

Микробиом кожи при аутоиммунной пузырчатке: сравнительный анализ разнообразия бактерий в зависимости от получаемой терапии

Н.П. Теплюк¹, Ю.В. Колесова¹, Н.О. Вартанова², А.Ю. Леонова², С.В. Тоццаков³, А.Д. Козлова³, А.А. Лепехова¹

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

² Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Skin microbiome in autoimmune pemphigus: a comparative analysis of bacterial diversity in relation to treatment

N.P. Teplyuk¹, Yu.V. Kolesova¹, N.O. Vartanova², A.Yu. Leonova², S.V. Toshchakov³, A.D. Kozlova³, A.A. Lepekhova¹

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

² I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

³ National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia

Аннотация

Обоснование. Аутоиммунная Пузырчатка (АП) – хроническое, жизнеугрожающее заболевание кожи и слизистых. На сегодняшний день имеются эффективные схемы терапии, однако смертность среди пациентов с пузырчаткой выше, чем в популяции. Лидирующие причины смерти занимают инфекционные осложнения. Последние годы выявлена ключевая роль изменения микробиома при ряде кожных заболеваний. Также публикуется всё больше работ, посвящённых исследованию микробиома кожи у пациентов с АП, однако они имеют ряд ограничений и требуют дальнейшего изучения проблемы с целью понимания роли микробного состава кожи в течении АП. **Цель исследования:** изучить состав микробиома кожи культуральным методом у пациентов с АП (в активной стадии и в ремиссии), провести корреляционный анализ состава микробиома и получаемой терапией.

Методы. Экспериментальное проспективное сравнительное исследование. В работу включены 44 пациента с установленным диагнозом АП (16 мужчин, 36,4%; 28 женщин, 63,6%; средний возраст 51,5±13,1 года), а также 10 человек группы контроля (7 женщин, 70%; 3 мужчин, 30%; средний возраст 40±12,5 года). Набор пациентов производился в период с ноября 2021 г. по июнь 2023 г. в Клинике кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова.

Результаты. Получено и проанализировано 79 образцов с кожи. Во всех представленных образцах выявлен рост только бактерий. В ходе исследования не было обнаружено статистически значимой разницы между составом микробиома неизменённой кожи пациентов с АП в актив-

Summary

Background. Autoimmune pemphigus (AP) is a chronic, life-threatening disease of the skin and mucous membranes. Effective therapeutic options are currently available, but mortality in AP patients is higher than in the general population. The leading causes of death are infectious complications. Recent years have revealed the key role of microbiome alteration in a number of skin diseases. There is an increasing number of published studies examining the skin microbiome in patients with AP, but they have a number of limitations and require further research to understand the role of skin microbial composition in the course of AP.

Aims: to study the composition of skin microbiome by culture method in patients with AP (in active stage and in remission), to perform correlation analysis of microbiome composition and therapy received.

Materials and methods. Experimental prospective comparative study. Forty-four patients with diagnosed AP (16 men, 36.4%; 28 women, 63.6%; mean age 51.5±13.1 years) and 10 controls (7 women, 70%; 3 men, 30%; mean age 40±12.5 years) were included. Patients were enrolled between November 2021 and June 2023 at the V.A. Rakhmanov Clinic of Skin and Venereal Diseases.

Results. Seventy-nine skin samples were obtained and analysed. Only bacterial growth was detected in all submitted samples. No statistically significant difference was found between the composition of the microbiome of the unchanged skin of patients with AP in the active stage and in remission and the control group. In patients in the active stage of AP, a significant difference was found between the composition

ной стадии и в ремиссии и группой контроля. У пациентов в активной стадии АП выявлена достоверная разница между составом микробиома с элементов сыпи и неизменённой кожи. На коже с элементами сыпи преобладает *S. aureus*, а на неизменной коже – *S. hominis*. У пациентов до начала терапии глюкокортикостероидами (ГКС) отмечается преобладание в образцах *S. aureus* и снижение микробного разнообразия. У пациентов, получающих терапию ГКС, преобладают *S. hominis* и *S. epidermidis*, отмечается большее микробное разнообразие.

Заключение. В процессе исследования выявлено, что микробиом кожи с элементов сыпи пациентов с АП претерпевает существенные изменения в ходе активной стадии заболевания, в основном за счёт колонизации кожи *S. aureus*. Однако на фоне терапии ГКС отмечается тенденция к нормализации состава микрофлоры кожи, что демонстрирует отсутствие различий в составе микробиома пациентов в ремиссии АП и группы контроля.

Ключевые слова

Аутоиммунная пузырчатка, микробиом, вульгарная пузырчатка, себорейная пузырчатка.

Обоснование

Аутоиммунная пузырчатка (АП) – группа тяжёлых, жизнеугрожающих буллёзных дерматозов, проявляющихся образованием пузырей на коже и слизистых оболочках, образующихся в результате фиксации циркулирующих аутоантител IgG на компонентах десмосом многослойного плоского эпителия [1].

Данная группа заболеваний является достаточно редкой и имеет неравномерное географическое и этническое распределение [2]. Ежегодные показатели заболеваемости варьируют от менее 0,76 на 1 млн населения в Финляндии до 16,1 на миллион населения в Израиле [3]. В России в 2015 году заболеваемость АП составила 1,9 случая на 100 000 населения, распространённость – 4,8 случая на 100 000 [2,4].

На сегодняшний день разработаны схемы эффективной терапии пузырчатки, позволяющие достичь стабильной и длительной ремиссии [2]. Основным методом лечения остаются системные глюкокортикостероиды (ГКС) в высоких дозировках с последующим медленным снижением дозы в сочетании с иммуносупрессантами (азатиоприн, микофенолата мофетил и др.), обладающими стероид-сберегающим эффектом [2,3,5]. Однако рецидивы АП возникают у 50% пациентов, а тяжёлые побочные явления, связанные с приёмом иммуносупрессивной терапии, – у 65% [5].

За последние десятилетия исследования, проведённые в различных странах, показали, что риск смерти при АП в 1,7-3 раза выше, чем в популяции [5]. Важно отметить, что такие причины

of the microbiome from rash elements and unchanged skin. *S. aureus* prevails on the skin from rash elements, and *S. hominis* dominates on unchanged skin. In patients before the start of glucocorticosteroid (GCS) therapy, a predominance of *S. aureus* in the samples and a decrease in microbial diversity is noted. In patients receiving GCS therapy, *S. hominis* and *S. epidermidis* predominate, and greater microbial diversity is also noted.

