

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *HBD1* И *LL37* ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

Быстрицкая Е.П.¹, Мурашкин Н.Н.^{2,3}, Материкин А.И.²,
Наумова Е.А.⁴, Яковлева И.В.¹, Вартанова Н.О.¹, Свитич О.А.^{1,3}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Резюме. Атопический дерматит – мультифакторное генетически детерминированное воспалительное заболевание кожи, характеризующееся зудом, хроническим рецидивирующим течением, возрастными особенностями локализации и морфологии очагов поражения. Атопический дерматит принадлежит к группе заболеваний, которые, как полагают, возникают в результате сложных взаимодействий между генетическими, иммунологическими факторами и факторами окружающей среды. При атопическом дерматите нарушается барьерная функция кожи. Противомикробные пептиды типа LL-37, β-дефенсины участвуют в поддержании барьерной функции кожи (в частности межклеточных контактов). Дисбаланс противомикробных пептидов приводит к развитию различных заболеваний, в том числе и аллергических. Целью этого исследования является изучение экспрессионного профиля генов противомикробных пептидов *HBD1* и *LL37* в коже и мононуклеарных клетках крови при среднетяжелом и тяжелом течении атопического дерматита у детей в динамике. С помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени в образцах кожи и в мононуклеарных клетках крови был выявлен уровень экспрессии генов *HBD1* и *LL37*. Анализ экспрессионного профиля таргетных генов показал достоверное ($p \leq 0,017$) повышение уровней экспрессии *HBD1* (Н-критерий = 24,76; 2, $n = 72$; $p = 0,00001$) и *LL37* (Н-критерий = 15,69; 2, $n = 72$; $p = 0,00039$) в крови у пациентов с атопическим дерматитом по отношению к группе сравнения, а также снижение ($p \leq 0,05$) уровня экспрессии *HBD1* в пораженной коже по отношению к контрольной группе. Наши данные по гену кателицидина в коже не расходятся с примерами из литературы, поскольку его экспрессия в случае атопического дерматита снижена. В нашем случае также имеет место повышение экспрессии этого гена в МНК. Пептид *HBD1* экспрессируется как в моноцитах, так и в макрофагах и является, таким образом, связующим звеном между врожденным и приобретенным иммунитетом. В нашем исследовании экспрессия гена *HBD1* повышалась только в крови, что свидетельствует об активации структур врожденного иммунитета на системном уровне в ответ на воспаление. Выявление роли иммунологических маркеров в течении атопического дерматита позволит создать новые прогностические подходы при ведении па-

Адрес для переписки:

Быстрицкая Елизавета Петровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (915) 155-86-18.
E-mail: lisabystritskaya@gmail.com

Address for correspondence:

Bystritskaya Elizaveta P.
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a.
Phone: 7 (915) 155-86-18.
E-mail: lisabystritskaya@gmail.com

Образец цитирования:

Е.П. Быстрицкая, Н.Н. Мурашкин, А.И. Материкин, Е.А. Наумова, И.В. Яковлева, Н.О. Вартанова, О.А. Свитич «Экспрессия генов *HBD1* и *LL37* при атопическом дерматите у детей и подростков» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 405-410.
doi: 10.46235/1028-7221-1194-HAL

© Быстрицкая Е.П. и соавт., 2022

For citation:

E.P. Bystritskaya, N.N. Murashkin, A.I. Materikin, Naumova E.A., I.V. Yakovleva, N.O. Vartanova, O.A. Svitich “*HBD1* and *LL37* gene expression in children with atopic dermatitis”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 405-410.
doi: 10.46235/1028-7221-1194-HAL

DOI: 10.46235/1028-7221-1194-HAL

циентов с атопической патологией. Поэтому важно иметь полное представление о патогенетических механизмах аллергического заболевания.

Ключевые слова: атопический дерматит, противомикробные пептиды, кателицидин, человеческий β -дефенсин 1, врожденный иммунитет, экспрессия генов

HBD1 AND LL37 GENE EXPRESSION IN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS

Bystritskaya E.P.^a, Murashkin N.N.^{b, c}, Materikin A.I.^b, Naumova E.A.^d, Yakovleva I.V.^a, Vartanova N.O.^a, Svitich O.A.^{a, c}

