

ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ АПОПТОЗА У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Ревякина В.А.^{1,2}, Мухортых В.А.^{1,3}, Тармаева Н.А.¹,
Ларькова И.А.^{1,2}

¹ ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия

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

³ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детей и подростков Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

Резюме. Исследование нацелено на изучение изменений в процессах апоптоза у пациентов, страдающих atopическим дерматитом (АтД). В ходе работы была проанализирована группа из 88 пациентов в возрастном диапазоне от одного года до трех лет, у которых наблюдались разнообразные степени тяжести данного заболевания. Показатели SCORAD, отражающие степень тяжести АтД, демонстрировали следующие значения: $68,14 \pm 2,63$ при тяжелой форме, $32,03 \pm 1,43$ при средней и $12,12 \pm 1,43$ при легкой. В рамках исследования для определения уровней маркеров апоптоза в крови (включая Caspase 8, Caspase 9, sCD153, sFas-L, Annexin 5) использовался иммуноферментный анализ (ELISA) с применением наборов от Bender MedSystems® (Австрия). Анализ показал значительное уменьшение концентрации Annexin 5 в сыворотке крови у пациентов с АтД в двадцать раз по сравнению с контрольными значениями, что говорит о заметном нарушении процессов апоптоза ($p < 0,05$). Кроме того, было обнаружено статистически значимое снижение уровней Caspase 8 и Caspase 9, где концентрация Caspase 8 уменьшилась втрое, а Caspase 9 – в восемь раз по сравнению с нормативными показателями. При этом уровни sFas-L также продемонстрировали существенное снижение. В отличие от этих показателей, содержание sCD153 в сыворотке крови оказалось значительно выше (в пять раз) нормы, что не характерно для здорового состояния. Особенно ярко выраженные отклонения в процессах апоптоза наблюдались у пациентов с тяжелыми формами atopического дерматита, подчеркивая тесную связь между уровнем нарушений апоптоза и тяжестью клинических проявлений заболевания. Это исследование подтверждает необходимость более глубокого анализа механизмов апоптоза в контексте АтД, указывая на комплексные изменения в сигнальных путях активации и нарушения элиминации альтерированных иммунных клеток, способствующих усилению и хронизации воспалительного процесса в коже.

Ключевые слова: atopический дерматит, дети, апоптоз, Annexin 5, Caspase 8, Caspase 9, sCD153, sFas-L

Адрес для переписки:

Ревякина Вера Афанасьевна
ФГБУН «Федеральный исследовательский
центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»
115446, Россия, Москва, Каширское шоссе, 21.
Тел.: 8 (499) 794-36-12.
E-mail: 5356797@mail.ru

Address for correspondence:

Vera A Revyakina
Federal Research Centre of Nutrition,
Biotechnology and Food Safety
21 Kashirskoe Highway
Moscow
115446 Russian Federation
Phone: +7 (499) 794-36-12.
E-mail: 5356797@mail.ru

Образец цитирования:

В.А. Ревякина, В.А. Мухортых, Н.А. Тармаева,
И.А. Ларькова «Оценка показателей апоптоза у
больных atopическим дерматитом» // Российский
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 4. С. 775–780.
doi: 10.46235/1028-7221-16943-EOA

© Ревякина В.А. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.A. Revyakina, V.A. Mukhortykh, N.A. Tarmaeva,
I.A. Larkova “Evaluation of apoptosis markers in patients with
atopic dermatitis”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 4, pp. 775–780.
doi: 10.46235/1028-7221-16943-EOA

© Revyakina V.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16943-EOA

EVALUATION OF APOPTOSIS MARKERS IN PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS

Revyakina V.A.^{a, b}, Mukhortykh V.A.^{a, c}, Tarmaeva N.A.^a, Larkova I.A.^{a, b}

^a Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian Federation

^b National Medical Research Center for Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation, Department of Allergy, Moscow, Russian Federation

