

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
«ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ»  
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

*На правах рукописи*

НОСЫРЕВА КСЕНИЯ КОНСТАНТИНОВНА

**Роль микробного дисбиоза кожи в иммунопатогенезе атопического дерматита**

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук  
Болдырева Маргарита Николаевна

Москва – 2026

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
Актуальность темы исследования .....	5
Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности.....	6
Степень разработанности темы исследования .....	7
Цель исследования .....	8
Задачи исследования .....	8
Научная новизна работы.....	9
Теоретическая значимость работы.....	9
Практическая значимость работы .....	10
Внедрение результатов исследования в практику.....	11
Методология и методы исследования.....	12
Положения, выносимые на защиту .....	13
Степень достоверности результатов .....	13
Апробация результатов.....	14
Личный вклад автора .....	15
Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах .....	15
Объем и структура диссертации.....	15
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	16
1.1. Клинико-эпидемиологическая характеристика АтД .....	16
1.1.1. Эпидемиология заболевания .....	16
1.1.2. Клиническая классификация АтД.....	17
1.2. Современные представления о патогенезе .....	19
1.2.1. Дисфункция эпидермального барьера .....	21
1.2.2. Роль филаггрина .....	22

1.2.3.	Изменения липидного состава рогового слоя .....	23
1.2.4.	Антимикробные пептиды .....	24
1.2.5.	Роль врожденного и адаптивного иммунитета .....	24
1.3.	Роль бактериальной микробиоты и инфекционных осложнений .....	27
1.4.	Грибковые инфекции при АтД.....	30
1.5.	Сложности диагностики грибковой и бактериальной колонизации кожи .	32
1.6.	Современные подходы к терапии АтД .....	34
1.6.1.	Системная терапия неосложненного АтД .....	35
1.6.2.	Терапия АтД, осложненного вторичными инфекциями.....	36
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>		<b>38</b>
2.1.	Формирование клинических групп и забор биологического материала ....	38
2.2.	Забор биоматериала для разных методов .....	40
2.3.	Секвенирование по Сэнгеру .....	41
2.4.	Сравнительный анализ микроорганизмов и статистическая обработка данных .....	42
2.5.	Культуральное микробиологическое исследование .....	43
2.5.1.	Культуральное исследование на бактерии .....	44
2.5.2.	Культуральное исследование на грибы .....	44
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>		<b>46</b>
3.1.	Формирование панели клинически значимых микроорганизмов .....	46
3.2.	Характеристика олигонуклеотидов и плазмидных стандартов.....	47
3.3.	Оптимизация и валидация условий ПЦР в реальном времени.....	50
3.4.	Определение микроорганизмов методом ПЦР .....	59
3.4.1.	Количественный анализ бактериальной колонизации .....	59
3.4.2.	Количественный анализ грибковой колонизации.....	67

<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	82
4.1. Интегративная модель иммунопатогенеза АтД, ассоциированного с микробным дисбиозом.....	82
4.1.1. Специфический характер бактериального дисбиоза .....	82
4.1.2. Специфический характер грибкового дисбиоза.....	85
4.2. Сравнительный анализ методов ПЦР и культурального исследования в диагностике микроорганизмов .....	89
4.3. Значение количественного подхода для объективизации диагностики и тактики ведения пациентов с АтД.....	91
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	95
Итоги .....	95
Рекомендации .....	96
Перспективы дальнейшей разработки темы.....	97
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	98
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	100
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	103
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А. Акт о внедрении результатов НИР</b> .....	127

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Атопический дерматит (АтД) — хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание кожи, ключевыми проявлениями которого служат интенсивный зуд и сухость кожных покровов. Заболевание широко распространено, особенно среди детей. АтД часто осложняется вторичными инфекциями, что определяет его медицинскую и социальную значимость [3, 14, 18].

В основе иммунопатогенеза АтД лежит сложная дисрегуляция врождённого и адаптивного иммунитета. В острой фазе доминирует Th2-иммунный ответ с продукцией цитокинов IL-4, IL-5, IL-13 и IL-31. Под влиянием этих цитокинов происходит переключение синтеза иммуноглобулинов на IgE. Одновременно возрастает число эозинофилов в крови и активируются тучные клетки. IL-4 и IL-13 подавляют синтез структурных белков эпидермиса — филаггрина и лорикрина. Следствием этого становится нарушение формирования натурального увлажняющего фактора. Трансэпидермальная потеря воды увеличивается, что облегчает проникновение аллергенов через кожный барьер [6, 73, 77, 93, 121]. Важную роль патогенезе АтД играет тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP). Он выделяется кератиноцитами при повреждении кожного барьера. TSLP активирует дендритные клетки, поляризуя Т-клетки по Th2-пути. Кроме того, TSLP напрямую связывается с рецепторами на сенсорных нейронах, вызывая зуд. Расчёсывание дополнительно повреждает эпидермис [25, 35, 105]. При хроническом течении к Th2-иммунному ответу присоединяются Th1, Th17 и Th22. Повышенная экспрессия IL-17 и IL-22 поддерживает хроническое воспаление [20, 43, 68, 71, 87, 114].

Особую роль в иммунопатогенезе АД играет микробный дисбиоз. Он не просто следствие нарушенного барьера, а активный участник патогенеза. До 90% пациентов имеют колонизацию кожи *Staphylococcus aureus* [30, 31, 97]. Бактерия продуцирует суперантигены (SEA, SEB, TSST-1). Они связываются с V $\beta$ -цепью Т-клеточного рецептора и МНС II вне антиген-связывающей щели. Это вызывает поликлональную активацию Т-клеток и массивный выброс IL-4, IL-5, IL-13 [30, 103]. Токсин  $\delta$ -гемолизин индуцирует дегрануляцию тучных клеток через MRGPRX2, усиливая зуд, отёк и воспаление [106].

Существенный вклад вносят липофильные дрожжи рода *Malassezia*. Их антигены активируют инфламмасому NLRP3 в кератиноцитах [59, 123, 135]. Это приводит к секреции IL-1 $\beta$ , а также индукции IL-8, IL-22, CCL17 и CCL22 [27, 81, 127]. Таким образом, грибковый дисбиоз поддерживает хроническое воспаление через механизмы врождённого и адаптивного иммунитета [70, 144].

Однако изучение микробного фактора сдерживается ограничениями культуральных методов [15, 83, 112, 138]. Они обладают низкой чувствительностью, особенно к труднокультивируемым таксонам, и дают лишь качественную оценку.

Следовательно, для количественной характеристики связи микробного дисбиоза с иммунопатогенезом и хроническим воспалением при АД актуальна разработка высокочувствительных количественных методов диагностики микробиома кожи.

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

Тема диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «3.2.7. Иммунология» (Направления исследований: №5, №6).

## Степень разработанности темы исследования

Диссертационная работа посвящена изучению роли микробного дисбиоза кожи в иммунопатогенезе атопического дерматита. На сегодняшний день достигнуты значительные успехи в понимании иммунопатогенеза АД. Установлена роль цитокинов IL-4, IL-5, IL-13 и IL-31 [6, 73, 77]. При хроническом течении выявлено вовлечение субпопуляций Th1, Th17 и Th22 [20, 43, 68]. Доказано, что колонизация кожи *S. aureus* и грибами рода *Malassezia* не случайна. Эти микроорганизмы активно модулируют иммунный ответ. Для *S. aureus* показана суперантиген-опосредованная активация Т-клеток и, отдельно, дегрануляция тучных клеток. Для *Malassezia* установлена активация инфламмосомы NLRP3 в кератиноцитах [59, 123, 135]. Этот процесс сопровождается секрецией IL-1 $\beta$  и выработкой широкого спектра хемокинов. Биологическая роль дисбиоза как активного участника патогенеза АД обоснована.

Культуральные методы диагностики традиционно применяются для выявления инфекционных осложнений АД. Однако эти методы имеют ограничения [15, 83, 112, 138]. Это низкая чувствительность и учёт только жизнеспособных клеток. Мёртвые микроорганизмы не детектируются, хотя их биомасса и генетический материал влияют на иммунную систему пациента с АД. Из этих ограничений вытекают нерешённые задачи по оценке роли дисбиоза при АД.

Одним из ключевых аспектов иммунопатогенеза АД остается не до конца охарактеризованная связь этого процесса с микробным дисбиозом кожи. Для ее количественного анализа в рамках данной работы необходимо разработать новую ПЦР-методику для оценки дисбиоза кожи при АД.

## Цель исследования

Изучить особенности изменения состава микробиоты кожи в иммунопатогенезе атопического дерматита и определить пороговые значения микробной нагрузки, ассоциированные с воспалением.

## Задачи исследования

1. Опираясь на известные данные о роли микробиоты в иммунопатогенезе атопического дерматита, создать новую методику на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени для улучшенной диагностики дисбиоза кожи. Доказать эффективность методики по сравнению с культуральными методами диагностики.

2. Провести сравнительный анализ микробиоты кожи у пациентов с атопическим дерматитом и у условно-здоровых лиц. Выявить таксоны микроорганизмов, которые могут быть ассоциированы с иммуноопосредованным заболеванием.

3. Установить количественные корреляционные взаимосвязи между уровнем колонизации кожи микроорганизмами и продукцией IgE у пациентов с атопическим дерматитом.

4. Охарактеризовать дисбиотические паттерны (видовой состав и количественные соотношения микроорганизмов), ассоциированные с тяжестью атопического дерматита.

5. Установить пороговые значения микробной нагрузки на коже, которые позволяют отличить бессимптомную колонизацию от колонизации, вызывающей активацию иммунопатологического процесса при атопическом дерматите.

## Научная новизна работы

Впервые с помощью метода ПЦР-РВ доказано, что дисбиоз кожи при АтД является триггером воспаления.

Впервые с помощью метода ПЦР-РВ установлено, что колонизация кожи *Staphylococcus aureus* выступает самостоятельным триггером воспаления, поскольку её уровень прямо коррелирует с концентрацией общего IgE, эозинофилией и тяжестью заболевания.

Впервые с помощью метода ПЦР-РВ установлено, что увеличение колонизации *Malassezia* spp. вносит вклад в поддержание хронического воспаления через IgE-независимые механизмы, так как его уровень коррелирует с тяжестью АтД, но не сопровождается повышением концентрации общего IgE.

Впервые сформулирована новая концепция «порога колонизации», согласно которой переход от бессимптомного носительства микроорганизмов к иммуноопосредованному воспалению определяется превышением строго определённого количественного уровня колонизации микроорганизма на коже.

Впервые показано, что грибковый состав микробиоты кожи при АтД включает повышение частоты носительства *Candida* spp., в том числе *Debaryomyces hansenii* (*C. famata*) и качественную перестройку видового состава *Malassezia* со снижением доли комменсального вида *Malassezia sympodialis*.

## Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в том, что результаты исследования расширяют представления об иммунопатогенезе АтД, доказывая, что микробный дисбиоз является активным участником воспаления. Это понимание пересматривает линейную логику развития заболевания «барьерный дефект –

колонизация – воспаление». Микробный дисбиоз кожи способен поддерживать воспаление при АтД за счет персистирующей продукции стафилококковых суперантигенов (SEA, SEB, SEC, SED, SEE), липотейхоевой кислоты, протеаз и аллергенов *Malassezia* (Mala s 1, Mala s 5 и др.), которые непрерывно активируют кератиноциты и тучные клетки.

Работа вносит вклад в теорию иммунной дисрегуляции, демонстрируя, что разные таксоны микроорганизмов – *Staphylococcus aureus*, *Malassezia* spp. – модулируют иммунный ответ через различные патогенетические пути (IgE-зависимый и IgE-независимый), что объясняет клиническую гетерогенность заболевания. Это позволяет теоретически выделить два сценария воспаления – аллергический, ассоциированный с колонизацией *Malassezia* spp. (через дектин-1 и TLR2 на дендритных клетках и кератиноцитах), и суперантиген-опосредованный, ассоциированный с *S. aureus* (через прямое связывание с V $\beta$ -цепью Т-клеточного рецептора в обход классического процессинга антигена) – что расширяет понимание механизмов формирования эндотипов заболевания.

Исследование теоретически обосновывает существование «иммунологически безопасного» уровня колонизации кожи комменсальными микроорганизмами. Данное понятие меняет представление о природе триггера. Важен не сам факт присутствия микроорганизма на коже, а превышение количественного порога его колонизации.

### **Практическая значимость работы**

Практическая значимость работы заключается в том, что разработана и валидирована методика мультиплексной количественной ПЦР-РВ для комплексной оценки микробного дисбиоза кожи, включающая клинически значимые для иммунопатогенеза АтД мишени.

На основании полученных результатов о роли сочетанного бактериально-грибкового дисбиоза кожи разработаны и обоснованы объективные параметры, которые могут быть использованы в клинической практике для улучшения диагностики и персонализации лечения. Разработанная и валидированная методика на основе ПЦР-РВ позволяет в одном анализе определять не только качественный состав, но и абсолютное содержание ключевых микроорганизмов, ассоциированных с иммуноопосредованным воспалением при АтД. Применение данного подхода преодолевает ограничения традиционных культуральных методов диагностики.

В исследовании научно обоснованы пороговые значения микробной нагрузки, которые служат объективным лабораторным показателем. Превышение установленных порогов коррелирует с активацией Th2-опосредованного иммунного ответа (ростом уровня общего IgE и числа эозинофилов) и тяжестью АтД, что служит объективным критерием для начала антимикробной терапии. Минимизации нерационального применения антибиотиков и антимикотиков снижает риски развития лекарственной резистентности и предотвращает усугубление дисбиоза кожи. Кроме того, применение количественной ПЦР-РВ обеспечивает возможность осуществлять объективный мониторинг эффективности подобранной терапии АтД, своевременно её корректировать и в конечном итоге оптимизировать сроки и схемы лечения пациентов с АтД.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследования были внедрены в практическую работу отделения аллергологии и иммунопатологии кожи ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и применяется для дифференциальной диагностики инфекционных осложнений АтД, для лабораторного обоснования таргетной терапии, для

мониторинга эффективности проводимого лечения (акт внедрения от 17 июня 2025 г., Приложение А)

### Методология и методы исследования

Для выполнения диссертационной работы были использованы современные методы исследования. Для ПЦР-РВ были подобраны олигонуклеотидные последовательности с использованием программного обеспечения Unipro UGENE v50.0. (Россия, Новосибирск) Специфичность разработанных олигонуклеотидов проанализирована *in silico* с помощью алгоритмов биоинформатического поиска BLAST (BLAST – Basic Local Alignment Search Tool) для исключения перекрестной реактивности с ДНК человека и нецелевых микроорганизмов. *In vitro* специфичность экспериментально подтверждена в перекрестных реакциях с ДНК референсных штаммов целевых и нецелевых микроорганизмов. Специфичность амплификации была дополнительно подтверждена методом секвенирования по Сэнгеру.

Оценка состава микробиоты проведена также с использованием традиционного культурального метода на стандартных и селективных питательных средах для выделения бактерий и грибов.

Оценка иммунологического статуса включала количественное определение общего IgE в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Клиническая оценка тяжести АД проведена с использованием международной валидированной шкалы SCORAD.

Статистический анализ выполнялся с использованием программного обеспечения Python 3.9 и библиотек SciPy, Pandas и StatsModels.

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

1. Микробный дисбиоз кожи при атопическом дерматите является активным триггером воспаления, что доказано с помощью разработанной методики ПЦР-РВ, обладающей достоверно более высокой чувствительностью по сравнению с культуральными методами диагностики.

2. Колонизация кожи бактерией *S. aureus* ассоциирована с повышением уровня общего IgE и эозинофилов, в то время как колонизация грибами рода *Malassezia* коррелирует с тяжестью заболевания, но не сопровождается значимыми изменениями этих показателей.

3. Установлен количественный порог уровня колонизации кожи микроорганизмами, превышение которого отличает патогенную колонизацию, индуцирующую иммуноопосредованное воспаление, от бессимптомного носительства.

### **Степень достоверности результатов**

Приведенные в диссертации данные получены с использованием современного оборудования, прошедшего своевременную поверку и зарегистрированного в Реестре средств измерения. Достоверность представленных данных обеспечены репрезентативным объемом клинического материала, соответствующим целям исследования, и строгой научной методологией. В ходе работы были применены современные методы математической статистики, адекватные типу распределения переменных и характеру изучаемых взаимосвязей, что позволило объективно интерпретировать результаты. Установлено, что результаты диссертационной работы являются достоверными.

## Апробация результатов

Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на: Российском диагностическом саммите лабораторной медицины (6–8 сентября 2022 г., Москва, Российская Федерация); 12-ом Всероссийском форуме Национального альянса дерматовенерологов и косметологов (17–18 октября 2022 г., Москва, Российская Федерация); 16-ом Всероссийском съезде Национального альянса дерматовенерологов и косметологов (14–16 марта 2023 г., Москва, Российская Федерация); III Южно-Российском медицинском конгрессе (07–08 июня 2023 г., Краснодар, Российская Федерация); Российском диагностическом саммите лабораторной медицины (4–6 октября 2023 г., Москва, Российская Федерация); 13-ом Всероссийском форуме Национального альянса дерматовенерологов и косметологов (17–18 октября 2023 г., Москва, Российская Федерация); XI Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2023» (14–16 ноября 2023 г., Москва, Российская Федерация); 17-ом Всероссийском съезде Национального альянса дерматовенерологов и косметологов (18–20 марта 2024 г., Москва, Российская Федерация); Всероссийском форуме молодых ученых, посвященный 300-летию РАН (18–19 апреля 2024 г., Москва, Российская Федерация); Школе по аллергологии и иммунологии им. академика Р.М. Хаитова (6–7 марта 2025 г., Москва, Российская Федерация). Апробация диссертации состоялась на заседании секции №1 ученого совета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России 15 января 2026 г.

### **Личный вклад автора**

Личный вклад состоит в непосредственном участии на всех этапах выполнения диссертационного исследования, непосредственном участии в получении исходных данных и научных экспериментах, личном участии в апробации результатов исследования, обработке, анализе и интерпретации полученных данных, подготовке публикаций по теме выполненных работ.

### **Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах**

По основным материалам диссертационной работы опубликовано 7 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых периодических научных изданиях, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и доктора наук; опубликовано 2 публикации в сборниках материалов конференций.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация оформлена в традиционном стиле, содержит 127 страниц машинописного текста, 13 рисунков и 12 таблиц. Работа включает «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 144 источника, в том числе 18 отечественных и 126 зарубежных и «Приложение».

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Клинико-эпидемиологическая характеристика АтД

#### 1.1.1. Эпидемиология заболевания

Атопический дерматит (АтД) является иммуноопосредованным хроническим многофакторным воспалительным заболеванием кожи, характеризующееся интенсивным зудом, сухостью кожи, рецидивирующим течением и склонностью к вторичным инфекциям [2, 100]. Наиболее распространенная характеристика определяет АтД как широко распространенное хроническое воспалительное заболевание кожных покровов, в патогенезе которого задействованы сложные генетические и иммунные механизмы, а также факторы внешней среды, и которое оказывает существенное негативное влияние на качество жизни пациента [2, 5, 118].

В мировом масштабе, за последние десятилетия наблюдается значительный рост в 2-3 раза — заболеваемости АтД, что отмечается в странах с различным уровнем экономического развития [58, 67, 91]. Глобальная распространенность АтД отличается высокой вариабельностью (1-20%), при этом наиболее высокие цифры зафиксированы в Нигерии, Великобритании, Новой Зеландии и государствах Латинской Америки [26, 46]. В Российской Федерации за период 2014-2018 гг. эпидемиологическая ситуация характеризовалась стабильно высокими показателями, с максимальной долей случаев в детской популяции (1589 на 100 тыс. детей), тогда как среди взрослых этот показатель был существенно ниже [3, 10, 11, 14]. Дебют заболевания отмечается в течение первых 6 месяцев жизни в 45% случаев, в течение первого года жизни – в 60%, а в возрасте от 1 года до 5 лет – в 85% случаев [1, 120]. Последующая ремиссия заболевания наступает

примерно у 65% детей к возрасту до 11 лет [120, 132], хотя болезнь может рецидивировать в подростковом, юношеском и даже зрелом возрасте [139]. Среди ключевых факторов риска повышения распространенности АтД выделяют социально-экономические условия и урбанизацию [47, 131]. Согласно статистике, заболеваемость среди сельского населения на 30% ниже, что, по мнению исследователей, может быть обусловлено влиянием окружающей среды, психоэмоциональными нагрузками, особенностями образа жизни и ограниченным контактом с триггерными агентами в детстве [18, 116, 129].

### 1.1.2. Клиническая классификация АтД

Клиническое течение АтД подразделяется по стадии болезни, распространенности кожного процесса и степени тяжести (таблица 1) [4].

Таблица 1 – Классификация АтД

<b>Критерий</b>	<b>Характеристика</b>
<b>Стадия болезни</b>	
Обострение	Наличие эритемы, папул, микровезикул, мокнутия, эскориаций, корок, шелушения; интенсивный зуд.
Ремиссия (неполная)	Значительное уменьшение симптомов при сохранении инфильтрации, лихенификации, сухости, шелушения и дисхромии.
Ремиссия (полная)	Отсутствие всех клинических симптомов заболевания.
<b>Распространенность процесса</b>	

Продолжение таблицы 1

<b>Критерий</b>	<b>Характеристика</b>
Ограниченно-локализованный	Площадь поражения до 10% кожного покрова.
Распространенный	Площадь поражения от 10% до 50% кожного покрова.
Диффузный	Площадь поражения более 50% кожного покрова.
<b>Степень тяжести</b>	
Легкая	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ограниченно-локализованные проявления.</li> <li>• Обострения 1-2 раза в год, длятся до 1 месяца.</li> <li>• Длительность ремиссии 8-10 месяцев.</li> <li>• Хороший эффект от терапии.</li> </ul>
Среднетяжелая	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Распространенный характер поражения.</li> <li>• Обострения 3-4 раза в год, более продолжительные.</li> <li>• Ремиссии 2-3 месяца.</li> <li>• Течение упорное, эффект от терапии незначительный.</li> </ul>
Тяжелая	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Распространенный или диффузный процесс.</li> <li>• Частые обострения (<math>\geq 5</math> раз в год), ремиссии короткие (1-1.5 мес).</li> <li>• Лечение дает кратковременное и незначительное улучшение.</li> <li>• Выраженный зуд, нарушающий сон.</li> </ul>

## 1.2. Современные представления о патогенезе

Несмотря на многочисленные исследования, проведенные в последние десятилетия, первичные механизмы, запускающие воспаление в коже при АтД, остаются неизвестными. На сегодняшний день существует несколько конкурирующих гипотез. С одной стороны, воспаление может инициироваться нейропептидами, которые вызывают зуд и механическое повреждение кожи вследствие расчесов, что, в свою очередь, приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов кератиноцитами [10, 36, 127]. С другой стороны, иммунный ответ изначально может развиваться по пути формирования IgE (IgE – immunoglobulin E) опосредованной сенсibilизации в ответ на воздействие внешнего аллергена в условиях нарушения функции эпидермального барьера [69].

В конце XX века большинство исследований подтвердили роль IgE-сенсibilизации при АтД [10, 22, 36]. Однако, оказалось, что выработка IgE не является обязательным условием для клинической манифестации АтД, что привело к появлению концепции «IgE-независимого АтД». Термин «сенсibilизация» был введен в клиническую практику Cooke R. в 1916 году [42] и сегодня широко используется, однако его смысловая нагрузка может различаться. Под сенсibilизацией понимают иммунологически опосредованное повышение чувствительности организма к экзогенным или эндогенным антигенам. Однако клинические проявления аллергии обусловлены не только самим фактом повышения чувствительности к антигену, но и реализацией этой повышенной чувствительности. Действительно, в ряде случаев сенсibilизация к аллергенам может сформироваться спустя несколько недель или месяцев после появления первых клинических симптомов АтД, либо не развиться вовсе на протяжении всей жизни пациента.

Органом, через который происходит первичная сенсibilизация, может быть не только желудочно-кишечный тракт или респираторная система, но и кожа [10, 86, 96]. Возможность формирования сенсibilизации в ответ на чрескожное

проникновение аллергена была продемонстрирована как у пациентов с аллергией к пыльцевым и пищевым аллергенам, так и на экспериментальных моделях на животных [10, 94, 117, 119]. Ранее существовало мнение, что высокомолекулярные белки не способны проникать через кожу, однако относительно недавние исследования показали, что такие молекулы могут захватываться дендритными клетками (ДК) кожи и инициировать развитие иммунного ответа [32, 50]. В 2003 году в Великобритании было проведено проспективное когортное исследование с участием 1300 детей с подтвержденной аллергией к арахису, которое выявило связь между развитием сенсibilизации и использованием средств по уходу за кожей, содержащих арахисовое масло [88]. Данную гипотезу подтверждают эксперименты на мышах, в которых была показана эффективность накожной специфической иммунотерапии аллергенами арахиса [99].

Открытие в 2006 году мутаций в гене, кодирующем филаггрин (FLG – Filament aggregating protein) – белок, вырабатываемый кератиноцитами, подтвердило предположение о том, что первичным звеном в патогенезе АтД может быть генетически детерминированное нарушение функций эпидермального барьера (ЭБ) [10, 73, 77, 93, 121].

Существуют две основные гипотезы патогенеза АтД:

– Гипотеза «outside-to-inside» (снаружи внутрь), согласно которой нарушение проницаемости и функции ЭБ, а также сухость кожи являются первичными событиями, ведущими к развитию иммунного ответа при АтД.

– Гипотеза «inside-to-outside» (изнутри наружу), в соответствии с которой нарушения функции ЭБ при АтД носят вторичный характер и возникают вследствие первичных изменений в иммунном ответе.

Следует отметить, что эти гипотезы не являются взаимоисключающими, а скорее дополняют друг друга. Безусловно, АтД является многофакторным заболеванием, и различные комбинации причинных факторов могут определять его конкретную клиническую картину [10, 68].

Клинические проявления АтД хорошо изучены, а диагностические критерии в настоящее время международными руководствами определены как основные, так

и вспомогательные критерии диагностики АтД [7, 8, 10, 52, 143] Также были разработаны диагностические шкалы для оценки степени тяжести АтД на основании субъективных и объективных показателей. Наиболее широкое распространение в мировой практике получили индексы SCORing of Atopic Dermatitis (SCORAD), Eczema Area and Severity Index (EASI) и Investigator Global Assessment (IGA), которые применяются для оценки тяжести АтД как у детей, так и у взрослых [34, 110, 116].

### 1.2.1. Дисфункция эпидермального барьера

Нормальная функция кожного барьера зависит от целостности структуры эпидермиса. Роговой слой, его самый наружный слой, состоит из корнеоцитов — конечного продукта дифференцировки кератиноцитов. Корнеоциты лишены ядер, а их клеточные мембраны заменены липидной оболочкой, содержащей керамиды и длинноцепочечные жирные кислоты, ковалентно связанные с белками корнеоцитарной оболочки, такими как инволюкрин, лорикрин и белки семейства плакинов, сшитые трансглутаминазой-1. Фрагменты таких белков, как хорнерин, могут проявлять антимикробную активность, подобную аминогликозидам [90, 103]. Повреждение барьера под воздействием факторов окружающей среды является триггером, который может запускать воспалительный каскад [24, 64, 80]. Нарушенный барьер облегчает проникновение аллергенов (например, протеаз клещей домашней пыли) и колонизацию *Staphylococcus aureus* [112]. Это инициирует иммунный ответ с доминированием Th2- и Th22-цитокинов (Th2 – T-helper 2), а также IL-31 (IL – interleukin), что приводит к зуду, дальнейшему повреждению барьера и созданию порочного круга (рисунок 1) [43, 68]. Таким образом, нарушение барьерной функции является центральным звеном в патогенезе АтД, объединяющим генетическую предрасположенность, иммунный ответ и воздействие окружающей среды.

