

О.Н. Зайнуллина¹, Д.В. Печкуров², З.Р. Хисматуллина¹, Л.В. Ганковская³**ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЕЙ TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 2 И ТИМИЧЕСКОГО СТРОМАЛЬНОГО ЛИМФОПОЭТИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ**¹ФГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Уфа,²ФГБОУ ВПО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Самара,³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» МЗ РФ, г. Москва, РФ

Цель исследования – оценить уровень Toll-подобного рецептора 2 (TLR-2) и тимического стромального лимфопоэтина (TSLP) в сыворотке крови у детей и установить связь этих показателей с тяжестью клинических проявлений атопического дерматита (АтД) и степенью микробной контаминации кишечника. Материалы и методы исследования: обследованы 68 детей с АтД в возрасте от 3 мес. до 6 лет и 31 условно-здоровый ребенок соответствующего возраста. Определение уровня в сыворотке крови TLR-2 и TSLP проводили методом иммуноферментного анализа, состав микрофлоры кишечника оценивали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Результаты: у детей с АтД медианный уровень TLR-2 в сыворотке крови составил 2,88 [1,60; 4,91] нг/мл, TSLP – 6,01 [1,11; 9,5] пг/мл, что статистически значимо выше, чем у условно-здоровых детей ($p < 0,0001$). Наиболее высокие уровни TLR-2 и TSLP отмечались при эритематозно-сквамозной с лихенификацией форме АтД – соответственно $Me = 6,10 [3,55; 10,62]$ нг/мл и $Me = 12,73 [5,81; 22,70]$ пг/мл. У детей со средней степенью тяжести АтД значения TLR-2 и TSLP статистически значимо ($p < 0,0001$) были выше по сравнению с легкой степенью АтД ($Me = 5,58 [2,29; 8,18]$ нг/мл против 0,72 [0,22; 2,02] нг/мл и 7,48 [4,25; 12,95] пг/мл против 0,64 [0,39; 0,75] пг/мл соответственно). Уровень TLR-2 и TSLP повышался с увеличением степени дисбиоза кишечника: $Me = 6,27 [4,14; 8,02]$ нг/мл при 3-й степени дисбиоза против 1,25 [0,46; 2,15] нг/мл при 1-й степени дисбиоза и 16,28 [10,01; 22,6] пг/мл при 3-й степени дисбиоза против 0,63 [1,33; 0,70] пг/мл при 1-й степени дисбиоза соответственно ($p < 0,0001$). Заключение: полученные данные об активации TLR-2 и TSLP при АтД подчеркивают системный характер воспалительной реакции, однако причинно-следственное соотношение между уровнем TLR-2 и TSLP и активностью АтД требует дальнейшего уточнения.

Ключевые слова: атопический дерматит, дети, Toll-подобные рецепторы, тимусный стромальный лимфопоэтин, кишечная микрофлора.

Цит.: О.Н. Зайнуллина, Д.В. Печкуров, З.Р. Хисматуллина, Л.В. Ганковская. Пилотное исследование уровней Toll-подобного рецептора 2 и тимического стромального лимфопоэтина в сыворотке крови детей с атопическим дерматитом. Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. 2021; 100 (2): 64–71.

О.Н. Zaynullina¹, D.V. Pechkurov², Z.R. Hismatullina¹, L.V. Gankovskaya³**THE PILOT STUDY OF TOLL-LIKE RECEPTOR LEVEL 2 AND THYMIC STROMAL LYMPHOPOIETIN IN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS**¹Bashkir State Medical University, Ufa, ²Samara State Medical University, Samara,³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia**Контактная информация:**

Зайнуллина Олеся Николаевна – к.м.н., асс. каф. дерматовенерологии с курсами дерматовенерологии и косметологии Института дополнительного профессионального образования Башкирского государственного медицинского университета
Адрес: Россия, 450010, г. Уфа, ул. Союзная, 37
Тел.: (347) 278-24-35
olisenok@mail.ru

Статья поступила 26.03.20
Принята к печати 24.03.21

Contact information:

Zainullina Olesya Nikolaevna – Cand. Med. Sc., Ass. Prof., Department of Dermatovenereology with courses in dermatovenereology and cosmetology at the Institute of Continuing Professional Education of the Bashkir State Medical University
Address: 37 Soyuznaya ul., Ufa, 450010, Russia
Phone: (347) 278-24-35
olisenok@mail.ru

Received on Mar. 26, 2020
Submitted for publication on Mar. 24, 2021

The aim of this study is to assess the level of Toll-like receptor level 2 (TLR-2) and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in the blood serum of children and to establish the relationship between these parameters and the severity of clinical manifestations of atopic dermatitis (AD) and the degree of microbial contamination of the gut. Research materials and methods: 68 children aged from 3 months to 6 years with an AD and 31 conditionally healthy children of the corresponding age were examined. Determination of the level of TLR-2 and TSLP in blood serum was carried out by enzyme immunoassay, and the composition of the intestinal microflora was assessed by MALDI-TOF mass spectrometry. Results: in children with AD, the median serum TLR-2 level was 2,88 [1,60; 4,91] ng/ml, TSLP – 6,01 [1,11; 9,5] pg/ml, which is statistically significantly higher than in conventionally healthy children ($p < 0,0001$). The highest levels of TLR-2 and TSLP were found in erythematous squamous with lichenification of the AD form – $Me = 6,10$ [3,55; 10,62] ng/ml and $Me = 12,73$ [5,81; 22,70] pg/ml respectively. In children with moderate severity of AD, TLR-2 and TSLP values were statistically significantly higher ($p < 0,0001$) compared to mild AD ($Me = 5,58$ [2,29; 8,18] ng/ml versus 0,72 [0,22; 2,02] ng/ml and 7,48 [4,25; 12,95] pg/ml versus 0,64 [0,39; 0,75] pg/ml, respectively). The level of TLR-2 and TSLP increased with the degree of intestinal dysbiosis: $Me = 6,27$ [4,14; 8,02] ng/ml at grade 3 dysbiosis versus 1,25 [0,46; 2,15] ng/ml at the 1st degree of dysbiosis and 16,28 [10,01; 22,6] pg/ml at the 3rd degree of dysbiosis versus 0,63 [1,33; 0,70] pg/ml at the 1st degree of dysbiosis, respectively ($p < 0,0001$). Results: the obtained data on the activation of TLR-2 and TSLP in AD emphasize the systemic nature of the inflammatory response; however, the causal relationship between the level of TLR-2 and TSLP and AD activity requires further verification.