^c Federal Scientific and Clinical Center for Children and Adolescents, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Abstract. The purpose of the study was to analyze indicators of apoptosis in patients with atopic dermatitis (AD). Patients (N = 88) aged from 12 months to 3 years with varying degrees of disease severity were involved into trial. SCORAD indices were: 68.14 ± 2.63 – in patients with severe AD; 32.03 ± 1.43 – with moderate; and 12.12 ± 1.43 – with mild AD, respectively. Determination of apoptosis markers (Caspase 8, Caspase 9, sCD153, sFas-L, Annexin 5) in blood serum was performed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits from Bender MedSystems® (Austria). A study of apoptosis markers in the blood serum of children with AD revealed a significant decrease ($p < 0.05$) in the concentration of Annexin 5 compared to standard values (by 20 times). A statistically significant decrease ($p < 0.05$) in the concentration levels of Caspase 8 and Caspase 9 in the serum of AD patients was revealed. Thus, the concentrations of Caspase 8 were reduced on by 3 times, and Caspase 9 by 8 times compared to the norm. Also In addition, when determining sFas-L indicators, a statistically significant ($p < 0.05$) decrease in concentration was noted compared to standard indicators. The content of sCD153 in the blood serum in AD patients was significantly higher ($p < 0.05$) than the normative values by 5 times (not detected normally). The most pronounced disturbances in apoptosis indicators were observed in patients with severe atopic dermatitis, ($p < 0.05$), highlighting the importance of studying apoptosis in the context of AD and the possible link between disruptions in this process and the severity of clinical manifestations in patients. The study demonstrates the peculiarities of apoptosis processes in children with AD. On the one hand, these patients have significantly increased activation of signaling systems, on the other hand, the elimination of altered immunocompetent cells does not occur properly, which contributes to the progression and chronicity of immune inflammation in the skin.

Keywords: atopic dermatitis, children, apoptosis, Annexin 5, Caspase 8, Caspase 9, sCD153, sFas-L

Введение

Атопический дерматит (АтД), являясь одним из самых распространенных заболеваний у детей, оказывает значительное влияние на качество жизни больных и членов их семей. В последние годы отмечается стойкая тенденция к увеличению частоты тяжелых, непрерывно-рецидивирующих форм заболевания, резистентных к стандартной терапии [1, 2].

Несмотря на существенный прогресс в изучении механизмов развития АтД, многие патофизиологические аспекты заболевания остаются до конца неизученными. Определенный интерес вызывают исследования показателей апоптоза [4, 5, 11, 12], так как нарушение процессов его регуляции и/или недостаточность индукции способно поддерживать воспалительный процесс в коже. Более глубокое понимание механизмов запрограммированной клеточной гибели в различных типах клеток может быть использовано в

терапевтических целях для регуляции этого процесса.

Апоптоз – физиологический процесс генетически запрограммированной гибели клетки, что является важным механизмом регуляции иммунного ответа [9]. В запуске апоптоза участвуют различные структуры, прежде всего, плазматическая мембрана и митохондрии. Индукция апоптоза и активация проапоптотических белков ведут к активации каспаз (цистеиновых протеаз). Различают инициаторные и эффекторные каспазы, функционирующие как протеолитические каскады. Каспазы находятся в клетках в неактивном состоянии (прокаспазы), активация которых происходит путем их протеолитического расщепления в местах расположения аспарагиновых оснований. Так, Caspase 9 активирует каспазы 3 и 7, что приводит к фрагментации ДНК и апоптозу. Апоптоз, индуцируемый CD95 и TNF α активирует Caspase 8, которая обеспечивает прямую связь

между рецепторами клеточной гибели и каспазами.

В результате действия эффекторных каспаз и активированных ими других ферментов (эндонуклеаз, гельзолина и т. д.) разрушаются такие компоненты клетки, как внутриядерная ламина, нарушается целостность ДНК, происходит специфическая компактизация хроматина, наблюдается распад элементов цитоскелета, митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума и т. д.

