



Сенцова Т.Б. ✉, Ильенко Л.И., Тарасова О.В.

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Маркеры апоптоза в оценке эффективности диетотерапии у детей раннего возраста с атопическим дерматитом

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн – Сенцова Т.Б., Тарасова О.В.; анализ данных и написание текста – Сенцова Т.Б., Ильенко Л.И., Тарасова О.В.; научное редактирование – Ильенко Л.И.

Подана: 09.08.2023

Принята: 11.09.2023

Контакты: bio45@inbox.ru

Резюме

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 находилось 66 детей в возрасте от 1,5 до 12 месяцев 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 аллергенспецифических IgG- и IgE-антител к белку коровьего молока, его фракциям и белку козьего молока явилось основанием для включения детей в первую группу, 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, каспаза-8, sFas-L, каспаза-9 и аннексин-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. При оценке динамики 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 значимые различия в содержании sFas-L, sCD153 и аннексина-5 на фоне диетотерапии не были выявлены 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 АтД. Диетотерапия с использованием смесей на основе козьего молока способствовала более физиологичному восстановлению эффекторного звена апоптоза.

Ключевые слова: маркеры апоптоза, атопический дерматит, аллергия, белок коровьего молока, дети

Tatyana B. Sentsova ✉, Lidia I. Ilyenko, Olga V. Tarasova
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Apoptosis Markers in the Evaluation of the Effectiveness of Diet Therapy in Infants with Atopic Dermatitis

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: the concept and design – Tatyana B. Sentsova, Olga V. Tarasova; data analysis and text writing – Tatyana B. Sentsova, Lidia I. Ilyenko, Olga V. Tarasova; scientific editing – Lidia I. Ilyenko.

Submitted: 09.08.2023

Accepted: 11.09.2023

Contacts: bio45@inbox.ru

Abstract

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

Materials 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 и 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 effector component of the apoptosis.

Keywords: apoptosis markers, atopic dermatitis, allergy, cow's milk protein, children

■ ВВЕДЕНИЕ

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 Araf-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 (рецепторном), 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.

На сегодняшний день 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 его специфичность 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 atopической бронхиальной астмой [12, 16], 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 АтД.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В соответствии с целью и задачами работы проведено исследование растворимых маркеров апоптоза у 66 пациентов раннего возраста с АтД, находившихся на искусственном вскармливании. Возраст обследованных детей был от 1,5 до 12 месяцев. В возрасте от 1,5 до 6 месяцев было 35 пациентов (53%), 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 6 месяцев до 1 года 53,3% составили девочки (16 человек) и 46,7% – мальчики (22 человека). 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 -лактглобулину (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 проводились на вертикальном спектрофотометре Sunrise (TECAN, Австрия) с прилагаемым программным обеспечением. Для получения референсных значений растворимых маркеров апоптоза были использованы образцы крови детей в возрасте от 1,5 месяца до 3 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 (М), стандартные ошибки среднего (m), среднеквадратичные отклонения (σ). Достоверность различий оценивалась с помощью критерия Стьюдента (t) для независимых и связанных

выборки при значениях вероятности $p < 0,05$. Различия групп расценивались как статистически значимые при $p < 0,05$ или высокозначимые при $p < 0,01$.

Дизайн исследования

Исследование являлось открытым, проспективным. Объектом исследования были дети раннего возраста, страдающие АтД, жители Московского региона. Критериями включения в исследование являлись: возраст пациента (1–12 месяцев), 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 ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 сенсибилизацию к белку коровьего и козьего молока ($n=27$), а во вторую – дети, у которых не выявлялась сенсибилизация к белку козьего молока ($n=39$). Детям первой группы в качестве диетотерапии назначались смеси на основе гидролизатов коровьего молока, детям второй группы – на основе козьего молока. Повторное наблюдение проводилось на 21-й день диетотерапии и включало аналогичный комплекс иммунологических исследований.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Было установлено, что у всех обследованных детей реализация атопического дерматита была обусловлена высокой степенью сенсибилизации 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, каспазы-8, каспазы-9 и аннексина-5 в сыворотке крови. Используемые показатели позволили создать представление как о процессах сигналинга, так и об эффекторных механизмах апоптоза с учетом степени тяжести АтД у детей (табл. 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 каспазы-8, -9 у обследованных детей были статистически