Keywords: atopic dermatitis, children, Toll-like receptors, thymic stromal lymphopoietin, intestinal microflora.

For citation: O.N. Zaynullina, D.V. Pechkurov, Z.R. Hismatullina, L.V. Gankovskaya. The pilot study of Toll-like receptor level 2 and thymic stromal lymphopoietin in children with atopic dermatitis. *Pediatrics n.a. G.N. Speransky*. 2021; 100 (2): 64–71.

Мультифакторная природа атопического дерматита (АтД) позволяет предположить, что значительную роль в его патогенезе играют как локальные процессы в кожных покровах с привлечением иммунокомпетентных, эпителиальных клеток и синтезируемых ими цитокинов, так и системные изменения, затрагивающие весь организм и связанные с общими иммунорегуляторными факторами [1, 2].

Распознавание микроорганизмов системой врожденного иммунитета служит пусковым моментом, обеспечивающим успешную защиту от патогенов [3, 4]. Ключевыми распознающими рецепторами врожденного иммунитета являются Toll-подобные рецепторы (TLRs) [5–7].

Каждый TLR обладает специфичностью, распознавая определенные лиганды микроорганизмов. Так, TLR2 и TLR6, представленные на цитоплазматической мембране иммунокомпетентных клеток, распознают липотейхоевую кислоту грамположительных бактерий, запуская каскад иммунных реакций, определяя их интенсивность и направленность. Известно, что дисфункция в TLR2-сигналах приводит к персистенции стафилококков у пациентов, страдающих аллергодерматозами, в результате нарушения индукции противомикробных пептидов [8].

Рассмотрены данные о взаимодействии нормальной кишечной микрофлоры с TLR макроорганизма, и такое взаимодействие необходимо для поддержания гомеостаза кишечника [9, 10]. Клетки кишечного эпителия отличают нормальную микрофлору от чужеродной благодаря TLR, которые в норме не реагируют на лиганды этой микрофлоры [11]. В физиологических условиях взаимодействие лигандов кишечной микро-

флоры обеспечивает баланс функций кишечного эпителия и других клеток, баланс синтеза провоспалительных, противовоспалительных цитокинов и протективных факторов [9].

У больных АтД выявлено значительное ослабление в TLR2-опосредованной продукции провоспалительных цитокинов моноцитами периферической крови, что обуславливает повышение чувствительности к бактериальным и вирусным инфекциям, распространению кожного процесса [12–15]. Идентифицирована растворимая форма TLR-2 (sTLR-2) которая, как полагают, играет регулируемую роль, связывая микробные лиганды. Растворимые формы TLRs были идентифицированы в сыворотке, моче, слезах и слюне [16, 17]. Показано, что sTLR-2 возникает в результате отщепления эктодомена внеклеточного домена мембранного рецептора, он ингибирует связанные с мембраной TLR-сигнальные пути [18, 19].

Понятие «цитокины» объединяет множество гуморальных факторов, способных активировать или ингибировать пролиферацию и дифференцировку клеток организма человека, влиять на их функции и осуществлять контроль этих функций [20]. Цитокины играют важнейшую роль в регуляции иммунопатологических механизмов, проявляющихся, в частности, аллергическими реакциями.

Одним из ключевых цитокинов является тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP), который выполняет важные функции в нормальных физиологических условиях, в патологической ситуации оказывает влияние на деятельность клеток иммунной защиты и регулирует аллергические реакции организма [21–23].

TSLP образуется преимущественно клетками покровного эпителия [24, 25]. Кишечный эпителий, постоянно выделяя TSLP, поддерживает «невоспалительный» фенотип местных дендритных клеток, играющих ключевую роль в иммунном гомеостазе желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [26, 27]. Наибольшее количество TSLP образуют энтероциты толстой кишки, этому способствуют и сигналы, вызываемые микрофлорой кишечника.

Установлено, что TSLP играет важную роль в поддержании баланса активности Th-клеток 1-го и 2-го типа. В зависимости от характера инфекции TSLP может усиливать либо подавлять иммунные реакции. Особенно важно его участие в развитии аллергических заболеваний, при которых увеличивается экспрессия TSLP в эпителии, что приводит к повышению активности Th2 дендритными клетками и усугубляет воспалительную реакцию [28].

Изучение особенностей патогенеза АтД на основании оценки цитокинового профиля и выявление маркеров тяжести течения АтД – весьма актуальное направление клинической аллергологии и иммунологии для определения не только прогноза заболевания, но и терапевтических мишеней в будущем [29].