Conclusions. The study revealed that the skin microbiome from the rash elements of patients with AP undergoes significant changes during the active stage of the disease, mainly due to colonisation of the skin by *S. aureus*. However, against the background of therapy with systemic GCS there is a tendency to normalisation of skin microflora composition, which demonstrates that there are no differences in the composition of the microbiome of patients in remission of AP and control groups.

Keywords

Autoimmune pemphigus, microbiome, pemphigus vulgaris, seborrheic pemphigus.

смерти, как сердечно-сосудистые заболевания и осложнения язвенной болезни, уступают лидирующие позиции инфекционным осложнениям (пневмония и сепсис) [5]. При этом источником инфекции обычно является кожа [6].

Кожа представляет собой барьер между внутренней средой организма и внешними факторами и является кислой, холодной, относительно сухой и скудной по питательным веществам средой, что представляет сложности для колонизации микроорганизмами [7]. Несмотря на это, благодаря процессам адаптации широкий спектр микробов способен найти на коже стабильную экологическую нишу и находиться с макроорганизмом во взаимовыгодных отношениях [8]. Взаимодействие между кожным микробиомом и иммунной системой макроорганизма может влиять на манифестацию и/или рецидив различных кожных заболеваний, таких как атопический дерматит, акне, розацеа и др. [9].

Так, в своей работе Scaglione G.L. и соавт. выявили преобладание типа Firmicutes на коже пациентов с АП, особо выделив род *Staphylococcus* [10].

Lili L.I. и соавт. также выявили преобладание рода *Staphylococcus* на коже пациентов по сравнению с преобладанием рода *Corynebacterium* у группы контроля [11]. К тому же они отметили разницу преобладающих родов бактерий на коже пациентов в зависимости от продолжительности заболевания [11].

На сегодняшний день опубликованные работы по изучению состава микробиома кожи у пациентов с АП имеют ряд ограничений: не-

большая выборка пациентов, не во всех работах имеются сравнения с группой контроля и корреляционный анализ со степенью тяжести заболевания или получаемой терапией, также многие работы являются ретроспективными и основаны на изучении историй болезней пациентов [10,11,12]. Таким образом, требуется дальнейшее изучение данной проблемы для понимания состава микробиома кожи и оценки его влияния на аутоиммунный процесс, ответ на терапию и течение заболевания.

Цель исследования: изучить состав микробиома кожи культуральным методом у больных АП (находящихся в активной стадии заболевания и в ремиссии) в образцах, полученных с элементов сыпи и с видимо неизменной кожи, а также провести корреляционный анализ состава микробиома, связанный с приёмом системных ГКС.

Методы

Дизайн исследования. Экспериментальное проспективное сравнительное.

Критерии соответствия

Критерии включения пациентов: возраст старше 18 лет; оба пола; впервые выявленный или ранее установленный диагноз «Вульгарная пузырчатка» или «Себорейная пузырчатка»; отсутствие использования каких-либо топических средств в течение минимум 3-х дней и приёма системных антибиотиков в течение минимум 30-ти дней до взятия образцов; наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании и согласия на обработку персональных данных.

Критерии невключения пациентов: несоответствие критериям включения; наличие в анамнезе других аутоиммунных или тяжёлых сопутствующих заболеваний; нежелание пациента участвовать в исследовании.

Критерии исключения пациентов: желание пациента прекратить участие в исследовании.

Критерии включения в группу контроля: возраст старше 18 лет, оба пола; отсутствие использования каких-либо топических средств в течение минимум 3-х дней и приёма системных антибиотиков в течение минимум 30-ти дней до взятия образцов; подписанное информированное согласие на участие в исследовании и согласие на обработку персональных данных.

Критерии невключения в группу контроля: несоответствие критериям включения; наличие в анамнезе хронических, аутоиммунных или онко-

логических заболеваний; нежелание участвовать в исследовании.

Критерии исключения для группы контроля: желание прекратить участие в исследовании.

Исследование проведено на базе Клиники кожных и венерических болезней имени В.А. Рахманова ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» в период с ноября 2021 г. по июнь 2023 г. Все пациенты подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании и согласие на обработку персональных данных. После взятия все образцы направлялись в лабораторию условно-патогенных бактерий ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» для проведения культурального исследования. Биоинформатическая обработка полученных данных проводилась на базе НИЦ «Курчатовский институт».

Описание медицинского вмешательства

В исследование включены 44 пациента с подтверждённым диагнозом АП: 35 пациентов с диагнозом «Вульгарная пузырчатка» и 9 пациентов – «Себорейная пузырчатка»; 28 женщин и 16 мужчин. Подробное описание группы пациентов представлено в табл. 1. Также в исследование включена группа контроля, состоящая из 10 человек: 7 женщин и 3 мужчин.

Таблица 1. Характеристики групп пациентов

| Показатель | Пациенты, n=44 (%) |
|---------------------------|--------------------|
| Возраст, лет | 51,5±13,1 |
| Пол: | |
| мужчины | 16 (36,4) |
| женщины | 28 (63,6) |
| Диагноз: | |
| вульгарная пузырчатка | 35 (79,5) |
| себорейная пузырчатка | 9 (20,5) |
| Длительность заболевания: | |
| >1 года | 25 (56,8) |
| <1 года | 19 (43,2) |
| Лечение: | |
| до начала терапии | 16 (36,4) |
| приём ГКС | 28 (63,6) |
| Степень тяжести: | |
| лёгкая | 8 (32) |
| средняя | 15 (60) |
| тяжёлая | 2 (8) |
| Стадия заболевания | |
| Активная стадия | 25 (56,8) |
| Ремиссия | 19 (43,2) |

Диагноз АП был установлен на основании жалоб и анамнестических данных, клинической картины, положительного результата на наличие антител в сыворотке крови к десмоглеинам 1 и/или 3, выявления типичных признаков по результатам гистологического исследования (наличие в боптатах интраэпидермального, супрабазального акантолиза с образованием щелевидных полостей, содержащих акантолитические клетки) и положительных результатов реакции прямой иммунофлюоресценции (фиксация IgG и C3 компонента комплемента на уровне межклеточных контактов шиповатого слоя эпидермиса). Степень тяжести заболевания оценивалась с помощью индекса оценки площади поражения пузырьчаткой PDAI (Pemphigus Disease Area Index), где лёгкая степень тяжести соответствует показателям до 15 баллов, средняя – от 15 до 45 баллов, тяжёлая – более 45 баллов.

