

Маркёры апоптоза у детей раннего возраста с атопическим дерматитом и оценка эффективности диетотерапии

Т.Б. Сенцова¹, В.А. Ревякина¹, С.Н. Денисова², И.В. Ворожко¹, О.Ю. Моносова¹,
О.О. Кириллова¹, А.М. Тимофеева¹

¹ НИИ питания РАМН, Москва

² Детская городская клиническая больница №9 им. Г.Н.Сперанского, Москва

Apoptosis markers in the evaluation of the effectiveness of diet therapy in infants with atopic dermatitis

T.B. Sentsova¹, V.A. Revyakina¹, S.N. Denisova², I.V. Vorozhko¹, O.Yu. Monosova¹,
O.O. Kirillova¹, A.M. Timofeeva¹

¹ Research Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

² G.N.Speransky Municipal Children's Clinical Hospital No 9, Moscow

Аннотация

Цель: оценить динамику растворимых маркеров апоптоза у детей раннего возраста с атопическим дерматитом для уточнения механизмов иммунопатогенеза и оптимизации диетотерапии.

Материалы и методы: под наблюдением находились 66 детей в возрасте от 1.5 до 12 мес. с атопическим дерматитом (47 мальчиков и 19 девочек) на искусственном вскармливании. При аллергологическом обследовании у всех детей была выявлена сенсибилизация к белку коровьего молока. Наличие IgG и IgE антител к белку коровьего молока, его фракциям и белку козьего молока явилось основанием для включения детей в первую группу детей, которая получала гидролизаты в качестве диетотерапии (27 детей), а 39 детей второй группы - у которых не было выявлено сенсибилизации к белку козьего молока, получали смеси на его основе. Содержание растворимых маркеров апоптоза (sCD153, каспазы-8, sFas-L, каспазы-9 и аннексина-5) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом (ELISA).

Результаты: Полученные результаты свидетельствовали об активации сигнальных систем апоптоза у детей с атопическим дерматитом (АтД) за счет повышения уровней sFas-L и sCD153. Содержание каспаз-8 и -9 было достоверно ниже, чем в контрольной группе, что отражало нарушение в элиминации измененных иммунокомпетентных клеток. Концентрации аннексина-5 были значительно снижены у детей с АтД по сравнению с контрольной группой. Оценивая динамику исследованных показателей у детей с АтД при проведении диетотерапии, отмечено статистически достоверное повышение уровня каспазы-9 в обеих группах. Уровень каспазы-8 повышался только в группе детей использовавших смеси на основе козьего молока. Статистически значимых различий содержания

Summary

Aim: To estimate the dynamics of soluble apoptosis markers in infants with atopic dermatitis for updating mechanisms of immunopathogenesis and improvement of diet therapy.

Patients and methods: We observed 66 bottle-fed infants aged 1.5-12 months old (boys -47, girls - 19) with atopic dermatitis (AD). The sensitization to cow milk protein was revealed in all 66 infants. Detected allergen-specific IgG and IgE antibodies to cow milk protein, its fraction and goat milk protein were the reason to include infants into the 1st group and feed with hydrolyzed formula (27 infants). 39 infants in the 2nd group, who were not sensitized to goat milk protein, were fed by goat milk-based formula. Serum levels of soluble apoptosis markers (sCD153, caspase-8, sFas-L, caspase-9 and annexin-5) were measured by immunoenzyme method (ELISA).

Results: The activation of signal apoptosis systems in infants with AD with increased levels of sFas-L and sCD153 was revealed. Levels of caspase-8 and caspase-9 were significantly lower than in control group, and reflected the impaired elimination of modified immunocompetent cells. The level of annexin-5 was significantly lower in infants with AD than in control group. The estimation of the dynamics of investigated parameters during diet therapy showed significant increase of caspase-9 level in both groups. The level of caspase-8 was increased only in infants who were fed by goat milk formula. Levels of sFas-L, sCD153 and annexin-5 during diet treatment did not differ significantly between groups.

Conclusion: The results showed that sCD153, caspase-8, sFas-L, caspase-9 and annexin-5 play a role in the realization of allergic inflammation in infants with AD. The diet therapy with goat milk formula promotes more physiological repair of the effectory component of the apoptosis.

sFas-L, sCD153 и аннексина-5 на фоне диетотерапии не было выявлено в обеих группах.