Цель исследования – оценить уровень TLR-2 и TSLP в сыворотке крови у детей и установить связь этих показателей с тяжестью клинических проявлений АтД и степенью микробной контаминации кишечника.

Материалы и методы исследования

Для достижения поставленной цели в 2018–2019 гг. проведено проспективное открытое контролируемое сплошное одноцентровое исследование. Исследование было пилотным, в связи с этим расчет необходимого объема выборки не проводили.

В исследование были включены 68 детей с АтД, находившихся на обследовании в ГАУЗ «Республиканский кожно-венерологический диспансер» в возрасте от 3 мес. до 6 лет. Все родители/законные представители детей, участвовавших в исследовании, подписывали протокол добровольного информированного согласия на включение ребенка в программу обследования, обработку его результатов и публикацию материалов, составленный в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека».

Диагноз АтД выставляли на основании анамнестических данных и характерной клинической картины согласно Национальным «Клиническим рекомендациям» Союза педиатров России, Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов и Российского общества, дерматовенерологов и косметологов (2016). Оценка клинических проявлений забо-

левания на момент госпитализации проводили путем подсчета индекса SCORAD: 32 ребенка (48%) имели легкие клинические проявления (SCORAD $12 \pm 7,3$ балла); 36 детей (52%) – среднетяжелые (SCORAD $32 \pm 6,9$ балла). Группу детей с АтД обозначили как основную, контрольную группу составил 31 условно-здоровый ребенок.

У обследованных детей наблюдали следующие клинические формы АтД: у 14 детей (21%) – экссудативную, у 17 – эритематозно-сквамозную. Наибольший удельный вес (26 детей – 38%) составила эритематозно-сквамозная форма АтД с лихенификацией. Лихеноидная форма заболевания диагностирована у 11 детей (16%).

В начале исследования все пациенты находились в фазе обострения кожного процесса с активными проявлениями в виде гиперемии, отека, наличия воспалительных папул и эскориаций. Основными жалобами пациентов были зуд и жжение кожи, нарушение сна, выраженные в различной степени.

В связи с тем, что использование метода «кожного окна» предполагает удаление с помощью скальпеля поверхностного слоя с эпидермиса площадью 4 мм (до появления эрозии), что травматично и болезненно, определение уровня TLR-2 и TSLP проводили в сыворотке крови. Использовали метод иммуноферментного анализа (ИФА) из единой пробы сыворотки крови в точном соответствии с инструкцией по применению, созданной производителем. Сущность анализа заключается в специфическом взаимодействии антитела и антигена с последующим присоединением к полученному комплексу конъюгата (антивидового иммуноглобулина, меченного ферментом). Фермент вызывает разложение хромогенного субстрата с образованием окрашенного продукта, который выявляется либо визуально, либо фотометрически. Исследования проводили с помощью иммуноферментного комплекса, состоящего из вошера «Проплан» (Picon, Россия), шейкера ElmiSkyLine 13 (Эстония) и спектрофотометра «Униплан» (Picon, Россия). В качестве диагностических тест-систем использовали наборы реагентов Human Toll-like Receptor 2 (TLR2) и Human TSLP Quantikine ELISA Kit (CUSABIO, Корея). Обработку данных осуществляли с построением калибровочных кривых путем применения программного пакета Ascent Software. Уровень TLR-2 выражали в пикограмм на миллилитр (пг/мл), уровень TSLP – в пикограммах на миллилитр (пг/мл).

Оценку состава микрофлоры кишечника проводили с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе Microflex LT производства Bruker®. Дисбиотические нарушения оценивали согласно Отраслевому стандарту «Протокол ведения больных» [30].

Полученные данные заносили в электронную таблицу для последующей обработки с применением пакетов прикладных программ обработки медико-биологических данных Statistica 13 (StatSoft) [31, 32]. Согласно результату предварительного анализа индивидуальные значения уровней TLR-2 и TSLP в основной группе могли различаться не просто кратно,

Особенности содержания TLR-2 и TSLP в сыворотке крови наблюдаемых детей

Показатели	Дети с АтД (n=68)		Контрольная группа (n=31)		p
	min–max	Me [Q1; Q3]	min–max	Me [Q1; Q3]	
TLR-2, нг/мл	0,13–17,16	2,88 [1,60; 4,91]	0,06–1,25	0,61 [0,22; 0,74]	p<0,0001
TSLP, пг/мл	0,63–55,45	6,01 [1,11; 9,5]	0,02–2,34	0,50 [0,22; 0,70]	p<0,0001

Таблица 2

Уровень TLR-2 и TSLP в сыворотке крови у детей с различными клиническими формами АтД (Me [Q1; Q3])

Клинические формы	TLR-2, нг/мл	TSLP, пг/мл
Экссудативная (n=14)	3,93 [2,61; 4,84]	8,64 [5,93; 10,42]
Эритематозно-сквамозная (n=17)	2,73 [0,74; 3,43]	5,09 [2,33; 6,98]
Эритематозно-сквамозная с лихенификацией (n=26)	6,10 [3,55; 10,62]	12,73 [5,81; 22,70]
Лихеноидная (n=11)	3,88 [0,74; 5,06]	4,02 [2,91; 9,50]

а на несколько порядков, а при учете таких факторов, как возраст, тяжесть заболевания и степень дисбиоза, выделяемые подгруппы оказывались еще и достаточно малочисленными. Соответственно, анализ результатов с помощью параметрических методов и оценок средних значений представлялся некорректным. В связи с этим математико-статистическую обработку данных осуществляли с применением непараметрических методов, независимых от формы распределения, пригодных даже на предельно малых выборках и малочувствительных к артефактам [33, 34].