Классические специфические рецепторы для индукции апоптоза относятся к суперсемейству рецепторов для TNF α . Одним из таких рецепторов является FasL, который содержится в цитоплазматическом участке «домен смерти» (death domain), обеспечивающий активацию каскада каспаз. FasL экспрессируется в значительной степени на активированных Т-лимфоцитах и, взаимодействуя (в виде мембраноассоциированного или растворимого белка) с Fas/CD95, становится основным механизмом апоптотической гибели клеток-мишеней. Считается, что взаимодействие Fas с FasL формирует апоптоиндуцирующий сигнал на поверхности активированных Т-лимфоцитов, но оказывает антиапоптотическое действие на покоящиеся Т-клетки [7].

Как было показано в недавних исследованиях, одним из наиболее перспективных с точки зрения использования в качестве маркера терминальных апоптотических стадий представляется Annexin 5 [3, 6, 8]. Показано, что в процессе апоптоза происходит усиление экспрессии фосфатидилсерина на наружной мембране клетки [13]. Annexin 5 способен связывать экспрессированный фосфатидилсерин и, таким образом, уменьшать провоспалительную активность гибнущей клетки. Таким образом, нахождение Annexin 5 в экстрацеллюлярном матриксе представляет иммунопатогенетическую значимость в процессах регуляции апоптоза.

Материалы и методы

Обследовано 88 детей с АтД в возрасте от 12 месяцев до 3 лет, среди них 39 (44,3%) мальчиков и 49 (55,7%) девочек. Оценка тяжести АтД проводилась по шкале SCORAD, предложенной Европейской группой Экспертов [10]. Распределение детей по тяжести АтД было следующим: 44 (50,0%) больных с тяжелым течением, 29 (32,95%) – со среднетяжелым и 15 (17,05%) с легким течением болезни. Индексы SCORAD составили $68,14 \pm 2,63$; $32,03 \pm 1,43$; $12,12 \pm 1,43$ баллов соответственно.

Материалом исследования служила венозная кровь обследованных лиц, взятая утром натощак из локтевой вены. Определение маркеров апоптоза (Annexin 5, sCD153, sFas-L, Caspase 8, Caspase 9) в сыворотке крови проводили с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием коммерческих наборов Bender MedSystems® (Австрия).

В работе применяли методы параметрической (критерий Стьюдента) и непараметрической (критерий Манна–Уитни) статистики. Результаты представлены в виде средних величин и их стандартной ошибки ($M \pm m$). Уровень значимости считали достоверным при $p < 0,05$.

Больные находились на стационарном лечении в Клинике лечебного питания ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» и получали наружную терапию согласно клиническим рекомендациям. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при Клинике лечебного питания ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» и проведено в соответствии с этическими и нормативными документами Российской Федерации.

Результаты и обсуждение

Показатели апоптоза у больных с АтД представлены на рисунке 1.

У детей с АтД было выявлено статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение концентрации Annexin 5 по сравнению с нормативными показателями (снижен в 20 раз). Функция Annexin 5 заключается в ингибировании провоспалительной активности клетки. Таким образом, можно предположить, что при его снижении возможно усиление аллергического воспаления.

При определении показателя sFas-L отмечалось статистически достоверное ($p < 0,05$) уменьшение концентрации по сравнению с нормативными показателями. Fas-лиганд индуцирует гибель клетки за счет связывания с Fas-рецептором.

Показатель sCD153 при АтД достоверно превышает ($p < 0,05$) нормативные показатели в 5 раз (в норме не обнаруживается). sCD153 отвечает за прием сигнала клеткой и экспрессируется на активированных Т- и В-клетках и моноцитах.

Концентрации Caspase 8 и Caspase 9 у обследованных детей были достоверно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с нормативными показателями. Так, Caspase 8 снижена в 3 раза, а Caspase 9 снижена в 8 раз (по сравнению с нормой). Минимальные значения этих показателей были зарегистрированы у пациентов с тяжелым течением АтД.