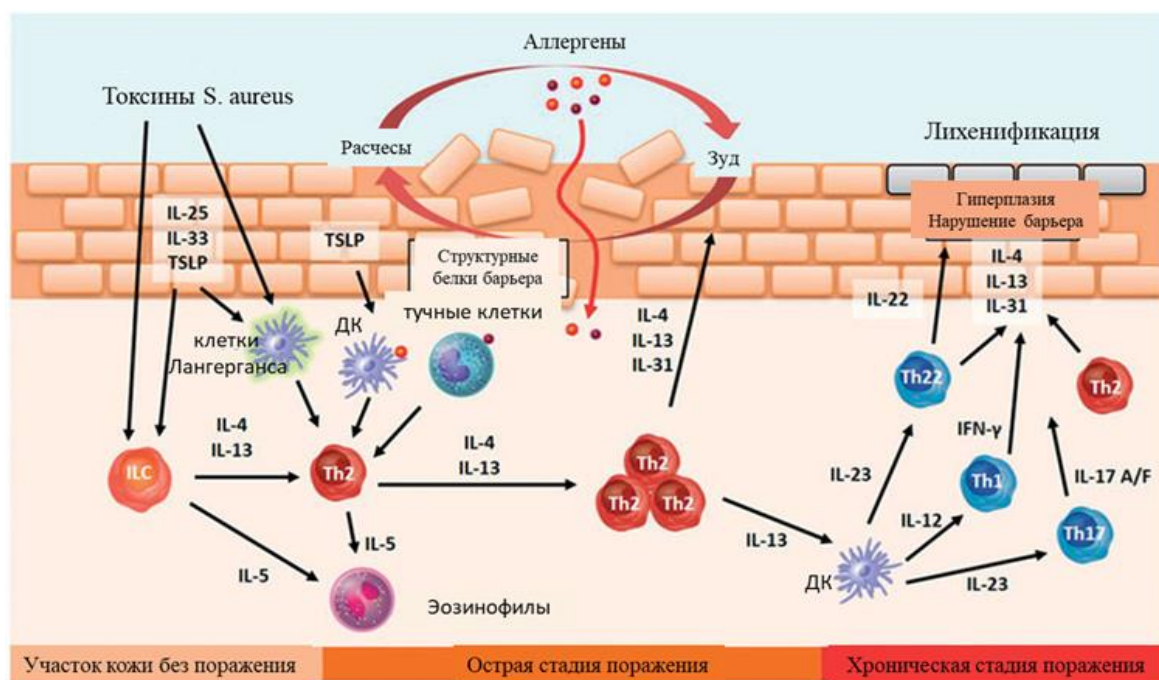


Рисунок 1 – Нарушение барьерной функции кожи и иммунный ответ при АтД

### 1.2.2. Роль филаггрина

Белок FLG играет ключевую роль в дифференцировке эпидермиса. FLG образуется в результате протеолитического процессинга белка-предшественника профилаггрина (pro-FLG – pro-filament aggregating protein), который содержится в кератогиалиновых гранулах кератиноцитов. Под воздействием ферментов FLG распадается на ряд аминокислот (глутамин, гистидин и др.), входящих в состав натурального увлажняющего фактора (НУФ) [6, 10, 33, 51, 98, 142]. Ген FLG расположен на хромосоме 1q21.3; его мутации при АтД могут приводить к снижению способности корнеоцитов удерживать влагу, а также к снижению эластичности и прочности кожи [10]. Мутации в гене его предшественника pro-FLG, являются хорошо установленным фактором риска развития АтД, астмы и других аллергических заболеваний [73,126]. Продукты деградации FLG (свободные аминокислоты, урокановая кислота) входят в состав НУФ [127]. Дефицит FLG приводит к нарушению барьера несколькими путями: нарушается

доставка содержимого ламеллярных телец [63], а снижение уровня урокановой кислоты ведет к повышению рН (рН – *potentia hydrogenii*) липидного барьера и активации сериновых протеаз, что усугубляет шелушение [74]. В совокупности это приводит к снижению увлажненности, нарушению регуляции рН и повышению предрасположенности к воспалению [122].

Хотя носительство мутаций гена FLG широко распространено среди пациентов североевропейского происхождения, их корреляция с уровнем транс эпидермальной потери воды (ТЭПВ) остается предметом дискуссий [21, 101, 130, 140]. Важно отметить, что на экспрессию FLG также влияют ненаследственные факторы, такие как Th2-воспаление (IL-4, IL-13), которое может подавлять его синтез [20, 80, 114, 122].

### **1.2.3. Изменения липидного состава рогового слоя**

Липидный барьер представлен в основном церамидами, холестерином и свободными жирными кислотами в эквимольном соотношении [23]. Особое значение имеют церамиды с ультрадлинными цепями жирных кислот, например 32-linoleoyloxydotriacontanoyl sphingosine (Cer[EOS]), которые придают мембранам высокую гидрофобность и стабильность [54, 135]. При АД под действием цитокинов Th2-пути (IL-4, IL-13) наблюдаются множественные липидные аномалии [113]. Общее снижение содержания церамидов, холестерина и свободных жирных кислот [63].

Цитокины IL-4 и IL-13 не только влияют на липиды, но и напрямую подавляют экспрессию ключевых структурных белков кожи, через механизмы, затрагивающие транскрипционные факторы AP-1 (AP-1 activating protein-1) и STAT3 (STAT – signal transducer and activator of transcription) [20, 43]. Это объясняет, почему нарушения барьера наблюдаются и у пациентов без мутаций в гене FLG.

#### 1.2.4. Антимикробные пептиды

Антимикробные пептиды (АМП) являются важнейшими агентами врожденной иммунной защиты кожи против бактерий, вирусов, грибов и других патогенов. В нормальной коже синтез АМП осуществляется преимущественно кератиноцитами зернистого слоя. Помимо прямой антимикробной активности, АМП в коже обладают разнообразными функциями, включая модуляцию воспалительного ответа и способность улучшать заживление ран [89, 128]. Исследования показали, что  $\beta$ -дефензин-2 может служить маркером тяжести заболевания и состояния барьерных свойств кожи при АтД [10, 19].

Интересно, что в коже больных АтД продуцируется меньшее количество АМП не только по сравнению со здоровыми индивидуумами, но и по сравнению с пациентами, страдающими псориазом, хотя оба заболевания сопровождаются воспалением и нарушением барьерной функции [10, 71]. Предполагается, что этот дефект при АтД вызывается супрессией АМП под влиянием повышенного уровня Th2-цитокинов – IL-4 и IL-13, что, в свою очередь, приводит к нарушению антимикробной функции и повышенной чувствительности к *S. aureus* и другим микробным агентам [87]. В то же время, результаты некоторых исследований демонстрируют повышенную продукцию АМП у пациентов с АтД в очагах поражения по сравнению с неповрежденной кожей [10, 25].

#### 1.2.5. Роль врожденного и адаптивного иммунитета

Патогенез АтД характеризуется мультифакторностью и представляет собой сложную сеть взаимодействий между клеточными элементами кожи, иммунной и нервной системами. Эти процессы опосредованы широким спектром иммунологических молекул, таких как Toll-подобные рецепторы (TLR – toll-like

receptor) и цитокины, нейротрансмиттеры и их рецепторы, а также иные сигнальные молекулы, задействованные в передаче сигналов зуда и боли [103]. Особый научный и клинический интерес в этом представляют провоспалительные цитокины, которые опосредуют взаимодействие между иммунной и сенсорной системами. Множество ключевых цитокинов реализуют свои эффекты через систему внутриклеточной передачи сигналов Янус-киназ (JAK – janus kinase), сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции (STAT), что делает путь JAK-STAT важной мишенью для фармакологического вмешательства [111].

Возникновение и персистенция АД ассоциированы со сложной дисрегуляцией как врожденного, так и адаптивного иммунитета [28]. Согласно современному представлению, инициирующим патологическим событием, вероятно, является нарушение эпидермального барьера и последующее взаимодействие между измененным кожным микробиомом и системой врожденного иммунитета хозяина. Это в дальнейшем приводит к вовлечению и активации механизмов адаптивного иммунного ответа. Ключевую роль во врожденном иммунном ответе играет сигналинг через TLR, экспрессируемые различными клетками кожи. В частности, кератиноциты активно экспрессируют несколько типов TLR (TLR2, TLR3, TLR5), активация которых патоген-ассоциированными молекулярными паттернами индуцирует продукцию широкого спектра провоспалительных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$  (TNF – tumor necrosis factor) и IL-6 [103]. Дендритные клетки кожи экспрессируют большинство известных TLR, в то время как инфильтрирующие поврежденную кожу плазмацитоидные дендритные клетки преимущественно экспрессируют TLR7 и TLR9, распознающие нуклеиновые кислоты бактерий, вирусов и собственных поврежденных клеток организма [103]. Активация TLR на поверхности дендритных клеток запускает сложный каскад внутриклеточных сигнальных путей, включая MyD88 (MyD88 – Myeloid differentiation primary response 88), AP-1, NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B – nuclear factor  $\kappa$ B), что в конечном итоге приводит к повышенной экспрессии генов провоспалительных цитокинов и хемокинов,

непосредственно способствуя развитию и поддержанию воспаления при АтД [12, 103]. Таким образом, TLR функционируют на стыке врожденного и адаптивного иммунитета, играя критическую роль в инициации иммунного ответа [103].

Патогенез АтД, в особенности в острой фазе, характеризуется выраженным Th2-опосредованным иммунным ответом. Клетки Лангерганса (LCs – Langerhans cells), резидентные дендритные клетки эпидермиса, распознают чужеродные антигены и патогены и представляют их для активации наивных Т-клеток [103]. Важным звеном является активация TLR2 и последующая продукция IL-4, которые индуцируют кератиноциты к повышенной выработке тимического стромального лимфопоэтина (TSLP – thymic stromal lymphopoietin) – ключевого цитокина-регулятора Th2-иммунного ответа [45]. Следовательно, TLR2 и TSLP функционально связывают врожденный иммунитет и Th2-опосредованный адаптивный иммунный ответ при АтД, способствуя персистенции воспаления и хронизации заболевания [141]. TSLP также напрямую активирует другие иммунные клетки, включая Т-клетки, ДК и тучные клетки [95], и, что особенно важно, способствует возникновению зуда через связывание со своим рецептором на сенсорных нейронах и последующую активацию кожных сенсорных нейронов, экспрессирующих ионные каналы TRPA1 (TRPA1 – Transient Receptor Potential Ankyrin 1) [139].

Помимо классического Th2-иммунного ответа, в патогенезе определенных клинических и этнических эндотипов АтД (например, азиатских) активное участие принимают отклонения в других типах иммунного ответа, включая Th1, Th17 и Th22 [105]. При хронической форме заболевания наблюдается сопряженная Th1-опосредованная дисрегуляция [130]. У пациентов африканского происхождения с АтД регистрируется выраженная сочетанная Th2/Th17 активация, характеризующаяся повышением уровней цитокинов Th1, Th17 и Th22 [35]. Цитокины и их рецепторы, участвующие в реализации как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа, модулируют ощущение зуда и боли при АтД через

активацию и сенситизацию ионных каналов TRP на сенсорных нервных окончаниях [82].

### 1.3. Роль бактериальной микробиоты и инфекционных осложнений

подавляющее большинство пациентов с АД – до 90% — колонизированы *Staphylococcus aureus* как на пораженных, так и на видимо здоровых участках кожи [30, 31], что является характерным отличием от здоровых лиц. Доминирование *S. aureus* в микробиоме объясняется сочетанием наличия у бактерии мощных факторов вирулентности и особенностей иммунного ответа хозяина при АД. Например, фибронектин-связывающие белки *S. aureus* обладают высоким сродством к белкам кожи, особенно в условиях Th2-опосредованного воспаления. Бактериальные энтеротоксины, выступающие в роли суперантигенов, непосредственно разрушают кожный барьер и потенцируют Th2-иммунный ответ [103], параллельно подавляя продукцию ключевых медиаторов противомикробного иммунитета — интерферона- $\gamma$  (IFN – interferon) и TNF- $\alpha$  [92]. Метициллин-резистентные штаммы *S. aureus* (MRSA – methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) часто продуцируют больше суперантигенов, чем метициллин-чувствительные штаммы (MSSA– methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) [130]. Суперантигены и  $\alpha$ -токсин индуцируют апоптоз кератиноцитов и дальнейшее нарушение барьерной функции [30], тогда как  $\delta$ -токсин стимулирует дегрануляцию тучных клеток, усиливая воспаление и зуд [103].

Здоровье кожи поддерживается сбалансированным комменсальным микробиомом, который локализуется не только на поверхности, но и в глубинных слоях эпителия, активно участвуя в иммунной регуляции и защите от патогенов [37]. Основные комменсалы кожи, такие как *Cutibacterium acnes*, *Corynebacterium* spp. и коагулазонегативные стафилококки [62, 85], при АД оказываются редуцированы, что облегчает колонизацию и доминирование *S. aureus*.

Комменсальные бактерии выполняют две ключевые функции: иммуномодуляцию через снижение избыточного воспаления и усиление защиты от патогенов, а также прямую конкуренцию с патогенами за ресурсы и пространство. Например, *S. epidermidis* продуцирует липотейхоевую кислоту, которая через активацию TLR2 подавляет TLR3-опосредованное воспаление при повреждении кожи [37]. Этот вид также модулирует активность цитотоксических и регуляторных Т-клеток при заживлении ран и поддержании иммунной толерантности. Кроме того, *S. epidermidis* усиливает выработку антимикробных пептидов кератиноцитами. Некоторые представители коагулазонегативных стафилококков (такие как *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*) способны продуцировать специфические протеазы и бактерицидные факторы (например, лантибиотики), которые подавляют образование биопленок *S. aureus* и непосредственно уничтожают этот патоген [37].

Пациенты с АтД подвержены развитию бактериальных инфекций кожи и мягких тканей (ИКМТ), наиболее распространенными из которых являются импетиго, целлюлит, фолликулит и абсцессы кожи. Основным возбудителем этих инфекций выступает также *Staphylococcus aureus* [12, 106]. Импетиго обычно проявляется образованием серозного экссудата, который при высыхании формирует характерные «медовые» корки на эритематозном основании. При буллезной форме импетиго возникают заполненные жидкостью пузыри (буллы), которые могут быть ошибочно приняты за проявления экзематозного герпеса (ЭГ). К негнойным ИКМТ относятся рожистое воспаление и целлюлит. Эти инфекции обычно начинаются на ограниченном участке кожи, но могут быстро прогрессировать и распространяться на обширные области тела, включая конечности, туловище и лицо [106]. Характерными признаками служат локальная эритема, отек, повышение местной температуры и болезненность. В тяжелых случаях возможно развитие системных симптомов, включая лихорадку и бактериемию. ИКМТ у пациентов с АтД могут приводить к серьезным системным осложнениям, включая бактериемию, остеомиелит, септический артрит или бурсит, а в более редких случаях — эндокардит и синдром ошпаренной кожи (SSSS

– Staphylococcal Scalded Skin Syndrome), опосредованный стафилококковыми эксфолиативными токсинами [106]. Повышение маркеров системного воспаления, таких как С-реактивный белок (СРБ) и скорость оседания эритроцитов (СОЭ), усиливает подозрение на развитие этих осложнений.

Вторым по частоте возбудителем ИКМТ и системных инфекций при АтД является *Streptococcus pyogenes* ( $\beta$ -гемолитический стрептококк группы А) [48]. Данный патоген может вызывать инфекции как самостоятельно, так и в ассоциации с *S. aureus*. Стрептококковые поражения кожи обычно проявляются пустулами или импетиго, а также могут иметь вид характерных глубоких эрозий с фестончатыми краями, что может имитировать клиническую картину герпеса [49].

Особую сложность в клинической практике представляет дифференциальная диагностика так называемого «инфицированной экземы» — тяжелого обострения АтД, ассоциированного с массивной бактериальной колонизацией, от истинной бактериальной инфекции [13, 72]. Согласно данным Кокрейновского систематического обзора, эмпирическое назначение антибиотиков системного действия не приводит к статистически значимому уменьшению тяжести АтД в таких случаях [29]. Основной риск избыточного и нерационального применения антибиотиков при обострении АтД заключается в селекции антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов и усугублении дисбиоза кожной микробиоты [84].

Тем не менее, существует определенная подгруппа пациентов с тяжелым обострением АтД, которые могут иметь положительный эффект от антибиотикотерапии в плане профилактики и лечения инфекционных осложнений [453, 60, 84]. Предполагается, что этих пациентов можно идентифицировать по очень высокой плотности колонизации *S. aureus* и объективным признакам выраженного тканевого повреждения, вызванного взаимодействием патогена с организмом хозяина [60]. У детей, госпитализированных с тяжелым обострением АтД, часто отмечается повышение уровня СРБ и СОЭ, хотя и менее значительное, чем при манифестных инфекционных осложнениях [53]. Таким образом, мониторинг динамики воспалительных маркеров в сочетании с диагностическими

исследованием может иметь потенциальную ценность для идентификации пациентов с АтД, подверженных высокому риску развития тяжелых инфекционных осложнений и нуждающихся в назначении антибактериальной терапии.

#### 1.4. Грибковые инфекции при АтД

В последние годы все большее внимание уделяется роли кожного микобиома, в частности грибковой его составляющей, в патогенезе АтД. *Malassezia* spp. являются липофильными дрожжами, составляющими значительную часть нормальной микобиоты кожи человека, однако при определенных условиях они могут приобретать патогенные свойства и участвовать в развитии воспалительных реакций [59, 124]. Наиболее клинически значимыми видами являются *M. globosa*, *M. restricta*, *M. sympodialis* и *M. furfur* [137, 138], которые колонизируют преимущественно себорейные зоны кожи, так как зависят от липидов как источника энергии [123].

Патогенное воздействие реализуется через взаимодействие с клетками кожи и иммунной системы. Нарушение кожного барьера при АтД облегчает прямой контакт клеток *Malassezia* с кератиноцитами и LCs, запуская воспалительный каскад [134]. Альтернативный механизм включает иммуногенные белки, высвобождаемые в нановезикулах, которые индуцируют цитокиновые ответы [76]. Ключевую роль в распознавании играют TLR, особенно TLR2, который специфически распознает компоненты дрожжевых грибов [81]. Активация TLR2 опосредует усиленную продукцию антимикробного пептида человеческого  $\beta$ -дефензина-2 и хемокина CXCL8 (CXCL – (C-X-C motif) ligand) кератиноцитами [27]. Взаимодействие с клетками хозяина запускает продукцию широкого спектра цитокинов. Аллерген Mala s 11 индуцирует созревание дендритных клеток и продукцию TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 и IL-12p70 [127, 144], а протеин MGL\_1304 вызывает дегрануляцию тучных клеток и высвобождение IL-4 базофилами [70].

Различные виды также активируют инфламмасому NLRP3 (NLRP3 – NLR family pyrin domain containing 3), индуцируя продукцию IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-13 и IL-18 [81, 127]. Данные о количественной колонизации *Malassezia* остаются противоречивыми. В некоторых исследованиях отмечается меньшее количество колоний *Malassezia* у пациентов с АтД, где *M. sympodialis* был наиболее часто выделяемым видом [66], в то время как другие работы показывают сопоставимую с здоровыми лицами частоту выявления [41, 78, 123].

Помимо *Malassezia*, в патогенезе АтД могут участвовать грибы рода *Candida* [15, 75]. *C. albicans* активирует иммунные пути через TLR4 [104] и экспрессирует протеазы, повреждающие барьер [102, 125]. Отмечается повышенная колонизация желудочно-кишечного тракта и кожи у пациентов с АтД, а также сенсibilизация к антигенам *Candida* в стадии обострения [56, 125].

Дерматофиты — это патогенные плесневые грибы, способные расщеплять кератин. Благодаря этой кератинолитической активности они поражают кожу, волосы, волосяные фолликулы и ногти [14, 140]. Семейство *Arthrodermataceae*, объединяющее дерматофиты, включает 7 родов (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Arthroderma*, *Lophophyton*, *Paraphyton*) и более 50 видов [48, 97]. Наибольшую клиническую значимость имеют роды *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* и *Nannizzia*, так как они вызывают микозы кожи и ее придатков (ногтей и волос) [9, 16, 17]. Эти заболевания характеризуются выраженным воспалением, хроническим рецидивирующим течением и практически не разрешаются самостоятельно. Отдельный риск представляют дерматофиты у пациентов, получающих системную терапию глюкокортикостероидами, которая является признанным фактором риска грибковых инфекций [44]. Противовоспалительный эффект стероидов может маскировать клиническую картину дерматомикоза [55], а местное и системное применение кортикостероидов рассматривается как фактор риска развития поверхностного микоза у пациентов с АтД [57].

## 1.5. Сложности диагностики грибковой и бактериальной колонизации кожи

Диагностика грибковой колонизации при АтД сопряжена с рядом методологических сложностей. Видовой спектр и относительная численность *Malassezia* не только варьируют при различных дерматопатологиях, но и демонстрируют выраженную географическую специфичность [63]. Например, доминирующим видом в Европе считается *M. sympodialis*, тогда как в азиатском регионе преобладают *M. restricta* и *M. globosa*. Указанные различия в распределении могут быть не только следствием истинной географической изменчивости, но и следствием, связанным с применением различных диагностических методик в исследовательской практике. Так, в европейских исследованиях исторически доминируют культуральные методы, в то время как в азиатских странах шире применяются молекулярно-генетические подходы. Поскольку некоторые виды, в частности *M. restricta*, характеризуются медленным ростом *in vitro*, при культивировании они могут быть вытеснены более быстрорастущими конкурентами, например, *M. sympodialis*, что приводит к существенному искажению данных об их реальной распространенности [66].

Для подтверждения присутствия дрожжей рода *Malassezia* при АтД и других патологиях применяется ряд методов забора проб, среди которых наиболее распространены скотч-пробы и соскобы с кожи [46]. В рутинной лабораторной практике широко используется прямая микроскопия, позволяющая детектировать грибковые элементы после обработки проб гидроксидом калия с использованием различных красителей, включая окраску по Граму, что особенно полезно для диагностики *Malassezia*-фолликулита [138]. Идентификация *Malassezia* основана на обнаружении характерных дрожжевых клеток с униполярным почкованием; в случае разноцветного лишая наблюдают также наличие коротких гиф (так называемая картина «спагетти и фрикаделек»). Однако при АтД, особенно при поражениях в области головы и шеи, гифы, как правило, не обнаруживаются.

Несмотря на возможность визуализировать различия в морфологии клеток (например, сферические клетки *M. globosa* или симодиальное почкование *M. sympodialis*), точная видовая идентификация с помощью прямой микроскопии невозможна, что является ее ключевым диагностическим ограничением [138].

«Золотым стандартом» долгое время считалось первичное выделение *Malassezia* на липид-обогащенных питательных средах с последующей видовой идентификацией, достигаемой путем оценки профиля ассимиляции липидов [65] в сочетании с морфологическими особенностями. Однако фенотипическая вариабельность, выявляемая этим классическим микологическим подходом, недостаточно специфична для надежной дифференциации всего спектра современных видов *Malassezia* ввиду частого перекрывания липидных профилей у разных видов [39]. Кроме того, культуральные методы являются трудоемкими и длительными, а разделение близкородственных видов по характеристикам штаммов затруднительно.

В связи с ограничениями традиционной диагностики, в последние десятилетия для быстрой и точной идентификации видов *Malassezia* [133] и грибов в целом [15] находят применение молекулярные методы. Широкое распространение также получают методы, определяющие химический профиль видов: масс-спектрометрия MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization—Time Of Flight) [83] и Рамановская спектроскопия [112]. Известные расхождения в данных, полученных культуральными и молекулярными методами, вероятно, обусловлены несколькими факторами: различиями в скорости роста видов (быстрорастущие виды могут подавлять рост медленных *in vitro*), наличием некультивируемых форм, а также тем, что молекулярные методы считаются более точными и чувствительными [115, 133].

Традиционные методы микробиологической диагностики, основанные на культуральных исследованиях, обладают существенными ограничениями при оценке и бактериальной колонизации кожи при АтД. Эти методы позволяют идентифицировать лишь небольшую часть микробного сообщества, в основном

быстрорастущие и неприхотливые микроорганизмы, что не дает полной картины его таксономического разнообразия и функционального потенциала [85].

### 1.6. Современные подходы к терапии АтД

АтД требует персонализированного комплексного лечения, направленного не только на восстановление кожного барьера и контроль воспаления, но и на профилактику инфекционных осложнений, которые значительно ухудшают течение болезни. Клинические рекомендации подчеркивают поэтапный подход, учитывающий наличие и характер инфекции: базисная терапия (ежедневное очищение и увлажнение), местная противовоспалительная терапия при обострениях и системные методы при тяжелом, рефрактерном течении. Различия в стратегиях определяются клиническими признаками инфекции, такими как мокнутие, гнойные корки медового цвета, пустулы, а также системными симптомами (лихорадка, лимфаденопатия). Важным компонентом терапии является диагностика обострения АтД, осложненного вторичной инфекцией [4].

Ежедневное применение эмолентов является основой терапии, направленной на восстановление липидного барьера и снижение ТЭПВ. Эффективность современных формул с декспантенолом или ликохалконом А сопоставима с мягкими топическими глюкокортикостероидами (ТГКС) при легком АтД [3]. ТГКС остаются препаратами первой линии при обострениях; их подбирают по силе активности (от I до IV класса), с учетом локализации и возраста пациента. Для поддержания ремиссии и снижения частоты обострений рекомендован проактивный режим применения ТГКС. Топические ингибиторы кальциневрина (ТИК): пимекролимус 1%, такролимус 0,03–0,1%) являются стероид-сберегающей альтернативой, особенно предпочтительной для чувствительных зон (лицо, шея, складки), и могут использоваться для длительного контроля заболевания [4].

### 1.6.1. Системная терапия неосложненного АтД

При умеренном и тяжелом АтД, резистентном к местной терапии и не осложненном активной инфекцией, применяют системные методы лечения. Традиционные иммуносупрессанты (циклоsporин, метотрексат, реже – азатиоприн) назначают в сочетании с местными средствами для достижения контроля по шкалам SCORAD/EASI. Фототерапия (узкополосный УФ-В, УФ-А1) также является эффективным и относительно безопасным методом, способствующим улучшению барьерной функции и модуляции иммунного ответа [2, 4, 5].

В последнее время произошла революция в системной терапии АтД благодаря появлению таргетных биологических препаратов и малых молекул. Моноклональное антитело дупилумаб (ингибитор рецептора IL-4/IL-13) продемонстрировал высокую эффективность и безопасность в клинических исследованиях, достигая показателя EASI-75 у 44–69% пациентов. Он не считается иммуносупрессивным и даже может снижать частоту тяжелых инфекционных осложнений, таких как герпетическая экзема. Ингибиторы JAK-киназ – аброцитиниб, бароцитиниб, упадацитиниб – представляют собой пероральные средства, быстро купирующие зуд и воспаление. Однако их применение ассоциировано с дозозависимым увеличением риска вирусных инфекций (например, опоясывающего герпеса), что требует взвешенного подхода и, по рекомендациям, профилактической вакцинации. Антигистаминные препараты (неседативные H1-блокаторы) имеют вспомогательную роль, главным образом для облегчения зуда, особенно в педиатрической практике. Перед началом любой системной терапии, особенно ингибиторами JAK и традиционными иммунодепрессантами, рекомендуется обязательный скрининг на латентный туберкулез и вирусные гепатиты [2, 4, 7, 8].

### 1.6.2. Терапия АтД, осложненного вторичными инфекциями

Вторичные инфекции, являются частым и серьезным осложнением АтД, требующим коррекции терапевтической стратегии. Принцип лечения заключается в комбинации этиотропной (противомикробной) и патогенетической (противовоспалительной) терапии.

#### *Бактериальные инфекции.*

При локализованных формах (мокнутые, корки) эффективно использование комбинированных препаратов, содержащих ТГКС и антибиотик (например, фузидиевую кислоту или мупироцин), курсом на 5–10 дней с последующим переходом на монотерапию ТГКС/ТИК [2, 4, 5].

При распространенной инфекции, абсцессах, фолликулите или системных симптомах (лихорадка) показана системная антибактериальная терапия. Выбор антибиотика должен учитывать локальную эпидемиологию резистентности, включая MRSA. Препаратами выбора могут быть цефалексин, амоксициллин-клавуланат, доксициклин (у взрослых), клиндамицин или сульфаметоксазол-триметоприм [5, 7, 8].

Рутинная деколонизация носительства *S. aureus* без клинических и лабораторных признаков инфекции не рекомендуется из-за риска развития антибиотикорезистентности.

#### *Грибковые инфекции.*

При дерматите головы и шеи, ассоциированном с сенсibilизацией к *Malassezia*, особенно при недостаточном ответе на стандартную терапию, эффективно добавление системных антимикотиков (например, итраконазол по 200 мг/сут курсом 1–2 месяца). Положительный ответ на такую терапию подтверждает роль грибковой гиперчувствительности в патогенезе [2, 4, 79].

В клинической практике в комплексной терапии гнойных инфекций у пациентов с АтД также применяют иммуномодуляторы (например,

глюкозаминилмурамилдипептид – Ликопид), что способствует снижению тяжести инфекции и улучшению клинических показателей [2, 4, 7].

Таким образом, современная терапия АтД, осложненного инфекциями, является интегрированной, требует тщательной диагностики и сочетает в себе противомикробные средства с методами, направленными на восстановление кожного барьера и контроль иммунного дисбаланса.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Формирование клинических групп и забор биологического материала

Клинический материал для исследования был получен в рамках научного сотрудничества с отделением аллергологии и иммунопатологии кожи ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (заведующая отделением — д.м.н. Феденко Е.С.). Все клинические процедуры, включая осмотр, постановку диагноза, оценку SCORAD и забор биоматериала, выполнялись врачами-сотрудниками указанного отделения в строгом соответствии с клиническими протоколами. Исследование проводилось в соответствии с этическими стандартами. Локальный этический комитет ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России одобрил протокол исследования (№ 7 от 07.08.2024). Участие всех пациентов было добровольным. Перед включением в исследование каждый пациент получал полную информацию о его целях и процедурах и подписывал форму информированного согласия, что соответствует принципам Хельсинкской декларации. Пациенты распределялись в группы на основе заранее установленных критериев включения и исключения.