Заключение: Полученные данные свидетельствовали об участии sCD153, каспазы-8, sFas-L, каспазы-9 и аннексина-5 в реализации аллергического воспаления у детей раннего возраста с АД. Диетотерапия с использованием смесей на основе козьего молока способствовала более физиологичному восстановлению эффекторного звена апоптоза.

Ключевые слова

Маркеры апоптоза, атопический дерматит, дети.

Keywords

Apoptosis markers, atopic dermatitis, infants.

Согласно современным представлениям апоптоз – это процесс, возникающий в клетке в результате внутреннего или внешнего сигнала определенной интенсивности и развивающийся по типичной для данной клетки программе [1]. В процессе апоптоза сохраняется целостность клеточных мембран и внутриклеточного содержимого, отсутствуют повреждение тканей и лейкоцитарная инфильтрация. В результате апоптоза происходит физиологическая смена клеточных поколений во всех тканях организма, в том числе и в иммунной системе, благодаря чему обеспечивается физиологическое равновесие гомеостаза [2].

Экспериментальными работами последних лет доказано, что активация апоптоза может происходить двумя основными путями: рецептор-опосредованным, при котором индуктором апоптотических изменений выступает комплекс Fas/Fas-L и др., и митохондриальным, за счет высвобождения цитохрома С и других апоптотических белков – регуляторов митохондриальных событий [3]. При сигналинге опосредованном Fas/Fas-L в результате цепочки взаимодействия «лиганд-рецептор-адаптер-эффектор» формируются агрегаты, в которых происходит активация каспазы-8 [4]. При высвобождении цитохрома С, белка Араф-1 и митохондриальных белков активируется каспаза-9. В дальнейшем каспазы -8 и -9 воздействуют на эффекторные каспазы -3, -6 и -7, что приводит к протеолитическому расщеплению белков клетки [5]. Таким образом, каспаза-8 выступает маркером инициации эффекторного звена апоптоза при рецепторном сигналинге, а каспаза-9 – при митохондриальном [6]. Следует отметить, что рецепторный и митохондриальный пути взаимодействуют и взаимно регулируются [7]. Поэтому в настоящее время процессы апоптоза оцениваются по белкам в зависимости от их преимущественного участия либо во внешнем (ре-

цепторном), либо во внутреннем (митохондриальном) пути активации [8].

Доказано, что помимо CD120a, CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2 триггером апоптоза может выступать белок CD153, также являющийся представителем суперсемейства TNF, и экспрессирующийся преимущественно на активированных Т-, В-клетках и моноцитах [9]. Его растворимая форма (sCD153) с высоким аффинитетом связывается с рецептором CD30, находящимся на клеточной мембране, однако конкретные механизмы приводящие к программируемой клеточной гибели с участием данного рецептора до настоящего времени остаются малоизученными.

В настоящее время установлено, что биологическая роль аннексина-5 при апоптозе неоднозначна. Экспериментальными работами показано, что аннексин-5 попадает во внеклеточное пространство в результате гибели клеток, при этом отсутствует специфичность его в отношении апоптоза. В терминальных стадиях апоптоза он связывается с белковыми структурами на внешней стороне плазматической мембраны, ингибируя провоспалительную активность клеток, что проявляется повышенными концентрациями этого показателя в сыворотке крови [10].

Внедрение в клиническую практику новых методов исследования позволило установить участие апоптоза в патогенезе различных заболеваний [11]. Изучение апоптоза иммунокомпетентных клеток в патогенезе аллергических болезней проводилось с целью определения особенностей его функционирования в реализации аллергического воспаления. В работах последних лет выявлена устойчивость Т-лимфоцитов к апоптозу как в фазе инициации, так и в эффекторной стадии у детей с атопической бронхиальной астмой [12]. Однако, эти данные носят фрагментарный характер, подобные исследования у детей раннего возраста при других

видах аллергопатологии не проводились. Тем не менее в экспериментальных работах было установлено, что элиминация аллергенспецифических эффекторных CD8+ Т-клеток за счет апоптоза не приводила к развитию аллергического воспаления кожи [13]. Поэтому раскрытие роли апоптоза в механизмах реализации аллергического воспаления представляется важным для профилактики и эффективной терапии, в том числе и диетотерапии у детей раннего возраста с АгД.