Таблица 1

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

Table 1

Apoptosis markers in the blood serum of children with atopic dermatitis (ng/ml, $M \pm m$)

Группы обследованных	sFas-L	sCD153	Каспаза-9	Каспаза-8	Аннексин- 5
1. Атопический дерматит, легкое течение (n=12)	0,48±0,08	2,38±0,2*	0,88±0,07*	0,18±0,002*	1,09±0,08*
2. Атопический дерматит, среднетяжелое течение (n=22)	0,54±0,03*	5,86±0,4*	0,72±0,07*	0,17±0,02*	0,92±0,07*
3. Атопический дерматит, тяжелое течение (n=32)	0,69±0,04*	6,11±0,4*	0,6±0,018*	0,16±0,02*	0,89±0,004*
4. 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: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

значимо ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной группе. Минимальные значения этих показателей были зарегистрированы при тяжелом течении атопического дерматита. С учетом в целом неспецифической регулирующей роли каспаз в поддержании 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 АД 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 АД имеют свои особенности. С одной стороны, активация сигнальных систем значительно повышена,

Таблица 2

Содержание sFas-L, sCD153, каспазы-9, каспазы-8 и аннексина-5 в сыворотке крови у детей раннего возраста с АД в процессе проведения диетотерапии (нг/мл, $M \pm m$)

Table 2

Serum content of sFas-L, sCD153, caspase-9, caspase-8 and annexin-5 in infants with atopic dermatitis during diet therapy (ng/ml, $M \pm m$)

Группы обследованных	Периоды наблюдения	sFas-L	sCD153	Каспаза-9	Каспаза-8	Аннексин-5
1. Дети с АД, 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 АД, 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
3. 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: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению с показателем до лечения.

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 (табл. 2). Уровень каспазы-8 повышался только в группе детей, использовавших смеси на основе козьего молока ($p < 0,05$). Статистически значимых различий в содержании sFas-L, sCD153 и аннексина-5 на фоне диетотерапии выявлено не было, хотя имелась тенденция к нормализации исследуемых показателей.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Элиминация причинно-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/REFERENCES

1. Susan Elmore. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;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;1,184(5):2401–2409.
3. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death and Differentiation.* 2009;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;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;16:3–11.
6. Zeng Q, Zeng Y, Tang Y, Liu W, Sun C. Effect of IL-35 on apoptosis, adhesion, migration, and activation of eosinophils in allergic rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2022 Feb;33(2):e13717. doi: 10.1111/pai.13717
7. Wilson N.S., Dixit V., Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.* 2009;10:348–335.
8. Kurokawa M., Kornbluth S. Caspase and kinases in a death grip. *Cell.* 2009;4,138 (5):838–854.
9. Manzo F., Nebbioso A., Miceli M., et al. TNF – relativ apoptosis-inducing ligand: signaling of a 'smart' molecule. *Int.J.Biol.* 2009;41(3):460–466.
10. Grégory Seumois, Ciro Ramírez-Suástegui, Benjamin J Schmiedel, Shu Liang, Bjoern Peters, Alessandro Sette, Pandurangan Vijayanand. Single-cell transcriptomic analysis of allergen-specific T cells in allergy and asthma. *Sci Immunol.* 2020 Jun 12;5(48):eaba6087. doi: 10.1126/sciimmunol.aba6087
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;16:966–975.
12. Gao H, Feng BS, Liu JQ, Mo LH, Geng XR, Xiao Y, Zhang YY, Hong JY, Liu ZJ, Liu ZG, Feng Y, Yang P. Surviving induces defects in apoptosis in eosinophils in intestine with food allergy. *Innate Immun.* 2019 May;25(4):244–254. doi: 10.1177/1753425919829554
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;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;131:557–559.
15. Shao JB, Luo XQ, Mo LH, Yang G, Liu ZQ, Liu JQ, Liu ZG, Liu DB, Yang PC. Twist1 sustains the apoptosis resistance in eosinophils in nasal mucosa of allergic rhinitis. *Arch Biochem Biophys.* 2021 May 15;702:108828. doi: 10.1016/j.ab.2021.108828
16. Jie Song, Jinxiang Wang. SIRT3 regulates bronchial epithelium apoptosis and aggravates airway inflammation in asthma. *Mol Med Rep.* 2022 Apr;25(4):144. doi: 10.3892/mmr.2022.12660