В исследование были включены образцы, полученные от 110 пациентов с верифицированным диагнозом «АтД» в соответствии с критериями клинических рекомендаций [4].

Критерии включения в исследование:

- подписанное информированное письменное согласие пациента на участие в исследовании;
- мужчины и женщины любой расовой принадлежности;
- возраст от 18 до 75 лет;
- пациенты с подтвержденным диагнозом АтД легкой, среднетяжелой или тяжелой степени тяжести, оцененной по SCORAD.

Критериями исключения для пациентов с АтД являлись:

- прием топических глюкокортикостероидов, цитостатиков или антимикробных препаратов за 2 недели до включения;
- наличие сопутствующих иммуносупрессивных или иных хронических дерматологических заболеваний.

Всем пациентам с АтД проводилось стандартное клиническое обследование врачами отделения. Обследование включало сбор анамнеза с анализом жалоб, длительности и характера течения заболевания, наследственной отягощенности и предшествующей терапии, а также физикальное обследование с визуальной оценкой характера и локализации кожных высыпаний, определением степени их распространенности и интенсивности. Для объективной стандартизированной оценки тяжести течения заболевания применялась международная шкала SCORAD, на основании рассчитанного индекса течение классифицировали как легкое, среднетяжелое или тяжелое. В рамках общеклинического обследования всем участникам исследования проводились общий клинический и биохимический анализы крови. Специфическое аллергологическое обследование включало количественное определение уровня общего иммуноглобулина Е (IgE) в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем «LabXima» (Швейцария-Россия) в строгом соответствии с инструкцией производителя. Все лабораторные анализы выполнялись в клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России с использованием стандартизированных методов и сертифицированного оборудования, что обеспечивало высокую воспроизводимость и достоверность результатов.

Группу сравнения составили условно-здоровые лица (n=86), сопоставимых по полу и возрасту группе пациентов с АтД. Учитывая гетерогенность локализаций, выбранных для исследования у пациентов с АтД (плечи, кисти, голени, спина, грудь, лицо, волосистая часть головы, пах), для группы сравнения были отобраны образцы из участков различной локализации: «зона с пониженной сальной секрецией» (N=43) и участки «себорейной зоны» (N=43). Это позволило

обеспечить более точное и корректное сопоставление результатов в рамках общей выборки исследования.

Критерии включения в группу условно-здоровых:

- подписанное информированное письменное согласие пациента на участие в исследовании;
- мужчины и женщины любой расовой принадлежности;
- возраст от 18 до 75 лет;

Критериями исключения были:

- прием топических антимикробных препаратов за 4 недели до включения;
- наличие дерматологических заболеваний;
- наличие аллергопатологий в анамнезе.

## **2.2. Забор биоматериала для разных методов**

Забор материала у всех участников проводился медицинским персоналом отделения аллергологии и иммунопатологии кожи ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Для повышения сопоставимости образцов соскоб проводили с площади примерно 1×1 см, контролируя визуально глубину соскоба. Для разных методов исследования использовались соответствующие методики.

*Для ПЦР исследования.* Методом поверхностных кожных соскобов стерильным одноразовым скальпелем Certus №10 (Китай) в чистые микроцентрифужные пробирки 1,5 мл. Последующее выделение ДНК осуществлялось с использованием набора «ПРОБА-НК» (ООО «ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции производителя. Готовый препарат ДНК анализировался согласно разработанной методике ПЦР.

*Для микологического анализа.* Стерильным одноразовым скальпелем производили соскоб чешуек с краев очага поражения. Полученный материал помещали в стерильные сухие пластиковые контейнеры.

*Для бактериологического анализа.* Стерильным тампоном из транспортной системы типа «Эймс» (Amies) забирали материал с поверхности эрозий, мокнущих участков или из складок кожи. Тампон сразу помещали в пробирку с транспортной средой.

### **2.3. Секвенирование по Сэнгеру**

Для независимого подтверждения специфичности амплификации и валидации результатов, полученных методом ПЦР в реальном времени, была проведена выборочная верификация с использованием секвенирования по Сэнгеру. Из репрезентативной выборки, положительных образцов по каждому целевому микроорганизму, были отобраны ампликоны для последующего секвенирования. Предварительную очистку продуктов амплификации проводили с использованием набора «Cleanup Mini» (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Реакции секвенирования выполняли в 5 независимых итерациях в прямом и обратном направлениях, используя те же праймерные пары, что и в ПЦР-РВ. Процедуру проводили на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США) с соблюдением стандартных протоколов, рекомендованных производителем. Исходные хроматограммы анализировали в программе Unipro UGENE v50.0 (Россия) с определением нуклеотидной последовательности, обрезкой низкокачественных концов и сборкой парных прочтений в консенсусные последовательности. Регистрировали среднюю длину прочтения, средние показатели качества Phred и долю неоднозначно определенных нуклеотидов. Неоднозначные позиции разрешали по принципу большинства при сравнении

повторных прочтений, и в окончательный консенсус включали только нуклеотиды с показателем качества Phred  $\geq 30$ . Затем консенсусные последовательности генов сравнивали с референсными последовательностями из базы данных GenBank с использованием алгоритма BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool). Видовую идентификацию присваивали при условии  $\geq 99$ –100% идентичности нуклеотидной последовательности и полного покрытия по отношению к установленным референсным образцам в GenBank.

#### **2.4. Сравнительный анализ микроорганизмов и статистическая обработка данных**

Количественное определение целевых микроорганизмов в образцах кожных соскобов от пациентов с АтД и лиц группы условно-здоровых лиц проводили с использованием разработанной и оптимизированной методики ПЦР-РВ. Для количественной оценки использовали стандартные кривые, построенные по серийным разведениям плазмидных ДНК с известной концентрацией. Полученные абсолютные значения (копий ДНК/мл) для последующего статистического анализа преобразовывали в десятичные логарифмы от полученной концентрации ( $\lg$  копий ДНК/мл). Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения Python 3.9 и библиотек SciPy, Pandas и StatsModels.

Проверка количественных данных на соответствие нормальному распределению осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения количественных показателей между двумя независимыми группами (пациенты с АтД и условно-здоровые лица) применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Оценку корреляционных взаимосвязей между микробиологическими, иммунологическими и клиническими параметрами проводили методом ранговой корреляции Спирмена с поправкой Бонферрони. Сила корреляционной связи

оценивалась как сильная ( $\rho = \pm 0,70-1,00$ ), умеренная ( $\rho = \pm 0,30-0,69$ ), слабая ( $\rho = \pm 0,10-0,29$ ) или отсутствующая ( $\rho = \pm 0,00-0,09$ ).

Для определения диагностически значимых пороговых значений (cut-off) микробной нагрузки, ассоциированных с наличием АД, осложненного вторичными инфекциями, был использован ROC-анализ. Для каждого сравниваемого показателя строилась ROC-кривая, рассчитывалась площадь под кривой (AUC) и определялись оптимальные пороговые значения методом Юдена (максимизация суммы чувствительности и специфичности). Диагностическая ценность интерпретировалась следующим образом: AUC 0,9-1,0 — отличная, 0,8-0,9 — хорошая, 0,7-0,8 — удовлетворительная, 0,6-0,7 — низкая, 0,5-0,6 — непригодная.

Во всех видах анализа уровень статистической значимости был установлен на значении  $p \leq 0,05$ .

## **2.5. Культуральное микробиологическое исследование**

Для сравнительной оценки диагностической эффективности молекулярно-генетических и классических микробиологических методов у каждого участника исследования врачами отделения параллельно брались соскобы кожи для культуральных исследований.

Все этапы микробиологического исследования выполнялись в соответствии с внутренними нормативными документами - «Методическими указаниями по применению унифицированных микробиологических методов исследования в клинко-диагностических лабораториях ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России». Методика исследования, применяемая в работе, включала стандартизированный протокол интерпретации результатов культурального исследования с определением видовой принадлежности микроорганизмов с использованием сертифицированного оборудования.

### 2.5.1. Культуральное исследование на бактерии

Транспортный тампон с материалом использовали для посева на стандартный набор селективных питательных сред. Для культивирования *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Pseudomonas* spp. применяли: желточно-солевой агар (ЖСА) — для стафилококков; 5% кровяной агар (КА) с бараньей кровью — для выделения широкого спектра бактерий и оценки гемолиза; цетримидный агар — для *Pseudomonas* spp. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 18–24 часов (при необходимости — до 48 часов). Обязательным этапом была постановка теста на плазмокоагулазу с кроличьей цитратной плазмой: образование сгустка через 2–4 часа считали положительным результатом, подтверждающим *S. aureus*.

### 2.5.2. Культуральное исследование на грибы

*Для дерматофитов.* Материал высевали на среду Сабуро с добавлением хлорамфеникола (0,05 грамм/литр) и циклогексимида (0,5 грамм/литр). Посевы инкубировали при +28°С. Рост контролировали на 5-7-е и 21-е и 35-е сутки.

*Для дрожжей Candida.* Материал высевали на хромогенную селективную среду «Агар хромогенный для Candida» (ООО «Средофф»). Чашки инкубировали при +37°С в течение 48 часов. Видовую принадлежность предварительно определяли по цвету колоний. Для подтверждения *Candida albicans* проводили тест на образование ростковых трубок в лошадиной сыворотке.

*Для дрожжей Malassezia.* Соскоб втирали в поверхность липид-обогащенного агара Диксона. Посевы инкубировали при +34°С в течение 10 суток. Выросшие колонии микроскопировали. Из-за сложности видовой дифференциации

классическими методами, в работе ограничились констатацией выделения культуры *Malassezia* spp.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Формирование панели клинически значимых микроорганизмов

Для формирования целевой панели микроорганизмов, ассоциированных с АтД, был проведен систематический анализ данных современных научных публикаций. Поиск релевантных источников осуществлялся в международных реферативных базах данных PubMed, Scopus и Web of Science за период с 2010 по 2024 год.

Стратегия поиска включала использование ключевых слов и их комбинаций: «атопический дерматит микробиом», «кожный дисбиоз», «*Staphylococcus aureus* atopический дерматит», «*Malassezia* atopический дерматит», «дерматофиты atopический дерматит».

Критериями включения микроорганизмов в целевую панель являлись:

- Ассоциация с тяжестью АтД, подтвержденная в ходе клинических или экспериментальных исследований;
- Доказанная роль в патогенезе заболевания, включая способность поддерживать хроническое воспаление, повреждать кожный барьер;
- Частота обнаружения в микробиоме кожи пациентов в фазу обострения АтД.

На основании указанных критериев была сформирована панель мишеней, включающая бактериальные и грибковые таксоны (таблица 2).

Таблица 2 – Целевая панель микроорганизмов, ассоциированных с АтД

Микроорганизмы	Аналиты
Бактерии	<i>Staphylococcus spp.</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Streptococcus spp.</i>
	<i>Streptococcus pyogenes</i>

## Продолжение таблицы 2

Микроорганизмы	Аналиты
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Грибы Дерматомицеты	<i>Trichophyton</i> spp.
	<i>Trichophyton rubrum</i>
	<i>Trichophyton tonsurans</i>
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>indotineae</i>
	<i>Microsporum</i> spp.
	<i>Microsporum canis</i>
	<i>Epidermophyton floccosum</i>
	<i>Nannizzia</i> spp.
Дрожжеподобные грибы	<i>Candida</i> spp.
	<i>Candida albicans</i>
	<i>Candida tropicalis</i>
	<i>Candida parapsilosis</i>
	<i>Nakaseomyces glabratus</i> ( <i>C. glabrata</i> )
	<i>Pichia kudriavzevii</i> ( <i>C. kruzei</i> )
	<i>Debaryomyces hansenii</i> ( <i>C. famata</i> )
	<i>Malassezia</i> spp.
	<i>Malassezia restricta</i>
	<i>Malassezia furfur</i>
	<i>Malassezia globosa</i>
	<i>Malassezia sympodialis</i>

### 3.2. Характеристика олигонуклеотидов и плазмидных стандартов

На основании сформированной панели мишеней (таблица 2) были разработаны нуклеотидные последовательности специфичных праймеров и ТаqMan-зондов. Для этого проводили множественное выравнивание консервативных участков генов целевых микроорганизмов с использованием программного обеспечения Unipro UGENE v.50.0 (Россия). В качестве генетических мишеней для бактерий использовали гены *16S pPHK*, *tuf*, *nuc*, *speB*, *oprL*, а для грибов — участки генов *ITS1*, *ITS2* и гена *26S pPHK*. Все референтные

последовательности были взяты из базы данных нуклеотидов GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI – The National Center for Biotechnology Information).

Специфичность разработанных олигонуклеотидов была предварительно проанализирована *in silico* с помощью алгоритма BLAST в базе данных нуклеотидных последовательностей NCBI для исключения перекрестной реактивности с ДНК человека и близкородственных нецелевых микроорганизмов. Синтез всех праймеров и зондов был выполнен компанией «ДНК-технология-ТС».

Целевые ампликоны клонировали в плазмидный вектор pAL2-T компанией «Evrogen». Полный перечень разработанных олигонуклеотидов представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика разработанных олигонуклеотидов и плазмидных стандартов

Аналиты		Олигонуклеотиды (5' → 3')	Плаزمида
Общее количество бактерий	<i>For</i>	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTG	TBL
	<i>Rev</i>	GGACTACCAGGGTATCTAATCCT	
	<i>Probe</i>	(BHQ1)- TGGGGAATATTGGACAATGGGCGA-(Cy5)	
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>For</i>	CCGTGGAGGGTCATTGGAAAC	<i>staph</i>
	<i>Rev</i>	TGATCCTCACGCTTTCGCACA	
	<i>Probe</i>	(BHQ1)-GCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCA-(Cy5)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>For</i>	ATGCTGGTGGTACATCAAATGC	<i>saur</i>
	<i>Rev</i>	CCAGCATCTTCAGCATCTTCTG	
	<i>Probe</i>	(BHQ1)-CCCATTGCACTGCATAACTTCCG - (Fam)	
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>For</i>	GGATAACTATTGGAAACGATAGC	<i>strept</i>
	<i>Rev</i>	TAAGCCACAGCCTTTAACTTCAGA	
	<i>Probe</i>	(BHQ1)-GGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTG-(Cy5)	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>For</i>	GCGCGTGATTCTATTATGGATGTGGT	<i>spyo</i>
	<i>Rev</i>	CGGGCAAGTAGTTCTTCAATGGCAA	
	<i>Probe</i>	(BHQ1)- AGACCGCGGTGCAGACGACTATATT-(Fam)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>For</i>	GAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT	<i>psaer</i>
	<i>Rev</i>	ACCACCCTCTACCGTACTCTAGCT	

## Продолжение таблицы 3

Аналиты		Олигонуклеотиды (5' → 3')	Плазмида
	Probe	(BHQ1)- TGGGGAATATTGGACAATGGGCGA-(Cy5)	
<i>Trichophyton</i> spp.	For	ATATTAGCCGCTGGTGGTAAGCA	<i>trph</i>
	Rev	CGTTCCTCATCGATGCCGGA	
	Probe	(BHQ1)- GAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAA-(Rox)	
<i>Trichophyton rubrum</i>	For	GCAGCCAATTCAGCGCCCT	<i>trub</i>
	Rev	CTACCTGATCCGAGGTCAACCTGA	
	Probe	(BHQ1)-CCGCCCTGGCCCAATCTTTATA- (Fam)	
<i>Trichophyton tonsurans</i>	For	CCGTACCGCCCCATTCTTGTCTA	<i>ttons</i>
	Rev	CCTCCGGCGGGCGCGGTCCA	
	Probe	(BHQ1)-CGGCGAGCCTCTCTTTA-(Fam)	
<i>Trichophyton mentagrophytes var. indotineae</i>	For	CATTCTTGTCTACCTTACTCGGT	<i>tind</i>
	Rev	CACTAAAGAGAGGCTCGCCGA	
	Probe	(BHQ1)-CGTCT(+T) CCAGGAGAGCCG TTC- (Fam)	
<i>Microsporum</i> spp.	For	GGACGCCTGAGGGGGACTC	<i>micr</i>
	Rev	GCGTTGCTCGCTCAGACGGTAT	
	Probe	(BHQ1)-TCGCCGAGGATTACTCTGG-(Fam)	
<i>Microsporum canis</i>	For	GCGTCATTTCAACCCCTCAA	<i>mcan</i>
	Rev	GCCAGGAGCCGGAAT	
	Probe	(BHQ1)-CCAGTAACCACCCACCGCTTA-(Rox)	
<i>Epidermophyton floccosum</i>	For	GCGTCATTTCAACCCCTCAA	<i>eflock</i>
	Rev	GGCCCGGAATCGCGGCCT	
	Probe	(BHQ1)-CCGGGAGAGGAGAAAGGT-(Rox)	
<i>Nannizzia</i> spp.	For	CCGCCGGCCACACGCCATT	<i>nan</i>
	Rev	CTCAGACGGAACAGTATTCATGGAT	
	Probe	(BHQ1)-TGGATCGCGCCCGCCGGAGGA- (Cy5)	
<i>Candida</i> spp.	For	CATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCT	<i>csp</i>
	Rev	CTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCT	
	Probe	(BHQ1)- AGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATT-(Cy5)	
<i>Candida albicans</i>	For	CAAGTTTGAAATCTGGCGTCT	<i>calb</i>
	Rev	GTCAGAGGCTATAACACACA	
	Probe	(BHQ1)-CAACCGCAGCGGCCGCC- (Fam)	
<i>Candida tropicalis</i>	For	GATGAGATGATCCAGGCCTATG	<i>ctrop</i>
	Rev	GCCGTGCCACATTCTAACGCA	
	Probe	(BHQ1)-CCGATAAACTGTAGAGGCCACCC- (Fam)	
<i>Candida parapsilosis</i>	For	GCGATGAGATGTCCCAGACCT	<i>cpar</i>
	Rev	GCAGTGCCACATTTCTTTGCA	

## Продолжение таблицы 3

Аналиты		Олигонуклеотиды (5' → 3')	Плазмида
	<i>Probe</i>	(BHQ1)-CCGGTAAACTGTAGAGGCCACC-(Cy5)	
<i>Nakaseomyces glabratus</i> ( <i>C.glabrata</i> )	<i>For</i>	GGAGAGTACCACTTTGGGACT	<i>cglab</i>
	<i>Rev</i>	CTATAACACTCTACACCGAGGTG	
	<i>Probe</i>	(BHQ1)-CAAGCCCACGAGAGGCAAGG-(Fam)	
<i>Pichia kudriavzevii</i> ( <i>C.kruzei</i> )	<i>For</i>	GTTGGAGTCTGTGTGAAAGGC	<i>ckruz</i>
	<i>Rev</i>	CCAAACAACCTCGACTCGTCAGA	
	<i>Probe</i>	(BHQ1)-TGCTTCCGCCGGCATCCCAC -(Rox)	
<i>Debaryomyces hansenii</i> ( <i>C.famata</i> )	<i>For</i>	TCAGACTTGGTATTTTGCGATC	<i>cfam</i>
	<i>Rev</i>	CCGAAGTAGAGCCACATTCCT	
	<i>Probe</i>	(BHQ1)-CAGCTTACTGGGCCAGCATC -(Fam)	
<i>Malassezia spp.</i>	<i>For</i>	GAAAATCCCGTACTTGCCATG	<i>mls</i>
	<i>Rev</i>	TAAGTGCGAAGGTGTCCGAAG	
	<i>Probe</i>	(BHQ1)-GAAGCGCTTGAAGTCAGCCATGCT-(Cy5)	
<i>Malassezia restricta</i>	<i>For</i>	GAAAATCCCGTACTTGCCATG	<i>mres</i>
	<i>Rev</i>	TAAGTGCGAAGGTGTCCGAAG	
	<i>Probe</i>	(BHQ1)-GAAGCGTATGGGGAATGTGGCAT-(Rox)	
<i>Malassezia globosa</i>	<i>For</i>	GAAAATCCCGTACTTGCCATG	<i>mglob</i>
	<i>Rev</i>	TAAGTGCGAAGGTGTCCGAAG	
	<i>Probe</i>	(BHQ1)-TCAGCCTGGCCTTTGGGCTTGG-(Fam)	
<i>Malassezia sympodialis</i>	<i>For</i>	CCCTCCCCTTACGGTGGCCGA	<i>msym</i>
	<i>Rev</i>	CGCTTATGCATTTCCGGCGA	
	<i>Probe</i>	(BHQ1)-CGGGGTAGGATGGGTGTTT-(Rox)	

### 3.3. Оптимизация и валидация условий ПЦР в реальном времени

Экспериментальная оптимизация условий проведения ПЦР-РВ для каждой мишени в моноплексном формате проводилась методом итеративного подбора ключевых параметров реакции. Отрабатывались различные температуры отжига праймеров (в диапазоне 60–68°C) и концентрации компонентов реакционной смеси, в первую очередь, концентрации праймеров (50–300 нМ) и зондов (50–200 нМ). Критериями оптимальности подобранных условий являлись минимальное

значение порогового цикла ( $C_t$  – Cycle Threshold), отсутствие неспецифической амплификации и димеризации праймеров в отрицательном контроле. Специфичность амплификации для каждой оптимизированной пары праймеров дополнительно проверялась на перекрестную реактивность с ДНК других представителей панели, а также с геномной ДНК человека. В результате подбора ключевых параметров реакции для всех аналитов была установлена унифицированная температура отжига  $64^{\circ}\text{C}$ , что позволило стандартизировать режим амплификации для всей панели. Состав реакционной смеси представлен в таблице 4.

Унифицированный профиль амплификации:

- Активация ДНК-полимеразы:  $80^{\circ}\text{C}$  - 30 секунд.
- Начальная денатурация:  $94^{\circ}\text{C}$  - 90 секунд.
- 5 «разгонных» циклов: денатурация  $94^{\circ}\text{C}$  - 30 секунд, отжиг и детекция сигнала  $64^{\circ}\text{C}$  - 15 секунд.
- 45 основных циклов: денатурация  $94^{\circ}\text{C}$  - 10 секунд, отжиг и детекция сигнала  $64^{\circ}\text{C}$  - 15 секунд.
- Финальное охлаждение:  $94^{\circ}\text{C}$  - 5 секунд.

Таблица 4 – Состав реакционной смеси

<b>Компонент</b>	<b>Концентрация</b>	<b>Объем на реакцию</b>
Буфер для полимеразы	1,25 кратный	0,5 мкл
dNTP's	0,25 мМ (каждого)	0,1 мкл
Праймеры	100 нМ	0,14 мкл
Зонды	50 нМ	0,05 мкл
Тaq-полимераза	5 ед. активности	0,5 мкл
ПЦР-буфер	1,25 кратный	18 мкл
Вода (деионизированная)	–	до 35 мкл
образец ДНК	–	5 мкл

Специфичность каждой мишени была подтверждена в перекрестных экспериментах. Амплификация с использованием ДНК, выделенной из охарактеризованных культур, целевых и не целевых микроорганизмов, а также геномной ДНК человека, не приводила к появлению сигнала, что свидетельствует об отсутствии перекрестной реактивности (таблицы 5–7). Референсные штаммы плесневых грибов были получены из научной-исследовательской лаборатории «Российская коллекция патогенных грибов» ФГБОУ ВО «Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова» Минздрава России.

Таблица 5 – Результаты анализа специфичности для бактериальных мишеней

№	ДНК, выделенная из культуры	Результаты специфичности для бактерий (Ст)					
		ОКБ	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	20,2	20,4	20,9	-	-	-
2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	23,4	-	-	23,5	23,2	-
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24,2	-	-	-	-	24,8
4	<i>Enterobacter cloacae</i>	21,3	-	-	-	-	-
5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	21,9	-	-	-	-	-
6	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	20,8	-	-	-	-	-
7	<i>Trichophyton rubrum</i>	37,9	-	-	-	-	-
8	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>var. indotineae</i>	42,7	-	-	-	-	-
9	<i>Trichophyton tonsurans</i>	40,3	-	-	-	-	-
10	<i>Epidermophyton floccosum</i>	38,5	-	-	-	-	-
11	<i>Microsporum canis</i>	39,9	-	-	-	-	-

Продолжение таблицы 5

№	ДНК, выделенная из культуры	Результаты специфичности для бактерий (Ct)					
		ОКБ	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>
12	<i>Nannizzia gypsea</i>	41,2	-	-	-	-	-
13	<i>Nakaseomyces</i> <i>glabratus</i> (C. <i>glabrata</i> )	40,7	-	-	-	-	-
14	<i>Candida albicans</i>	37,6	-	-	-	-	-
15	<i>Geotrichum</i> <i>candidum</i>	38,6	-	-	-	-	-
16	<i>Malassezia furfur</i>	38,4	-	-	-	-	-
17	<i>Aspergillus flavus</i>	39,3	-	-	-	-	-
18	<i>Aspergillus niger</i>	40,0	-	-	-	-	-
19	<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	37,8	-	-	-	-	-
20	<i>Scopulariopsis</i> <i>brevicaulis</i>	39,1	-	-	-	-	-
21	ДНК человека	38,4	-	-	-	-	-

Проведенный анализ специфичности системы для определения общее количество бактерий (ОКБ) продемонстрировал ее высокую эффективность при работе с чистыми бактериальными культурами, что подтверждает способность системы детектировать широкий спектр бактериальных таксонов. Вместе с тем, наблюдалась неспецифическая амплификация при использовании грибковых культур и геномной ДНК человека, проявляющаяся в виде сигнала на поздних циклах амплификации (Ct > 36).

Указанный феномен может быть объяснен наличием следовых количеств бактериальной ДНК в качестве контаминантов в коммерческих препаратах грибковой ДНК и реактивах. Для минимизации влияния потенциальной контаминации на интерпретацию результатов была установлена аналитическая отсечка на уровне 36 циклов. Образцы, демонстрирующие пороговый цикл выше





Продолжение таблицы 7

№	ДНК, выделенная из культуры	Результаты специфичности для дрожжеподобных (Ct)											
		<i>Candida</i> spp.	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Nakaseomyces glabratus</i> ( <i>C. glabrata</i> )	<i>Pichia kudriavzevii</i> ( <i>C. kruzei</i> )	<i>Debaryomyces hansenii</i> ( <i>C. famata</i> )	<i>Malassezia</i> spp.	<i>Malassezia restricta</i>	<i>Malassezia globosa</i>	<i>Malassezia furfur</i>	<i>Malassezia sympodialis</i>
6	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>Trichophyton rubrum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>var. indotineae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>Trichophyton tonsurans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>Epidermophyton floccosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>Microsporum canis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>Nannizzia gypsea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	<i>Nakaseomyces glabratus</i> ( <i>C. glabrata</i> )	22,4	-	-	-	22,3	-	-	-	-	-	-	-
14	<i>Candida albicans</i>	21,2	21,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>Geotrichum candidum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	<i>Malassezia furfur</i>	-	-	-	-	-	-	-	21,3	-	-	20,9	-
17	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	ДНК человека	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Все полученные плазмидные ДНК-стандарты на основе вектора pAL2-T были охарактеризованы количественно с использованием калибровочных стандартов

ВСКО#1 и ВСКО#2 производства «ДНК-Технология-ТС». Эти плазмидные растворы содержали целевой фрагмент ДНК определяемого микроорганизма (аналита), клонированный в тот же вектор рAL2-Т. В последствии служили калибраторами следующего порядка. В реакции ПЦР применялись праймеры и зонд, комплементарные консервативной последовательности самого вектора рAL2-Т. Таким образом, определённая концентрация вектора (копий ДНК/мл) соответствовала концентрации целевого фрагмента аналита. Так исходные концентрации клонированных плазмидных препаратов находились в диапазоне от  $1,0 \times 10^{13}$  до  $1,0 \times 10^{12}$  копий/мл. Для каждой анализируемой мишени были приготовлены серии калибраторов. Концентрация калибратора К1 составляла  $1,0 \times 10^7$  копий/мл и калибратора К2 –  $1,0 \times 10^4$  копий/мл. Данный диапазон концентраций ( $10^4$ - $10^7$  копий/мл) охватывал клинически значимые уровни бактериальной и грибковой нагрузки и был использован для построения калибровочных кривых.

Для всех разработанных ПЦР-мишеней были построены калибровочные кривые, которые продемонстрировали высокие аналитические характеристики. Эффективность амплификации для всех систем находилась в диапазоне 95-105%, что соответствует требованиям к количественным ПЦР-исследованиям. Коэффициент корреляции  $R^2$  для всех калибровочных зависимостей превышал 0,998, что свидетельствует о высокой линейности и воспроизводимости методов в рабочем диапазоне концентраций.