Цель работы: оценить динамику растворимых маркеров апоптоза при диетотерапии у детей раннего возраста с атопическим дерматитом.

Материалы и методы

В соответствии с целью и задачами работы проведено исследование растворимых маркеров апоптоза у 66 больных раннего возраста с АгД находившихся на искусственном вскармливании. Возраст обследованных детей был от 1,5 до 12 месяцев. Дети от 1,5 до 6 месяцев составили 35 человек (53%) от общего числа детей, дети от 1 до 12 месяцев - 31 ребенок (47%). В группе детей от 1,5 до 6 месяцев преобладали мальчики 71,5 % (25 детей). Среди детей от полугодия до года 53,3 % составили девочки (16 детей) и 46,7 % мальчики (22 детей). Диагноз атопический дерматит ставился на основании совокупности диагностических критериев, сформулированных на международных согласительных документах [14]. Для оценки степени тяжести атопического дерматита использовалась шкала SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis) [15]. Аллергологическое исследование включало количественное определение аллергенспецифических IgE и IgG антител с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) к белку коровьего молока (БКМ), казеину, α -лактальбумину (α -ЛА), β -лактоглобулину (β -ЛГ) и белку козьего молока в сыворотке крови. Применялись коммерческие тест-системы Allergopharma (Германия).

Содержание sCD153, каспазы-8, sFas-L, каспазы-9 выявлялось с помощью коммерческих наборов для ИФА Bender MedSystems (Австрия), уровень аннексина-5 с помощью коммерческих наборов Biosource (BioSource International Inc, Бельгия). Изучение концентраций sFas-L и sCD153 позволяло охарактеризовать рецепторный путь апоптоза, а каспазы -8 и -9 его эффекторное звено. Определение участия аннексина-5 в реакциях апоптоза было обусловлено его регуляторной ролью. Учет и регистрация результатов проводилась на вертикальном спектрофотометре Sunrise (TECAN, Австрия) с при-

лагаемым программным обеспечением. Для получения референсных значений растворимых маркеров апоптоза были использованы образцы крови детей в возрасте от 1,5 мес. до 3-х лет проходивших обследование перед малыми хирургическими операциями (грыжи и т.д.). Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом. Обработка результатов проводилась с использованием пакета статистических программ SPSS (США) для персонального компьютера. В связи с тем, что центральные тенденции и дисперсии имели нормальное распределение, при анализе определяли средние значения признака (M), стандартные ошибки среднего (m), среднеквадратичные отклонения (σ). Достоверность различий оценивалась с помощью критерия Стьюдента (t) для независимых и связанных выборок при значениях вероятности $p < 0,05$. Различия групп расценивались, как статистически значимые при $p < 0,05$ или высоко значимые при $p < 0,01$.

Дизайн исследования. Исследование являлось открытым, проспективным. Объектом исследования были дети раннего возраста страдающие АгД, жители московского региона. Критериями включения в исследование являлись: возраст больного (1 – 12 мес.), нахождение на искусственном вскармливании; критериями исключения – участие в другом исследовании, декомпенсированная органная патология, наличие иного аллергического заболевания, желание родителей пациента. Всем пациентам включенным в исследование после объективного обследования, проводимого для уточнения диагноза и оценки степени тяжести, исследовались аллергенспецифические IgE и IgG антитела в сыворотке крови к БКМ, казеину, α -ЛА, β -ЛГ и белку козьего молока с целью выявления причинно-значимого аллергена. Для определения sCD153, каспазы-8, sFas-L, каспазы-9 и аннексина-5 аликвоты этих сывороток были заморожены (минус 20°C) до момента проведения анализа. Диетотерапия обследованным детям назначалась с учетом данных аллергологического исследования (аллергенспецифических IgE и IgG антител к белку БКМ) казеину, α -ЛА, β -ЛГ и белку козьего молока. На фоне диетотерапии детям проводилась медикаментозная терапия блокаторами H-1 гистаминовых рецепторов и наружная кожная терапия. По результатам аллергологического обследования были сформированы группы наблюдения: в первую группу вошли дети, которые имели сенсibilизацию к белку коровьего и козьего молока ($n=27$), а во вторую - дети, у которых не выявля-

лась сенсibilизация к белку козьего молока (n=39). Детям первой группы в качестве диетотерапии назначались смеси на основе гидролизатов коровьего молока, детям второй группы - смеси на основе козьего молока. Повторное наблюдение проводилось на 21 день диетотерапии и включало аналогичный комплекс иммунологических исследований.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что у всех обследованных детей реализация атопического дерматита была обусловлена высокой степенью сенсibilизации к БКМ и его фракциям - казеину, α -ЛА, β -ЛГ. Частота изолированного IgE ответа составляла 52% (34 ребенка), а смешанного (IgG и IgE) - 48% (32 ребенка). Изолированный IgG ответ не выявлялся ни в одном случае наблюдения.