Все пациенты в активной стадии заболевания получали лечение в стационаре клиники кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова, где в процессе обследования был установлен диагноз «Аутоиммунная пузырьчатка» и произведён забор материала. Пациенты в ремиссии находились под амбулаторным наблюдением, у них взятие образцов производилось в день посещения. Набор группы контроля проходил также в амбулаторных условиях, взятие образцов осуществлялось при посещении клиники. Всем пациентам в активной стадии заболевания производилось взятие материала с очагов сыпи и с видимо неизменённой кожи груди или спины, у пациентов в ремиссии – с видимо неизменённой кожи спины, у участников группы контроля – с кожи спины. Взятие образцов производилось методом смыва стерильным ватным зондом-тампоном, предварительно смоченным в стерильном буферном растворе 0,9% NaCl и 0,1% Tween 20, после взятия материала головку зонда-тампона срезали и помещали в 2 мл пробирку типа Эппендорф, содержащую 1 мл стерильного буферного раствора. Затем образцы транспортировались в лабораторию условно-патогенных бактерий ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова».

После поступления материала в лабораторию производились обработка и посев всех образцов по следующей схеме: каждый образец встряхивали на шейкере в течение 30 сек; затем производили посев на среды: питательная среда No 10 ГРМ для выделения стафилококков с добавлением яичного желтка; Агар Эндо-ГРМ, питательная среда для выделения энтеробактерий; питательная среда No 2 ГРМ, Сабуро, для выделения грибов; питательный агар, ГРМ-агар с добавлением 5% стерильной

дефибринированной лошадиной крови; UriSelect 4, для выделения уропатогенных бактерий. После инкубации материала в течение 1-2 дней при температуре 37°C в аэробных и анаэробных условиях все колонии подсчитывали и производили пересчёт количества на 1 мл исходного раствора. Затем путём пересевов получали чистые культуры микроорганизмов. Идентификация чистых культур микроорганизмов осуществлялась с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе MALDI Biotyper Sirius RUO System (Bruker, Германия), для чего одну изолированную колонию свежей чистой культуры микроорганизма наносили одноразовой микробиологической петлёй на лунку мишени MSP-чипа. Сразу после высыхания биомассы мишени обрабатывали 1-2 мкл 70% муравьиной кислоты для экстракции микробных белков. Далее на мишени наносили 1-2 мкл матрицы (альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты в водном растворе ацетонитрила и трифторуксусной кислоты) для ионизации микробных пептидов, после чего помещали в прибор и проводили MS-идентификацию. Результат идентификации считали достоверным, если коэффициент соответствия с базой данных (Score) был больше или равен 2.0.

Этическая экспертиза. Протокол одобрен локальным этическим комитетом Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Протокол №22-21 от 09.12.2021 г.).

Статистический анализ

Методы статистического анализа данных. Анализ данных проводился в среде программирования R. Для хранения данных был использован объект phyloseq класса S4, позволяющий объединять информацию о метаданных по каждому образцу, представленности в них бактериальных организмов в образцах и их таксономической принадлежности.

Анализ количественной представленности культивированных организмов был отображён с помощью диаграммы размаха на суммированных колониеобразующих единицах по каждому пациенту со здоровой кожей и кожей с сыпью. Для анализа альфа-разнообразия было проведено 10-кратное разреживание с выведением коэффициентов Симпсона, Шеннона и Chao1 с последующим усреднением данных. Обработка данных для проведения анализа отличия таксономического состава микроорганизмов для больных и здоровых включала разреживание, очистку от нулей и нормализацию относительным центрированным логарифмированием. Анализ бета-разнообразия для групп был выполнен на расстоянии Эйтчи-сона, учитывающего композиционность данных.

Результаты

Объекты исследования. В ходе исследования получено и проанализировано 79 образцов с кожи: 25 образцов – с элементов сыпи у пациентов с АП, 25 – с видимо неизменённой кожи пациентов с АП, 19 с видимо неизменённой кожи пациентов в ремиссии АП, 10 – с кожи участников группы контроля.

Основные результаты исследования. Проверка различий микробиома в образцах с элементов сыпи пациентов при различных формах АП (вульгарная и себорейная) с длительностью течения заболевания (до года и больше года) не показала достоверных отличий, что позволило объединить данных пациентов в одну группу (Рис. 1Б и 1В).

Микробиом видимо неизменённой кожи пациентов в активной стадии АП, неизменённой кожи пациентов в ремиссии и здоровой кожи группы контроля не имел статистически значимых отличий при анализе как соотношения микроорганизмов, так и видового состава ($pV > 0,05$) (Рис. 1А). Микробиом кожи пациентов в ремиссии

и микробиомом неизменённой кожи пациентов в активной стадии АП не отличается по составу и по представленности микроорганизмов (Рис. 1А).

Далее проводился анализ сумм колониеобразующих единиц, показавший, что, как правило, для образцов с участков высыпаний характерно большее количество колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий на образец. Полученные результаты свидетельствуют о более высоком содержании бактериальных организмов в образцах при сборе материала с высыпаний. В среднем на абсолютных значениях в образцах с сыпи было 7711 КОЕ, тогда как в образцах неизменённой кожи – 1041 КОЕ. При сравнении логарифмированной суммы колониеобразующих единиц с помощью Т-критерия Стьюдента была определена статистически значимая разница ($pV = 2,8e-06$).

