

Содержание антимикробных пептидов в сыворотке у детей с атопическим дерматитом

Е.И. Ермолаева, Т.В. Виноградова, А.Н. Пампура

ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии» ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва

Serum levels of antimicrobial peptides in children with atopic dermatitis

E.I. Ermolaeva, T.V. Vinogradova, A.N. Pampura

Research Clinical Institute of Pediatrics, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Цель работы: установить взаимосвязь уровня циркулирующих антимикробных пептидов – кателицидина (LL-37), альфа-дефензинов (HNP 1–3) в сыворотке крови с клиническими проявлениями атопического дерматита у детей. В исследование были включено 70 пациентов в возрасте от 5 мес до 17 лет с атопическим дерматитом. Уровень LL-37 и HNP1–3 определяли с помощью иммуноферментного анализа. По результатам исследования уровень HNP1–3 был выше у детей со средней тяжестью заболевания в сравнении с детьми с легкой степенью атопического дерматита. Концентрация LL-37 в сыворотке крови не зависела от индекса тяжести дерматита SCORAD. Однако уровень этого пептида был связан с выраженностью отдельных клинических проявлений заболевания. Концентрация LL-37 была повышена при площади поражения более 50% поверхности тела; уровень LL-37 возрастал с увеличением интенсивности эксфолиаций, лихенификации и зуда. В то же время по мере нарастания интенсивности корок/мокнущих от легкой до умеренной степени уровень LL-37 увеличивался и резко снижался при максимальной ее выраженности. Установленная взаимосвязь между концентрацией антимикробных пептидов и клиническими проявлениями атопического дерматита свидетельствует о патогенетической роли LL-37 и HNP1–3 в развитии данного заболевания.

Ключевые слова: дети, атопический дерматит, кателицидин, дефензины, SCORAD.

Objective: to establish a relationship of the serum levels of the antimicrobial peptides (AMP) cathelicidin (LL-37) and α -defensins (HNP 1-3) to the clinical manifestations of atopic dermatitis (AD) in children. **Subjects and methods.** The investigation enrolled 70 patients aged 5 months to 17 years with AD. LL-37 and HNP1-3 levels were determined by enzyme immunoassay. **Results.** The level of HNP 1-3 was found to be higher in children with moderate AD than in those with its mild form. The serum concentration of LL-37 was independent of the severity scoring of atopic (SCORAD) index. However, the level of this peptide was associated with the magnitude of clinical manifestations of the disease. The concentration of LL-37 was increased with an injury over 50% of the body surface; its level rose with the higher intensity of excoriations, lichenification, and pruritus. At the same time, as the intensity of crusts/oozing lesion increased from mild to moderate, LL-37 rose and drastically decreased at their highest intensity levels. **Conclusion.** The established correlation between AMP concentration and clinical manifestations of AD suggests that LL-37 and HNP1-3 play a role in the pathogenesis of this disease.

Key words: children, atopic dermatitis, cathelicidin, defensins, SCORAD.

Атопический дерматит – распространенное хроническое воспалительное кожное заболевание, характеризующееся структурным нарушением эпидермиса и иммунной дисрегуляцией [1]. В последние годы наблюдается тенденция роста числа более тяжелых форм заболевания, в связи с чем идет интенсивное изучение механизмов его развития и осложнений. Известна роль в патогенезе и течении данного заболевания различных микроорганизмов (*S.aureus*, грибов рода *Malazessia*, *Candida* и др.) [2, 3].

Одной из древнейших систем защиты организма от микробных агентов являются антимикробные пептиды, играющие роль в процессе воспаления инфекционного и неинфекционного генеза [4]. В коже чело-

века обнаружено более 20 таких пептидов, из которых наиболее хорошо изучены два семейства – дефензинов и кателицидина [5, 6]. Альфа-дефензины (HNP1, 2, 3 и 4), главным образом, экспрессируются нейтрофилами, где созревают и накапливаются в специфических гранулах [7]. Эти пептиды обнаруживаются как в эпителиальных тканях, так и в физиологических жидкостях. До настоящего времени нам не встретились данные об уровне альфа-дефензинов в сыворотке крови у больных атопическим дерматитом.