Для общей оценки наличия различий групп и подгрупп детей использовали ранговый критерий Краскела–Уоллиса, а для попарного сравнения конкретных групп – ранговый критерий Манна–Уитни. При описании результатов использовали оценки медиан (Me), квартилей [Q1 и Q3] и границ вариации (min–max).

Номинальные данные описывали с указанием абсолютных значений, процентных долей и границ 95% доверительного интервала (95% ДИ). Сравнение номинальных данных проводили при помощи критерия χ^2 Пирсона.

Для оценки тесноты связи TLR-2 и TSLP использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена (r). Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

Результаты и их обсуждение

Среди обследованных детей преобладали мальчики (35 детей, 52% в основной группе; 17 детей, 55% – в контрольной группе). При анализе возрастной структуры установлено, что группу пациентов в возрасте от 3 мес. до 3 лет (1-я возрастная группа) составили 23 ребенка (34%), в возрасте от 3 до 6 лет (2-я возрастная группа) – 45 детей (66%). В контрольной группе распределение детей по возрасту составило: 12 детей (39%) – в 1-й возрастной группе, 19 детей (61%) – во 2-й возрастной группе. Основная и контрольная группы были сопоставимы по полу ($\chi^2=0,324$, p>0,56) и выделенным возрастным группам ($\chi^2=0,364$, p>0,54).

В результате проведенного исследования выявлено, что индивидуальные значения уровня показателей TLR-2 и TSLP распределяются в широком диапазоне минимальных и максимальных значений (границы вариаций), что более выражено в группе детей с АтД (табл. 1).

Медианные значения концентрации TLR-2 и TSLP в сыворотке крови детей с АтД были статистически значимо выше, чем в контрольной группе. Можно предположить, что высокий уровень показателей TLR-2 и TSLP у детей с АтД объясняется их участием в поддержании аллергического воспалительного процесса.

Оценка степени корреляционной связи между уровнями TLR-2 и TSLP в группе детей с АтД показала статистически значимую, но слабую связь (p=0,38, p=0,002). В контрольной группе такая связь фактически отсутствовала (p=0,007, p=0,98).

Нами проведена оценка медианных значений TLR-2 и TSLP в сыворотке крови в зависимости от клинической формы АтД (табл. 2).

Различия уровня TLR-2 у детей с экссудативной, эритематозно-сквамозной и лихеноидной формами оказались незначимыми (p=0,12÷0,78). Значимо (p=0,04÷0,009) более высокий уровень TLR-2 имел место при эритематозно-сквамозной с лихенификацией форме АтД.

Уровень TSLP при эритематозно-сквамозной форме АтД оказался значимо выше такового при экссудативной форме (p=0,006), но значимо не отличался (p=0,13) от уровня у детей с лихеноидной формой. Между эритематозно-сквамозной и лихеноидной формами значимых различий не было (p=0,71), причем в каждой из них уровень TSLP оказался значимо ниже, чем при эритематозно-сквамозной с лихенификацией форме (p<0,0001 и p=0,02 соответственно), где уровень содержания TSLP был наиболее высок, но значимо не отличался от такового при экссудативной форме (p=0,07).

Таким образом, наиболее высокий средний уровень исследуемых показателей выявлен в

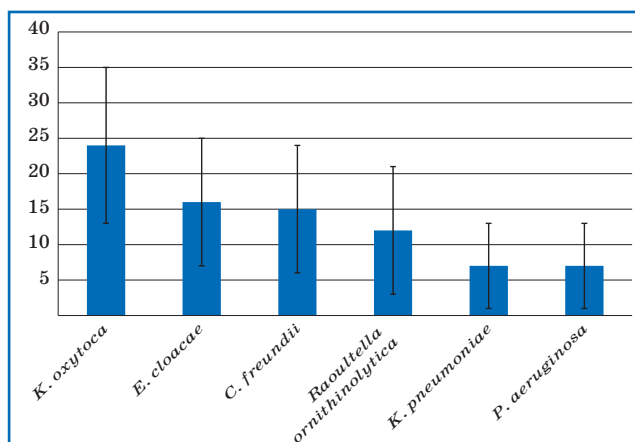


Рис. 1. Относительная частота выявления условно-патогенных бактерий в фекалиях у детей с АтД. По оси ординат – относительная частота с указанием 95% ДИ – доля случаев обнаружения данной бактерии у ребенка в % по отношению к общему числу детей.

группе детей с эритематозно-сквамозной с лихенификацией формой АтД, что может быть связано с более выраженным воспалительным процессом на коже при данной форме АтД.

По результатам микробиологического исследования кала с идентификацией микроорганизмов с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии у всех детей с АтД были выявлены нарушения микробиоценоза кишечника. У всех больных определен значительный дефицит лактобацилл, у 58 детей (85%) выявлено снижение уровня бифидобактерий, у 14 (21%) – повышение уровня энтерококков. Снижение количества кишечной палочки с нормальными свойствами (*Escherichia coli*) отмечено у 25 (37%) пациентов.

Известно, что *Lactobacillus spp.* стимулируют образование секреторного IgA, который нейтрализует пищевые аллергены и уменьшает их всасывание в кишечнике. Уменьшение уровня *Lactobacillus spp.* в кишечнике больных АтД способствует формированию аллергического воспаления слизистой оболочки [35].