В проведенном исследовании об особенностях функционирования апоптоза судили по уровням sFas-L, sCD153, каспаза-8, каспаза-9 и аннексина-5 в сыворотке крови. Используемые показатели позволили создать представление, как о процессах сигналинга, так и эффекторных механизмах апоптоза с учетом степени тяжести АтД у детей (таблица 1). У детей с легким течением АтД была выявлена лишь тенденция к повышению sFas-L, в то время, как концентрации sCD153 превышали значения контрольной группы при легкой, средней и тяжелой степени АтД ($p < 0.05$). Можно предположить, что процессы сигналинга апоптоза у детей с АтД при реализации аллергического воспаления активированы. При тяжелом течении АтД

показатели sFas-L и sCD153 были максимально повышены по сравнению с данными контрольной группы ($p < 0.05$). Иная тенденция прослеживалась при изучении каспазы-8, каспазы-9 и аннексина-5. Концентрации каспаз-8, -9 у обследованных детей были статистически значимо ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной группе. Минимальные значения этих показателей были зарегистрированы при тяжелом течении атопического дерматита. Учитывая в целом неспецифическую регулирующую роль каспаз в поддержке функционального равновесия, выявляемый дефицит в содержании каспаз -8 и -9, свидетельствует о дисфункции эффекторного звена апоптоза.

Отмечено статистически значимое ($p < 0,05$), снижение концентрации аннексина-5 у детей с АтД по сравнению с контрольной группой. Учитывая его способность к ингибированию провоспалительной активности клетки можно предположить деполяризацию иммунного равновесия в сторону аллергического воспаления.

Следовательно, процессы апоптоза при развитии АтД имеют свои особенности. С одной стороны, активация сигнальных систем значительно повышена, а с другой, - имеются косвенные признаки недостаточной элиминации измененных клеток, что способствует прогрессированию и хронизации аллергического воспалительного процесса.

Оценивая динамику исследованных показателей у детей с АтД при проведении диетотерапии отмечено статистически достоверное ($p < 0.01$) повышение уровня каспазы-9 в обеих группах (таблица 2). Уровень каспазы-8 повы-

Таблица 1. Маркеры апоптоза в сыворотке крови детей с атопическим дерматитом (нг/мл, $M \pm m$).

Группы обследованных	sFas-L	sCD153	каспаза-9	каспаза-8	аннексин-5
1. Атопический дерматит, легкое течение (n=12)	0,48 \pm 0,08	2,38 \pm 0,2*	0,88 \pm 0,07*	0,18 \pm 0,002*	1,09 \pm 0,08*
2. Атопический дерматит, среднетяжелое течение (n=22)	0,54 \pm 0,03*	5,86 \pm 0,4*	0,72 \pm 0,07*	0,17 \pm 0,02*	0,92 \pm 0,07*
3. Атопический дерматит, тяжелое течение (n=32)	0,69 \pm 0,04*	6,11 \pm 0,4*	0,6 \pm 0,018*	0,16 \pm 0,02*	0,89 \pm 0,004*
4. Контрольная группа (n=20)	0,35 \pm 0,07	1,56 \pm 0,78	5,9 \pm 0,4	0,6 \pm 0,04	21,3 \pm 0,2

Примечание: * $p < 0.05$ по сравнению с контролем

Таблица 2. Содержание sFas-L, sCD153, каспазы-9, каспазы -8 и аннексина-5 в сыворотке крови у детей раннего возраста с АтД в процессе проведения диетотерапии (нг/мл, M±m)