Результаты количественной ПЦР выражали в "копиях/мл" как в единицах, непосредственно отражающих количество выявленной ДНК-мишени в образце. Использование многокопийных генов, характеризующихся межштаммовой вариабельностью числа копий, в особенности для грибов, делает пересчет в геномные эквиваленты (ГЭ) некорректным без дополнительных данных о конкретном штамме. В связи с этим единица "копии/мл" является объективной мерой для сравнительного анализа микробной нагрузки в группах пациентов с АД и условно-здоровых лиц.

Специфичность разработанных олигонуклеотидов была независимо подтверждена методом секвенирования по Сэнгеру. Для анализа использовали как ДНК, выделенную из референсных культур микроорганизмов, так и клинические образцы, в которых ПЦР-РВ выявила наличие целевых патогенов (*Malassezia restricta*, *Malassezia globosa* и *Malassezia sympodialis*).

Результаты показали полную конкордантность данных, полученных двумя независимыми молекулярно-генетическими методами. Во всех протестированных образцах результаты секвенирования на 100% совпали с результатами предварительной детекции методом ПЦР-РВ (таблица 8), что подтверждает высокую специфичность разработанных праймерных систем и достоверность полученных ПЦР-данных.

Таблица 8 – Результаты выборочной верификации специфичности мультиплексной ПЦР-РВ методом секвенирования по Сэнгеру

Целевая мишень	Количество итераций	Конкордантность с результатами ПЦР-РВ, %
<i>Staphylococcus</i> spp.	8	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	100
<i>Streptococcus</i> spp.	7	100
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	100
<i>Trichophyton</i> spp.	7	100
<i>Trichophyton rubrum</i>	3	100
<i>Trichophyton tonsurans</i>	2	100
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>indotineae</i>	2	100
<i>Microsporum</i> spp.	2	100
<i>Microsporum canis</i>	2	100
<i>Epidermophyton floccosum</i>	2	100
<i>Nannizzia</i> spp.	2	100
<i>Candida</i> spp.	10	100
<i>Candida albicans</i>	3	100
<i>Candida tropicalis</i>	2	100
<i>Candida parapsilosis</i>	2	100
<i>Nakaseomyces glabratus</i> ( <i>C. glabrata</i> )	2	100

Продолжение таблицы 8

Целевая мишень	Количество итераций	Конкордантность с результатами ПЦР-РВ, %
<i>Pichia kudriavzevii</i> ( <i>C. kruzei</i> )	2	100
<i>Debaryomyces hansenii</i> ( <i>C. famata</i> )	2	100
<i>Malassezia</i> spp.	10	100
<i>Malassezia restricta</i>	5	100
<i>Malassezia furfur</i>	5	100
<i>Malassezia globosa</i>	5	100
<i>Malassezia sympodialis</i>	5	100

### 3.4. Определение микроорганизмов методом ПЦР

#### 3.4.1. Количественный анализ бактериальной колонизации

Обнаружены статистически значимые различия между группами условно - здоровых лиц и пациентов с АтД. Результаты сравнительного анализа графически отображены на рисунке 2. ОКБ в группе условно-здоровых лиц составила 3,7 lg копий/мл [3,1; 4,3], в то время как в группе пациентов с АтД данный показатель был достоверно выше — 5,2 lg копий/мл [4,3; 6,2] ( $p < 0,001$ ). В абсолютных значениях это различие соответствует 32-кратному увеличению количества бактерий у пациентов с АтД по сравнению со здоровыми лицами.

Аналогичная динамика наблюдалась для представителей рода *Staphylococcus*. Медианное значение *Staphylococcus* spp. в группе условно-здоровых лиц составляло 2,9 lg копий/мл [2,4; 3,5], тогда как в группе пациентов с АтД этот показатель достигал 4,9 lg копий/мл [4,1; 5,6] ( $p < 0,001$ ), что отражает 100-кратное увеличение концентрации у пациентов с АтД.

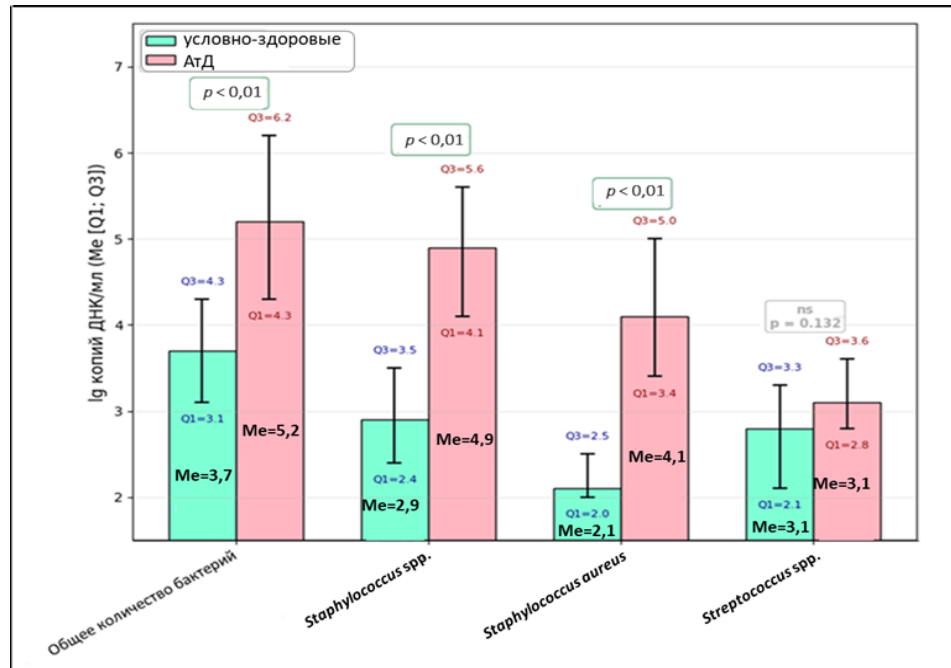


Рисунок 2 – Медианы с квартильными интервалами для бактерий

Наиболее выраженные различия между группами были зарегистрированы для *Staphylococcus aureus*. В группе условно-здоровых лиц концентрация этого микроорганизма составила 2,1 lg копий/мл [2,0; 2,5], тогда как у пациентов с АтД данный показатель достигал 4,1 lg копий/мл [3,4; 5,0] ( $p < 0,001$ ), что соответствует 100-кратному увеличению бактериальной нагрузки.

В отличие от стафилококков, концентрация *Streptococcus* spp. не имела статистически значимых различий между группами. В условно-здоровой группе этот показатель составлял 2,8 lg копий/мл [2,1; 3,3], в группе АтД — 3,1 lg копий/мл [2,8; 3,6] ( $p = 0,13$ ), что эквивалентно всего 2-кратному увеличению. Следует отметить, что ДНК *Streptococcus pyogenes* не была обнаружена ни в одной исследуемой группе. ДНК *Pseudomonas aeruginosa* была обнаружена по одному повтору в двух группах. Показатели *Streptococcus pyogenes* и *Pseudomonas aeruginosa* не представлены в сводной таблице из-за недостаточной выборки, что делает статистический анализ между группами недостаточно репрезентативным.

В ходе проведенного исследования выполнено сравнение количественных показателей бактериальной колонизации кожи у пациентов с АтД и условно-здоровых лиц. Для оценки диагностической значимости бактериальных

параметров был проведен ROC-анализ с определением оптимальных пороговых значений (cut-off), обеспечивающих баланс между чувствительностью и специфичностью. У пациентов с АтД зафиксировано достоверное повышение уровня общей бактериальной обсеменённости кожи по сравнению с группой условно-здоровых лиц. Установлено, что значение 4,8 lg копий ДНК/мл может служить диагностическим порогом, обеспечивая специфичность 79% при чувствительности 88%. Данный показатель демонстрирует хорошую дискриминационную способность, о чём свидетельствует площадь под ROC-кривой (AUC), составившая 0,9 (рисунок 3). Особый интерес представляет анализ представителей рода *Staphylococcus*. Для *Staphylococcus* spp. пороговое значение определено на уровне 3,8 lg копий ДНК/мл. При этом достигается высокая диагностическая эффективность с чувствительностью 72% и специфичностью 91% (AUC = 0,87) (рисунок 3). Наиболее выраженные различия между группами отмечены для *Staphylococcus aureus*. Образцы кожи условно-здоровых лиц характеризуются минимальным присутствием или полным отсутствием данного микроорганизма, в то время как в образцах пациентов с АтД его концентрация достигала клинически значимых величин. Порог в 3,6 lg копий ДНК/мл продемонстрировал исключительную специфичность, равную 100%, при сохранении чувствительности на уровне 83,6% (AUC = 0,93) (рисунок 3).

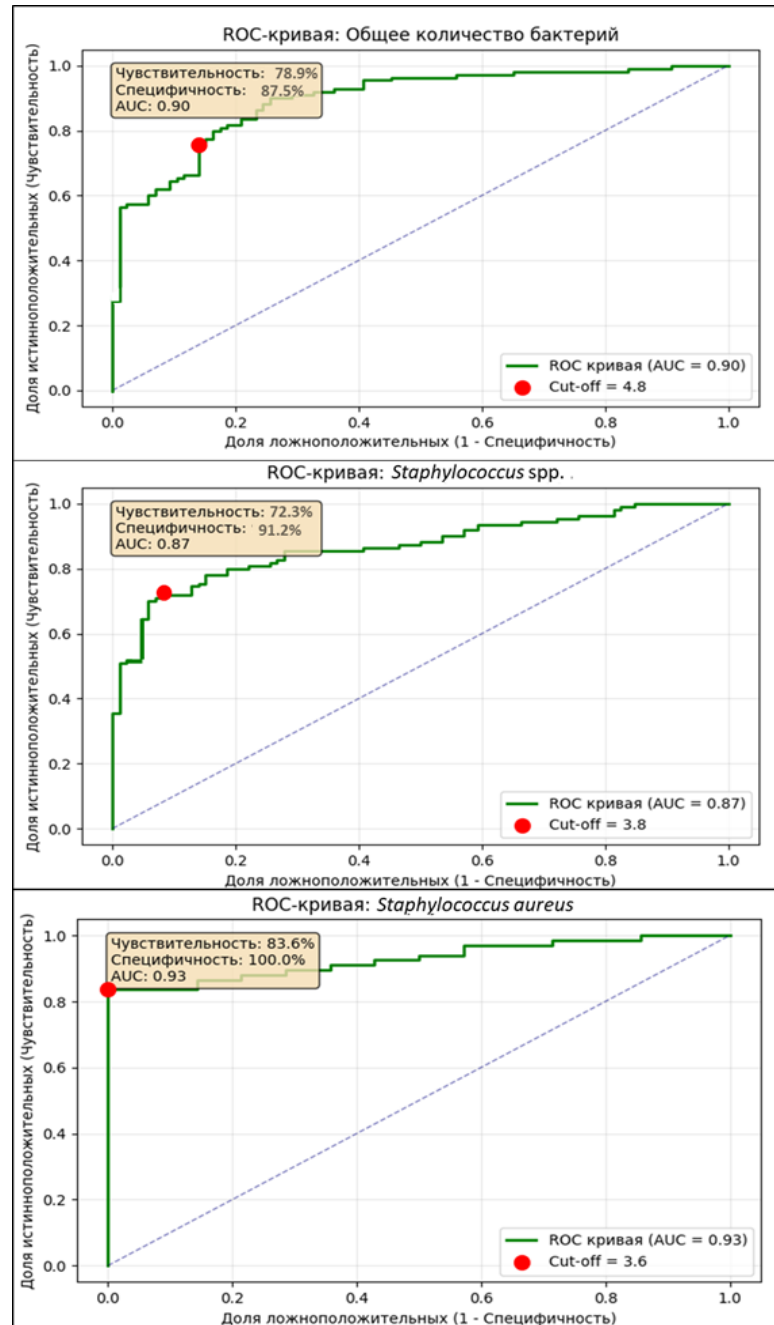


Рисунок 3 – ROC- анализ для анализируемых бактерий

Анализ распределения значений подтвердил наличие выраженного сдвига бактериальных показателей в группе АтД в сторону более высоких значений. Пики распределения у пациентов с АтД локализируются в области более высоких концентраций по сравнению с группой условно-здоровых лиц. Так, например, для общего количества бактерий максимум плотности в группе АтД наблюдается в интервале 4,0–5,0 lg копий ДНК/мл, тогда как у условно-здоровых лиц пик распределения приходится на диапазон 2,5–3,5 lg копий ДНК/мл. Особенно

показательным является анализ распределения *Staphylococcus* spp. У условно-здоровых лиц наблюдается неравномерное распределение уровня колонизации бактерий с выраженным пиком в области низких значений (2,0–3,0 lg копий ДНК/мл) и быстрым спадом плотности вероятности (рисунок 4). В группе АтД распределение значительная доля наблюдений, превышает порог в 3,8 lg копий ДНК/мл. Такая картина свидетельствует не только о более высокой средней концентрации данного микроорганизма, но и о большей вариабельности показателя среди пациентов с АтД. (рисунок 4). Тем не менее, установленные пороговые значения позволяют эффективно дифференцировать пациентов с АтД, осложненного бактериальной инфекцией, в частности стафилококком, от здорового носительства.

Стоит отметить, что для унификации диагностических критериев и с учетом аналитической погрешности метода ПЦР-РВ целесообразно округление расчетных порогов до целых чисел. Порог 5,0 lg копий ДНК/мл для ОКБ позволяет надежно дифференцировать инфекционную форму АтД от бессимптомного носительства. Аналогично, cut-off значения для *Staphylococcus* spp. (4,0 lg), *Staphylococcus aureus* (4,0 lg) обеспечивают объективные и практичные критерии для клинической интерпретации результатов.

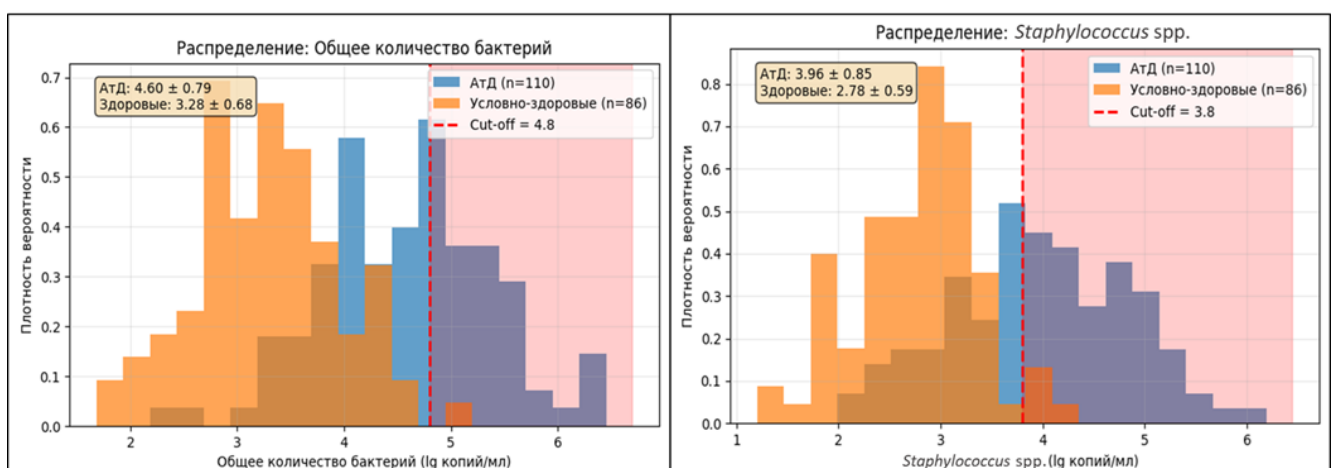


Рисунок 4 – Кумулятивное распределение ОКБ и *Staphylococcus* spp.

Количественный анализ ДНК продемонстрировал достоверные корреляционную связь между тяжестью АтД (SCORAD) и количеством основных бактериальных таксонов на коже для ОКБ ( $p < 0,001$ ), *Staphylococcus* spp. ( $p < 0,001$ ) и *Staphylococcus aureus* ( $p < 0,001$ ). Так, при тяжелом течении АтД определяемая концентрация ОКБ превышала показатели легкой формы в 400 раз, а *S. aureus* в 250 раз (рисунок 5). Однако для *Streptococcus* spp. была выявлена отрицательная корреляция с тяжестью течения заболевания.

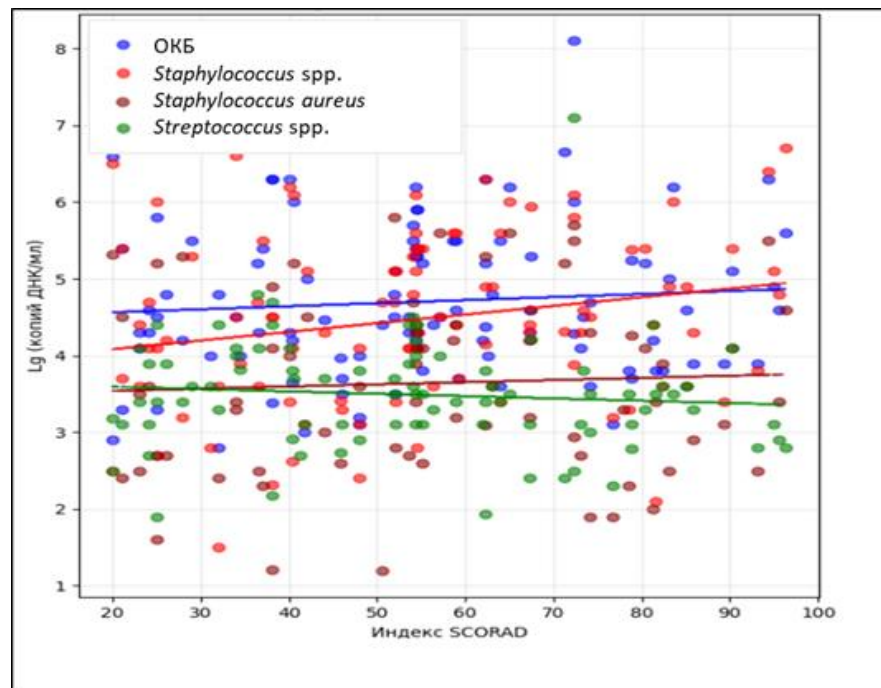


Рисунок 5 – Зависимость бактериальной обсемененности от тяжести АтД

Проведенный корреляционный анализ выявил ряд статистически значимых взаимосвязей между уровнем колонизации *Staphylococcus aureus* и клинико-лабораторными параметрами у пациентов с АтД. Результаты анализа представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Корреляция клинико-лабораторных показателей с колонизацией *Staphylococcus aureus* у пациентов с АтД

Показатель	Единица измерения	Значение в группе АтД (Ме [Q25; Q75])	Коэффициент корреляции Спирмена ( $\rho$ ) с <i>S. aureus</i>	$p$ -value
SCORAD	индекс	48,0 [34,0; 67,5]	0,89	<0,001
Общий IgE	МЕ/мл	357,0 [104,5; 731,0]	0,78	<0,001
Эозинофилы	$10^9$ /л	0,31 [0,17; 0,47]	0,71	<0,001
СОЭ	мм/ч	4,0 [2,0; 6,0]	0,41	<0,001
Лейкоциты	$10^9$ /л	6,50 [5,55; 6,95]	0,17	0,08
Лимфоциты	$10^9$ /л	1,80 [1,50; 2,00]	0,05	0,61
Нейтрофилы	$10^9$ /л	3,70 [2,70; 4,30]	0,12	0,21
Моноциты	$10^9$ /л	0,55 [0,45; 0,60]	0,09	0,35
Тромбоциты	$10^9$ /л	262,0 [223,0; 303,0]	0,14	0,14
Возраст	лет	29,0 [21,0; 41,0]	0,16	0,10

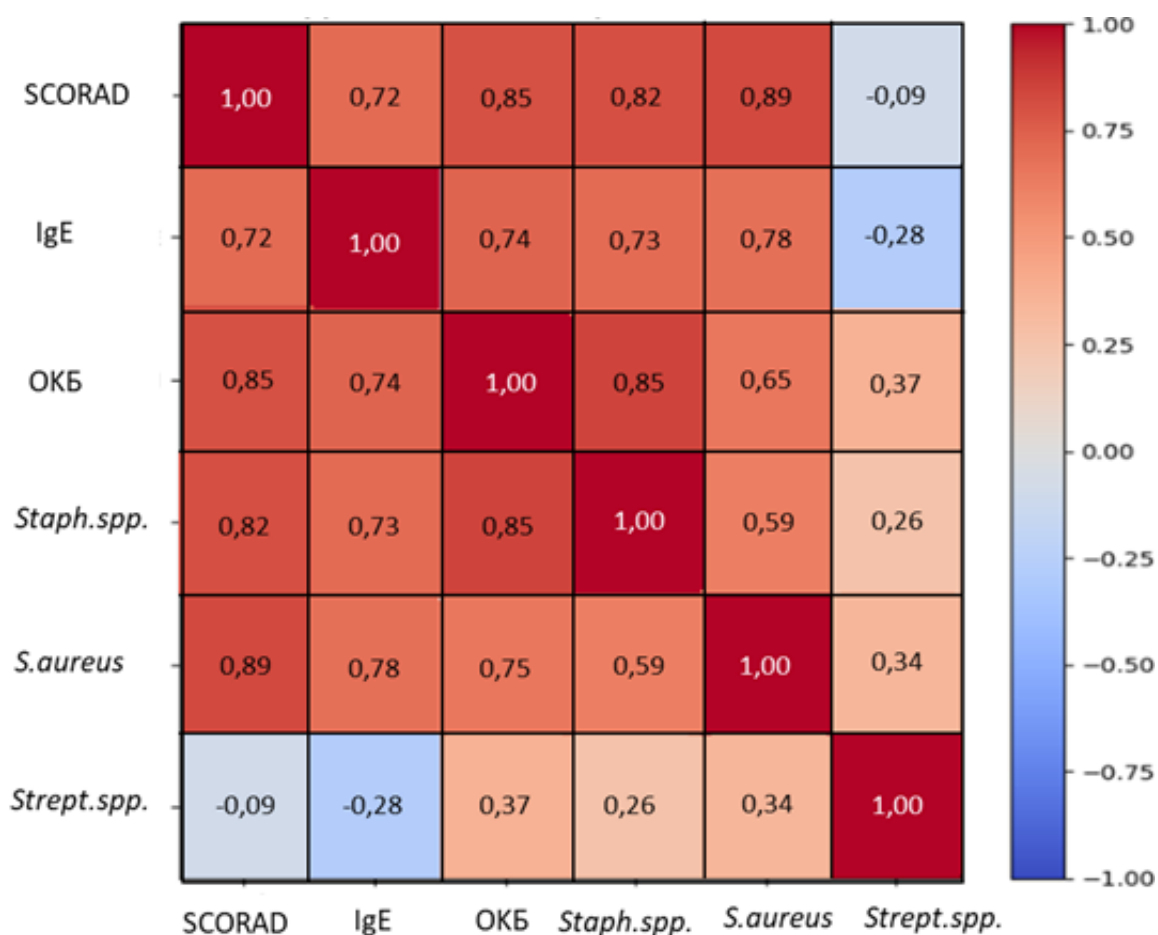
Была обнаружена сильная положительная корреляция ( $\rho = 0,89$ ,  $p < 0,001$ ) между концентрацией *S. aureus* и индексом SCORAD. Аналогичным образом, уровень *S. aureus* продемонстрировал сильную положительную корреляцию с ключевыми маркерами Th2-опосредованного иммунного ответа. Наблюдалась тесная связь с концентрацией общего IgE ( $\rho = 0,78$ ,  $p < 0,001$ ), медианное значение которого в группе пациентов составило 357,0 [104,5; 731,0] МЕ/мл, а также с

абсолютным числом эозинофилов в периферической крови ( $\rho = 0,71, p < 0,001$ ), чей медианный уровень был равен  $0,31 [0,17; 0,47] \times 10^9/\text{л}$ .

Кроме того, была установлена умеренная, но статистически значимая положительная корреляция ( $\rho = 0,45, p < 0,001$ ) между количеством *S. aureus* и скоростью оседания эритроцитов (СОЭ), медиана которой в исследуемой группе достигала  $4,0 [2,0; 6,0]$  мм/ч. Это свидетельствует о вкладе стафилококковой колонизации в системный воспалительный ответ.

В то же время, анализ не выявил статистически значимых корреляций уровня *S. aureus* с общим количеством лейкоцитов ( $\rho = 0,17, p = 0,08$ ), лимфоцитов ( $\rho = 0,05, p = 0,61$ ), нейтрофилов ( $\rho = 0,12, p = 0,21$ ), моноцитов ( $\rho = 0,09, p = 0,35$ ) и тромбоцитов ( $\rho = 0,14, p = 0,14$ ). Медианные значения этих показателей в группе пациентов оставались в пределах референсных интервалов: лейкоциты –  $6,50 [5,55; 6,95] \times 10^9/\text{л}$ , лимфоциты –  $1,80 [1,50; 2,00] \times 10^9/\text{л}$ , нейтрофилы –  $3,70 [2,70; 4,30] \times 10^9/\text{л}$ , моноциты –  $0,55 [0,45; 0,60] \times 10^9/\text{л}$ , тромбоциты –  $262,0 [223,0; 303,0] \times 10^9/\text{л}$ . Также не была подтверждена значимая корреляционная связь с возрастом пациентов ( $\rho = 0,16, p = 0,10$ ), медиана которого составила  $29,0 [21,0; 41,0]$  лет.

Корреляционный анализ выявил статистически значимые взаимосвязи и между другими изучаемыми параметрами (рисунок 6). С помощью анализа корреляционных взаимосвязей выявили статистически значимые положительные связи между тяжестью АД, концентрацией IgE и микроорганизмами (рисунок 6). Была обнаружена сильная положительная корреляционная связь между уровнем общего IgE и индексом SCORAD ( $p < 0,001$ ), что подтверждает его роль как ключевого иммунологического маркера тяжести заболевания (рисунок 6). Также была обнаружена корреляционная связь между ОКБ и концентрацией IgE ( $p < 0,001$ ) и индексом SCORAD ( $p < 0,001$ ). Между *Streptococcus* spp. и уровнем общего IgE и индексом SCORAD корреляционная связь была отрицательная.



\*Примечание: красный цвет - сильная положительная корреляция (близко к +1); белый/светлый цвет - слабая или отсутствующая корреляция (близко к 0); синий цвет - сильная отрицательная корреляция (близко к -1)

Рисунок 6 – Корреляционная матрица показателей у пациентов с АтД

### 3.4.2. Количественный анализ грибковой колонизации

Анализ результатов, направленный на изучение роли дрожжеподобных грибов рода *Candida* в патогенезе АтД, выявил комплексную и неоднозначную картину. Прежде всего, было установлено, что частота выявления данных грибов в группе пациентов с АтД статистически значимо превышала таковую в группе условно-здоровых лиц. Если в группе условно-здоровых ДНК *Candida spp.* определялась лишь в 8,1% случаев (7 из 86 человек), то среди пациентов с АтД этот

показатель был в 4-е раза выше и составлял 32,7% (36 из 110 человек) ( $p < 0,001$ ) (таблица 10). Однако последующий количественный анализ уровня колонизации, выраженного в lg копий ДНК/мл, не показал различимого результата. Среди тех индивидов, у которых факт колонизации был установлен, медианная концентрация *Candida* spp. в группе АтД (Me = 2,10 lg) не имела достоверных отличий от аналогичного показателя в группе сравнения (Me = 2,05 lg) ( $p = 0,69$ ). Так наблюдали, что у пациентов с АтД большая распространенность носительства грибами рода *Candida*, но количественная нагрузка не превышает таковую у группы условно-здоровых лиц (таблица 11). Относительно видового состава, статистический анализ выявил значимые различия для одного из видов. *Debaryomyces hansenii* (ранее *Candida famata*) был выявлен с достоверно более высокой частотой в группе АтД (19,1%; 21 из 110 пациентов) по сравнению с группой здоровых лиц (7,0%; 6 из 86 человек) ( $p = 0,02$ ). При этом у тех пациентов, у которых данный вид был обнаружен, количественная нагрузка статистически не различалась между группами ( $p = 0,58$ ). Для других видов значимых различий выявлено не было. Виды *Nakaseomyces glabratus* (ранее *Candida glabrata*), *Pichia kudriavzevii* (ранее *Candida kruzei*) и *Candida tropicalis* не были обнаружены ни у одного из участников исследования двух групп. Таким образом, наряду с общим увеличением частоты носительства *Candida* spp., для АтД характерна специфически более высокая частота колонизации именно видом *Debaryomyces hansenii* (ранее *Candida famata*) (таблица 10).