По результатам анализа особенностей видового состава облигатной микрофлоры кишечного микробиоценоза у детей с АтД выявлено, что чаще всего из лактобактерий определялся *B. longum* (57%), на втором месте по частоте – *B. animalis* (18%). Среди лактобактерий чаще всего обнаруживались *L. paracasei* (29%), *L. rhamnosus* (21%), *L. paralimentabilis* (15%).

Нами также был изучен видовой состав условно-патогенных микроорганизмов в кишечнике у детей с АтД (рис. 1).

Среди условно-патогенных бактерий в фекалиях чаще всего (25±5%) встречались случаи выявления *K. oxytoca*, а реже всего (по 7±3%) – *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. Эти различия оказались статистически значимыми (p=0,008).

С меньшей частотой встречались *Raoultella ornithinolytica*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* (16±4%, 15±4% и 12±4% соответственно) и значимо не отличались (p=0,07÷0,24) ни между собой, ни от крайних значений. Остальные микроорганизмы встречались в единичных случаях.

Значительное увеличение условно-патогенной флоры в кишечнике больных АтД в период обострения, вероятно, вызывает повреждение целостности стенки кишечника, что стимулирует активацию всех звеньев иммунитета, включая аллергические реакции. Это подтверждается результатами нашего исследования – чем выше степень дисбиоза кишечника у детей с АтД, тем выше медианное значение TLR-2 и TSLP в сыворотке крови (табл. 3).

Зависимость уровня содержания TLR-2 от наличия сопутствующего дисбиоза кишечника и степени его тяжести оказалась высокозначимой ($\chi^2=72,8$, p<0,0001). Она обусловлена тем, что уже при 1-й степени дисбиоза уровень TLR-2 был значимо выше (p<0,0002) по сравнению с контрольной группой. По мере усиления степени дисбиоза уровень TLR-2 последовательно и значимо возрастал. При дисбиозе 2-й степени медианное значение TLR-2 значимо (p<0,0001) возросло до 4,01 нг/мл, а при дисбиозе 3-й степени также значимо (p=0,03) увеличилось до 6,27 нг/мл.

Аналогичная ($\chi^2=70,2$, p<0,0001) зависимость имела место и для уровней TSLP. Однако в данном случае уровни содержания TSLP при дисбиозе 1-й степени и в контрольной группе близки, а при дисбиозе 2-й степени показатель значимо возрастает до Me=8,07 [4,92; 21,4] пг/мл (p<0,001) и при дисбиозе 3-й степени также увеличивается до Me=16,28 [10,01; 22,6] пг/мл (p<0,0001).

Нами было проведено сравнение медианных значений концентрации TLR-2 и TSLP в сыворотке крови в зависимости от тяжести течения АтД (табл. 4). Обнаружено статистически зна-

Таблица 3

Уровни TLR-2 и TSLP сыворотки крови у детей с АтД при разной степени дисбиоза кишечника (Me [Q1; Q3])

Показатели	Основная группа			Контрольная группа
	1-я степень дисбиоза (n=29)	2-я степень дисбиоза (n=24)	3-я степень дисбиоза (n=15)	
TLR-2, нг/мл	1,25 [0,46; 2,15]	4,01 [3,17; 5,17]	6,27 [4,14; 8,02]	0,61 [0,22; 0,74]
TSLP, пг/мл	0,63 [1,33; 0,70]	8,07 [6,34; 9,19]	16,28 [10,01; 22,6]	0,50 [0,22; 0,70]

Уровни TLR-2 и TSLP в сыворотке крови у детей в зависимости от тяжести клинических проявлений АтД (Me [Q1; Q3])

Показатели	Легкая степень АтД (n=32)	Средняя степень АтД (n=36)	p
TLR-2, нг/мл	0,72 [0,22; 2,02]	5,58 [2,29; 8,18]	p<0,0001
TSLP, пг/мл	0,64 [0,39; 0,75]	7,48 [4,25; 12,95]	p<0,0001

чимое превышение уровня исследуемых показателей у детей с АтД средней степени тяжести по сравнению с показателями у детей с легкой степенью АтД ($p<0,0001$). Так, в группе со средней степенью тяжести АтД по сравнению с легкой степенью медианное значение уровня TLR-2 в сыворотке крови превышало в 7,7 раза, а TSLP – в 11,7 раза.

Взаимосвязь между концентрацией TLR-2 и TSLP в сыворотке крови и степенью тяжести АтД у детей говорит о значимости этих показателей в механизмах регуляции иммунопатологических состояний. Эти данные коррелируют с результатами исследования содержания TLRs и цитокинов у детей с бронхиальной астмой в зависимости от степени тяжести заболевания [36, 37].

Поскольку дети основной группы различались по возрасту и степени тяжести АтД, а дети контрольной – только по возрасту, для обеспечения приемлемой корректности сравнений уровней TLR-2 и TSLP мы разделили их на 6 подгрупп: 1 – 1-я возрастная группа с легкой степенью АтД; 2 – 1-я возрастная со средней степенью АтД; 3 – 2-я возрастная с легкой степенью АтД; 4 – 2-я возрастная со средней степенью АтД; 5 – 1-я возрастная контрольная группа; 6 – 2-я возрастная контрольная группа.