Несмотря на то, что методика сбора образцов была однотипной у всех пациентов и группы контроля, человеческий фактор может вносить значимый вес в итоговые результаты. Также присутствует вероятность того, что в пробу в каком-

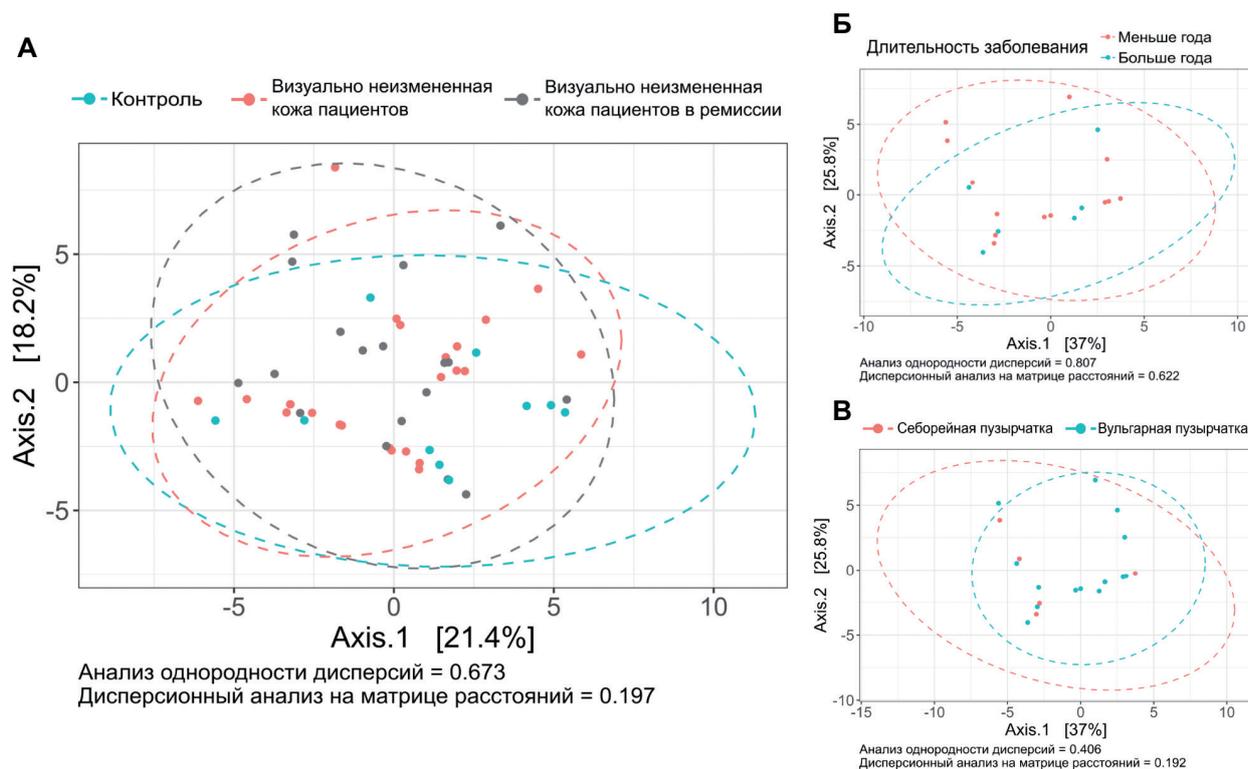


Рис. 1. Визуализация бета-разнообразия Эйтчисона между образцами с помощью метода главных координат: каждая точка относится к определённому образцу, цветом обозначен тип образца, а расстояние между точками приблизительно отображает бета-разнообразие Эйтчисона (сходство пропорций) между образцами. С помощью пермутационного многомерного анализа вариации (PERMANOVA) проверена гипотеза о том, что образцы неизменённой кожи и сыпи отличаются друг от друга. А – сравнение образцов неизменённой кожи группы контроля, кожи пациентов в ремиссии и неизменённой кожи пациентов в активной стадии АП. Б – сравнение микробиома кожи пациентов с длительностью заболевания до года и более года. В – сравнение микробиома кожи пациентов с себорейной и вульгарной формой АП.

то случае попадёт различное количество организмов. Для того чтобы нивелировать данный эффект, проводится нормализация центральным относительным логарифмированием. Она даёт возможность более точно судить об отношении бактерий в образцах за счёт того, что опирается на логарифмированные отношения (Рис. 2).

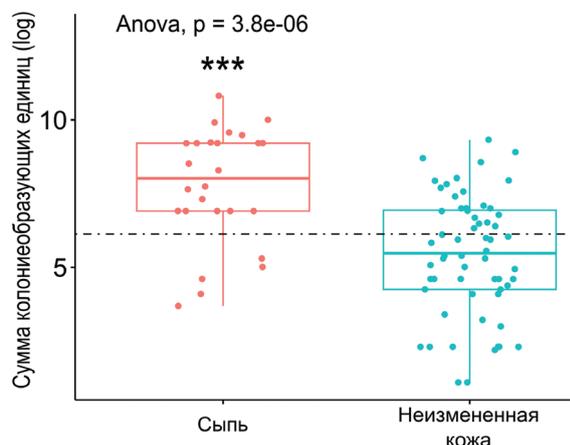


Рис. 2. Логарифмированная сумма КОЕ выселяемых организмов в образцах с сыпи и неизменной кожи пациентов в активной стадии АП, в ремиссии и здоровой кожи группы контроля

Сравнение относительной представленности микроорганизмов неизменной кожи и элементов сыпи пациентов в активной форме АП показало, что нет статистически значимых отличий в пробах (betadisper $pV=0,321$). Визуальное отображение отсутствия отличий в соотношении микробиома кожи с сыпью и видимо неизменной кожи было проверено с помощью альфа-разнообразия на основе коэффициента Chao1 (рис. 3Б).

При этом сравнительный анализ таксономического состава образцов показал статистически значимые отличия по составу микробиома неизменной кожи и сыпи пациентов с АП на основе расстояния Эйтчисона (adonis2 $pV=0,001^{***}$, $r^2=0,09$) (рис. 3А). Анализ соотношения численности коровых (наиболее часто встречающихся) микроорганизмов был визуализирован с помощью тепловой карты (рис. 3В).

На данных корового состава микробиома продемонстрировано, что *S. aureus* преобладает на коже с участков сыпи у пациентов с АП.