Референсные значения маркеров апоптоза представлены в таблице 1.

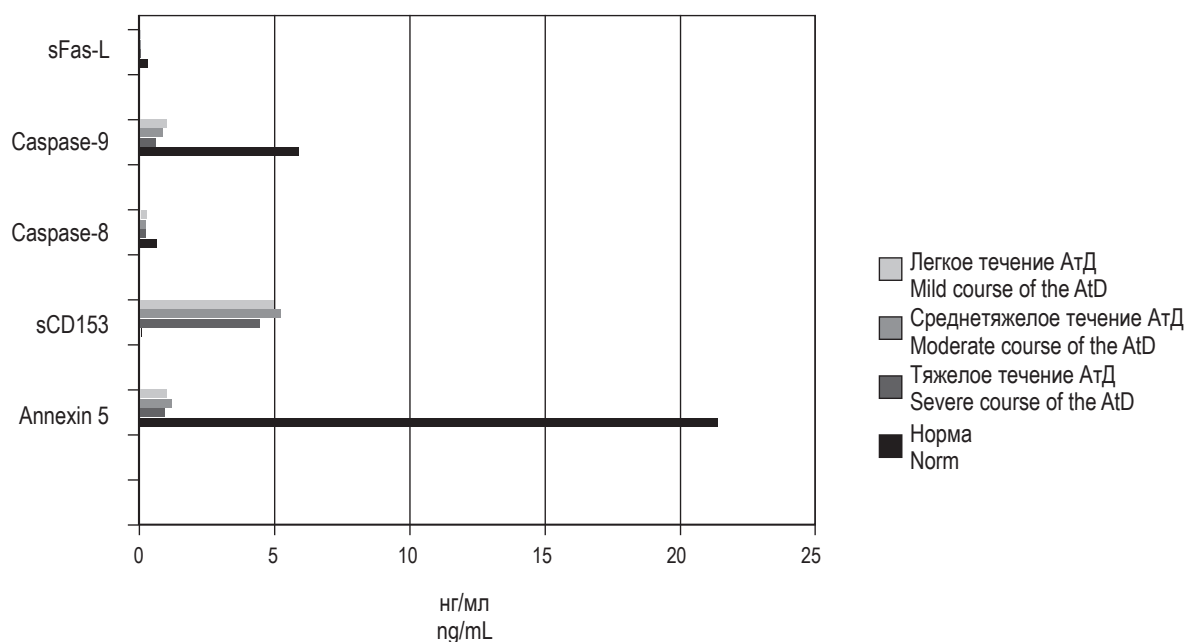


Рисунок 1. Концентрация маркеров апоптоза (нг/мл) в сыворотке крови у детей с АтД

Figure 1. Concentration of apoptosis markers (ng/mL) in serum of children with AtD

ТАБЛИЦА 1. РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА, М±m

TABLE 1. REFERENCE VALUES OF APOPTOSIS MARKERS, M±m

Показатель Indicator	Норма, нг/мл Normal range, ng/mL
Annexin 5	21,3±0,2
sCD153	У здоровых не обнаруживается Not detected in healthy individuals
Caspase 8	0,60±0,05
Caspase 9	5,9±0,4
sFas-L	0,21±0,01

Заключение

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что процессы апоптоза при АтД имеют свои особенности. С одной стороны, активация сигнальных систем значительно повы-

шена, с другой – не происходит в должной мере элиминации измененных иммунокомпетентных клеток, что способствует прогрессированию и хронизации аллергического воспалительного процесса.

Список литературы / References

1. Глухова Е.А., Мухортых В.А., Тамразова О.В., Таганов А.В., Ревякина В.А. Предикторы тяжелого течения атопического дерматита // Вопросы питания, 2022. Т 91, № 1. С. 76-85. [Glukhova E.A., Mukhortykh V.A., Tamrazova O.V., Taganov A.V., Revyakina V.A. Predictors of severe course of atopic dermatitis. *Voprosy Pitaniya = Nutrition Issues*, 2022, Vol. 91, no. 1, pp. 76-85. (In Russ.)]