Исследование дрожжей рода *Malassezia*, являющихся постоянными комменсалами кожи человека, выявило некоторые различия между группами. Для *Malassezia* spp. были зафиксированы статистически значимые различия по качественному выявлению (таблица 10). Качественный анализ показал, что данные микроорганизмы практически повсеместно обнаруживались у пациентов с АтД. Их частота выявления в этой группе достигала 90,9% (100 из 110 пациентов), что было достоверно выше, чем в группе здоровых, где этот показатель составлял 80,2% (69 из 86 человек) ( $p = 0,04$ ) (таблица 10).

Изучение видового состава также выявило статистически значимую динамику. В то время как частота выявления и уровень колонизации таких видов, как *M. globosa* и *M. restricta*, оставались сопоставимыми между группами, вид *M. sympodialis* продемонстрировал противоположную тенденцию. Его частота выявления была достоверно снижена в группе АтД (15,5%) по сравнению с группой здоровых лиц (27,9%) ( $p = 0,04$ ) (таблица 10). Это указывает на то, что при АтД происходит не просто увеличение количественной нагрузки *Malassezia*, но и качественная перестройка видовой структуры микобиоты кожи. В двух исследуемых нами группах дерматофитные грибы не были выявлены.

Таблица 10 – Сравнительный анализ частоты выявления грибов на коже у пациентов с АтД и условно-здоровых лиц

Показатель	Группа условно-здоровых лиц Частота, n/N (%)	Группа пациентов с АтД Частота, n/N (%)	p-value (Частота)
<i>Candida spp.</i>	7/86 (8,1%)	36/110 (32,7%)	<0,001
<i>C. albicans</i>	2/86 (2,3%)	4/110 (3,6%)	0,69
<i>C. parapsilosis</i>	4/86 (4,7%)	10/110 (9,1%)	0,27
<i>Debaryomyces hansenii</i> ( <i>C. famata</i> )	6/86 (7,0%)	21/110 (19,1%)	0,02
<i>Nakaseomyces glabratus</i> ( <i>C. glabrata</i> )	0/86 (0%)	0/110 (0%)	–
<i>Pichia kudriavzevii</i> ( <i>C. kruzei</i> )	0/86 (0%)	0/110 (0%)	–
<i>C. tropicalis</i>	0/86 (0%)	0/110 (0%)	–

Продолжение таблицы 10

Показатель	Группа условно-здоровых лиц Частота, n/N (%)	Группа пациентов с АтД Частота, n/N (%)	p-value (Частота)
<i>Malassezia</i> spp.	69/86 (80,2%)	100/110 (90,9%)	0,04
<i>M. globosa</i>	48/86 (55,8%)	56/110 (50,9%)	0,51
<i>M. restricta</i>	53/86 (61,6%)	60/110 (54,5%)	0,33
<i>M. sympodialis</i>	24/86 (27,9%)	17/110 (15,5%)	0,04
<i>Trichophyton</i> spp.	0/86 (0%)	0/110 (0%)	–
<i>T. rubrum</i>	0/86 (0%)	0/110 (0%)	–
<i>T. tonsurans</i>	0/86 (0%)	0/110 (0%)	–
<i>T. ment. var. indotineae</i>	0/86 (0%)	0/110 (0%)	–
<i>Microsporum</i> spp.	0/86 (0%)	0/110 (0%)	–
<i>M. canis</i>	0/86 (0%)	0/110 (0%)	–
<i>E. floccosum</i>	0/86 (0%)	0/110 (0%)	–
<i>Nannizzia</i> spp.	0/86 (0%)	0/110 (0%)	–

Количественный анализ позволил оценить уровень грибковой нагрузки у колонизированных лиц. Медианное значение плотности колонизации *Malassezia* spp. в группе пациентов с АтД составило 2,90 lg [2,40; 3,60] (n=100), тогда как в контрольной группе этот показатель был равен 2,48 lg [2,07; 3,01] (n = 69). Однако, проведённый сравнительный анализ не выявил статистически значимых различий между группами по данному параметру ( $p = 0,12$ ) (таблица 11). В то же время, подтверждённый факт более высокой частоты носительства *Malassezia* у пациентов

с АтД позволяет считать, что микробиота кожи при данном иммунозависимом заболевании характеризуется увеличением доли лиц, колонизированных дрожжевыми грибами, при этом значимого усиления плотности уже существующего грибкового пула обнаружено не было. Для других анализируемых видов грибов статистически значимых различий в концентрации между группами также выявлено не было (таблица 11).

Таблица 11 – Сравнительный анализ грибковой колонизации кожи у пациентов с АтД и здоровых лиц

Показатель	Группа условно-здоровых лиц lg коп. ДНК/мл., Me [Q25; Q75]	Группа пациентов с АтД lg коп. ДНК/мл., Me [Q25; Q75]	<i>p</i> -value (lg коп. ДНК/мл)
<i>Candida</i> spp.	2,05 [1,70; 2,40] (n=7)	2,10 [1,55; 2,58] (n=36)	0,69
<i>C. albicans</i>	2,50 [2,50; 2,50] (n=2)	1,95 [1,40; 2,50] (n=4)	0,38
<i>C. parapsilosis</i>	1,60 [1,15; 1,98] (n=4)	1,95 [1,59; 2,49] (n=10)	0,46
<i>Debaryomyces hansenii</i> ( <i>C. famata</i> )	2,00 [1,80; 2,20] (n=6)	1,80 [1,50; 2,40] (n=21)	0,58
<i>Malassezia</i> spp.	2,48 [2,07; 3,01] (n=69)	2,90 [2,40; 3,60] (n=100)	0,12
<i>M. globosa</i>	2,53 [2,06; 3,24] (n=48)	2,76 [2,18; 3,38] (n=56)	0,31

## Продолжение таблицы 11

Показатель	Группа условно-здоровых лиц lg коп. ДНК/мл., Me [Q25; Q75]	Группа пациентов с АтД lg коп. ДНК/мл., Me [Q25; Q75]	p-value (lg коп. ДНК/мл)
<i>M. restricta</i>	2,59 [2,24; 3,06] (n=53)	2,71 [2,21; 3,29] (n=60)	0,28
<i>M. sympodialis</i>	2,41 [1,92; 2,68] (n=24)	2,29 [1,97; 3,00] (n=17)	0,60

При последующем разделении группы АтД относительно степени тяжести заболевания анализ распределения данных демонстрирует четкую градиентную зависимость колонизации *Malassezia* spp. Для общего показателя *Malassezia* spp. медианный уровень был наиболее высоким в группе пациентов с тяжелым течением АтД и составил 3,8 lg копий ДНК/мл. Данное значение было достоверно выше, чем в группе пациентов с легким/среднетяжелым течением АтД (медиана 2,9 lg копий ДНК/мл,  $p < 0,001$ ) и в группе условно-здоровых лиц (медиана 2,5 lg копий ДНК/мл,  $p < 0,001$ ). Различия между группой пациентов с легкой/ среднетяжелым АтД и условно-здоровыми лицами также достигли статистической значимости ( $p < 0,01$ ) (рисунок 7).

Аналогичная зависимость наблюдалась для вида *Malassezia globosa*. Наибольший уровень колонизации отмечался в группе тяжелого АтД (медиана 3,2 lg копий ДНК/мл). Он был статистически значимо выше по сравнению с группой легкого/среднетяжелого АтД (медиана 2,3 lg копий ДНК/мл;  $p < 0,05$ ). Наиболее выраженные различия были выявлены между группой условно-здоровых лиц (медиана 2,2 lg копий ДНК/мл) и группой тяжелого АтД ( $p < 0,001$ ) (рисунок 7).

В отличие от этого, для видов *Malassezia restricta* и *Malassezia sympodialis* значимых различий между группами выявлено не было. Уровень колонизации *M. restricta* был схожим у пациентов с тяжелой формой АтД (медиана 2,5 lg копий ДНК/мл), легкой/среднетяжелой тяжести (2,4 lg копий ДНК/мл) и условно-здоровыми лицами (2,4 lg копий ДНК/мл). Колонизация *M. sympodialis* во всех трех группах также была сравнительно низкой и статистически не различалась (рисунок 7).

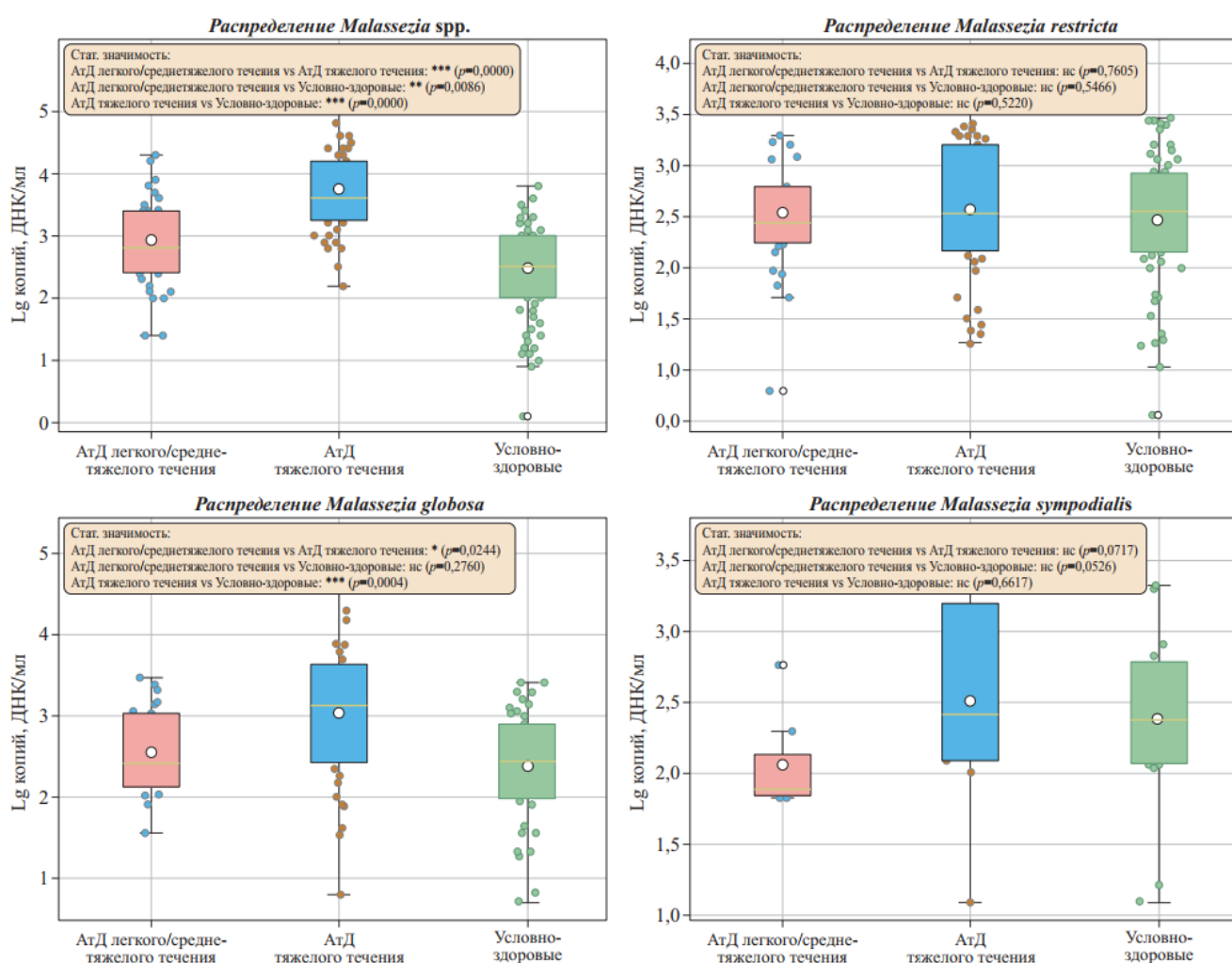


Рисунок 7 – Количественное распределение *Malassezia* в группах

Статистический анализ показал наличие прямой зависимости между количеством грибов рода *Malassezia* и тяжестью заболевания. Была обнаружена статистически значимая положительная корреляция между общим уровнем колонизации *Malassezia* spp. и степенью тяжести АтД, оцениваемой по шкале

SCORAD ( $p < 0,001$ ). Эта связь была наиболее выраженной в подгруппе пациентов с тяжелым течением болезни, где наблюдался четкий линейный рост содержания *Malassezia* spp. параллельно с увеличением значений индекса SCORAD (рисунок 8). В то же время для отдельных исследованных видов: *Malassezia globosa*, *Malassezia restricta* и *Malassezia sympodialis* — значимой корреляционной связи с показателем SCORAD установить не удалось ( $p > 0,05$  для всех видов) (рисунок 8). Статистически значимой корреляции между уровнем колонизации как общим для *Malassezia* spp., так и для отдельных видов и концентрацией общего IgE в сыворотке крови выявлено не было ( $p > 0,05$ ) для всех анализируемых показателей (рисунок 8).

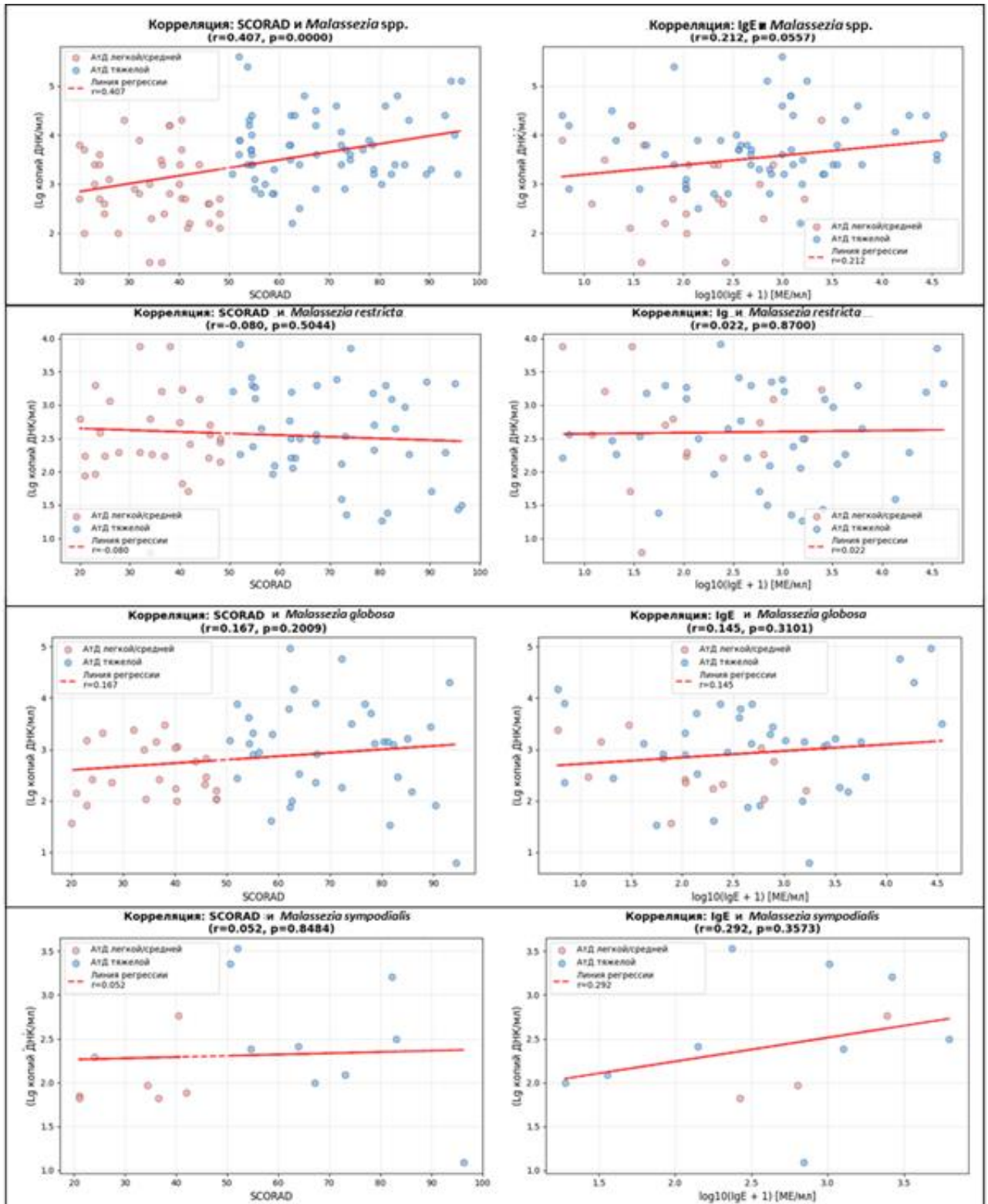
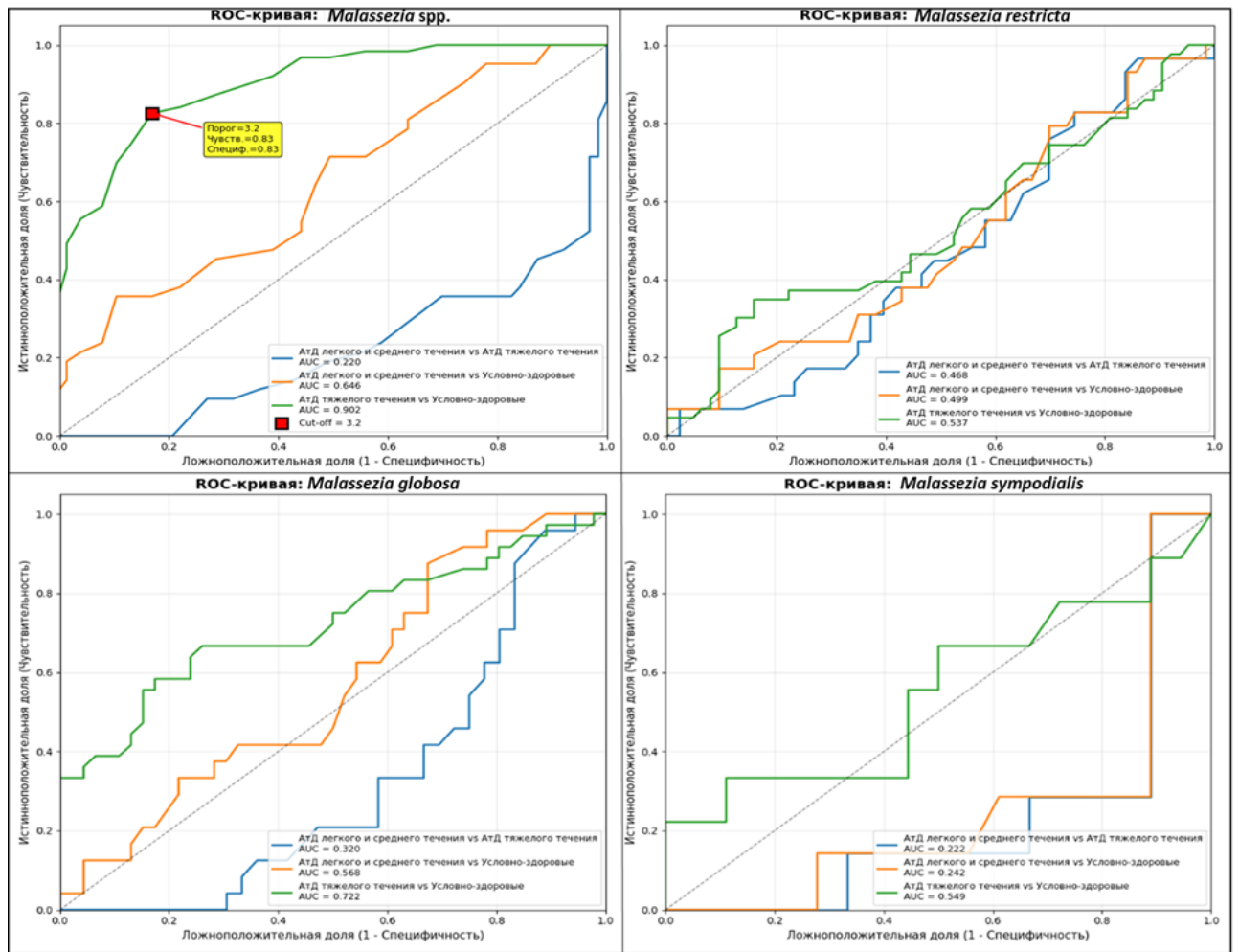


Рисунок 8 – Корреляционная зависимость уровня колонизации *Malassezia* spp. и ее видов от тяжести АтД (по SCORAD) и IgE

Результаты ROC-анализа подтвердили различную диагностическую значимость изучаемых параметров. Наибольшей ценностью для дифференциации

осложненной формы АтД обладал общий анализ *Malassezia* spp. При сравнении пациентов с тяжелым АтД и условно-здоровых лиц площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,9, что свидетельствует об отличной диагностической точности. Пороговое значение (cut-off) был определен, как 3,2 lg при этом достигается высокая диагностическая эффективность с чувствительностью 83% и специфичностью 83%. Однако анализ *Malassezia* spp. оказался непригодным для различения легкого/среднетяжелого и тяжелого течения АтД (AUC = 0,2) (рисунок 9). Вид *Malassezia globosa* показал умеренную диагностическую эффективность. Наибольшее значение AUC (0,7) было получено при дифференциации АтД тяжелой степени тяжести от группы условно-здоровых лиц. (рисунок 9). Виды *Malassezia restricta* и *Malassezia sympodialis* продемонстрировали ограниченную диагностическую ценность, о чем свидетельствуют низкие значения площади под ROC-кривой при сравнении всех исследуемых групп (рисунок 9).

Рисунок 9 – ROC-анализ *Malassezia* и ее видов

Для дифференциальной диагностики АтД тяжелого течения, осложненного *Malassezia*, от здоровой колонизации *Malassezia* оптимальным диагностическим порогом является уровень 3,2 lg копий ДНК/мл (рисунок 10). Для унификации диагностических критериев и с учетом аналитической погрешности метода ПЦР целесообразно округление расчетных порогов до целых чисел. Порог 3,0 lg копий ДНК/мл для *Malassezia* spp. позволит надежно дифференцировать тяжелое АтД, осложненное инфекцией от нормального носительства.

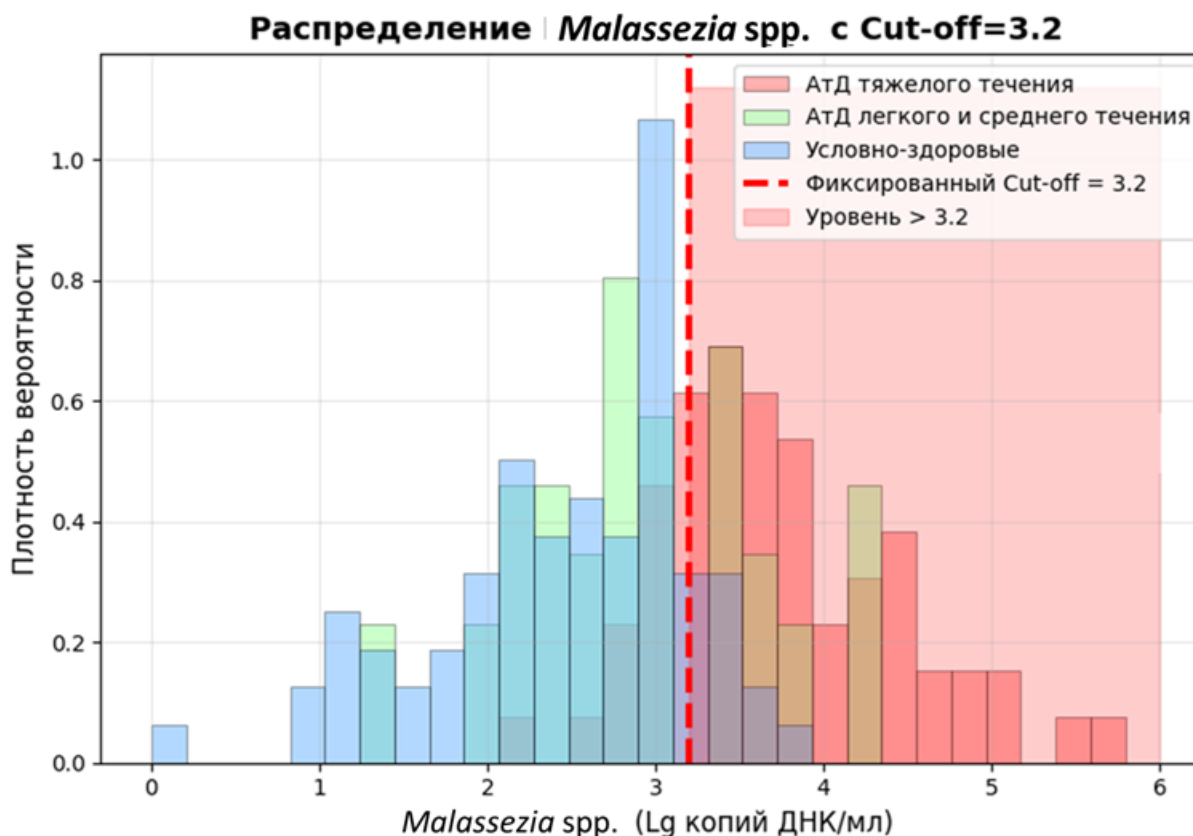


Рисунок 10 – Распределение *Malassezia* spp. с cut-off линией

### 3.5. Сравнительный анализ микробной колонизации методом культурального исследования и количественной ПЦР

В рамках исследования была проведена параллельная оценка состояния микробиоты кожи с помощью двух независимых методов: традиционного культурального исследования (посева) и разработанного метода количественной ПЦР в реальном времени.

Данные, полученные при исследовании бактериального компонента микробиоты, в целом демонстрировали согласованность между методами в качественной оценке. Как культуральный метод, так и ПЦР однозначно подтвердили доминирующую роль стафилококков в микробном пейзаже кожи пациентов с АтД. Результаты культурального исследования показали, что

*Staphylococcus aureus* выделялся у 51,8% (57 из 110) пациентов с АтД, что было достоверно выше, чем в группе условно-здоровых лиц (10,5%, 9 из 86,  $p < 0,0001$ ) (рисунок 11). Частота выявления коагулазонегативных стафилококков (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*) также была значимо повышена в группе пациентов с АтД (таблица 13). Однако в ПЦР панель эти бактерии включены не были.

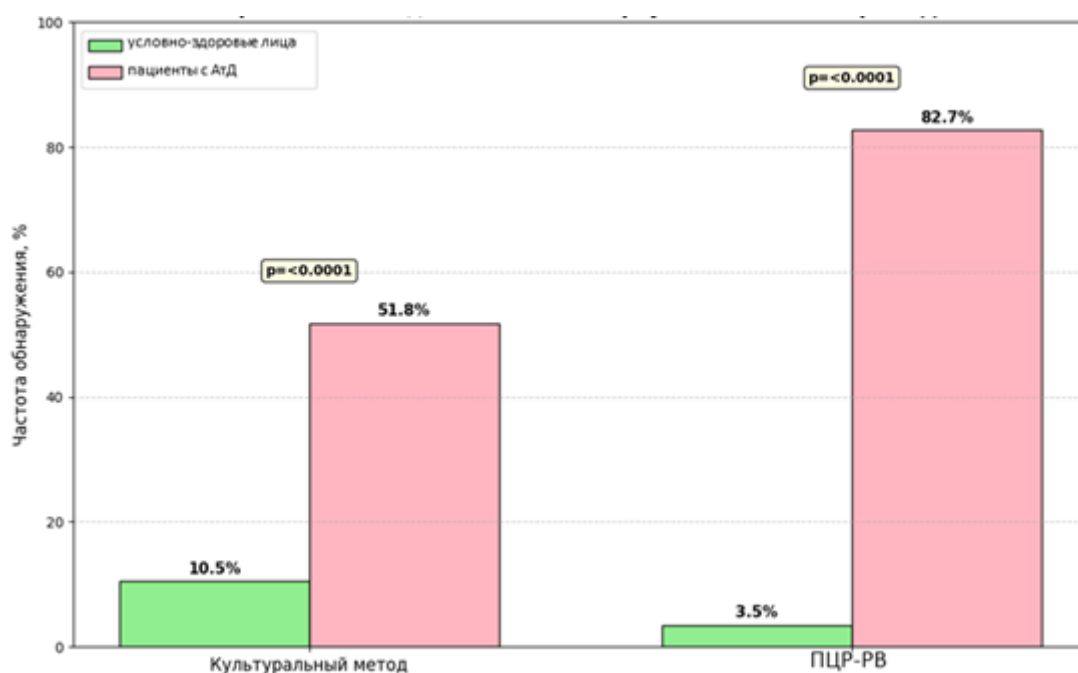


Рисунок 11 – Сравнение методов ПЦР и посева для выявления *S. aureus* у сравниваемых групп

Наиболее выраженные и принципиальные расхождения между методами были получены при оценке грибкового компонента микробиоты, особенно в отношении дрожжей рода *Malassezia*. Культуральным методом эти микроорганизмы были выделены лишь у 2,7% пациентов с АтД против 22,1% в группе сравнения ( $p < 0,0001$ ) (таблица 12), что противоречило результату ПЦР. ПЦР показал, что *Malassezia* spp. может обнаруживаться как у условно-здоровых лиц (80,2%), так и у пациентов с АтД (90,9%).

