления атопического дерматита полностью исчезли, за исключением остаточных очагов депигментации (поствоспалительная гиперпигментация и/или гипопигментация).
1	Практически чистая кожа	Проявления атопического дерматита в целом не полностью исчезли, а оставшиеся очаги представляют собой светло-розовые (за исключением поствоспалительной гиперпигментации) и/или едва заметные при пальпации твердые участки утолщения кожи и/или папулы и/или едва заметные при пальпации участки лихенизации, эксфолиации; экссудация/образование струпуев отсутствует.
2	Легкая степень	Проявления атопического дерматита в целом представляют собой очаги светло-красного цвета; с незначительными, но четко выраженными твердыми участками утолщения кожи и/или папулами с незначительными, но четко выраженными линейными или прерывистыми следами расчесывания или проникающего поверхностного поражения; с незначительным, но четко выраженным утолщением кожи, мелкими отметинами на коже и мелкопластинчатым лихеноидным шелушением; экссудация/образование струпуев отсутствует.
3	Средняя степень	Проявления атопического дерматита в целом представляют собой очаги красного цвета; с легко определяемыми при пальпации умеренно выраженными твердыми участками утолщения кожи и/или папулами; с умеренными линейными или прерывистыми следами расчесывания или проникающего поверхностного поражения; с умеренным утолщением кожи, грубыми отметинами на коже и крупнопластинчатым лихеноидным шелушением; с незначительной экссудацией/образованием струпуев.
4	Тяжелая степень	Проявления атопического дерматита в целом представляют собой глубокие очаги темно-красного цвета; с выраженными твердыми участками утолщения кожи и/или папулами; с выраженными линейными или прерывистыми следами расчесывания или проникающего поверхностного поражения; с выраженным утолщением кожи с очень грубыми отметинами на коже и крупнопластинчатым лихеноидным шелушением; с экссудацией/образованием струпуев от средней до тяжелой степени.
<*> Из оценки/подсчета баллов IGA исключаются волосистая часть головы, ладони и подошвы.		