^a I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

^c I. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^d M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Atopic dermatitis (AD) is a multifactorial genetically determined inflammatory skin disease characterized by itching, chronic course, age-related features of localization and lesion morphology. Atopic dermatitis is caused by complex interactions between genetic, immunological, and environmental factors. The barrier function of the skin is impaired in atopic dermatitis. Antimicrobial peptides, e.g., LL-37, β -defensins are involved in maintaining the skin barrier function (especially, intercellular contacts). An imbalance of antimicrobial peptides may cause different disorders, including allergic pathologies. The aim of this study is to investigate gene expression profile of the *HBD1* and *LL37* encoding antimicrobial peptides in the samples of skin and blood mononuclear cells obtained from the children with moderate and severe atopic dermatitis before and after treatment. By means of real-time polymerase chain reaction, the levels of *HBD1* and *LL37* gene expression were evaluated in the samples. Statistical analysis showed significantly increased ($p \leq 0.017$) expression levels of both *HBD1* (H-test = 24.76; 2, $n = 72$; $p = 0.00001$), and *LL37* genes (H-test = 15.69; 2, $n = 72$; $p = 0.00039$) in blood cells of AD patients compared to the control group, as well as decreased ($p \leq 0.05$) levels of *HBD1* expression in the affected skin compared to the control group. Our data on the cathelicidin gene in the skin do not differ from the literature data, since its expression is reduced in AD. In our series, an increase of the gene expression was revealed in PBMCs. The HBD1 peptide is expressed in both monocytes and macrophages, representing a link between innate and adaptive immunity. In our study, the expression of the *HBD1* gene was increased only in blood, thus suggesting activation of innate immunity components at the systemic level in response to inflammation. Of importance, understanding the role of immunological markers in AD will help to develop novel prognostic approaches in management of the patients with atopic disorders. Therefore, one should understand pathogenetic mechanisms of allergic diseases.

Keywords: atopic dermatitis, antimicrobial peptides, cathelicidin, human β -defensin 1, innate immunity, gene expression

Введение

Атопический дерматит (АтД) — генетически детерминированное воспалительное заболевание кожи, характеризующееся зудом, хроническим рецидивирующим течением, возрастными особенностями локализации и морфологии очагов поражения [1]. Дебют заболевания, как правило, приходится на детский возраст. Распространенность АтД среди детского населения достигает 20%, среди взрослого населения — 8%.

АтД принадлежит к группе заболеваний, которые, как полагают, возникают в результате

сложных взаимодействий между генетическими, иммунологическими факторами и факторами окружающей среды. Наследственность играет важную роль в развитии заболевания. Происходит также нарушение иммунного ответа (чаще всего баланс сдвигается в сторону Th2-ответа). Также повышается уровень IgE, наблюдается инфильтрация Т-клеток в коже [6]. Помимо генетических факторов, также определенную роль в развитии и поддержании заболевания играют эпигенетические механизмы. Нарушается и барьерная функция эпидермиса, что приводит

к проникновению различных факторов окружающей среды (т. е. микроорганизмов, раздражителей, аллергенов, загрязняющих агентов); снижается способность кожи удерживать воду. Повышение уровня pH, нарушение барьерной функции и снижение уровня противомикробных пептидов вкупе способствуют дисбиозу кожи, возникновению кожных инфекций [8]. К первой линии защиты от патогенов относятся противомикробные пептиды. Это структуры врожденного иммунитета, обладающие антимикробной активностью. Дисбаланс противомикробных пептидов приводит к развитию различных заболеваний [2, 5], в том числе и аллергических. Противомикробные пептиды типа LL-37, β -дефенсины участвуют в поддержании барьерной функции кожи (в частности межклеточных контактов) [7].

Целью этой работы является изучение экспрессионного профиля генов противомикробных пептидов *HBD1* и *LL37* в кератиноцитах кожи и мононуклеарных клетках крови при среднетяжелом и тяжелом течении атопического дерматита у детей в динамике.

Материалы и методы

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» (протокол заседания локального совета по этике № 5 от 12 мая 2022 г.). Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Из ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России был получен клинический материал от 53 пациентов обоих полов от 6 до 18 лет с диагнозом L.20 «Атопический дерматит» среднетяжелой (SCORAD 25-50) и тяжелой (SCORAD \geq 50) степени. 48 пациентов получали топическую терапию (МГК средней и высокой активности, топические ингибиторы кальциневрина); 5 пациентов проходили системную терапию с применением препарата дупилумаба. Материалом для исследований послужили биопсии пораженных участков кожи и образцы цельной крови (пробирки с ЭДТА), из которых впоследствии выделялись мононуклеарные клетки крови (МНК). При анализе уровней экспрессии генов в образцах крови в группу «до лечения» вошли 36 пациентов, в группу «после лечения» – 22 пациента; группу сравнения («контроль») составили 17 здоровых доноров; при анализе экспрессии генов в коже

группу пациентов «до лечения» составили 9 пациентов (повторную биопсию не брали), а группу сравнения – 9 здоровых волонтеров.