Частота выявления *Candida* spp. культуральным методом была низкой и сопоставимой у пациентов с АтД так и в группе сравнения (таблица 12). ПЦР выявила более высокую частоту носительства у пациентов с АтД относительно контрольной группы (32,7% против 8,1%) (таблица 10).

Таблица 12 – Сравнительная характеристика микробной колонизации кожи у пациентов с АтД и здоровых лиц по данным культурального исследования

Микроорганизм	Группа пациентов с АтД (n=110)	Группа условно-здоровых лиц (n=86)	<i>p</i> -value
<i>S. aureus</i>	57 (51,8%)	9 (10,5%)	<0,0001
<i>S. epidermidis</i>	43 (39,1%)	12 (14,0%)	<0,0001
<i>S. haemolyticus</i>	38 (34,5%)	13 (15,1%)	0,002
<i>Candida</i> spp.	5 (4,5%)	6 (7,0%)	0,62
<i>Malassezia</i> spp.	3 (2,7%)	19 (22,1%)	<0,0001

На рисунке 12 представлена сравнительная гистограмма, иллюстрирующая частоту обнаружения дрожжевых грибов *Candida* spp. и *Malassezia* spp. в группе пациентов с АтД с использованием двух независимых лабораторных методов: ПЦР-РВ и культурального метода (посева).

Анализ выявляет принципиально различные картины, получаемые при применении двух методик. Для *Candida* spp. наблюдается статистически незначимая разница ( $p = 0,62$ ). Метод ПЦР регистрирует наличие ДНК этих грибов в 32,7% проб, тогда как культуральный метод позволяет вырастить живые культуры лишь в 4,5% случаев (рисунок 12).

Наиболее значительное расхождение фиксируется для рода *Malassezia*. Метод ПЦР-РВ детектирует ДНК этих липофильных дрожжей в 90,9% проб, что свидетельствует об их практически универсальном присутствии в микробиоме кожи пациентов с АтД. Культуральный метод выявляет *Malassezia* лишь в 2,7% случаев. Данное расхождение является статистически достоверным ( $p < 0,001$ ) (рисунок 12).

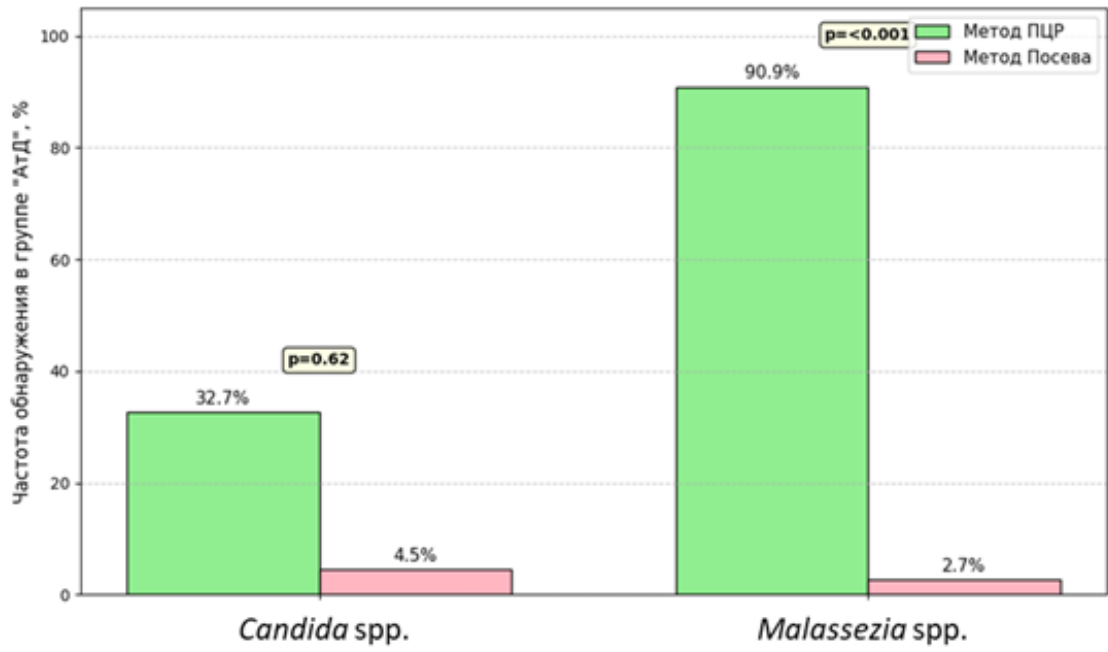


Рисунок 12 – Сравнение методов ПЦР и посева для выявления *Candida* spp и *Malassezia* spp. у пациентов с АД

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Интегративная модель иммунопатогенеза АтД, ассоциированного с микробным дисбиозом

Проведенное исследование выявило системные нарушения микробного сообщества кожи у пациентов с АтД, затрагивающие как бактериальный, так и грибковый компоненты микробиома. Полученные количественные данные позволяют не только констатировать наличие дисбиоза, но и впервые в российской популяции установить прямые корреляции между уровнем колонизации ключевыми патогенами и активностью иммунопатологического процесса, что выводит понимание роли микробиоты на новый уровень — от пассивного маркера к активному участнику иммунной дисрегуляции.

#### 4.1.1. Специфический характер бактериального дисбиоза

Результаты исследования демонстрируют четкие патогенетические взаимосвязи между микробным дисбиозом и иммунологическими нарушениями. Выявлено, что бактериальная обсемененность кожи преимущественно определяется стафилококковой флорой, что подчеркивает значимость микробного дисбиоза в поддержании воспалительного процесса. Анализ бактерий микробиома продемонстрировал выраженный дисбаланс, характеризующийся избирательным доминированием *Staphylococcus aureus*. Выявленное 100-кратное увеличение концентрации этого микроорганизма между группой пациентов с АтД и условно-здоровыми лицами согласуется с современными представлениями о ключевой роли *S. aureus* в патогенезе заболевания [29, 53, 60, 72]. Особую значимость этому наблюдению придает тот факт, что увеличение концентрации носило

избирательный характер, в то время как стафилококковая нагрузка увеличивалась на два порядка, количественная нагрузка *Streptococcus* spp. оставалась на сопоставимом уровне в обеих группах. Следует отметить, что анализ микробного профиля пациентов выявил значительную межиндивидуальную вариабельность соотношения *S. aureus* к ОКБ. При этом прогностическая ценность абсолютной концентрации *S. aureus* оказалась более значимой для оценки тяжести течения заболевания, чем его относительная доля в микробном сообществе. Это свидетельствует о специфическом характере микробного дисбаланса при АД, а не о генерализованном увеличении бактериальной обсемененности.

Механизмы этого влияния многообразны и изучены в экспериментальных моделях. *S. aureus* секретирует целый ряд факторов вирулентности, которые напрямую модулируют иммунный ответ хозяина:

1. Суперантигены (энтеротоксины SEA, SEB, TSST-1). Эти молекулы способны связываться с V $\beta$ -цепью T-клеточного рецептора и молекулой МНС II класса на антигенпрезентирующих клетках вне антигенсвязывающей щели, вызывая поликлональную активацию огромного пула T-клеток, включая Th2 [103]. Это приводит к "цитокиновому шторму" с гиперпродукцией IL-4, IL-5 и IL-13, что клинически проявляется ростом уровня IgE и эозинофилией. К сожалению, в рамках данной работы не проводили типирование выделенных штаммов *S. aureus* на наличие генов суперантигенов, однако высокая корреляция с IgE косвенно свидетельствует в пользу их участия.

2. PAMPs и активация TLR. Компоненты клеточной стенки *S. aureus* (липотейхоевая кислота, пептидогликан) распознаются TLR2 на кератиноцитах и дендритных клетках. Активация TLR2 на кератиноцитах, в свою очередь, индуцирует продукцию TSLP — регулятора Th2-иммунного ответа [45,87,141]. TSLP не только способствует созреванию дендритных клеток, поляризующих Th2-лимфоциты, но и напрямую активирует сенсорные нейроны, усиливая зуд и тем самым замыкая порочный круг воспаления [139].

3. Повреждение барьера. Токсины *S. aureus* ( $\alpha$ -токсин,  $\delta$ -токсин) вызывают апоптоз и некроз кератиноцитов, напрямую разрушая эпидермальный

барьер [30, 103]. Это облегчает проникновение аллергенов и самого *S. aureus* в более глубокие слои кожи, усиливая антигенную стимуляцию.

Отсутствие значимых корреляций *S. aureus* с уровнем нейтрофилов и лейкоцитов периферической крови подчеркивает, что наблюдаемый процесс является не столько острой инфекцией, сколько хроническим иммуноопосредованным воспалением с доминированием Th2, а не Th1/Th17-зависимого антимикробного ответа. Полученные данные согласуются с работой Byrd A.L. и соавт. [37], показавшей, что при АД штаммы *S. aureus* обладают специфическими патогенными свойствами, индуцирующими Th2-иммунный ответ через клетки Лангерганса.

Интересной находкой стала отрицательная корреляция *Streptococcus* spp. с тяжестью заболевания и уровнем IgE. Можно предположить, что представители этого рода, являясь частью нормальной комменсальной флоры, вступают в конкурентные отношения с *S. aureus* или, возможно, их метаболиты или компоненты клеточной стенки способствуют индукции регуляторных Т-клеток (Treg) или Th1, которые могут подавлять Th2-поляризацию. Это наблюдение требует дальнейшего изучения с использованием метагеномного секвенирования для точной идентификации видов стрептококков и их функционального потенциала.

Результаты исследования подтверждают, что количественная оценка *S. aureus* на коже может служить ценным объективным биомаркером тяжести АД и активности Th2 и ключевым аспектом работы воспаления, наряду с определением уровня общего IgE и эозинофилов. Количественные параметры бактериальной нагрузки, установленные в исследовании, обладают значительным клиническим потенциалом. В частности, пороговое значение *S. aureus* > 4,0 lg копий/мл может рассматриваться в качестве объективного критерия для назначения целенаправленной антистафилококковой терапии. Порог 5,0 lg копий ДНК/мл для общего количества бактерий позволит дифференцировать патологическое инфекционное состояние от бессимптомного носительства при

АтД. Аналогично, значения для *Staphylococcus* spp. (4,0 lg) могут обеспечить объективные и практичные критерии для интерпретации результатов.

#### 4.1.2. Специфический характер грибкового дисбиоза

Проведенное исследование позволило выявить специфические особенности грибкового микобиома кожи у пациентов с АтД, которые вносят вклад в понимание патогенеза данного заболевания. Известно, что у больных АтД часто наблюдается гиперчувствительность к аллергенам *Malassezia*, а различные виды этого рода способны индуцировать Th2-опосредованный иммунный ответ с выработкой ключевых для АтД провоспалительных цитокинов, таких как IL-4, IL-13 и IL-17 [61, 115]. Полученные нами данные о значимо более высокой частоте и тенденции к увеличению количественной нагрузки *Malassezia* spp. у пациентов с АтД находятся в русле современных исследований и согласуются с работой Yoojeong Choi и соавт. [40], также продемонстрировавшей увеличение колонизации данным родом дрожжей при АтД. Данные подтвердили, что общая колонизация *Malassezia* spp. служит значимым маркером, тесно связанным с тяжестью АтД. Достоверное увеличение концентрации у пациентов с тяжёлым АтД (3,2 lg) подкрепляет теорию о патогенной роли этих липофильных дрожжей при данном заболевании [134]. Наиболее убедительным доказательством этой связи стала выявленная сильная положительная корреляция ( $p < 0,001$ ) между количеством *Malassezia* spp. и объективным клиническим индексом SCORAD, особенно в подгруппе с тяжёлым течением. Этот факт позволяет рассматривать грибковую нагрузку не как сопутствующий феномен, а как потенциальный патогенетический фактор, отягощающий воспаление. Полученные результаты согласуются с литературными данными о способности *Malassezia* выступать в роли аллергена, запускать Th2-иммунный ответ и вырабатывать липолитические ферменты, повреждающие эпидермальный барьер, что особенно критично на фоне уже

имеющегося дефекта кожи у пациентов с АтД [59]. Однако отсутствие статистически значимой корреляции между уровнем *Malassezia* (общим и видовым) и концентрацией общего IgE в сыворотке может указывать на то, что патогенное влияние грибов при АтД может реализоваться не преимущественно через IgE-опосредованную гиперчувствительность I типа, а через альтернативные механизмы. Так распознавание  $\beta$ -глюканов клеточной стенки *Malassezia* рецептором дектин-1 на дендритных клетках и макрофагах ведет к активации Th17- и Th22-путей [107]. Цитокины IL-17 и IL-22 играют важную роль в поддержании хронического воспаления и гиперплазии эпидермиса при АтД, особенно у пациентов азиатского происхождения и при хронических формах заболевания [35,105]. Также *Malassezia* может активировать инфламмасому NLRP3 в кератиноцитах и антигенпрезентирующих клетках через Syk-киназный сигналинг, что ведет к продукции мощных провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-18, способствующих поддержанию воспаления и зуда независимо от адаптивного Th2-иммунного ответа [81,127]. Липазы и фосфолипазы, вырабатываемые грибами рода *Malassezia* для утилизации кожного сала, могут напрямую повреждать липидный слой эпидермиса и мембраны кератиноцитов, усугубляя дисфункцию барьера, что само по себе является триггером воспаления. Данное наблюдение согласуется с современными представлениями о гетерогенности иммунных эндотипов АтД.

Ключевым аспектом работы стал дифференцированный анализ отдельных видов грибов, выявивший их неодинаковое клиническое значение. Уровень колонизации *Malassezia globosa* продемонстрировал схожую с *Malassezia* spp., но менее выраженную динамику. Уровень был статистически значимо выше при тяжёлом течении АтД по сравнению с другими группами, что коррелирует с данными о высокой иммуногенности этого вида и его частой ассоциацией с поражениями кожи туловища и головы [59, 61, 66, 70]. Однако отсутствие прямой корреляции с индексом SCORAD может говорить об опосредованном вкладе или зависимости от дополнительных факторов, например, локализации высыпаний. Уровни колонизации *Malassezia restricta* и *Malassezia sympodialis* не показали статистически значимых различий между группами. Этот результат важен для

интерпретации. Так вид *M. restricta* часто доминирует в микобиоме здоровой кожи головы, а *M. sympodialis* считается частью резидентной флоры [76]. Их относительная стабильность во всех группах позволяет предположить, что они в меньшей степени вовлечены в патогенез тяжёлых форм АтД, а наблюдаемый общий рост колонизации обусловлен в первую очередь видами с более выраженными патогенными свойствами, такими как *M. globosa* и другими представителями рода *Malassezia* [70, 138]. Так же в исследовании было обнаружено достоверное снижение частоты колонизации видом *M. sympodialis* в группе АтД. Этот результат указывает на то, что при АтД происходит не просто увеличение общей массы *Malassezia*, а качественная перестройка видового состава микобиоты.

Относительно дрожжей рода *Candida*, данные демонстрируют двойственную картину. С одной стороны, обнаружили значимое увеличение частоты носительства *Candida* spp. у пациентов с АтД (32,7% против 8,1% в группе условно-здоровых лиц), что согласуется с работами, указывающими на роль этих дрожжей в патогенезе заболевания [75, 125]. Особый интерес представляет вид *Debaryomyces hansenii* (ранее *C. famata*), частота выявления которого была достоверно выше в группе АтД. Этот вид, наряду с другими дрожжами, может участвовать в формировании сенсibilизации и поддерживать воспалительную среду [108, 136]. С другой стороны, количественный анализ показал, что у пациентов с АтД, являющихся носителями, уровень грибковой нагрузки не превышает таковой у здоровых носителей. Это позволяет предположить, что вклад *Candida* в патогенез АтД может быть связан не с чрезмерным колонизационным ростом у отдельных индивидов, а с более широкой распространенностью носительства и, как следствие, с увеличением числа пациентов, иммунная система которых постоянно подвергается воздействию грибковых антигенов.

В исследовании не удалось подтвердить гипотезу о том, что колонизация *Candida* spp. приводит к снижению количества *Malassezia* spp. у пациентов с тяжёлыми формами АтД [56, 75]. Напротив, оба рода демонстрировали выявление

в группе АД, что указывает на возможность их совместного влияния на иммунопатогенез, а не конкуренцию.

Важным результатом явилось полное отсутствие дерматофитных грибов в образцах участников двух групп. Этот факт подтверждает, что выявленные изменения микобиома связаны именно с дисбиозом аутохтонной дрожжевой флоры (*Malassezia*, *Candida*), а не с присоединением патогенных дерматофитов. Последние, как правило, ассоциированы с инфекцией на фоне иммуносупрессии, например, при терапии системными глюкокортикостероидами [57].

Суммируя полученные данные и современные литературные сведения, можно предложить следующую модель, представленную на рисунке 13.

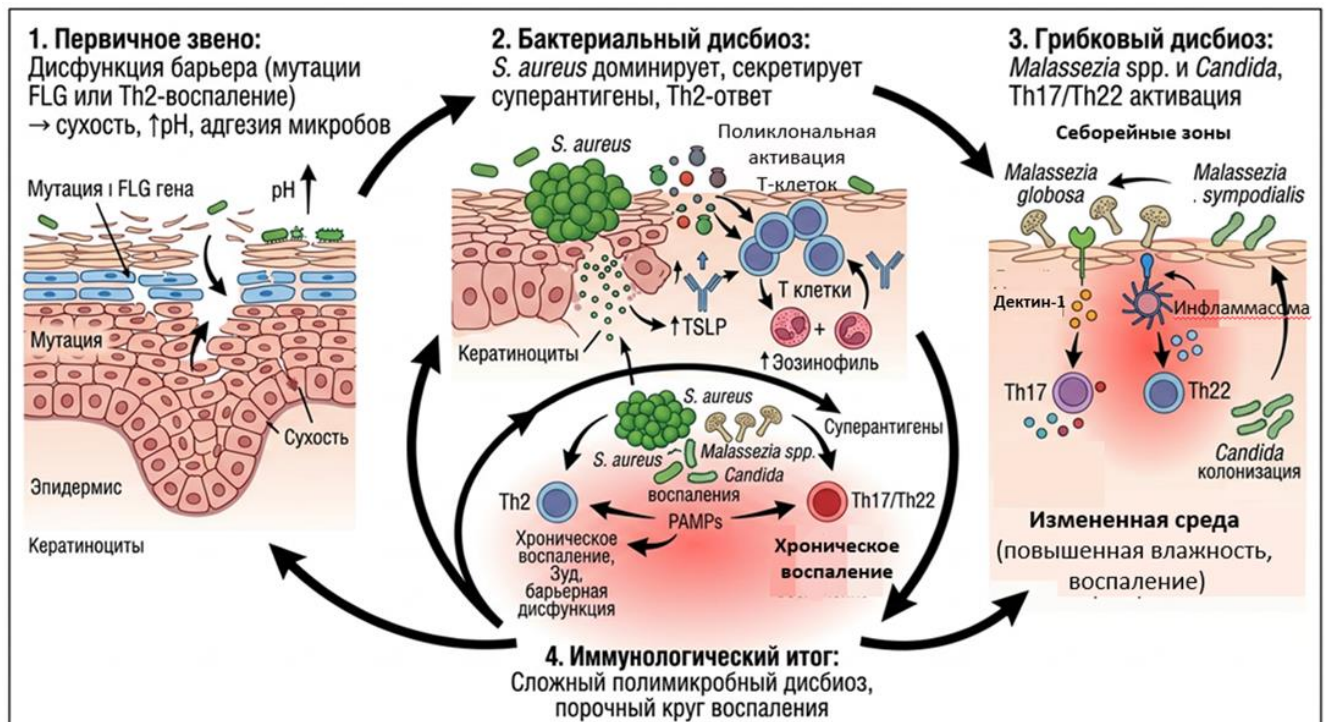


Рисунок 13 – Модель иммунопатогенеза атопического дерматита с полимикробным дисбиозом

#### 4.2. Сравнительный анализ методов ПЦР и культурального исследования в диагностике микроорганизмов

Проведенное исследование позволило всесторонне оценить особенности микробиоты кожи у пациентов с АтД и здоровых лиц с помощью двух принципиально разных методов: количественной ПЦР-РВ и традиционного культурального исследования. ПЦР-диагностика продемонстрировала не только факт наличия, но и значительное количественное увеличение бактериальной нагрузки в группе АтД по сравнению с контролем. Было зафиксировано достоверное ( $p < 0,001$ ) увеличение ОКБ в 32 раза, *Staphylococcus* spp. в 100 раз и *S. aureus* в 100 раз. Более того, количественная оценка ПЦР помогла выявить сильную положительную корреляцию между уровнем колонизации *S. aureus* и тяжестью заболевания (индекс SCORAD), что подтверждает его роль как ведущего патогена. При этом метод позволил дифференцировать динамику для разных родов: в отличие от стафилококков, уровень *Streptococcus* spp. не имел значимых различий между группами.

Культуральное исследование, в свою очередь, подтвердило более высокую частоту выявления *S. aureus* и коагулазо-негативных стафилококков (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*) у пациентов с АтД. Однако данный метод не дает информации о реальной бактериальной нагрузке, а его результаты зависят от жизнеспособности микроорганизмов и условий культивирования, что делает его применение недопустимым на фоне приема топических антимикробных препаратов.

Полученные данные о доминирующей роли *S. aureus* полностью согласуются с современными представлениями о патогенезе АтД, где данный микроорганизм рассматривается как ключевой триггер воспаления. Результаты, указывающие на прямую связь между количеством *S. aureus* и тяжестью заболевания, находят подтверждение в работах, демонстрирующих, что штаммы *S. aureus*, колонизирующие кожу пациентов с АтД, обладают особыми патогенными свойствами. В частности, исследования показывают, что клинические изоляты

*S. aureus* от пациентов с АДД способны модифицировать иммунный ответ, индуцируя через клетки Лангерганса поляризацию Т-лимфоцитов в сторону Th2-пути, что является иммунологической основой заболевания. В то же время, штаммы *S. epidermidis*, как правило, не вызывают подобных специфических изменений. Эта концепция подтверждается данными Byrd A.L. [37], которые также отметили, что штаммы *S. aureus*, выделенные от пациентов с тяжелым АДД, индуцируют более выраженное воспаление кожи по сравнению с другими штаммами. Таким образом, результаты, подчеркивают важность таргетной диагностики и последующей терапии.

Наиболее сильные расхождения между методами были получены при анализе грибковой микрофлоры, особенно рода *Malassezia*. ПЦР-диагностика выявила сложную динамику. В отношении *Candida* spp. была обнаружена частота носительства, которая была достоверно выше в группе АДД (32,7% против 8,1%,  $p < 0,001$ ), но уровень колонизации у носителей не отличался от здоровых. Также было выявлено специфическое увеличение частоты носительства вида *Debaryomyces hansenii* при АДД. Для *Malassezia* spp. ПЦР показала, что при АДД наблюдается не только большая распространенность (90,9% против 80,2%,  $p = 0,04$ ), но и метод позволил зафиксировать качественную перестройку микобиома при АДД. Культуральное исследование дало абсолютно противоположные результаты по *Malassezia* spp. Согласно посевам, эти грибы значительно реже выявлялись в группе АДД (2,7%), чем у условно-здоровых лиц (22,1%,  $p < 0,0001$ ). Это кардинальное расхождение с ПЦР-данными, скорее всего, связано с известными трудностями культивирования *Malassezia* in vitro, которые требуют специфических липидных сред, а также их возможной переходной в некультивируемые формы или конкуренцией [39].

ПЦР-диагностика, обладающая высокой количественной точностью, успешно интегрировалась с данными иммунологического обследования. Была выявлена сильная положительная корреляция между тяжестью АДД (SCORAD) и уровнями ОКБ, *Staphylococcus* spp. и *S. aureus*. Аналогичная сильная корреляция была обнаружена между SCORAD и уровнем общего IgE, а также эозинофилией.

Это позволило создать комплексную картину патогенеза, связавшую бактериальную колонизацию, активацию Th2-иммунного ответа и клиническую манифестацию болезни. К сожалению, культуральный метод, не предоставляющий количественных данных, не позволил провести такой углубленный корреляционный анализ.

Проведённое сравнение не ставит целью представить метод ПЦР-РВ как полную замену культурального метода диагностики. Эти подходы являются не взаимоисключающими, а взаимодополняющими. Культуральное исследование сохраняет свою незаменимую роль как "золотой стандарт" для получения жизнеспособных изолятов, необходимых для определения чувствительности к антибиотикам и дальнейших микробиологических исследований. В то же время, количественная ПЦР-РВ представляет собой мощный инструмент для быстрого, объективного и высокочувствительного скрининга состояния микробиоты. Она позволяет в сжатые сроки получить полную количественную картину по широкому спектру целевых микроорганизмов, включая труднокультивируемые виды, что критически важно для оперативного принятия клинических решений. Идеальная диагностическая модель при АтД могла бы включать ПЦР-РВ как метод первичной, быстрой оценки микробного пейзажа, а посев как уточняющий метод в сложных случаях.

#### **4.3. Значение количественного подхода для объективизации диагностики и тактики ведения пациентов с АтД**

Проведенное исследование подчеркивает принципиальную важность перехода от качественной к количественной оценке микробной колонизации кожи для углубления понимания патогенеза и совершенствования терапевтической стратегии при АтД. Полученные данные свидетельствуют о том, что факта наличия

или отсутствия микроорганизма является недостаточной для понимания его роли в патологическом процессе АтД.

Наиболее репрезентативным примером, иллюстрирующим данный тезис, является анализ колонизации дрожжевыми грибами рода *Malassezia*. Применение культурального метода, основанного на качественном анализе, приводит к формированию заключения о статистически значимом снижении частоты выявления данного таксона в группе пациентов с АтД. В противоположность этому, количественный ПЦР-анализ может демонстрировать не только сопоставимую, но и более высокую частоту носительства, а также повышенную грибковую нагрузку у пациентов с разными формами АтД. Указанное расхождение результатов, как уже упоминалось, связано с требовательностью *Malassezia* spp. к условиям культивирования и их конкуренцией с более быстрорастущей флорой, меняет патогенетическую гипотезу — от концепции дефицита к концепции избыточной колонизации и персистирующей антигенной стимуляции для тяжелого АтД. Для *Candida* spp. анализ выявил диссоциацию между частотой носительства, которая была значимо повышена при АтД, и интенсивностью колонизации, которая у носителей не отличалась от таковой в группе сравнения. Это позволяет предположить, что патогенетическая значимость кандид может быть связана не с экстенсивным ростом у отдельных индивидов, а с увеличением доли сенсibilизированных пациентов в популяции. Традиционно противогрибковая терапия при АтД назначается при наличии явных клинических признаков инфекции или в рамках терапии себорейных зон [3]. Однако данные, показавшие практически тотальную колонизацию *Malassezia* spp. (90,9%) и значимо повышенную частоту носительства *Candida* spp. (32,7%) у пациентов с АтД, согласуются с работами, указывающими на их иммуногенную роль в поддержании воспаления [61, 115, 125]. Выявление с помощью ПЦР значимой грибковой нагрузки (превышение порога  $> 3,0 \lg$  копий/мл для *Malassezia* spp.) у пациентов с упорным течением заболевания, особенно с поражением головы и шеи, может стать дополнительным обоснованием для включения топических или системных антимикотиков в комплексную терапию.

Количественный подход также позволил дифференцировать вклад различных параметров колонизации в патогенез для разных микробных таксонов. В случае *Staphylococcus aureus* была установлена прямая зависимость между абсолютным показателем микробной нагрузки и тяжестью АД, что подтверждает его роль как ключевого патогена. Способность этого патогена продуцировать суперантигены, стимулирующие массивную активацию Т-клеток, и другие факторы вирулентности, такие как липотейхоевая кислота, позволяет ему не только усугублять воспаление, но и дополнительно нарушать целостность эпидермального барьера [53, 72, 98]. Таким образом, обнаруженная нами повышенная колонизация является ключевым звеном в порочном круге «дисфункция барьера – иммунный дисбаланс – микробный дисбиоз – хроническое воспаление».