По итогам анализа по критерию Краскела–Уоллиса показано, что различия уровней TLR-2 в целом имеют место ($\chi^2=41,9$, $p<0,0001$), но, как видно, на рис. 2, носят специфический характер. Наиболее низок уровень TLR-2 в 1-й подгруппе детей с АтД (Me=0,46 [0,29; 0,62] нг/мл) и обеих возрастных подгруппах условно-здоровых детей (Me=0,62 [0,28; 0,74] нг/мл и Me=0,52 [0,19; 0,73] нг/мл соответственно). При этом согласно критерию Манна–Уитни уровни TLR-2 в обеих возрастных подгруппах контрольной группы значимо не отличаются ($p=0,63$), а у детей 1-й возрастной группы с легкой степенью АтД (подгруппа 1) он значимо не отличается от значений в обеих контрольных группах ($p=0,38$ и $p=0,98$ соответственно). У детей 2-й возрастной группы с легкой степенью АтД (подгруппа 3) уровень содержания TLR-2 (0,91 [0,64; 2,88] нг/мл) оказался значимо выше, чем в подгруппе 1 и двух контрольных подгруппах ($p=0,02$). Наиболее высокие уровни содержания TLR-2 в подгруппах 2 и 4 у детей со средней степенью тяжести АтД: Me=2,9 [0,74; 8,22] нг/мл и Me=4,64 [2,39; 8,14] нг/мл соответственно. Значимых различий между этими подгруппами не обнаруже-

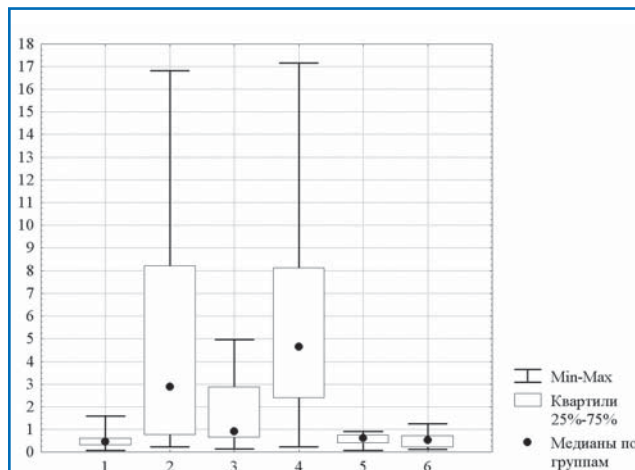


Рис. 2. Уровни содержания TLR-2 у детей с АтД в подгруппах разного возраста и степени тяжести заболевания и у детей контрольной группы разного возраста.

По оси абсцисс – номера подгрупп детей (расшифровка в тексте), по оси ординат – уровни TLR-2 в сыворотке крови (нг/мл).

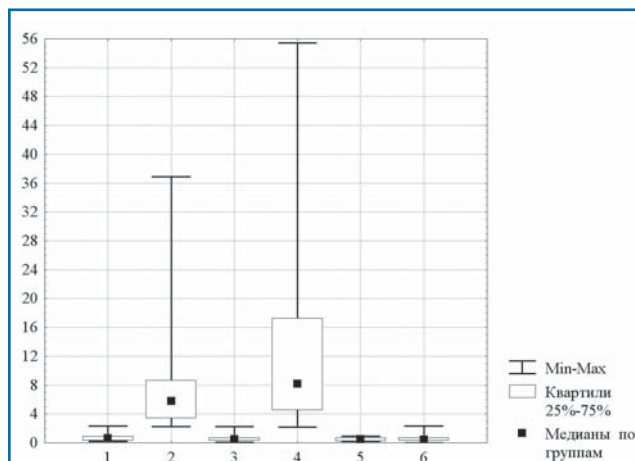


Рис. 3. Уровни содержания TSLP у детей с АтД в подгруппах разного возраста и степени тяжести заболевания и у детей контрольной группы разного возраста.

По оси абсцисс – номера подгрупп детей (расшифровка в тексте), по оси ординат – уровни TSLP в сыворотке крови (пг/мл).

но ($p=0,44$), однако они оказались значимо (от $p=0,05$ до $p<0,0001$) выше, чем во всех остальных подгруппах основной и контрольной групп.

В принципе, аналогичная картина имела место и для уровней содержания TSLP (рис. 3). В целом значимая зависимость уровня TSLP от принадлежности детей к той или иной группе ($\chi^2=54,4$, $p<0,0001$) обусловлена, как видно, также резким превышением над всеми прочими группами уровня TSLP у детей подгрупп 2 и 4 (средняя степень АтД): Me=5,81 [3,41; 8,67] пг/мл и Me=8,21 [4,49; 17,3] пг/мл соответственно.

Различия этих групп оказались статистически незначимыми ($p=0,30$, но превышение над прочими группами было резко выражено ($p<0,0001$ для всех случаев).

Следует также отметить, что уровни TSLP при легкой степени АтД независимо от возраста оказались достаточно близки ($Me=0,62 [0,28; 0,91]$ пг/мл и $Me=0,48 [0,29; 0,70]$ пг/мл для подгрупп 1 и 3 соответственно) и значимо не различались ($p=0,53$). То же имело место в обеих возрастных подгруппах контрольной группы – $Me=0,50 [0,21; 0,70]$ пг/мл и $Me=0,45 [0,25; 0,73]$ пг/мл соответственно ($p=0,89$). Соответственно, не было значимых различий подгруппы 1 и 3 с обеими контрольными – $p=0,57$ и $p=0,56$, а также $p=0,95$ и $p=0,80$ соответственно.

Таким образом, статистически значимое повышение уровня TLR-2 и TSLP в сыворотке крови детей с АтД указывает на участие данных показателей в патогенезе дерматоза. При этом уровень показателей повышается с увеличением степени тяжести АтД и степени дисбиоза кишечника. Наши данные подтверждают значимость TLR-2 и TSLP в индукции аллергических процессов и указывают на их повышенный синтез и активное участие в реализации аллергического воспаления.