Также проводился анализ индикаторных видов с помощью пакета indicpecies, который показал значимое выделение данного вида для выборки, относимой к микробиому участков сыпи ($pV=1e-04^{***}$). По данным литературных источ-

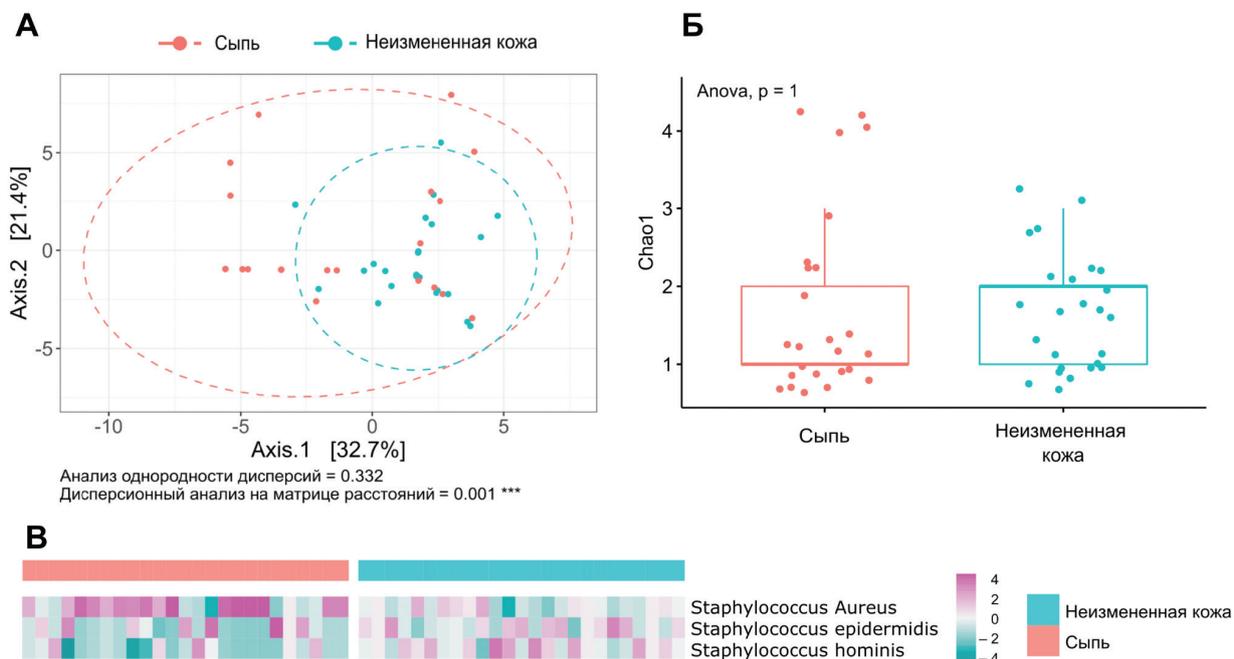


Рис. 3. А – Визуализация бета-разнообразия Эйтчисона между образцами с помощью метода главных координат: каждая точка относится к определённому образцу, цветом обозначен тип образца (здоровая кожа или элементы сыпи), а расстояние между точками приблизительно отображает бета-разнообразие Эйтчисона (сходство пропорций) между образцами. С помощью пермутационного многомерного анализа вариации (PERMANOVA) проверена гипотеза о том, что образцы неизменной кожи и сыпи у пациентов с АП отличаются друг от друга ($n=50$). Б – Альфа-разнообразие по индексу Chao1, В – Состав образцов на уровне вида: тепловая карта. Цветом ячеек обозначена центрованная логарифмированная доля различных микробных видов (по строчкам) в образцах (по столбцам).

ников, *S. aureus* является патогенным микроорганизмом, вызывающим воспалительные реакции в коже, также данный вид бактерий склонен к образованию биоплёнок (структурно организованное сообщество микроорганизмов, заключённое внутри полимерного матрикса, синтезированного членами сообщества, и прикреплённое к живым или инертным поверхностям). В свою очередь отмечается, что на участках неизменённой кожи пациентов преобладает *S. hominis*, который является мутуалистическим видом бактерий, колонизирующим кожу человека в норме.

Сравнение микробного состава кожи пациентов с АП в зависимости от приёма ГКС показало значимое отличие в группах с лечением и до лечения (Рис. 4А и 4Б). Анализ однородности дисперсий показал значимые отличия в соотношении микроорганизмов и представленности таксономических групп в образцах между группами. Так, образцы, взятые у пациентов до начала лечения ГКС, характеризовались присутствием большого количества *Staphylococcus aureus*. Вместе с тем, разнообразие микроорганизмов было существенно снижено: 80% образцов были представлены тремя видами микроорганизмов. В свою очередь образцы, собранные от пациентов, получавших терапию ГКС, содержали большее разнообразие видов. В образцах преобладали виды *S. epidermidis* и *S. hominis*.

Обсуждение

В ходе исследования выявлено, что микробиом кожи с элементов сыпи пациентов с АП претерпевает существенные изменения в активной стадии заболевания, преимущественно за счёт колонизации кожи *S. aureus*. Однако на фоне терапии системными ГКС отмечается тенденция к нормализации состава микрофлоры кожи, что демонстрирует отсутствие различий в составе микробиома кожи пациентов в ремиссии АП и группы контроля.

Ряд исследователей отмечают предрасположенность пациентов с АП ко всем видам инфекций, в частности, выявлена связь с более высокой вероятностью инфекций кожи, костей, дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, мочеполовой и центральной нервной систем, септицемии и антибиотикорезистентными инфекциями [13]. К тому же отмечается ассоциация методов терапии АП и развития инфекционных процессов [14].

На сегодняшний день основным методом лечения АП остаются системные ГКС [1]. Длительный приём ГКС в высоких дозировках приводит к подавлению клеточно-опосредованного иммунитета и изменению функции моноцитов, что предрасполагает пациентов к развитию вторичных инфекций [15]. Необходимо также помнить, что инфекционные процессы в данном случае могут