В настоящее время решение о назначении антибиотиков при обострении АД часто принимается эмпирически, что, как отмечено в Кокрейновском обзоре, не всегда приводит к значимому улучшению и сопряжено с рисками появления резистентных штаммов и усугубления дисбиоза [29, 84]. Практическая значимость результатов заключается в обосновании перехода к таргетной диагностике и терапии. Метод количественной ПЦР предоставляет клиницисту инструмент для принятия обоснованных решений. Превышение порогового значения для *S. aureus* (> 4,0 lg копий/мл) может служить прямым показанием к назначению направленной антимикробной терапии, выбор формы которой (топические антисептики, антибиотики) должен определяться клинической картиной. Более того, этот метод позволяет объективно контролировать эффективность вмешательства, отслеживая динамику бактериальной нагрузки в ответ на лечение, что особенно важно в свете известной проблемы быстрой реколонизации после отмены антибиотиков.

Важно отметить, что работа подтверждает необходимость комплексного подхода. Поскольку колонизация *S. aureus* тесно связана с активностью основного воспалительного процесса, эффективная противовоспалительная терапия (топические кортикостероиды, ингибиторы кальциневрина), направленная на восстановление барьера и подавление Th2-иммунного ответа, сама по себе способствует нормализации микробного пейзажа. Следовательно, количественная

ПЦР-диагностика может помочь в стратификации пациентов: высокие значения нагрузки могут указывать на целесообразность комбинированной терапии с одновременным воздействием на воспаление и микробный фактор [3].

Количественная ПЦР-РВ предоставляет уникальную возможность для объективного динамического контроля за состоянием микробиома на фоне проводимой терапии. Снижение концентрации *S. aureus* ниже диагностического порога может служить критерием эффективности антистафилококкового лечения, а восстановление баланса микробного сообщества — маркером успешности общей противовоспалительной терапии и применения эмоленов, восстанавливающих барьер [3, 4, 6]. В дальнейшем этот метод может быть использован для проактивного ведения пациентов, позволяя выявлять нарастание патогенной нагрузки на доклиническом этапе и предотвращать обострения.

Таким образом, переход от качественной констатации к количественной оценке ключевых бактериальных и грибковых патогенов открывает новые возможности для дифференцированного подхода к терапии АД. Это позволяет обоснованно применять антимикробные и антимикотические средства, оптимизировать выбор базисной противовоспалительной терапии и осуществлять объективный мониторинг, что в конечном итоге может повысить эффективность лечения и улучшить состояние пациентов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Итоги

В результате комплексного исследования с применением разработанной методики ПЦР-РВ получены новые данные об иммунологической значимости дисбиоза кожи при АтД. Методика впервые позволила перейти от качественного анализа к точной количественной оценке микроорганизмов. Это изменило понимание роли микробного фактора и открыло возможность изучения прямых количественных связей между уровнем колонизации и активацией иммунного ответа.

Установлено, что микробный дисбаланс кожи при АтД носит избирательный характер и сопряжён с системной иммунной дисрегуляцией. Ключевым звеном является не общее увеличение бактериальной обсеменённости, а гиперколонизация *S. aureus*. Установлены прямые корреляции между уровнем колонизации *S. aureus* и концентрацией общего IgE ( $p < 0,001$ ), числом эозинофилов ( $p < 0,001$ ) и клинической тяжестью АтД ( $p < 0,001$ ). Эти данные доказывают, что *S. aureus* является активным триггером воспаления.

Разработанная ПЦР-РВ методика впервые детально охарактеризовала грибковый компонент микробиоты. Частота обнаружения *Malassezia* spp. методом ПЦР-РВ составила 90,9% против 2,7% при культуральном исследовании ( $p < 0,0001$ ). АтД ассоциирован с увеличением частоты носительства *Candida* spp. (32,7% против 8,1% в группе условно-здоровых лиц,  $p < 0,001$ ) и с качественной перестройкой видового состава *Malassezia* spp. Доля комменсального вида *M. sympodialis* снижена (15,5% против 27,9%,  $p < 0,05$ ). Количественная нагрузка *Malassezia* spp. коррелировала с тяжестью заболевания ( $p < 0,001$ ), но не с уровнем IgE и эозинофилией. Это указывает на вклад грибкового дисбиоза через

альтернативные пути и обосновывает концепцию сочетанного бактериально-грибкового дисбиоза.

С помощью ROC-анализа установлены пороговые значения микробной нагрузки, ассоциированные с активацией иммунного ответа. Они служат лабораторным основанием для дифференциальной диагностики осложнённой формы АтД и назначения этиотропной терапии, так для *Staphylococcus* spp. и *S. aureus* – более 4,0 lg копий/мл, для *Malassezia* spp. – более 3,0 lg копий/мл, для общего количества бактерий – более 5,0 lg копий/мл. Превышение этих уровней коррелирует с клиническими признаками инфекционного осложнения.

Разработанный метод мультиплексной ПЦР-РВ преодолевает ограничения культуральных методов. Таким образом, методика может быть применена в качестве инструмента, получения новых знаний об иммунопатогенезе АтД, раскрыв количественные взаимосвязи между сочетанным бактериально-грибковым дисбиозом и системной иммунной дисрегуляцией.

## Рекомендации

Для понимания роли сочетанного бактериально-грибкового дисбиоза кожи в иммунопатогенезе АтД рекомендуется применять методы с возможностью количественной оценки уровня колонизации микроорганизмов для выявления триггера воспаления.

Для количественной оценки дисбиотических нарушений кожи, ассоциированных с активацией Th2-иммунного ответа у пациентов с атопическим дерматитом, рекомендуется применять разработанную мультиплексную методику ПЦР-РВ вместо традиционного культурального метода диагностики.

Для дифференциальной диагностики обострения АтД, опосредованного избыточной микробной колонизацией, от неинфекционного обострения рекомендуется использовать установленные количественные уровни

бактериальной и грибковой нагрузки в качестве объективного лабораторного критерия для назначения этиотропной терапии.

### Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшие исследования должны быть направлены на углублённое изучение механизмов, связывающих конкретные количественные параметры дисбиоза с активацией иммунных путей. Это включает корреляцию микробных профилей с экспрессией цитокинов в коже, профилями хемокинов и активностью различных популяций иммунных клеток (например, Th2, Th17, Treg).

Ключевой долгосрочной задачей является интеграция количественного анализа микробиоты в алгоритмы выбора терапии. Проспективные исследования должны быть нацелены на выявление специфических микробно-иммунных биомаркеров, предсказывающих ответ на различные виды лечения: топические ингибиторы кальциневрина, дупилумаб (анти-IL-4R $\alpha$ ), ингибиторы JAK и другие биологические препараты.

Перспективным также является включение в анализ дополнительных иммунологически значимых мишеней. Целесообразно дополнить панель: комменсальными бактериями (например, *Corynebacterium* spp., *Cutibacterium acnes*), играющими роль в поддержании иммунного гомеостаза кожи и подавлении колонизации патогенами; вирусными патогенами, часто осложняющими течение АтД и влияющими на характер иммунного ответа; маркерами вирулентности и резистентности у выявленных патогенов (например, гены стафилококковых энтеротоксинов, *tecA*). Это позволит оценить не только количественную нагрузку, но и иммуногенный и патогенный потенциал микробной колонизации кожи.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что микробный дисбиоз кожи при atopическом дерматите является активным триггером воспаления.

2. Разработана и валидирована новая методика на основе ПЦР-РВ для диагностики дисбиоза кожи при atopическом дерматите, которая достоверно превосходит культуральные методы диагностики по чувствительности и скорости, а также позволяет перейти от качественного определения наличия микроорганизмов к точной количественной оценке микробной нагрузки.

3. При сравнительном анализе микробиоты кожи пациентов с atopическим дерматитом и условно-здоровых лиц были выявлены бактериальные и грибковые таксоны, связанные с иммунопатогенезом заболевания. В частности, общая бактериальная нагрузка у пациентов с АД оказалась в 32 раза выше, чем в сравниваемой группе, концентрация бактерий рода *Staphylococcus* spp. – в 100 раз выше, частота выявления грибов *Candida* spp. – в 4 раза выше, а частота выявления *Malassezia* spp. – в 1,2 раза выше.

4. Установлены корреляционные взаимосвязи между уровнем колонизации кожи микроорганизмами и продукцией общего IgE, причём уровень *S. aureus* положительно коррелирует с уровнем IgE и эозинофилией, тогда как уровень *Malassezia* spp. коррелирует с тяжестью заболевания, но не связан с продукцией IgE и эозинофилией.

5. Охарактеризованы дисбиотические паттерны, ассоциированные с тяжестью atopического дерматита, включающие сочетанную колонизацию *S. aureus* и *Malassezia* spp., а также повышенное носительство *Candida* spp., что обосновывает концепцию сочетанного бактериально-грибкового дисбиоза как фактора, усиливающего иммунопатологический процесс.

6. Определены иммунологически значимые уровни микробной нагрузки, превышение которых ассоциировано с переходом от комменсального носительства к иммуноопосредованному воспалению при АДД: *S. aureus* и *Staphylococcus* spp. –  $>4,0 \lg$  копий/мл, для *Malassezia* spp. –  $>3,0 \lg$  копий/мл, для общей бактериальной нагрузки –  $>5,0 \lg$  копий/мл.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АМП – антимикробные пептиды

АПК – антигенпрезентирующие клетки

АР – аллергический ринит

АСИТ – аллерген-специфическая иммунотерапия

АтД – атопический дерматит

ГЭ – геномный эквивалент

ДК – дендритная клетка

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖСА – желточно-солевой агар

ИКМТ – инфекции кожи и мягких тканей

КОЕ – колониеобразующие единицы

НУФ – натуральный увлажняющий фактор

ОКБ – общее количество бактерий

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

РГ – роговой слой

РНК – рибонуклеиновая кислота

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРБ – С-реактивный белок

ТГКС – топические глюкокортикостероиды

ТИК – топические ингибиторы кальциневрина

ТЭПВ – трансэпидермальная потеря воды

ЭБ – эпидермальный барьер

ЭГ – экзематозный герпес

AP-1 (activating protein-1) – активирующий протеин-1

CXCL ((C-X-C motif) ligand) – лиганд с мотивом C-X-C

EASI (Eczema Area and Severity Index) – Индекс распространенности и

тяжести экземы

FLG (filament aggregating protein) – белок, агрегирующий филаменты или белок филаггрин

IGA (Investigators Global Assessment) – Общая оценка заболевания исследователем

IFN (interferon) – интерферон

Ig (immunoglobulin) – иммуноглобулин

IL (interleukin) – интерлейкин

ILC (innate lymphoid cells) – врожденные лимфоидные клетки

JAK (janus kinase) – янус-киназа

MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) – первичный белок миелоидной дифференцировки 88

MRSA (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) – метициллин-резистентный золотистый стафилококк

MSSA (Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus) – метициллин-чувствительный золотистый стафилококк

NF-κB (nuclear factor κB) – ядерный фактор κB

NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3) – белок семейства NLR, содержащий пириновый домен 3

SCORAD (Scoring of Atopic Dermatitis) – оценка атопического дерматита

SSSS (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome) – стафилококковый синдром ошпаренной кожи

STAT (signal transducer and activator of transcription) – преобразователь сигнала и активатор транскрипции

T reg (T regulatory cells) – T-регуляторные клетки

TGF (transforming growth factor) – трансформирующий фактор роста

Th (T-helper) – T-хелпер

TLR (toll-like receptor) – толл-подобный рецептор

TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) – транзиторный рецепторный потенциал анкирин 1

TSLP (thymic stromal lymphopoietin) – тимический стромальный лимфопоэтин

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аллергия у детей: от теории к практике / под ред. Л. С. Намазовой-Барановой. – Москва : Союз педиатров России, 2010–2011. – 668 с. – Текст : непосредственный.
2. Аллергология и иммунология: национальное руководство / под ред. Р. М. Хаитова, Н. И. Ильиной. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 428 с. – Текст : непосредственный.
3. Анализ состояния заболеваемости болезнями кожи и подкожной клетчатки в Российской Федерации за период 2003-2016 гг. / А. А. Кубанова, А. А. Кубанов, Л. Е. Мелехина, Е. В. Богданова. – Текст : электронный// Вестник дерматологии и венерологии. – 2017. – № 6. – С. 22–33. – URL: [//medj.rucml.ru/journal/45562d564553544e494b44562d41525449434c452d333439/](http://medj.rucml.ru/journal/45562d564553544e494b44562d41525449434c452d333439/) (дата обращения: 22.11.2025).
4. Атопический дерматит: клинические рекомендации: 2024/ Общероссийская общественная организация «Российское общество дерматовенерологов и косметологов», Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов, Союз педиатров России, Общероссийская общественная организация «Национальный альянс дерматовенерологов и косметологов» // Рубрикатор клинических рекомендаций: [сайт] / Министерство здравоохранения Российской Федерации. – Москва, 2024. – URL: <https://cr.minzdrav.gov.ru/viewcr/265-3> (дата обращения: 15.12.2025).
5. Атопический дерматит у детей: современные клинические рекомендации по диагностике и терапии / Л. С. Намазова-Баранова, А. А. Баранов, А. А. Кубанова, Н. И. Ильина, [и др.]. – Текст: электронный // Вопросы современной педиатрии. – 2016. – Т. 15, № 3. – С. 279–294. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/atopicheskiy-dermatit-u-detey-sovremennye-klinicheskie-rekomendatsii-po-diagnostike-i-terapii/viewer> (дата обращения: 22.11.2025).

6. Гущин, И. С. Эпидермальный барьер и аллергия / И. С. Гущин. – Текст : электронный // Российский аллергологический журнал. – 2007. – № 2. – С. 3–16. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=9501240> (дата обращения: 18.10.2025).
7. Дерматовенерология. Национальное руководство. Краткое издание / под ред. Ю. С. Бутова, Ю. К. Скрипкина, О. Л. Иванова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 896 с. – Текст : непосредственный.
8. Детская аллергология: руководство для врачей / под ред. А. А. Баранова, И. И. Балаболкина. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 688 с. – Текст : непосредственный.
9. Диагностическая значимость количественного определения грибов рода *Malassezia* для оценки степени тяжести атопического дерматита / К. К. Носырева, О. Г. Елисютина, Д. П. Шуть, Е. В. Смольников, Е. С. Феденко, М. Н. Болдырева. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2026. – Т. 47, № 2. – С. 255–266.
10. Елисютина О.Г. Публичная библиотека в системе непрерывного библиотечно-информационного образования : специальность 14.03.09 «Клиническая иммунология, аллергология» : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Елисютина Ольга Гурьевна ; Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства. – Москва, 2019. – 287с. – Библиогр.: с. 239–284. – Текст : непосредственный..
11. Кубанова, А. А. Перспективные направления в терапии атопического дерматита / А. А. Кубанова, А. А. Кубанов. – Текст: электронный // Вестник дерматологии и венерологии. – 2017. – № 5. – С. 34–46. – URL: <https://vestnikdv.ru/jour/article/view/340> (дата обращения: 15.12.2025).
12. Микробная колонизация кожи у пациентов с атопическим дерматитом: взаимосвязь с иммунологическими параметрами и клинической тяжестью заболевания / К. К. Носырева, О. Г. Елисютина, Е. В. Смольников, [и др.]. – Текст: непосредственный // Медицинская иммунология. – 2026. – Т. 28, № 2. – С. 115–124.

13. Носырева, К. К. Атопический дерматит: от патогенеза к инфекционным осложнениям / К. К. Носырева. – Текст : электронный // Международный научно-исследовательский журнал. – 2025. – № 12 (162). – URL : <https://research-journal.org/archive/12-162-2025-december/10.60797/IRJ.2025.162.103> (дата обращения: 15.12.2025).

14. Общая заболеваемость взрослого населения России в 2017 году. Ч. IV: статистические материалы. – Текст: электронный. – М. : Минздрав России, 2018. – 160 с. – URL: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/zdrav17.pdf> (дата обращения: 18.09.2025).

15. Первый опыт применения метода ПЦР в реальном времени для диагностики дерматофитий и его сравнительная оценка с КОН-микроскопией и микологическим посевом / А. Е. Гущин, К. К. Носырева, Е. С. Негашева, [и др.]. – Текст: непосредственный // Клиническая дерматология и венерология. – 2023. – Т. 22, № 4. – С. 382–391.

16. Сергеев, А. Ю. Грибковые инфекции: руководство для врачей / А. Ю. Сергеев, Ю. В. Сергеев. – 2-е изд. – Москва : Бином, 2008. – 480 с. – Текст : непосредственный.

17. Сравнительный анализ грибковой колонизации кожи у пациентов с атопическим дерматитом и здоровых индивидов / К. К. Носырева, О. Г. Елисютина, Д. П. Шуть, [и др.]. – Текст : непосредственный // Медицинская иммунология. – 2026. – Т. 28, № 1. – С. 301–310.

18. Хамаганова, И. В. Эпидемиология атопического дерматита / И. В. Хамаганова, О. Л. Новожилова. – Текст: электронный // Клиническая дерматология и венерология. – 2017. – Т. 16, № 4. – С. 21–25. – URL: <https://www.mediasphera.ru/issues/klinicheskaya-dermatologiya-i-venerologiya/2017/4/downloads/ru/1199728492017041021> (дата обращения: 18.09.2025).

19. Afshar, M. Innate immune defense system of the skin / M. Afshar, R. L. Gallo. – Text: electronic // Veterinary Dermatology. – 2013. – Vol. 24, No. 1. – P. 32–

38. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2012.01082.x> (дата обращения: 18.09.2025).

20. Ahn, S. S. FRA1:c-Jun: HDAC1 complex down-regulates filaggrin expression upon TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  stimulation in keratinocytes / S. S. Ahn, H. Yeo. – Text: electronic // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2022. – Vol. 119. – Article e2123451119. – URL : <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9477237/> (дата обращения: 09.12.2025).

21. Angelova-Fischer, I. Distinct barrier integrity phenotypes in filaggrin-related atopic eczema following sequential tape stripping and lipid profiling / I. Angelova-Fischer, A. C. Mannheimer. – Text: electronic // *Experimental Dermatology*. – 2011. – Vol. 20, No. 4. – P. 351–356. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0625.2011.01259.x> (дата обращения: 07.11.2025).

22. Asher, M. I. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys / M. I. Asher. – Text: electronic // *The Lancet*. – 2006. – Vol. 368, No. 9537. – P. 733–743. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673606692830> (дата обращения: 09.11.2025).

23. Badhe, Y. Investigating the nanostructure of a CERNPNP/CERAPAP-based stratum corneum lipid matrix model: a combined neutron diffraction & molecular dynamics simulation approach / Y. Badhe, T. Schmitt. – Text: electronic // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2022. – Vol. 1864. – Article 184007. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273622001456?via%3Dihub> (дата обращения: 18.09.2025).

24. Bae, Y. J. Effects of particulate matter in a mouse model of oxazolone-induced atopic dermatitis / Y. J. Bae, K. Y. Park. – Text: electronic // *Annals of Dermatology*. – 2020. – Vol. 32, No. 6. – P. 496–507. URL: <https://anndermatol.org/DOIx.php?id=10.5021/ad.2020.32.6.496> (дата обращения: 18.09.2025).

25. Ballardini, N. Enhanced expression of the antimicrobial peptide LL-37 in lesional skin of adults with atopic eczema / N. Ballardini. – Text: electronic // *British Journal of Dermatology*. – 2009. – Vol. 161, No. 1. – P. 40–47. – URL: <https://academic.oup.com/bjd/article-abstract/161/1/40/6642099?redirectedFrom=fulltext> (дата обращения: 18.09.2025).
26. Barbarot, S. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international survey / S. Barbarot, S. Auziere. – Text: electronic // *Allergy*. – 2018. – Vol. 73, No. 6. – P. 1284–1293. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.13401> (дата обращения: 08.12.2025).
27. Baroni, A. Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates intracellular signalling in human keratinocytes in response to *Malassezia furfur* / A. Baroni, M. Orlando. – Text: electronic // *Archives of Dermatological Research*. – 2006. – Vol. 297, No. 7. – P. 280–288. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00403-005-0594-4> (дата обращения: 08.12.2025).
28. Bieber, T. Atopic dermatitis / T. Bieber. – Text: electronic // *New England Journal of Medicine*. – 2008. – Vol. 358, No. 14. – P. 1483–1494. – URL: <https://anndermatol.org/DOIx.php?id=10.5021/ad.2010.22.2.125> (дата обращения: 10.12.2025).
29. Birnie, A. J. Interventions to reduce *Staphylococcus aureus* in the management of atopic eczema / A. J. Birnie, F. J. Bath-Hextall. – Text: electronic // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2008. – No. 3. – Article CD003871. – URL: <https://academic.oup.com/bjd/article-abstract/163/1/12/6642657?redirectedFrom=fulltext> (дата обращения: 10.12.2025).
30. Boguniewicz, M. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation / M. Boguniewicz, D. Y. Leung. – Text: electronic // *Immunological Reviews*. – 2011. – Vol. 242, No. 1. – P. 233–246. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-065X.2011.01027.x> (дата обращения: 21.12.2025).
31. Boguniewicz, M. Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications / M. Boguniewicz, D. Y. Leung. – Текст :

электронный // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2010. – Vol. 125, No. 1. – P. 4–13. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674909017485> (дата обращения: 15.12.2025).

32. Boralevi, F. Epicutaneous aeroallergen sensitization in atopic dermatitis infants - determining the role of epidermal barrier repairmen / F. Boralevi. – Текст : электронный // *Allergy*. – 2008. – Vol. 63, No. 2. – P. 205–210 – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1398-9995.2007.01556.x> (дата обращения: 26.11.2025).

33. Bouwstra, J. A. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations / J. A. Bouwstra, K. Pilgrim. – Текст : электронный // *Progress in Lipid Research* – 2003 – P. 1–36. – URL: [linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782702000280](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782702000280) (дата обращения: 05.12.2025).

34. Brenninkmeijer, E. E. Diagnostic criteria for atopic dermatitis: a systematic review / E. E. Brenninkmeijer. – Текст : электронный // *British Journal of Dermatology*. – 2008. – Vol. 158, No. 4. – P. 754–765. – URL: <https://academic.oup.com/bjd/articleabstract/158/4/754/6641091?redirectedFrom=fulltext> (дата обращения: 13.12.2025).

35. Brunner, P. M. Racial differences in atopic dermatitis / P. M. Brunner, E. Guttman-Yassky. – Text: electronic // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. – 2019. – Vol. 122, No. 5. – P. 449–455. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1081120618314200> (дата обращения: 13.12.2025).

36. Buddenkotte, J. Pathophysiology and therapy of pruritus in allergic and atopic diseases / J. Buddenkotte, M. Steinhoff. – Текст : электронный // *Allergy*. – 2010. – Vol. 65, No. 7. – P. 805–821. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1398-9995.2010.01995.x> (дата обращения: 13.12.2025).

37. Byrd, A. L. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis / A. L. Byrd, C. Deming, S. – Текст :

электронный // *Science Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 9, No. 397. – P. 46–51. – URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aal4651> (дата обращения: 14.12.2025).

38. Cabañes, F. J. *Malassezia* yeasts: how many species infect humans and animals? / F. J. Cabañes. – Текст : электронный // *PLoS Pathogens*. – 2014. – Vol. 10, No. 2. – Article e1003892. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3937305/> (дата обращения: 14.12.2025).

39. Cafarchia, C. *Advances in the identification of Malassezia* / C. Cafarchia, R. B. Gasser, L. A. Figueredo. – Текст : электронный // *Molecular and Cellular Probes*. – 2011. – Vol. 25, No. 1. – P. 1–7. – URL: [https://www.researchgate.net/publication/49716224\\_Advances\\_in\\_the\\_identification\\_of\\_Malassezia](https://www.researchgate.net/publication/49716224_Advances_in_the_identification_of_Malassezia) (дата обращения: 21.12.2025).

40. Choi, Y. *Comparative Analysis of Cutaneous Fungi in Atopic Dermatitis Patients and Healthy Individuals* / Y. Choi, K. Y. Park. – Текст : электронный // *Annals of Dermatology*. – 2022. – Vol. 34, No. 2. – P. 118–124. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8989898/> (дата обращения: 19.12.2025).

41. Chua, W. *Secretory Proteases of the Human Skin Microbiome* / W. Chua, S. E. Poh. – Текст : электронный // *Infection and Immunity*. – 2022. – Vol. 90, No. 1. – Article e00397-21. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.00397-21> (дата обращения: 08.12.2025).

42. Cooke, R. A. *The antibody mechanisms of ragweed allergy; electrophoretic and chemical studies. I. The blocking antibody* / R. A. Cooke, A. Menzel. – Текст : электронный // *Journal of Experimental Medicine*. – 1955. – Vol. 4, No. 2. – P. 201–305. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13233444/> (дата обращения: 08.12.2025).

43. Cork, M. J. *Atopic dermatitis epidemiology and unmet need in the United Kingdom* / M. J. Cork, S. G. Danby. – Текст : электронный // *Journal of Dermatological Treatment*. – 2020. – Vol. 31, No. 8. – P. 801–809. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09546634.2019.1655137> (дата обращения: 08.12.2025).

44. Cutolo, M. Use of glucocorticoids and risk of infections / M. Cutolo, B. Seriolo. – Текст : электронный // *Autoimmunity Reviews*. – 2008. – Vol. 8, No. 2. – P. 153–155. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997208001225> (дата обращения: 08.12.2025).

45. Dai, X. TSLP impairs epidermal barrier integrity by stimulating the formation of nuclear IL-33/phosphorylated STAT3 complex in human keratinocytes / X. Dai, J. Muto, K. Shiraishi. – Текст : электронный // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2022. – Vol. 142, No. 8. – P. 2100–2108. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X22000124> (дата обращения: 24.12.2025).

46. Darabi, K. The role of *Malassezia* in atopic dermatitis affecting the head and neck of adults / K. Darabi, S. G. Hostetler, M. A. Bechtel. – Текст : электронный // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2009. – Vol. 60, No. 1. – P. 125–136. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962208010177> (дата обращения: 21.12.2025).

47. DaVeiga, S. P. Epidemiology of atopic dermatitis: a review / S. P. DaVeiga. – Текст : электронный // *Allergy and Asthma Proceedings*. – 2012. – Vol. 33, No. 3. – P. 227–234. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22584191/> (дата обращения: 21.12.2025).

48. De Hoog, G. S. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes / G. S. de Hoog, K. Dukik, M. Monod. – Текст : электронный // *Mycopathologia*. – 2017. – Vol. 182. – P. 5–31.

49. Dhar, S. Role of bacterial flora in the pathogenesis and management of atopic dermatitis / S. Dhar, A. J. Kanwar. – Текст : электронный // *Indian Journal of Medical Research*. – 1992. – Vol. 95. – P. 234–238. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjd.18643> (дата обращения: 23.12.2025).

50. Dioszeghy, V. Epicutaneous immunotherapy results in rapid allergen uptake by dendritic cells through intact skin and downregulates the allergen-specific response in sensitized mice / V. Dioszeghy. – Текст : электронный // *Journal of Immunology*. –

2011. – Vol. 186, No. 10. – P. 5629–5637. – URL: <https://academic.oup.com/jimmunol/articleabstract/186/10/5629/7996694?redirectedFrom=fulltext> (дата обращения: 13.12.2025).

51. Droitcourt, C. A prospective study of filaggrin null mutations in keratoconus patients with or without atopic disorders / C. Droitcourt, D. Touboul. – Текст : электронный // *Dermatology*. – 2011. – Vol. 222, No. 4. – P. 336–341. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21701148/> (дата обращения: 23.12.2025).

52. Eichenfield, L. F. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis / L. F. Eichenfield. – Текст : электронный // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2014. – Vol. 70, No. 2. – P. 338–351. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962213010955> (дата обращения: 13.12.2025).

53. Elizalde-Jiménez, I. G. Global Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* in Atopic Dermatitis / I. G. Elizalde-Jiménez, F. G. Ruiz-Hernández. – Текст : электронный // *JAMA Dermatology*. – 2024. – Vol. 160, No. 11. – P. 1171–1181. – URL: <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2024.3360> (дата обращения: 23.09.2025).

54. Elias, P. M. Primary role of barrier dysfunction in the pathogenesis of atopic dermatitis / P. M. Elias. – Текст : электронный // *Experimental Dermatology*. – 2018. – Vol. 27, No. 8. – P. 847–851. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/exd.13693> (дата обращения: 05.11.2025).

55. Erbagci, Z. Topical therapy for dermatophytoses: should corticosteroids be included? / Z. Erbagci. – Текст : электронный // *American Journal of Clinical Dermatology*. – 2004. – Vol. 5, No. 6. – P. 375–384. – URL: <https://link.springer.com/article/10.2165/00128071-200405060-00002> (дата обращения: 15.09.2025).

56. Faergemann, J. Atopic dermatitis and fungi / J. Faergemann. – Текст : электронный // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2002. – Vol. 15, No. 4. – P. 545–563.

– URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.15.4.545-563.2002> (дата обращения: 10.10.2025).