Сегодня проводятся исследования механизмов реализации врожденного иммунитета, выявляющие роль определенного вида рецепторов, распознающих «образы» патогенов (PRRs) в патогенезе АтД. Исследования TLR выявили их ключевую роль в детекции патогенных микроорганизмов и реализации ранних механизмов врожденного иммунитета. В зарубежной литературе имеются статьи обзорного характера, посвященные исследованиям TLRs и цитокинов при некоторых дерматозах [38, 39]. Описана роль TSLP и TLR-2 как факторов, влияющих на микробную колонизацию кожи и участвующих в иммунопатогенезе АтД [40].

Многочисленные экспериментальные исследования, а также накапливающиеся результаты из клинической практики убедительно свидетельствуют о ключевой роли TLRs в патогенезе иммунопатологических заболеваний. Дисбаланс в системе Th-клеток может быть вызван недостаточностью микробного воздействия в раннем детстве во время активного становления иммунной системы из-за пониженной активации и экспрессии TLR.

TLR широко экспрессируются клетками врожденного иммунитета, в частности макрофа-

гами, нейтрофилами, моноцитами, дендритными клетками, а также эпителиальными клетками слизистых оболочек. TLR проводят активационные сигналы внутрь клетки и индуцируют воспалительные реакции, участвуя тем самым в реализации механизмов иммунной защиты [41–43]. При АтД увеличена экспрессия TLR на моноцитах [44]. Можно предположить, что увеличение этих рецепторов в сыворотке крови в растворимой форме связано с их усиленным сбросом с мембран клеток у больных АтД.

Ограничением данной работы следует признать отсутствие расчета необходимого объема выборки, так как исследование пилотное.

Заключение

Полученные данные об активации TLR-2 и TSLP при АтД подчеркивают системный характер воспалительной реакции, который включает не только поражение кожи, но и изменение кишечного биоценоза. Установлена связь этих показателей с тяжестью течения кожного процесса и степенью дисбиоза кишечника. Учитывая имеющиеся данные о роли TLR-2 и TSLP в развитии воспалительной реакции различных систем, причинно-следственный характер этой связи требует дальнейшего уточнения.

Вклад авторов: все авторы в равной степени внесли свой вклад в рукопись, рассмотрели ее окончательный вариант и дали согласие на публикацию.

Финансирование: все авторы заявили об отсутствии финансовой поддержки при подготовке данной рукописи.

Конфликт интересов: все авторы заявили об отсутствии конкурирующих интересов.

Примечание издателя: ООО «Педиатрия» остается нейтральным в отношении юрисдикционных претензий на опубликованные материалы и институциональных принадлежностей.

Authors contribution: all authors contributed equally to this manuscript, revised its final version and agreed for the publication.

Funding: all authors received no financial support for this manuscript.

Competing interests: the authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note: Pediatra LLC remains neutral with regard to jurisdictional claims in published materials and institutional affiliations.

Zaynullina O.N.  0000-0002-6366-3595

Pechkurov D.V.  0000-0002-5869-2893

Hismatullina Z.R.  0000-0001-8674-2803

Gankovskaya L.V.  0000-0003-1271-3078

Список литературы

1. Gittler JK, Shemer A, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQF, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130: 1344–1354.
2. Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunological Reviews.* 2011; 242; 1: 233–246.

3. Быкова В.П., Калинин Д.В. Иммунный барьер слизистых оболочек в современном прочтении: клиническая лекция. *Российская ринология.* 2009; 1: 40–42.

4. Лебедева О.П., Пахомов С.П., Калущий П.В., Карпов П.А., Чурносков М.И., Попов В.Н. Роль Толл-подобных рецепторов врожденного иммунитета в развитии акушерской и гинекологической патологии. *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2012; 1: 19–26.