Из части биопсийного материала и МНК последовательно была выделена РНК (Extract RNA, Евроген, Россия), проведена реакция обратной транскрипции («ОТ-1», «Синтол», Россия). Методом ПЦР-РВ были определены уровни экспрессии генов *LL37* и *HBD1*. В реакции использовались специфические последовательности праймеров («Синтол», Россия), которые подбирались с помощью программы Primer-BLAST (NCBI). ПЦР-анализ в режиме реального времени проводился на приборе Rotor-Gene Q (QIAGEN Hiden, Германия). Реакция проводилась при следующих условиях: 1) 95 °C – 5 мин – 1 цикл; 2) 95 °C – 15 сек, 60 °C (или 58 °C) – 50 сек – 40 циклов. Обработка полученных данных (Ct) проводилась методом $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства β -актина (*ACTB*).

Анализ полученных данных, представленных в относительных единицах, проводился в несколько этапов в программе MS Excel. Статистическая достоверность между группами данных рассчитывалась при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни, а также Н-теста Краскела–Уоллиса.

Результаты и обсуждение

Так, на рисунках 1 и 2 представлены уровни экспрессии гена *LL37* у больных с АТД по сравнению со здоровым контролем в крови и коже. Как видно из графиков, экспрессия *LL37* снижена у пациентов с АТД на локальном уровне: медианные значения составляют 0,5 и 1 в группе пациентов и здоровых доноров соответственно ($p \leq 0,05$). В крови, напротив, наблюдается повышение уровня экспрессии этого показателя как до терапии, так и после нее по сравнению с контролем (Н-критерий = 15,69; 2, $n = 72$; $p = 0,00039$). Медианы равны 9, 7,6, 0,3 в группах до лечения, после лечения и в контрольной группе соответственно.

Для гена *HBD1* локально в коже разницы между группой пациентов и контрольной группой выявлено не было. Однако в крови его экспрессия значительно отличалась и имела тенденцию к снижению после лечения. На рисунке 3 представлены уровни экспрессии гена *HBD1* в крови. Как показано на графике, экспрессия *HBD1* повышалась в крови по сравнению с контролем (Н-критерий = 24,76; 2, $n = 72$; $p = 0,00001$). Медианы равны 127, 18, 1 в группах до лечения, после лечения и в контрольной группе соответственно.

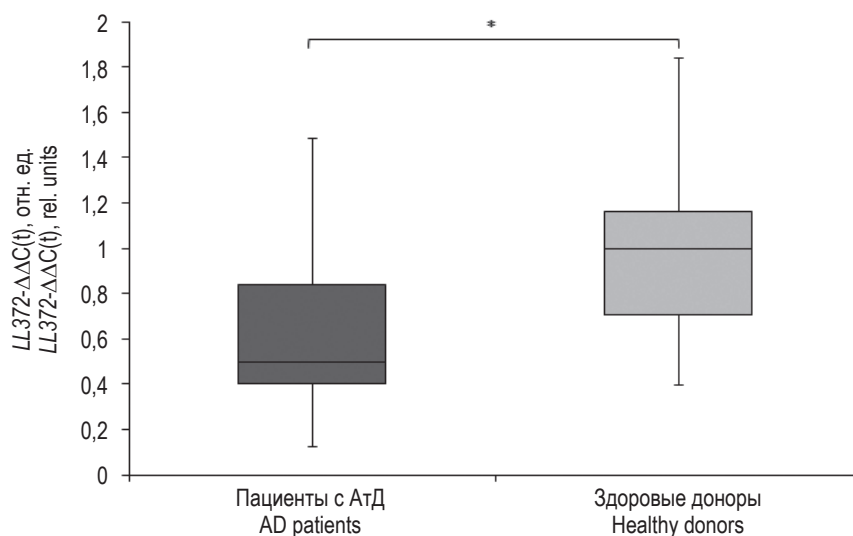


Рисунок 1. Уровень экспрессии гена *LL37* в коже пациентов с АтД по сравнению с контролем

Примечание. * – $p \leq 0,05$.

Figure 1. *LL37* gene expression level in the skin of AD patients compared to the control group

Note. *, $p \leq 0.05$.