Группы обследованных	Периоды наблюдения	sFas-L	sCD153	каспаза-9	каспаза -8	аннексин- 5
1. Дети с АтД получавшие смесь на основе гидролизатов БКМ (n=27)	до	0,59±0,08	4,74±0,64	0,81±0,09	0,164±0,12	1,17±0,21
	после	0,55±0,11	3,13±1,15	3,15±0,42**	0,199±0,21	1,50±0,28
2. Дети с АтД получавшие смесь на основе козьего молока (n=39)	до	0,57±0,13	4,96±0,40	0,65±0,17	0,176±0,13	0,85±0,17
	после	0,52±0,12	4,12±1,81	2,52±0,68**	0,230±0,22*	1,2±0,42
Контрольная группа (n=20)		0,35±0,07	1,56±0,78	5,9±0,4	0,6±0,04	21,3±0,2

Примечание: *p < 0.05, и **p < 0.01 по сравнению с показателем до лечения

шался только в группе детей использовавших смеси на основе козьего молока (p < 0.05). Статистически значимых различий содержания sFas-L, sCD153 и аннексина-5 на фоне диетотерапии выявлено не было, хотя имелась тенденция к нормализации исследуемых показателей. Таким образом, элиминация причинного значимого аллергена у детей с АтД при проведении диетотерапии приводила к активации митохондриального пути апоптоза. Учитывая тот факт, что при диетотерапии с использованием смесей на основе козьего молока, как

одного из видов диетического продукта происходит увеличение содержания, как каспазы-9, так и каспазы-8, можно предположить, что данный вид гипоаллергенной диеты способствует более физиологичному восстановлению эффекторного звена апоптоза. Обобщая результаты проведенных исследований можно заключить, что изучение маркеров апоптоза важно с точки зрения раскрытия иммунопатогенеза АтД и определения их прогностической значимости в процессе проведения диетотерапии у детей раннего возраста.

Литература

1. Susan Elmore. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; v.35(4): 495-516.
2. Ream R.M., Sun J., Braciale T.J. Stimulation of naive CD8+T cells by a variant viral epitope induces activation and enhanced apoptosis. *J. Immunol.* 2010; v.1,184(5): 2401-2409
3. A Eisenberg-Lerner, S Bialik, H-U Simon. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death and Differentiation.* 2009; v.16: 966-975
4. Janni T.S., Gobejishvili L., Hote.P.T., Inhibition of methionin adenosyltransferase II induces FasL expression? Fas-DISC formation and caspase -8-dependent apoptotic death in T leukemic cells. *Cel/res.* 2009; v.19(3): 358-369
5. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P. Cell Death classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation.* 2009; v.16: 3-11.
6. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007; v. 87(1): 99-163.
7. Wilson N.S., Dixit V., Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.* 2009; v.10: 348-335.
8. Kurokawa M., Kornbluth S. Caspase and kinases in a death grip. *Cell.* 2009; v.4,138 (5): 838-854.
9. Manzo F., Nebbioso A., Miceli M., et al. TNF – relativ apaptosis-inducing ligand: signaling of a ‘smart’ molecule. *Int. J. Biol.* 2009; v.41(3): 460-466.
10. Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Луговая А.В. Содержание растворимых маркёров апоптоза и циркулирующих аннексин v-связанных апоптических клеток в крови больных острым коронарным синдромом. *Вестн. С-Пб. У-та.* 2008; т.11(1): 14-23.

11. A Eisenberg-Lerner, S Bialik, H-U Simon. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death and Differentiation*. 2009; v.16: 966-975.

12. Булгакова В.А. Научное обоснование и эффективность иммунопрофилактики и иммунотерапии вирусной и бактериальной инфекции у детей с бронхиальной астмой. Автореферат на соиск. уч. степени докт. мед. наук. М., 2009.

13. Luckey Ulrike; Maurer Marcus; Schmidt Talkea; et al. T cell killing by tolerogenic dendritic cells protects mice

from allergy. *Journal of clinical investigation*. 2011; v. 121(10): 3860-3871.

14. Carsten Flohr. Atopic Dermatitis Diagnostic Criteria and Outcome Measures for Clinical Trials: Still a Mess. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011; v.131: 557-559.

15. Kunz B., Oranje A.P., Labreze L., et al. Clinical validation and guidelines for the SCORAD index: consensus report of the European Task Force on atopic dermatitis. *Dermatology*. 1997; v.195: 10-19.

Сведения об авторах:

Т.Б. Сенцова

Каширское шоссе, 21, Москва, 115446

Эл. почта: bio45@inbox.ru

Поступила 18.06.2013 г.