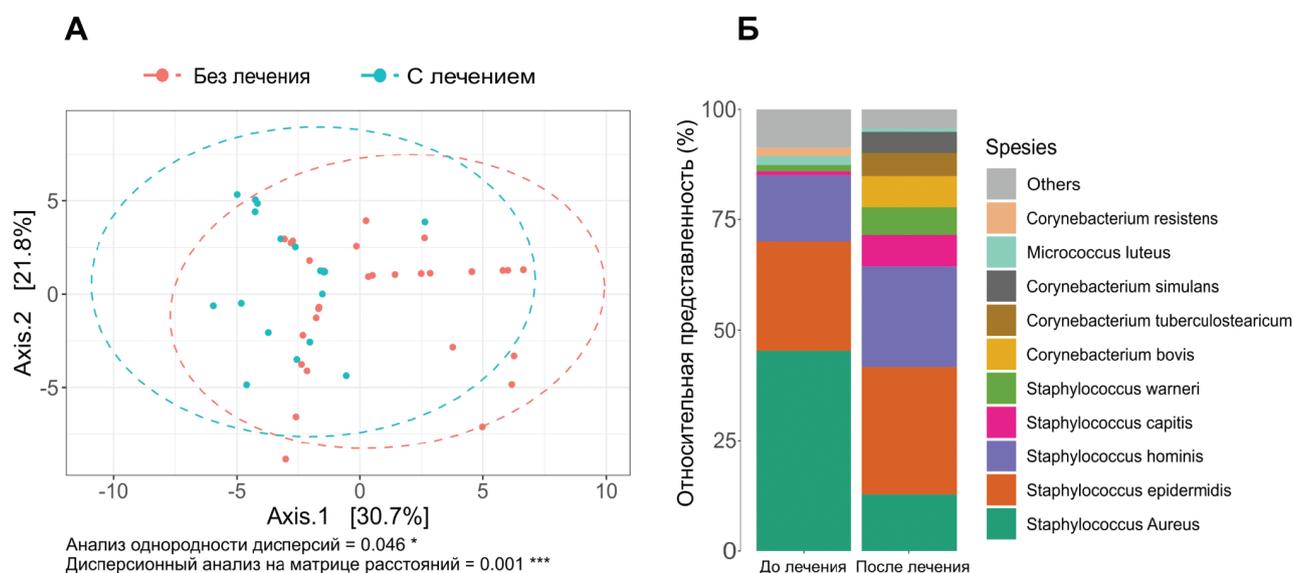


Рис. 4. А – Визуализация бета-разнообразия Эйтчисона между образцами с помощью метода главных координат: каждая точка относится к определённому образцу, цветом обозначен тип образца (с лечением, до лечения), а расстояние между точками приблизительно отображает бета-разнообразие Эйтчисона (сходство пропорций) между образцами. С помощью пермутационного многомерного анализа вариации (PERMANOVA) проверена гипотеза о том, что образцы с неизменённой кожи и с сыпи отличаются друг от друга ($n=57$), **Б** – Относительная представленность микроорганизмов в группах образцов, разделённых по признаку наличия лечения.

протекать малосимптомно или атипично, что может затруднить их диагностику [6].

Однако сообщается, что при длительном приёме низких доз ГКС (10 мг преднизолона в сутки) вероятность развития инфекционных осложнений не увеличивается [15]. Наше исследование также подтверждает эти данные, демонстрируя отсутствие статистически значимой разницы состава микробиома пациентов в ремиссии (получающих низкие дозы ГКС) и группы контроля.

По результатам представленного исследования выявлено, что у пациентов в активной стадии АП отмечается повышенная колонизация изменённой кожи *S. aureus*, являющимся одним из наиболее важных кожных патогенов с широким набором факторов вирулентности, включая токсины, подавляющие нейтрофилы, ингибиторы хемотаксиса, антифагоцитарные поверхностные молекулы, суперантигены и белки уклонения от иммунитета [16,17,18]. И хотя более 30% здоровых людей бессимптомно колонизированы *S. aureus*, при появлении триггерных факторов он может вызывать широкий спектр инфекций от поверхностного фолликулита до глубоких поражений дермы, подкожно-жировой клетчатки, а также более серьёзные, потенциально смертельные инфекционные поражения костей, бактериальный сепсис и бактериальный эндокардит [19,20]. *S. aureus* также вовлечён в патогенез таких хронических заболеваний, как атопический дерматит [9,21], системная красная волчанка с поражением почек и кожи [22]. Предполагается, что *S. aureus* способен модулировать иммунную систему как в плане её врождённых, так и адаптивных реакций [23].

Наши данные коррелирует с результатами, описанными в литературе, причём колонизация кожи *S. aureus* отмечалась в исследованиях, где для идентификации бактерий использовался и культуральный метод [12], и метод геномного секвенирования [10]. Scaglione G.L. и соавт., обнаружив в ходе своего исследования колонизацию кожи пациентов с АП *S. aureus*, пришли к выводу о необходимости и важности дальнейших исследований в этой области в связи с вовлечённостью этого микроорганизма в патогенез аутоиммунных дерматозов [10]. В это же время Li F. и соавт. также выявили, что у большинства пациентов с АП имеются признаки вторичной бактериальной инфекции, вызванной колонизацией *S. aureus* [12]. При этом особый акцент исследователи сделали на изучение факторов риска развития бактериальных осложнений пузырчатки и продемонстрировали ассоциацию колонизации кожи *S. aureus* с более высоким уровнем антител к Dsg-

1 и Dsg-3 у пациентов [12]. В ещё одной работе Mohanty S. и соавт. продемонстрировали, что у 56,3% пациентов имеется колонизация кожи *S. aureus*, у 16,7% – *Pseudomonas aeruginosa*, 6,5% – *E. coli*. [24]. Однако здесь исследователи уделили внимание чувствительности к антибиотикам выделенных микроорганизмов, выявив высокий процент метициллин-резистентных штаммов *S. aureus* (24,6%) [24]. В работе подчёркивается важность постоянного мониторинга кожных поражений при АП для своевременного выбора адекватной антибиотикотерапии [24].

На коже пациентов в ремиссии, получающих длительную терапию низкими дозами ГКС, отмечено преобладание видов *S. epidermidis* и *S. hominis*, а также отсутствие статистически значимой разницы по составу микробиома по сравнению со здоровой кожей группы контроля. Данные микроорганизмы являются представителями нормальной микрофлоры кожи, однако взаимодействие между микробами кожи и макроорганизмом может быть примером истинного мутуализма или патогенности [25,26]. Вид такого взаимодействия в значительной степени зависит от состояния иммунной системы, генетической предрасположенности к определённым заболеваниям, особенности макроорганизма, состояния эпидермального барьера, локализации микробов и их взаимодействия друг с другом [25,26]. Взаимоотношения между иммунной системой хозяина и микроорганизмами начинаются в раннем детском возрасте. Имеются данные, что первый иммунный ответ контролируют регуляторные Т-лимфоциты, широко представленные в тканях кожи [7,27]. Scharschmidt T.C. et al. продемонстрировали, что колонизация кожи мыши *S. epidermidis* в раннем возрасте ведёт к толерантности иммунной системы к этой бактерии во взрослом возрасте и способствует накоплению специфических для неё регуляторных Т-клеток в коже [28].