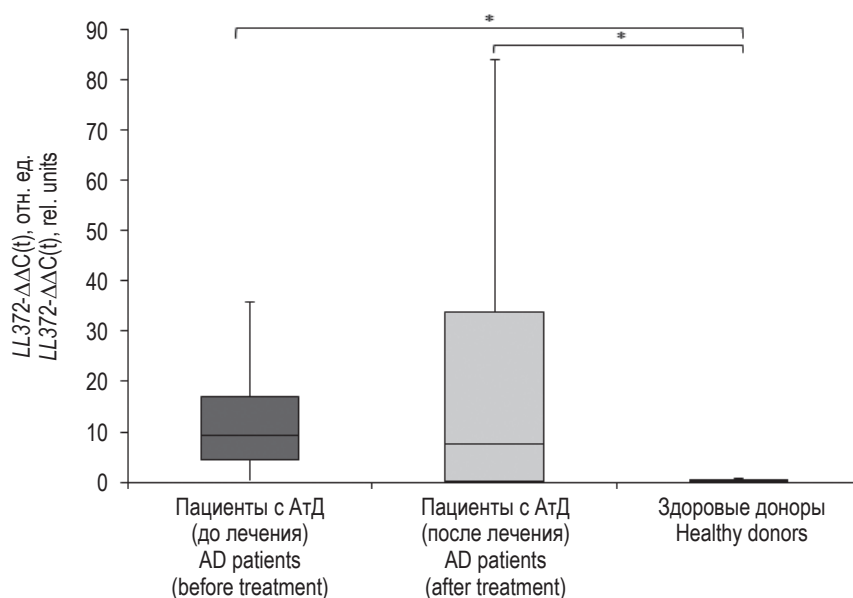


Рисунок 2. Уровень экспрессии гена *LL37* в крови пациентов с АтД по сравнению с контролем

Примечание. * – $p \leq 0,017$.

Figure 2. *LL37* gene expression level in the blood of AD patients compared to the control group

Note. *, $p \leq 0.017$.

Известно, что *LL37* стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов. Однако существуют данные, что при развитии АтД его экспрессия может быть снижена [7]. Наши данные по гену кателицидина в коже не расходятся с примерами из литературы, поскольку его экспрессия в случае АтД снижена. В другом исследовании было показано, что влияние кателицидина в крови на Т-клетки снижало их пролиферативную актив-

ность и увеличивало количество Т-регуляторных клеток [3]. В нашем случае имеет место повышение экспрессии этого гена в МНК. В настоящий момент недостаточно данных по поводу функционального значения этого пептида в крови при АтД, поэтому предстоит выяснить, в чем заключается подобное повышение этого показателя.

В отношении пептида *HBD1* можно сказать, что он экспрессируется как в моноцитах, так и в

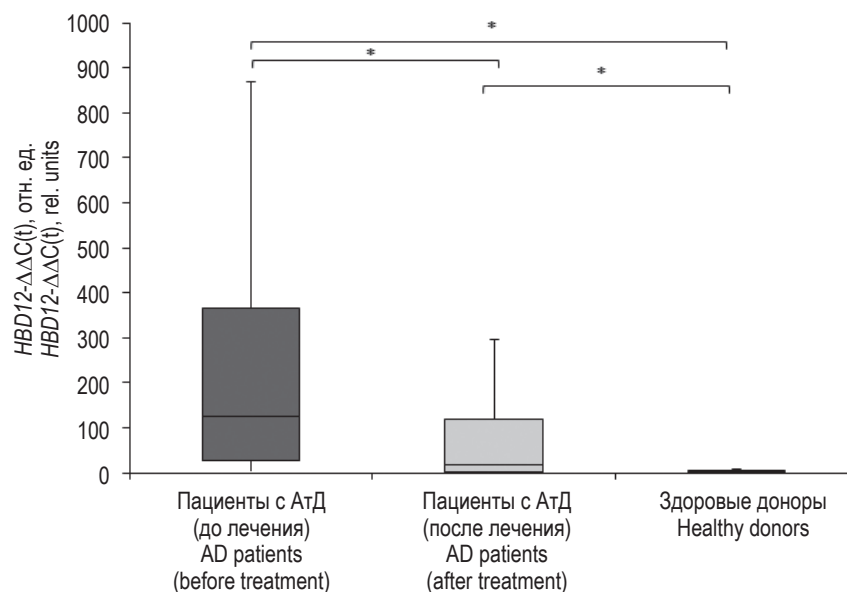


Рисунок 3. Уровень экспрессии гена *HBD1* в крови пациентов с АтД по сравнению с контролем

Примечание. * – $p \leq 0,017$.

Figure 3. *HBD1* gene expression level in the blood of AD patients compared to the control group

Note. *, $p \leq 0.017$.