Кателицидин человека LL-37 является индуцируемым антимикробным пептидом и его уровень в сыворотке крови лабилен. Основными источниками LL-37 служат клетки периферической крови (нейтрофилы, Т- и В-лимфоциты, макрофаги, моноциты, тучные клетки, НК-клетки) и эпителиальные клетки. Экспрессия генов LL-37 увеличивается в ответ на проникновение в организм патогенов или при повреждении и воспалении в тканях. В норме при травматизации кожи в месте повреждения достаточно быстро повышается уровень LL-37, который обладает прямой антимикробной активностью, является хемоаттрактантом для нейтрофилов,

© Коллектив авторов, 2015

Ros Vestn Perinatol Pediat 2015; 4:89–92

Адрес для корреспонденции: Ермолаева Екатерина Игоревна – асп. отделения иммунологии и клинической иммунологии НИКИ педиатрии РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Пампура Александр Николаевич – д.м.н., рук. указанного отделения
Виноградова Татьяна Владимировна – к.м.н., в.н.с. лаборатории общей патологии того же учреждения
125412 Москва, ул.Талдомская, д. 2

T-клеток и моноцитов [8–10], способствует ангиогенезу и васкуляризации, пролиферации кератиноцитов, ускоряя реэпителизацию.

Данные о концентрации LL-37 в сыворотке крови у больных atopическим дерматитом противоречивы. Так, в исследовании N. Kanda и соавт. установлено, что при этом заболевании уровень LL-37 в сыворотке ниже, чем у здоровых [11]. В другом исследовании концентрация LL-37 в сыворотке крови детей с atopическим дерматитом не отличалась от таковой у здоровых детей. Однако при atopическом дерматите отмечалось повышение уровня LL-37 с увеличением индекса SCORAD [12].

Данные о концентрации LL-37 в коже больных atopическим дерматитом также неоднозначны. Например, L. Mallbris и соавт. показали, что при atopическом дерматите экспрессия LL-37 в коже больных снижена [13]; с другой стороны, N. Ballardini и соавт. обнаружили высокий уровень экспрессии LL-37 при этом заболевании [14]. К настоящему времени проведено множество исследований, указывающих на снижение активности антимикробных пептидов, в частности LL-37, в коже пациентов с atopическим дерматитом при наличии вторичного инфицирования. Известно, что больные atopическим дерматитом с дефицитом экспрессии LL-37 чаще страдают вакцинальной экземой. Наблюдаемые при atopическом дерматите вирусные инфекции — *eczema vaccinatum* и *eczema herpeticum* (экзема Капоши) предположительно сопряжены с недостаточностью LL-37 [15]. Уровень последнего в поврежденной коже пациентов с экземой Капоши ниже, чем при неосложненном atopическом дерматите [16]. Однако не ясно, является ли такой низкий уровень антимикробных пептидов у пациентов с экземой Капоши первичным.

Таким образом, неоднозначные результаты могут отражать, с одной стороны, активацию продукции антимикробных пептидов при воздействии различных факторов (в ответ на повреждение или встречу с инфекционным агентом), с другой — исходно низкий уровень антимикробных пептидов (что приводит к нарушению защитных свойств кожи) либо снижение уровня антимикробных пептидов при чрезмерном потреблении организмом. Несмотря на расхождения в результатах, имеет место факт участия этих антимикробных пептидов в течении atopического дерматита.

Анализ вышеизложенной информации обосновал цель настоящего исследования: установить взаимосвязь уровня циркулирующих антимикробных пептидов (LL-37, HNP1–3) в сыворотке крови и клинических проявлений atopического дерматита у детей.

Характеристика детей и методы исследования

В исследование были включены 70 детей с atopическим дерматитом различной степени тяжести. Оценка клинических проявлений заболевания

на момент госпитализации проводилась путем подсчета индекса SCORAD [17]. Пациенты были разделены на три группы в зависимости от тяжести клинических проявлений atopического дерматита: легкие проявления (SCORAD до 20 баллов), средней тяжести (SCORAD 20–40 баллов) и тяжелые (SCORAD более 40 баллов). Критериями исключения были тяжелые сопутствующие соматические заболевания, проявления инфекционных заболеваний на момент осмотра и забора крови, подозрение на генетические заболевания.

Количественное определение уровня антимикробных пептидов было проведено с помощью иммуноферментного анализа (Human LL-37 ELISA test kit, Human HNP1–3 ELISA test kit, Hycult biotech, Нидерланды). Диапазон количественного определения LL-37 составлял 0,14 – 100 нг/мл. Чувствительность метода – 0,14 нг/мл. Диапазон количественного определения человеческого HNP1–3 был 156 – 10 000 пг/мл, чувствительность – 156 пг/мл. У всех детей были определены общее количество лейкоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов периферической крови.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Statistica 8. Результаты исследования обработаны с использованием методов непараметрической статистики. Количественные значения представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала Q_1 (25-й перцентиль) и Q_3 (75-й перцентиль). Для оценки связи признаков применялся корреляционный анализ с расчетом корреляции по методу Спирмена. Характеристики групп пациентов по количественным признакам сравнивали с помощью *U*-критерия Манна–Уитни. Значимость установлена на уровне 5% ($p=0,05$).