Взаимодействия микроорганизмов внутри сообщества также весьма сложны. Одни бактерии являются полезными и сдерживают колонизацию патогенной флорой и препятствуют формированию биоплёнок [7,25,26]. Однако при определённых условиях, например, при наличии у пациента иммуносупрессии, эти же полезные бактерии могут сами колонизировать кожу и принимать участие в развитии кожных заболеваний [29]. Как уже отмечалось, такой патоген, как *S. aureus*, часто может колонизировать кожу бессимптомно, в то время как мутуалистические бактерии, например, *S. epidermidis* могут провоцировать развитие кожного заболевания [7].

Комменсальные микроорганизмы способны формировать как провоспалительные, так и противовоспалительные иммунные реакции, вызывать изменения в экспрессии генов и модулировать структуру микробного сообщества [30]. Согласно опубликованным данным, изменения в структуре микробиома ассоциируются и с различными аутоиммунными заболеваниями, включая системную красную волчанку и ревматоидный артрит [31]. Также описаны возможные механизмы (персистенция патогенов, изменение функции генов, молекулярная мимикрия и др.), благодаря которым комменсальные бактерии транслоцируются в отдалённые органы, вызывая аутоиммунную патологию [32].

Данные механизмы имеют отношение и к степени тяжести течения аутоиммунных буллёзных дерматозов. Однако в исследованиях, проведённых до настоящего времени, основное внимание уделялось видовому составу микробиома, а информация о функциональной активности этих сообществ отсутствовала [10,11]. В связи с этим для окончательного понимания роли микробиома в патогенезе заболеваний необходимы детальные транскриптомные, иммунологические и метаболические исследования.

Ограничения исследования. Ограничением исследования является небольшая выборка пациентов, а также выбранный метод идентификации бактериального состава. На сегодняшний день многие исследователи отдают предпочтение методу геномного секвенирования, позволяющему подробнее изучить состав микробиома. Несмотря на это, в проведённом исследовании удалось получить достоверные данные по различию состава микробиома кожи 44 пациентов, а также провести корреляцию между изменением состава и получаемой терапией.

Заключение

АП является относительно редкой группой кожных заболеваний. Однако тяжесть течения, частые вторичные бактериальные осложнения и существующий риск смертельных микробных

осложнений, несмотря на проводимую терапию, заставляет исследователей прицельно изучать состав микробиома кожи у таких пациентов. На сегодняшний день известно, что состав микробиома кожи индивидуален и зависит от множества экзогенных и эндогенных факторов [33]. Однако исследователям удаётся выявить некоторые закономерности в качественном и количественном разнообразии микроорганизмов, колонизирующих кожу [34,35,36].

Полученные данные подтверждают уже опубликованные другими авторами результаты: на коже пациентов с АП отмечается колонизация таким патогеном, как *S. aureus*, и общее снижение микробного разнообразия. Однако в представленном исследовании отмечена тенденция к стабилизации микробиома на фоне терапии ГКС, подтверждённая отсутствием достоверной разницы в составе микробиома кожи пациентов в ремиссии и группой контроля. Хотя в литературе отмечается, что в условиях ятрогенной иммуносупрессии такой представитель нормальной микрофлоры кожи, как *S. epidermidis*, может стать оппортунистическим патогеном, в процессе нашего наблюдения пациентов в течение трёх лет после стабилизации процесса и дальнейшего применения ГКС в низких дозировках не отмечались вторичные бактериальные осложнения. Таким образом, регулярное наблюдение за пациентами с АП с прицельным вниманием в отношении инфекционных процессов и своевременная адекватная терапия позволят предотвратить тяжёлые осложнения течения заболевания.

Источник финансирования. Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова» при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Минобрнауки России, Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.

Литература

- Олисова О.Ю., Теплюк Н.П. Иллюстрированное руководство по дерматологии для подготовки врачей к аккредитации. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2023. 376 с.
- Махнева М.В., Теплюк Н.П., Белецкая Л.В. Аутоиммунная пузырчатка. От истоков развития до наших дней. Издательские решения, 2016.
- Kridin K. Pemphigus group: Overview, epidemiology, mortality, and comorbidities. *Immunol Res.* 2018;66(2):255–270. doi:10.1007/s12026-018-8986-7
- Пузырчатка. Клинические рекомендации. Утверждены Российским обществом дерматовенерологов и косметологов на XVI Всероссийском Съезде дерматовенерологов и косметологов. Москва, 16 июня 2016 г.
- Schmidt E., Kasperkiewicz M., Joly P. Pemphigus. *Lancet.* 2019;394(10201):882–894. doi:10.1016/S0140-6736(19)31778-7
- Борисова Е.О. Нежелательные эффекты системной глюкокортикостероидной терапии. *Клиническая геронтология.* 2009; 15 (8-9):19-26..