макрофагах и является, таким образом, связующим звеном между врожденным и приобретенным иммунитетом [4]. Исследований *HBD1* при АтД значительно меньше (например, по сравнению с *HBD2* и *HBD3*). В нашем исследовании экспрессия гена *HBD1* повышалась только в крови, что свидетельствует об активации структур врожденного иммунитета на системном уровне в ответ на воспаление.

Заключение

Выявление роли иммунологических маркеров в течении АтД позволит создать новые про-

гностические подходы при ведении пациентов с атопической патологией. Поэтому важно иметь полное представление о патогенетических механизмах аллергического заболевания.

Благодарности

Выражаем благодарность Центру коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова», Москва, Россия. Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Список литературы / References

1. Мурашкин Н.Н., Амбарчян Э.Т., Материкин А.И., Епишев Р.В. Роль нарушений эпидермального барьера при атопическом дерматите: современные концепции патогенеза заболевания // Вопросы современной педиатрии, 2018. Т. 17, № 1. С. 85-88. [Murashkin N.N., Ambarchian E.T., Materikin A.I., Epishev R.V. The role of epidermal barrier impairments in atopic dermatitis: modern concepts of disease pathogenesis. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2018, Vol. 17, no. 1, pp. 85-88. (In Russ.)]
2. Свитич О.А., Ганковская Л.В., Рахманова И.В., Зайцева И.А., Ганковский В.А. Ассоциация полиморфных маркеров, локализованных в 5'-нетранслируемой области гена *Defb 1*, с гипертрофией аденоидных вегетаций // Вестник Российского государственного медицинского университета, 2012. Т. 3. С. 59-62. [Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Rakhmanova I.V., Zaytseva I.A., Gankovskiy V.A. The association of polymorphic markers in the 5'-untranslated region of the *DEFB1* gene with adenoid hypertrophy vegetations. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Russian State Medical University*, 2012, Vol. 3, pp. 59-62. (In Russ.)]
3. Alexandre-Ramos D.S., Silva-Carvalho A.É., Lacerda M.G., Serejo T.R.T., Franco O.L., Pereira R.W., Carvalho J.L., Neves F., Saldanha-Araujo F. LL-37 treatment on human peripheral blood mononuclear cells modulates immune response and promotes regulatory T-cells generation. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, Vol. 108, pp. 1584-1590.

4. Chieosilapatham P, Ogawa H., Niyonsaba F. Current insights into the role of human β -defensins in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2017, Vol. 190, no. 2, pp. 155-166.
5. Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Gankovskaya O.A., Lavrov V.F. Herpes simplex virus: treatment with antimicrobial peptides. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007, no. 601, pp. 369-376.
6. Luger T., Adaskevich U., Anfilova M., Dou X., Murashkin N.N., Namazova-Baranova L., et al. Practical algorithm to inform clinical decision-making in the topical treatment of atopic dermatitis. *J. Dermatol.*, 2021, Vol. 48, no. 8, pp. 1139-1148.
7. Reinholz M., Ruzicka T., Schaubert J. Cathelicidin LL-37: An Antimicrobial Peptide with a Role in Inflammatory Skin Disease. *Ann. Dermatol.*, 2012, Vol. 24, no. 2, 126. doi: 10.5021/ad.2012.24.2.126.
8. Weidinger S., Beck L.A., Bieber T., Kabashima K., Irvine A.D. Atopic dermatitis. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2018, Vol. 4, 1. doi: 10.1038/s41572-018-0001-z.

Авторы:

Быстрицкая Е.П. — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Мурашкин Н.Н. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующий отделением дерматологии с группой лазерной хирургии, заведующий лабораторией патологии кожи у детей отдела научных исследований в педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Материкин А.И. — к.м.н., врач-дерматовенеролог отделения дерматологии с группой лазерной хирургии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ Москва, Российская Федерация

Наумова Е.А. — научный сотрудник кафедры генетики, биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Яковлева И.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Вартанова Н.О. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории условно-патогенных бактерий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Authors:

Bystritskaya E.P., Postgraduate Student, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Murashkin N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Research Associate, Head, Department of Dermatology, Head, Laboratory of Skin Pathology in Children, Federal Medical Research Center for Children's Health; Professor, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Materikin A.I., PhD (Medicine), Dermatovenereologist, Department of Dermatology, Federal Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Naumova E.A., Research Associate, Department of Genetics, Faculty of Biology, M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Yakovleva I.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cells Hybridomas, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Vartanova N.O., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Microbiology of Opportunistic Bacteria, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 15.07.2022

Отправлена на доработку 20.07.2022

Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022

Revision received 20.07.2022

Accepted 28.07.2022