2. Ларькова И.А., Глухова Е.А., Ревякина В.А. Эффективность и безопасность иммунобиологической терапии атопического дерматита у детей // Российский педиатрический журнал, 2022. Т. 25, № 1. С. 46-51. [Larkova I.A., Glukhova E.A., Revyakina V.A. Effectiveness and safety of immunobiological therapy for atopic dermatitis in children. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal = Russian Pediatric Journal*, 2022, Vol. 25, no. 1, pp. 46-51. (In Russ.)]
3. Alshiraihi I., Kato T.A. Apoptosis Detection Assays. *Methods Mol. Biol.*, 2023, Vol. 2519, pp. 53-63.
4. Alyoussef A. Attenuation of experimentally induced atopic dermatitis in mice by sulforaphane: effect on inflammation and apoptosis. *Toxicol. Mech. Methods*, 2022, Vol. 32, no. 3, pp. 224-232.
5. James B.N., Oyeniran C., Sturgill J.L., Newton J., Martin R.K., Bieberich E., Spiegel, S. Ceramide in apoptosis and oxidative stress in allergic inflammation and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 147, no. 5, pp. 1936-1948.
6. Jing J. The Relevance, Predictability, and Utility of Annexin A5 for Human Physiopathology. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, Vol. 25, no. 5, 2865. doi: 10.3390/ijms25052865.
7. Mao M.G., Xu J., Liu R.T., Ye L., Wang R., Jiang J.L. Fas/FasL of pacific cod mediated apoptosis. *Dev. Comp. Immunol.*, 2021, Vol. 119, 104022. doi: 10.1016/j.dci.2021.104022.
8. Niles A.L., Kupcho K.R. A Nondestructive, Real-Time Annexin V Apoptosis Assay. *Methods Mol. Biol.*, 2022, Vol. 2543, pp. 1-11.
9. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals – A review. *Braz. J. Biol.*, 2021, Vol. 81, no. 4, pp. 1133-1143.
10. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*, 1993, Vol. 186, no. 1, pp. 23-31.
11. Sroka-Tomaszewska J., Trzeciak, M. Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, 4130. doi: 10.3390/ijms22084130.
12. Szymański U., Cios A., Ciepielak M., Stankiewicz W. Cytokines and apoptosis in atopic dermatitis. *Postepy Dermatol. Alergol.*, 2021, Vol. 38, no. 2, pp. 1-13.
13. Trautmann A, Akdis M, Klunker S, Blaser K, Akdis CA. Role of apoptosis in atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2001, Vol. 124, no. 1-3, pp. 230-232.

Авторы:

Ревякина В.А. — д.м.н., профессор, заведующая отделением ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»; ведущий научный сотрудник ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Мухортык В.А. — к.м.н., научный сотрудник ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»; врач — аллерголог-иммунолог ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детей и подростков Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

Authors:

Revyakina V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department, Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology, and Food Safety; Leading Research Associate, Department of Allergy, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Mukhortykh V.A., PhD (Medicine), Research Associate, Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology, and Food Safety; Allergist-immunologist, Department of Allergy, Federal Scientific and Clinical Center for Children and Adolescents, Federal Medical and Biological Agency Moscow, Russian Federation

Тармаева Н.А. — младший научный сотрудник ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия

Tarmaeva N.A., Junior Research Associate, Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology, and Food Safety, Moscow, Russian Federation

Ларькова И.А. — к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»; старший научный сотрудник ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Larkova I.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology, and Food Safety; Senior Research Associate, Department of Allergy, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Поступила 05.04.2024

Отправлена на доработку 06.04.2024

Принята к печати 25.04.2024

Received 05.04.2024

Revision received 06.04.2024

Accepted 25.04.2024