7. Chen Y.E., Fischbach M.A., Belkaid Y. Skin microbiota-host interactions. *Nature*. 2018;553(7689):427–436. doi:10.1038/nature25177
8. Byrd A.L., Belkaid Y., Segre J.A. The human skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology*. 2018;16(3):143–155. doi:10.1038/nrmicro.2017.157
9. Заславский Д.В., Барина А.Н. Микробиом кожи при атопическом дерматите и особенности различных средств базисного ухода за кожей. *Медицинский совет*. 2018;(2):165–171. doi:10.21518/2079-701X-2018-2-170-176
10. Scaglione G.L., Fania L., De Paolis E., et al. Evaluation of cutaneous, oral and intestinal microbiota in patients affected by pemphigus and bullous pemphigoid: A pilot study. *Exp Mol Pathol*. 2020;112:104331. doi:10.1016/j.yexmp.2019.104331
11. Lili L., Xiukun S., Hong S. Analysis of skin microbiota diversity in patients with pemphigus based on 16S rDNA sequences[J]. *Chinese Journal of Dermatology*. 2021;54(3):212–219. doi:10.35541/cjd.20200650
12. Li F., Wu Y., Bian W., et al. Features and associated factors of bacterial skin infections in hospitalized patients with pemphigus: a single-center retrospective study. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2020;19(1):46. doi:10.1186/s12941-020-00388-6
13. Ren Z., Narla S., Hsu DY, et al. Association of serious infections with pemphigus and pemphigoid: analysis of the Nationwide Inpatient Sample. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(10):1768–1776. doi:10.1111/jdv.14961
14. Belgnaoui FZ, Senouci K, Chraïbi H, et al. Prédiposition aux infections des malades ayant un pemphigus Etude rétrospective de 141 cas [Predisposition to infection in patients with pemphigus. Retrospective study of 141 cases]. *Presse Med*. 2007;36(11 Pt 1):1563–1569. doi:10.1016/j.lpm.2006.12.034
15. Oray M., Abu Samra K., Ebrahimiadib N., et al. Long-term side effects of glucocorticoids, Expert Opinion on Drug Safety. 2016;15:4:457–465. doi:10.1517/14740338.2016.1140743
16. Nakagawa S., Matsumoto M., Katayama Y., et al. Staphylococcus aureus Virulent PSMα Peptides Induce Keratinocyte Alarmin Release to Orchestrate IL-17-Dependent Skin Inflammation. *Cell host & microbe*. 2017;22(5):667–677.e5. doi:10.1016/j.chom.2017.10.008
17. Liu H., Archer N.K., Dillen C.A., et al. Staphylococcus aureus Epicutaneous Exposure Drives Skin Inflammation via IL-36-Mediated T Cell Responses. *Cell host & microbe*. 2017;22(5):653–666.e5. doi:10.1016/j.chom.2017.10.006
18. Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Annual review of microbiology*. 2010;64:143–162. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134309
19. Tótté J.E., van der Feltz W.T., Hennekam M., et al. Prevalence and odds of Staphylococcus aureus carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *The British journal of dermatology*. 2016;175(4):687–695. doi:10.1111/bjd.14566
20. Tótté J.E., van der Feltz W.T., Bode L.G., et al. A systematic review and meta-analysis on Staphylococcus aureus carriage in psoriasis, acne and rosacea. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2016;35(7):1069–1077. doi:10.1007/s10096-016-2647-3
21. Kobayashi T., Glatz M., Horiuchi K., et al. Dysbiosis and Staphylococcus aureus Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. *Immunity*. 2015;42(4):756–766. doi:10.1016/j.immuni.2015.03.014
22. Conti F., Ceccarelli F., Iaiani G., et al. Association between Staphylococcus aureus nasal carriage and disease phenotype in patients affected by systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*. 2016;18:177. doi:10.1186/s13075-016-1079-x
23. Ceccarelli F., Perricone C., Olivieri G., et al. Staphylococcus aureus Nasal Carriage and Autoimmune Diseases: From Pathogenic Mechanisms to Disease Susceptibility and Phenotype. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(22):5624. doi:10.3390/ijms20225624
24. Mohanty S., Saha S., Firdaus S., et al. Profile of Cutaneous Bacterial Flora in Pemphigus Patients. *Journal of laboratory physicians*. 2023;15(4):616–620. doi:10.1055/s-0043-1768635
25. Boxberger M., Cenizo V., Cassir N., et al. Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome. *Microbiome*. 2021;9(1):125. doi:10.1186/s40168-021-01062-5
26. Muszer M., Noszczyńska M., Kasperkiewicz K., et al. Human Microbiome: When a Friend Becomes an Enemy. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2015;63(4):287–298. doi:10.1007/s00005-015-0332-3
27. Schoch J.J., Monir R.L., Satcher K.G., et al. The infantile cutaneous microbiome: A review. *Pediatric dermatology*. 2019;36(5):574–580. doi:10.1111/pde.13870
28. Scharschmidt T.C., Vasquez K.S., Truong H.A., et al. A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes. *Immunity*. 2015;43(5):1011–1021. doi:10.1016/j.immuni.2015.10.016
29. Gudjonsson J.E., Kabashima K., Eyerich K. Mechanisms of skin autoimmunity: Cellular and soluble immune components of the skin. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2020;146(1):8–16. doi:10.1016/j.jaci.2020.05.009
30. Belkaid Y., Hand T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014;157(1):121–141. doi:10.1016/j.cell.2014.03.011
31. Suárez L.J., Garzón H., Arboleda S., et al. Oral Dysbiosis and Autoimmunity: From Local Periodontal Responses to an Imbalanced Systemic Immunity. A Review. *Frontiers in immunology*. 2020;11:591255. doi:10.3389/fimmu.2020.591255
32. Ruff W.E., Kriegel M.A. Autoimmune host-microbiota interactions at barrier sites and beyond. *Trends in molecular medicine*. 2015;21(4):233–244. doi:10.1016/j.molmed.2015.02.006
33. Moskvicz V., Gross A., Mizrahi B. Extrinsic Factors Shaping the Skin Microbiome. *Microorganisms*. 2020;8(7):1023. doi:10.3390/microorganisms8071023
34. Kapitány A., Medgyesi B., Jenei A., et al. Regional Differences in the Permeability Barrier of the Skin-Implications in Acantholytic Skin Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(19):10428. doi:10.3390/ijms221910428
35. Grice E.A., Kong H.H., Conlan S., et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*. 2009;324(5931):1190–1192. doi:10.1126/science.1171700
36. Lunjani N., Hlela C., O'Mahony L. Microbiome and skin biology. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2019;19(4):328–333. doi:10.1097/ACI.0000000000000542

Сведения об авторах

Теплюк Наталья Павловна – д.м.н., профессор; e-mail: teplyukn@gmail.com. ORCID: 0000-0002-5800-4800; eLibrary SPIN: 8013-3256.

Колесова Юлия Владимировна – аспирант, ассистент кафедры. Адрес: Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2. E-mail: kolesovamsmu@gmail.com. ORCID: 0000-0002-3617-2555; eLibrary SPIN: 1441-8730.

Вартанова Нунэ Оганесовна – к.б.н.; e-mail: labmicr@mail.ru. ORCID: 0000-0002-6372-9910; eLibrary SPIN: 6795-0835.

Леонова Анна Юрьевна – научный сотрудник; e-mail: anya.leonova.82@mail.ru. ORCID: 0000-0002-2889-2405.

Тошчак Степан Владимирович – к.б.н.; e-mail: stepan.toshchakov@gmail.com. ORCID: 0000-0001-7549-3450; eLibrary SPIN: 8994-5224;

Козлова Александра Дмитриевна. e-mail: amiandwho@gmail.com. ORCID: 0009-0005-3450-8253.

Лепехова Анфиса Александровна – к.м.н., доцент кафедры; e-mail: anfisa.lepehova@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-4365-3090; eLibrary SPIN: 3261-3520.

Поступила 21.11.2023.