5. Ковальчук Л.В., Черноусова Л.Н., Соколова Е.В., Ганковская Л.В., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е. и др. Регуляторное действие комплекса природных цитокинов и противомикробных пептидов на мышиные макрофаги, инфицированные *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью. Журнал микробиологии, иммунологии и иммунобиологии. 2010; 3: 52–55.
6. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2011: 640.
7. Lloyd S, Miller MD. Toll-like receptors in skin. Dermatol. 2008; 24: 71–87.
8. Снарская Е.С. Некоторые клинико-иммунологические аспекты патогенеза атопического дерматита и роль толл-подобных рецепторов. Лечащий врач. 2012; 4: 109–110.
9. Бондаренко В.М., Лиходед В.Г. Взаимодействие кишечной микрофлоры с Toll-подобными рецепторами в норме и патологии. Медицинский вестник Юга России. 2010; 1: 4–8.
10. Rakoff-Wahoum S, Paglino J, Esmali-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell. 2004; 118 (2): 229–241.
11. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунофизиология эпителиальных клеток и образраспознающие рецепторы. Физиология человека. 2006; 32 (2): 97–109.
12. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010: 752.
13. Катунина О.Р. Функции Toll-подобных рецепторов как компонента врожденного иммунитета и их участие в патогенезе дерматозов различной этиологии. Вестник дерматологии и венерологии. 2011; 2: 18–25.
14. Сорокина Е.В., Масюкова С.А. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе некоторых дерматозов. Клиническая дерматология и венерология. 2011; 5: 13–17.
15. Сорокина Е.В. Toll-подобные рецепторы и первичное распознавание патогена при дерматозах инфекционной и неинфекционной этиологии. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012; 2: 6–15.
16. Hossain MJ, Morandi E, Tanasescu R, Frakich N, Caldano M, Onion D, et al. The Soluble Form of Toll-Like Receptor 2 Is Elevated in Serum of Multiple Sclerosis Patients: A Novel Potential Disease Biomarker. Front. Immunol. 2018; 9: 457.
17. Zunt SL, Burton LV, Goldblatt LI, Dobbins EE, Srinivasan M. Soluble forms of Toll-like receptor 4 are present in human saliva and modulate tumour necrosis factor- α secretion by macrophage-like cells. Clin. Exp. Immunol. 2009; 156 (2): 285–293.
18. AlQallaf H, Hamada Y, Blanchard S, Shin D, Gregory R, Srinivasan M. Differential profiles of soluble and cellular toll like receptor (TLR)-2 and 4 in chronic periodontitis. PLoS ONE. 2018; 13 (12): e0200231.
19. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. Nat. Rev. Immunol. 2005; 5 (6): 446–458.
20. Виноградова Т.В., Чусляева А.А., Варламов Е.Е., Ружицкая Е.А., Сухоруков В.С., Пампура А.Н. Современная оценка цитокинового статуса детей при атопическом дерматите. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2014; 1: 76–81.
21. Абдуллин Т.Г., Гамгия А.В., Зайцев В.Б. Современные представления о тимусном стромальном лимфопоэстине. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2012; 7: 71–72.
22. Lambrecht BN, Hammad H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. Immunity. 2009; 31 (3): 412–424.
23. Sarah R Wilson, Lydia Thé, Lyn M Batia, Maurizio Pellegrino, Daniel M Estandian, Diana M Bautista. The Epithelial Cell-Derived Atopic Dermatitis Cytokine TSLP Activates Neurons to Induce Itc. Cell. 2013; 155 (2): 285–295.
24. Demehri S, Morimoto M, Holtzman MJ, Kopan R. Skin-derived TSLP triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma. PLoS Biol. 2009; 7: e1000067.
25. Headley MB, Zhou B, Shih WX, Aye T, Co-meau MR, Ziegler SF. TSLP conditions the lung immune environment for the generation of pathogenic innate and antigen-specific adaptive immune responses. J. Immunol. 2009; 182: 1641–1647.
26. Iliev ID, Spadoni I, Miletì E, Matteoli G, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. Gut. 2009; 58 (11): 1481–1489.
27. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. Nat. Immunol. 2005; 6: 507–514.
28. Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. J. Exp. Med. 2005; 202: 1213–1223.
29. Варламов Е.Е., Пампура А.Н., Сухоруков В.С. Значение цитокинов в патогенезе атопического дерматита. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2018; 63 (1): 28–33.
30. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91 500.11.0004-2003). М., 2003.
31. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2002: 312.
32. Халфин А.А. Statistica 6. Статистический анализ данных. М.: Бином, 2008: 505.
33. Холлендер М., Вульф Д. Непараметрические методы статистики. М.: Финансы и статистика, 1983: 518.
34. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998: 459.
35. Ардатская М.Д., Минушкин О.Н. Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции. Consilium Medicum. 2006; 8: 2.
36. Ганковская Л.В., Намазова-Баранова Л.С., Хорева М.В., Брагвадзе Б.Г., Огуцова А.Д., Алексеева А.А. и др. Особенности экспрессии Toll-подобного рецептора 2 и Toll-подобного рецептора 4 у детей с бронхиальной астмой. Медицинская иммунология. 2017; 19 (4): 431–440.
37. Ганковская Л.В., Намазова-Баранова Л.С., Порядин Г.В., Греченко В.В., Ганковский В.А., Алексеева А.А. и др. Изменение показателей врожденного иммунитета при тяжелой бронхиальной астме у детей. Медицинская иммунология. 2019; 21 (1): 99–106.
38. Charles J, Chaperot L, Salameire D, Domizio Di J, Aspor C, Gressin R, et al. Plasmacytoid dendritic cells and dermatological disorders: focus on their role in autoimmunity and cancer. Eur. J. Dermatol. 2010; 20 (1): 16–23.
39. Miller LS. Toll-like receptors in skin. Adv. Dermatol. 2008; 24: 71–87.
40. Kai HH, Cornelissen C, Lüscher B, Baron JM. Cytokines and the Skin Barrier. Int. J. Mol. Sci. 2013; 14: 6720–6745.
41. Свитич О.А., Намазова-Баранова Л.С., Брагвадзе Б.Г., Зайцева М.А., Ганковская Л.В. Механизмы врожденного иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы. Аллергология и иммунология. 2016; 17 (3): 194–196.
42. Chen K, Yi X, Liu Y, Gong W, Yoshimura T, Wang JM. The active contribution of Toll-like receptors to allergic airway inflammation. International Immunopharmacology. 2011; 11 (10): 1391–1398.
43. Gillina FG Bezemer, Seil Sagar, Jeroen van Bergen-henegouwen, Niki A Georgiou, Johan Garssen, Aletta D Kraneveld, Gert Folkerts. Dual Role of Toll-Like Receptors in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Pharmacological Reviews. 2012; 64 (2): 337–358.
44. Namjil N. Tsybikov, Irina Petrisheva, Elena V. Fefelova, Boris I. Kuznik, Eli Magen. Expression of TLR2 and TLR4 on peripheral blood monocytes during exacerbation of atopic dermatitis. Allergy and Asthma Proceedings. 2015; 36 (6): 140–145.