57. Freitas, R. S. De Investigation of superficial mycosis in cutaneous allergy patients using topical or systemic corticosteroids / R. S. De Freitas, P. S. Neves. – Текст : электронный // *International Journal of Dermatology*. – 2017. – Vol. 56, No. 10. – P. e194–e198. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijd.13651> (дата обращения: 23.12.2025).

58. Furue, M. Current status of atopic dermatitis in Japan / M. Furue, T. Chiba. – Текст : электронный // *Asia Pacific Allergy*. – 2011. – Vol. 1, No. 2. – P. 64–72. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3206256/> (дата обращения: 23.12.2025).

59. Gaitanis, G. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases / G. Gaitanis, P. Magiatis. – Текст : электронный // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2012. – Vol. 25, No. 1. – P. 106–141. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00021-11> (дата обращения: 27.12.2025).

60. Geoghegan, J. A. *Staphylococcus aureus* and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship / J. A. Geoghegan, A. D. Irvine. – Text: electronic // *Trends in Microbiology*. – 2018. – Vol. 26, No. 6. – P. 484–497 – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X17302573> (дата обращения: 16.09.2025).

61. Glatz, M. The role of *Malassezia* spp. in atopic dermatitis / M. Glatz, P. P. Bosshard, W. Hoetzenecker. – Текст : электронный // *Journal of Clinical Medicine*. – 2015. – Vol. 4. – P. 1217–1228. – URL: <https://www.mdpi.com/2077-0383/4/6/1217> (дата обращения: 26.09.2025).

62. Grice, E. A. The skin microbiome / E. A. Grice, J. A. Segre. – Текст : электронный // *Nature Reviews Microbiology*. – 2011. – Vol. 9, No. 4. – P. 244–253 – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3535073/> (дата обращения: 26.09.2025).

63. Grice, E. A. Host–microbe interactions: *Malassezia* and human skin / E. A. Grice, T. L. Dawson. – Текст : электронный // *Current Opinion in Microbiology*. – 2017.

– Vol. 40. – P. 81–87. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527416301874> (дата обращения: 23.12.2025).

64. Gruber, R. Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function / R. Gruber, P. M. Elias. – Текст : электронный // *American Journal of Pathology*. – 2011. – Vol. 178, No. 5. – P. 2252–2263. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944011001696> (дата обращения: 23.12.2025).

65. Guého, E. The genus *Malassezia* with description of four new species / E. Guého, G. Midgley. – Текст : электронный // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1996. – Vol. 69, No. 4. – P. 337–355. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00399623> (дата обращения: 23.12.2025).

66. Gupta, A. K. Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses / A. K. Gupta, Y. Kohli. – Текст : электронный // *Medical Mycology*. – 2001. – Vol. 39, No. 3. – P. 243–251. – URL: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/mmy.39.3.243.251> (дата обращения: 23.12.2025).

67. Guttman-Yassky, E. New era of biological therapeutics in atopic dermatitis / E. Guttman-Yassky, N. Dhingra. – Текст : электронный // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2013. – Vol. 13, No. 4. – P. 549–561. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2013.758708> (дата обращения: 23.12.2025).

68. Hatano, Y. "Outside-to-inside," "inside-to-outside," and "intrinsic" endogenous pathogenic mechanisms in atopic dermatitis: keratinocytes as the key functional cells involved in both permeability barrier dysfunction and immunological alterations / Y. Hatano, P. M. Elias. – Текст : электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – Article 1239251. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1239251/full> (дата обращения: 23.12.2025).

69. Heratizadeh, A. Atopic dermatitis: new evidence on the role of allergic inflammation / A. Heratizadeh. – Текст : электронный // *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – Vol. 16, No. 5. – P. 458–464. – URL: [https://journals.lww.com/co-allergy/abstract/2016/10000/atopic\\_dermatitis\\_\\_new\\_evidence\\_on\\_the\\_role\\_of.8.aspx](https://journals.lww.com/co-allergy/abstract/2016/10000/atopic_dermatitis__new_evidence_on_the_role_of.8.aspx) (дата обращения: 13.11.2025).

70. Hiragun, T. Fungal protein MGL\_1304 in sweat is an allergen for atopic dermatitis patients / T. Hiragun, K. Ishii, M. Hiragun. – Текст : электронный // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2013. – Vol. 132, No. 3. – P. 608–615. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674913005873> (дата обращения: 23.12.2025).

71. Howell, M. D. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression / M. D. Howell. – Текст : электронный // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2009. – Vol. 124, No. 3, Suppl. 2. – P. R7–R12. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674909011221> (дата обращения: 23.12.2025).

72. Huang, J. T. Treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis decreases disease severity / J. T. Huang, M. Abrams. – Текст : электронный // *Pediatrics*. – 2009. – Vol. 123, No. 5. – P. e808–e814. – URL: <https://www.semanticscholar.org/paper/Treatment-of-Staphylococcus-aureus-Colonization-in-Huang-Abrams/653daed690861ef16578149261e58cbd8c2c40a9> (дата обращения: 05.09.2025).

73. Irvine, A. D. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases / A. D. Irvine, W. H. McLean. – Текст : электронный // *New England Journal of Medicine*. – 2011. – Vol. 365, No. 14. – P. 1315–1327. – URL: <https://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1011040> (дата обращения: 23.12.2025).

74. Jang, H. Skin pH is the master switch of kallikrein 5-mediated skin barrier destruction in a murine atopic dermatitis model / H. Jang, A. Matsuda. – Текст : электронный // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2016. – Vol. 136, No. 1. – P.

127–135. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15000147> (дата обращения: 23.12.2025).

75. Javad, G. Evaluation of *Candida* colonization and specific humoral responses against *Candida albicans* in patients with atopic dermatitis / G. Javad, M. Taheri Sarvtin. – Текст : электронный // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – Article ID 849206. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/849206/> (дата обращения: 25.12.2025).

76. Johansson, H. J. Extracellular nanovesicles released from the commensal yeast *Malassezia sympodialis* are enriched in allergens and interact with cells in human skin / H. J. Johansson, H. Vallhov. – Текст : электронный // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8, No. 1. – Article 9182. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-27451-9> (дата обращения: 01.11.2025).

77. Jungersted, J. M. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filлагрин mutations in patients with atopic eczema / J. M. Jungersted. – Текст : электронный // *Allergy*. – 2010. – Vol. 65, No. 7. – P. 911–918. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1398-9995.2010.02326.x> (дата обращения: 14.12.2025).

78. Kaga, M. Molecular analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota from the skin of patients with atopic dermatitis of different severities / M. Kaga, T. Sugita. – Текст : электронный // *Mycoses*. – 2011. – Vol. 54, No. 1. – P. e24–e28. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0507.2009.01821.x> (дата обращения: 13.12.2025).

79. Kanda, N. Anti-mycotics suppress interleukin-4 and interleukin-5 production in anti-CD3 plus anti-CD28-stimulated T cells from patients with atopic dermatitis / N. Kanda, U. Enomoto. – Текст : электронный // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2001. – Vol. 117, No. 6. – P. 1635–1646. – URL: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.145185> (дата обращения: 23.12.2025).

80. Kim, B. E. Particulate matter causes skin barrier dysfunction / B. E. Kim, J. Kim. – Текст : электронный // *JCI Insight*. – 2021. – Vol. 6, No. 11. – Article e145185. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33497363/> (дата обращения: 23.12.2025).

81. Kistowska, M. Malassezia yeasts activate the NLRP3 inflammasome in antigen-presenting cells via Syk-kinase signalling / M. Kistowska, G. Fenini. – Текст : электронный // *Experimental Dermatology*. – 2014. – Vol. 23, No. 12. – P. 884–889. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/exd.12552> (дата обращения: 26.01.2026).

82. Kittaka, H. The molecular and cellular mechanisms of itch and the involvement of TRP channels in the peripheral sensory nervous system and skin / H. Kittaka, M. Tominaga. – Текст : электронный // *Allergology International*. – 2017. – Vol. 66, No. 1. – P. 22–30. – URL: <linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1323893016301575> (дата обращения: 23.12.2025).

83. Kolecka, A. Efficient identification of Malassezia yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) / A. Kolecka, K. Khayhan. – Текст : электронный // *British Journal of Dermatology*. – 2014. – Vol. 170, No. 2. – P. 332–341. – URL: <https://academic.oup.com/bjd/article-abstract/170/2/332/6614927?redirectedFrom=fulltext> (дата обращения: 25.12.2025).

84. Kong, H. H. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis / H. H. Kong, J. Oh, C. Deming. – Текст : электронный // *Genome Research*. – 2012. – Vol. 22, No. 5. – P. 850–859. – URL: <https://genome.cshlp.org/content/22/5/850> (дата обращения: 23.12.2025).

85. Kong, H. H. Skin microbiome: genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes / H. H. Kong. – Текст : электронный // *Trends in Molecular Medicine*. – 2011. – Vol. 17, No. 6. – P. 320–328. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491411000232> (дата обращения: 16.10.2025).

86. Kubo, A. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases / A. Kubo, K. Nagao. – Текст : электронный // *Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – Vol. 122, No. 2. – P. 440–447. – URL: <https://doi.org/10.1172/jci57416> (дата обращения: 03.09.2025).

87. Kuo, I. H. Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function: implications for atopic dermatitis and skin barrier repair / I. H. Kuo. – Текст : электронный // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2013. – Vol. 133, No. 4. – P. 988–998. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15362060> (дата обращения: 23.12.2025).

88. Lack, G. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood / G. Lack. – Текст : электронный // *New England Journal of Medicine*. – 2003. – Vol. 348, No. 11. – P. 977–985. – URL: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa013536> (дата обращения: 23.12.2025).

89. Lai, Y. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense / Y. Lai, R. L. Gallo. – Текст : электронный // *Trends in Immunology*. – 2009. – Vol. 30, No. 3. – P. 131–141. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490609000052> (дата обращения: 23.12.2025).

90. Latendorf, T. Cationic intrinsically disordered antimicrobial peptides (CIDAMPs) represent a new paradigm of innate defense with a potential for novel anti-infectives / T. Latendorf, U. Gerstel, Z. Wu. – Текст : электронный // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, No. 1. – Article 3331. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-39219-w> (дата обращения: 23.12.2025).

91. Lee, M. The role of antiseptic agents in atopic dermatitis / M. Lee. – Текст : электронный // *Asia Pacific Allergy*. – 2014. – Vol. 4, No. 4. – P. 230–240. – URL: [https://journals.lww.com/apallergy/fulltext/2014/10000/the\\_role\\_of\\_antiseptic\\_agents\\_in\\_atopic\\_dermatitis.7.aspx](https://journals.lww.com/apallergy/fulltext/2014/10000/the_role_of_antiseptic_agents_in_atopic_dermatitis.7.aspx) (дата обращения: 15.12.2025).

92. Leung, D. Y. Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens / D. Y. Leung, R. Harbeck. – Текст : электронный // *Journal of Clinical Investigation*. – 1993. – Vol. 92, No. 3. – P. 1374–1380. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3805301/> (дата обращения: 23.12.2025).

93. Levin, J. Atopic dermatitis and the stratum corneum: part 1: the role of filaggrin in the stratum corneum barrier and atopic skin / J. Levin, S. F. Friedlander. –

Текст : электронный // *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. – 2013. – Vol. 6, No. 10. – P. 16–22. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24155988/> (дата обращения: 23.12.2025).

94. Li, W. Prevention of oral food allergy sensitization via skin application of food allergen in a mouse model / W. Li. – Текст : электронный // *Allergy*. – 2012. – Vol. 67, No. 5. – P. 622–629. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1398-9995.2012.02798.x> (дата обращения: 23.12.2025).

95. Liu, Y. J. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation / Y. J. Liu, V. Soumelis, N. Watanabe. – Текст : электронный // *Annual Review of Immunology*. – 2007. – Vol. 25. – P. 193–219. – URL: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141718> (дата обращения: 23.12.2025).

96. Matsumoto, K. Epicutaneous immunity and onset of allergic diseases - per-"eczematous" sensitization drives the allergic march / K. Matsumoto, H. Saito. – Текст : электронный // *Allergology International*. – 2013. – Vol. 62, No. 3. – P. 291–296. – URL: [10.2332/allergolint.13-RAI-0603](https://doi.org/10.2332/allergolint.13-RAI-0603) (дата обращения: 23.12.2025).

97. Mercer, D. K. Keratin hydrolysis by dermatophytes / D. K. Mercer, C. S. Stewart. – Текст : электронный // *Medical Mycology*. – 2019. – Vol. 57. – P. 13–22. – URL: <https://academic.oup.com/mmy/article-abstract/57/1/13/4816029?redirectedFrom=fulltext> (дата обращения: 23.12.2025).

98. Meylan, P. Skin Colonization by *Staphylococcus aureus* Precedes the Clinical Diagnosis of Atopic Dermatitis in Infancy / P. Meylan, C. Lang. – Текст : электронный // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2017. – Vol. 137, No. 12. – P. 2497–2504. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1732794X> (дата обращения: 13.11.2025).

99. Meylan, P. De. Filaggrin mutations and the skin / P. De Meylan, S. Handa. – Текст : электронный // *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. – 2012. – Vol. 78, No. 5. – P. 545–551. – URL: <https://doi.org/10.4103/0019-2029.100000> (дата обращения: 23.12.2025).

the skin / P. De Meylan, S. Handa. – Текст : электронный // Indian Journal of (дата обращения: 23.12.2025).

100. Mondoulet, L. Intact skin and not stripped skin is crucial for the safety and efficacy of peanut epicutaneous immunotherapy (EPIT) in mice / L. Mondoulet. – Текст : электронный // Clinical and Translational Allergy. – 2012. – Vol. 2, No. 1. – P. 22. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1186/2045-7022-2-22> (дата обращения: 23.12.2025).

101. Montero-Vilchez, T. Skin Barrier Function in Psoriasis and Atopic Dermatitis: Transepidermal Water Loss and Temperature as Useful Tools to Assess Disease Severity / T. Montero-Vilchez, M. V. Segura-Fernández-Nogueras. – Текст : электронный // Journal of Clinical Medicine. – 2021. – Vol. 10, No. 2. – Article 359. – URL: <https://www.mdpi.com/2077-0383/10/2/359> (дата обращения: 23.12.2025).

102. Naglik, J. R. Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis / J. R. Naglik, S. J. Challacombe. – Текст : электронный // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2003. – Vol. 67, No. 3. – P. 400–428. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/membr.67.3.400-428.2003> (дата обращения: 23.12.2025).

103. Nakamura, Y. Staphylococcus  $\delta$ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells / Y. Nakamura, J. Oscherwitz. – Текст : электронный // Nature. – 2013. – Vol. 503, No. 7476. – P. 397–401. – URL: <https://www.nature.com/articles/nature12655> (дата обращения: 23.12.2025).

104. Netea, M. G. Immune sensing of Candida albicans requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors / M. G. Netea, N. A. Gow. – Текст : электронный // The Journal of Clinical Investigation. – 2006. – Vol. 116, No. 6. – P. 1642–1650. – URL: <https://doi.org/10.1172/jci27114> (дата обращения: 23.12.2025).

105. Niebuhr, M. Innate immunity, allergy and atopic dermatitis / M. Niebuhr, T. Werfel. – Текст : электронный // Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology. – 2010. – Vol. 10, No. 5. – P. 463–468. – URL: <https://journals.lww.com/co>

allergy/abstract/2010/10000/innate\_immunity,\_allergy\_and\_atopic\_dermatitis.10.aspx (дата обращения: 23.12.2025).

106. Niehues, H. CYSRT1: an antimicrobial epidermal protein that can interact with late cornified envelope proteins / H. Niehues, G. Rikken. – Текст : электронный // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2023. – Vol. 143, No. 8. – P. 1498–1508. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X23000854> (дата обращения: 23.12.2025).

107. Noda, S. The Asian atopic dermatitis phenotype combines features of atopic dermatitis and psoriasis with increased TH17 polarization / S. Noda, M. Suárez-Fariñas, B. Ungar. – Текст : электронный // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2015. – Vol. 136, No. 5. – P. 1254–1264. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674915011963> (дата обращения: 23.12.2025).

108. Oh, J. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome / J. Oh, A. L. Byrd. – Текст : электронный // *Nature*. – 2014. – Vol. 514. – P. 59–64. – URL: <https://www.nature.com/articles/nature13786> (дата обращения: 23.12.2025).

109. Ong, P. Y. Bacterial and Viral Infections in Atopic Dermatitis: a Comprehensive Review / P. Y. Ong, D. Y. Leung. – Текст : электронный // *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. – 2016. – Vol. 51, No. 3. – P. 329–337. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12016-016-8548-5> (дата обращения: 23.12.2025).

110. Oranje, A. P. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: SCORAD Index, objective SCORAD, patient-oriented SCORAD and Three-Item Severity score / A. P. Oranje. – Текст : электронный // *Current Problems in Dermatology*. – 2011. – Vol. 41. – P. 149–155. – URL: <https://doi.org/10.1159/000323308> (дата обращения: 23.12.2025).

111. O'Shea, J. J. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention / J. J. O'Shea, D. M. Schwartz. – Текст : электронный // *Annual*

Review of Medicine. – 2015. – Vol. 66. – P. 311–328. – URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537> (дата обращения: 23.12.2025).

112. Petrokilidou, C. The lipid profile of three *Malassezia* species assessed by Raman spectroscopy and discriminant analysis / C. Petrokilidou, E. Pavlou. – Текст : электронный // *Molecular and Cellular Probes*. – 2019. – Vol. 46. – Article 101416. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890850819302099> (дата обращения: 23.12.2025).

113. Pfisterer, K. Non-IgE-reactive allergen peptides deteriorate the skin barrier in house dust mite-sensitized atopic dermatitis patients / K. Pfisterer, M. Wielscher. – Текст : электронный // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2023. – Vol. 11. – Article 1240289 – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37675143/> (дата обращения: 17.09.2025).

114. Progneaux, A. Keratinocytes activated by IL-4/IL-13 express IL-2R $\gamma$  with consequences on epidermal barrier function / A. Progneaux, C. Evrard, V. De Glas. – Текст : электронный // *Experimental Dermatology*. – 2023. – Vol. 32, No. 5. – P. 660–670 – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/exd.14749> (дата обращения: 23.11.2025).

115. Prohic, A. *Malassezia* species in healthy skin and in dermatological conditions / A. Prohic, T. Jovovic Sadikovic. – Текст : электронный // *International Journal of Dermatology*. – 2016. – Vol. 55, No. 5. – P. 494–504 – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijd.13116> (дата обращения: 23.11.2025).

116. Pucci, N. Scoring atopic dermatitis in infants and young children: distinctive features of SCORAD index / N. Pucci. – Текст : электронный // *Allergy*. – 2005. – Vol. 60, No. 1. – P. 113–116 – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1398-9995.2004.00622.x> (дата обращения: 26.10.2025).

117. Puri, P. Effects of air pollution on the skin: A review / P. Puri, S. K. Nandar. – Текст : электронный // *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. – 2017. – Vol. 83, No. 4. – P. 415–423 – URL: <https://doi.org/10.4103/0378-6323.199579> (дата обращения: 26.05.2026).

118. Reekers, R. Birch pollen-related foods trigger atopic dermatitis in patients with specific cutaneous T-cell responses to birch pollen antigens / R. Reekers. – Текст : электронный // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 1999. – Vol. 104, No. 2. – P. 466–472. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674999703957> (дата обращения: 23.12.2025).

119. Ring, J. Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) part II / J. Ring. – Текст : электронный // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2012. – Vol. 26, No. 8. – P. 1176–1193. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1468-3083.2012.04636.x> (дата обращения: 23.12.2025).

120. Ring, J. Molecular genetics of atopic eczema / J. Ring, M. Mohrenschlager. – Текст : электронный // *Chemical Immunology and Allergy*. – 2012. – Vol. 96. – P. 24–29. – URL: <https://doi.org/10.1159/000331807> (дата обращения: 23.12.2025).

121. Roduit, C. Phenotypes of atopic dermatitis depending on the timing of onset and progression in childhood / C. Roduit. – Текст : электронный // *JAMA Pediatrics*. – 2007. – Vol. 171, No. 7. – P. 655–662. – URL: <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.0556> (дата обращения: 23.12.2025).

122. Ruether, A. Filaggrin loss-of-function variant contributes to atopic dermatitis risk in the population of Northern Germany / A. Ruether. – Текст : электронный // *British Journal of Dermatology*. – 2006. – Vol. 155, No. 5. – P. 1093–1094. – URL: <https://academic.oup.com/bjd/article-abstract/155/5/1093/6637380?redirectedFrom=fulltext> (дата обращения: 23.12.2025).

123. Sandström Falk, M. H. The prevalence of *Malassezia* yeasts in patients with atopic dermatitis, seborrhoeic dermatitis and healthy controls / M. H. Sandström Falk, M. Tengvall Linder. – Текст : электронный // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2005. – Vol. 19, No. 3. – P. 289–294. – URL: <https://medicaljournalssweden.se/actadv/article/view/13483> (дата обращения: 23.12.2025).

124. Saunders, C. W. *Malassezia* fungi are specialized to live on skin and associated with dandruff, eczema, and other skin diseases / C. W. Saunders, A. Scheynius.

– Текст : электронный // PLoS Pathogens. – 2012. – Vol. 8, No. 6. – Article e1002701.  
– URL: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002701>  
(дата обращения: 23.12.2025).

125. Savolainen, J. *Candida albicans* and atopic dermatitis / J. Savolainen, K. Lammintausta. – Текст : электронный // *Clinical & Experimental Allergy*. – 1993. – Vol. 23, No. 4. – P. 332–339. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2222.1993.tb00331.x> (дата обращения: 09.10.2025).

126. Schaubert, J. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system / J. Schaubert, R. L. Gallo. – Текст : электронный // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2008. – Vol. 122, No. 2. – P. 261–266. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009167490800612X> (дата обращения: 23.12.2025).

127. Selander, C. TLR2/MyD88-dependent and -independent activation of mast cell IgE responses by the skin commensal yeast *Malassezia sympodialis* / C. Selander, C. Engblom. – Текст : электронный // *The Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 182, No. 7. – P. 4208–4216. – URL: <https://academic.oup.com/jimmunol/article-abstract/182/7/4208/8007530?redirectedFrom=fulltext> (дата обращения: 10.12.2025).

128. Schuler, C. F. Genetic and Immunological Pathogenesis of Atopic Dermatitis / C. F. Schuler, L. C. Tsoi. – Текст : электронный // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2024. – Vol. 144, No. 5. – P. 954–968. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X23030579> (дата обращения: 23.12.2025).

129. Schulte-Herbruggen, O. Clinical relevance of nerve growth factor serum levels in patients with atopic dermatitis and psoriasis / O. Schulte-Herbruggen. – Текст : электронный // *International Archives of Allergy and Immunology*. – 2007. – Vol. 144, No. 3. – P. 211–216. – URL: <https://doi.org/10.1159/000103994> (дата обращения: 23.12.2025).

130. Scott, I. R. Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the

environment / I. R. Scott, C. R. Harding. – Текст : электронный // *Developmental Biology*. – 1986. – Vol. 115, No. 1. – P. 84–92. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0012160686902307?via%3Dihub> (дата обращения: 23.12.2025).

131. Silverberg, J. I. Patient burden and quality of life in atopic dermatitis in US adults: A population-based cross-sectional study / J. I. Silverberg, J. M. Gelfand. – Текст : электронный // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. – 2018. – Vol. 121, No. 3. – P. 340–347. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1081120618305672> (дата обращения: 23.12.2025).

132. Silverberg, J. I. Association between obesity and atopic dermatitis in childhood: A case-control study / J. I. Silverberg, E. Kleiman. – Текст : электронный // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2011. – Vol. 127, No. 5. – P. 1180–1186. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674911002600> (дата обращения: 23.12.2025).

133. Soares, R. C. Malassezia intra-specific diversity and potentially new species in the skin microbiota from brazilian healthy subjects and seborrheic dermatitis patients / R. C. Soares, M. B. Zani. – Текст : электронный // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, No. 2. – Article e0117921. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0117921> (дата обращения: 24.12.2025).

134. Sparber, F. Host Responses to Malassezia spp. in the Mammalian Skin / F. Sparber, S. LeibundGut-Landmann. – Текст : электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – Article 1614. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2017.01614/full> (дата обращения: 23.12.2025).

135. Suzuki, M. Whole picture of human stratum corneum ceramides, including the chain-length diversity of long-chain bases / M. Suzuki, Y. Ohno. – Текст : электронный // *Journal of Lipid Research*. – 2022. – Vol. 63, No. 6. – Article 100235. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227522000682> (дата обращения: 13.12.2025).

136. Taheri, S. M. *Debaryomyces hansenii* colonization and its protein profile in psoriasis / S. M. Taheri, M. T. Hedayati. – Текст : электронный // *Iranian Journal of Dermatology*. – 2014. – Vol. 17, No. 4. – P. 134–137. – URL: [https://www.iranjd.ir/article\\_98237.html](https://www.iranjd.ir/article_98237.html) (дата обращения: 23.12.2025).

137. Theelen, B. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment / B. Theelen, C. Cafarchia. – Текст : электронный // *Medical Mycology*. – 2018. – Vol. 56, No. 1. – P. S10–S25. – URL: [https://academic.oup.com/mmy/article-abstract/56/suppl\\_1/S10/4925974?redirectedFrom=fulltext](https://academic.oup.com/mmy/article-abstract/56/suppl_1/S10/4925974?redirectedFrom=fulltext) (дата обращения: 15.12.2025).

138. Tu, W. T. Utility of gram staining for diagnosis of *Malassezia* folliculitis / W. T. Tu, S. Y. Chin, C. L. Chou. – Текст : электронный // *Journal of Dermatology*. – 2018. – Vol. 45, No. 2. – P. 228–231. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1346-8138.14120> (дата обращения: 23.12.2025).

139. Weidinger, S. Atopic dermatitis / S. Weidinger. – Текст : электронный // *Nature Reviews Disease Primers*. – 2018. – Vol. 4. – Article 1. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067361500149X> (дата обращения: 14.12.2025).

140. Weitzman, I. The dermatophytes / I. Weitzman, R. Summerbell. – Текст : электронный // *Clinical Microbiology Reviews*. – 1995. – Vol. 8, No. 2. – P. 240–259. – URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.8.2.240> (дата обращения: 19.12.2025).

141. Wilson, S. R. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch / S. R. Wilson, L., L. M. Batia. – Текст : электронный // *Cell*. – 2013. – Vol. 155, No. 2. – P. 285–295. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741301088X> (дата обращения: 25.12.2025).

142. Winge, M. C. Filaggrin genotype determines functional and molecular alterations in skin of patients with atopic dermatitis and ichthyosis vulgaris / M. C. Winge, T. Hoppe, B. Berne. – Текст : электронный // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, No. 12. –

Article e28254. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0028254> (дата обращения: 15.12.2025).

143. Wollenberg, A. ETFAD/EADV Eczema task force 2015 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adult and paediatric patients / A. Wollenberg. – Текст : электронный // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. – 2016. – Vol. 30, No. 5. – P. 729–747. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdv.13599> (дата обращения: 12.12.2025).

144. Zargari, A. Serum IgE reactivity to Malassezia furfur extract and recombinant M. furfur allergens in patients with atopic dermatitis / A. Zargari, H. Eshaghi. – Текст : электронный // Acta Dermato-Venereologica. – 2001. – Vol. 81, No. 6. – P. 418–422. – URL: <https://medicaljournalssweden.se/actadv/article/view/13952> (дата обращения: 08.12.2025).

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

УТВЕРЖДАЮ



Зам. Директора ФГБУ «ГНЦ Институт  
иммунологии» ФМБА России по науке  
и инновациям

И.П. Шиловский

« 17 » 06 2025 г.

## АКТ


## о внедрении результатов НИР

Мы, нижеподписавшиеся: ведущий научный сотрудник отдела иммуногенетики ФГБУ «ГНЦ "Институт иммунологии"» ФМБА России Болдырева Маргарита Николаевна и ведущий научный сотрудник отделения аллергологии и иммунопатологии кожи Елисютина Ольга Гурьевна, составили настоящий акт о том, что методика полимеразной цепной реакции в реальном времени как универсальный метод диагностики бактериальных и грибковых инфекций у пациентов с атопическим дерматитом, разработанная в рамках диссертационной работы Носыревой Ксении Константиновны «Роль микробного дисбиоза кожи в иммунопатогенезе атопического дерматита», внедрена в отделение аллергологии и иммунопатологии кожи с 20 июня 2025 года.

Ведущий научный сотрудник отдела  
иммуногенетики ФГБУ «ГНЦ  
Институт иммунологии» ФМБА  
России

  
М.Н. Болдырева  
« 16 » 06 2025 г.

Ведущий научный сотрудник отделения  
аллергологии и иммунопатологии кожи  
ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии»  
ФМБА России ФГБУ «ГНЦ Институт  
иммунологии» ФМБА России

  
О.Г. Елисютина  
« 16 » 06 2025 г.