Результаты и обсуждение

Среди обследованных детей (средний возраст $6,6 \pm 4,65$ года) было 56% мальчиков и 44% девочек. У 17% больных имели место легкие клинические проявления atopического дерматита (SCORAD – 12 [7; 15] баллов); у 29% – среднетяжелые (SCORAD – 32 [26; 36] баллов); у 53% – тяжелые (SCORAD – 66 [51; 77] баллов).

Уровень LL-37 и HNP1–3 в сыворотке крови составил 26,06 [21,78; 40,10] нг/мл и 466,8 [344,8; 603,4] пг/мл соответственно. Не выявлено взаимосвязи между содержанием антимикробных пептидов (LL-37, HNP1–3) в периферической крови и полом и возрастом детей. Уровень LL-37 и HNP1–3 не коррелировал между собой. Медианы уровня антимикробных пептидов у детей с различной тяжестью клинических проявлений atopического дерматита представлены в таблице.

Уровень HNP1–3 был достоверно выше в группе детей со среднетяжелыми проявлениями atopического дерматита в сравнении, чем с легкими. Уровень

LL-37 при различной тяжести клинических проявлений заболевания достоверно не различался. Однако отмечена тенденция к его увеличению при тяжелых проявлениях atopического дерматита. Исследователи полагают, что уровень LL-37 в сыворотке крови можно считать маркером тяжести заболевания [12].

Учитывая многочисленные эффекты антимикробных пептидов, которые могут иметь значение в патогенезе atopического дерматита, и влияние различных факторов (воспаление кожи, механические повреждения, дополнительная травматизация вследствие расчесов, инфекционный компонент) на их концентрацию, представлялась актуальной оценка уровня LL-37 и HNP1-3 в зависимости от интенсивности отдельных клинических симптомов atopического дерматита (площадь поражения кожи, интенсивность эритемы, отек, корок и/или мокнутия, эксфолиаций, лихенификации, зуда). Уровень LL-37 возрастал при диффузном atopическом дерматите (площадь поражения более 50%) и был достоверно выше (37,58 [29,84; 45,4] нг/мл), чем при ограниченном (площадь поражения до 10%) и распространенном дерматите (площадь 10–50%) (24,00 [20,47; 37,97] и 24,14 [21,18; 35,67] нг/мл соответственно).

Далее была проведена оценка уровня антимикробных пептидов при различной выраженности отдельных кожных проявлений заболевания (см. рисунок). Уровень HNP1-3 не зависел от площади высыпаний, интенсивности эритемы, отека, корок/мокнутия, эксфолиаций, лихенификации, зуда. Уровень LL-37 был достоверно выше при более интенсивных эксфолиациях: при отсутствии эксфолиаций – 22,94 [17,33; 26,33] нг/мл, при их интенсивности 2 балла – 35,15 [23,29; 41,79] нг/мл ($p=0,0204$).

Уровень LL-37 возрастал в соответствии с увеличением интенсивности мокнутия/корок: 0 баллов – 24,04 [19,34; 31,80] нг/мл; 1 балл – 24,5 [19,95; 38,19] нг/мл; 2 балла – 38,24 [26,47; 45,40] нг/мл. При максимальной выраженности мокнутия/корок (3 балла) уровень этого пептида резко снижался – 22,87 [20,68; 24,00] нг/мл, что, возможно, отражает декомпенсацию продукции кателицидина и приводит к недостаточности его защитного действия в случае отсутствия эпидермиса и, соответственно, наличия мокнутия (см. рисунок).

Уровень LL-37 возрастал с увеличением интенсивности лихенификации кожи. Так, при отсутствии ли-

хенификации уровень LL-37 был ниже (21,78 [19,06; 26,82] нг/мл), чем при ее интенсивности 2 балла (29,84 [22,23; 40,18] нг/мл) и 3 балла (40,01 [32,53; 42,41] нг/мл) ($p=0,028$ и $p=0,023$ соответственно). Выявленная зависимость может указывать на вовлеченность LL-37 в механизмы хронического аллергического воспаления при atopическом дерматите.

С увеличением интенсивности зуда концентрация кателицидина LL-37 увеличивалась. У детей с интенсивностью зуда 1–3 балла его уровень составил 21,59 нг/мл, что ниже, чем в группе с интенсивностью зуда 4–7 баллов – 35,15 нг/мл ($p=0,025$). При максимальных проявлениях зуда (8–10 баллов) данный показатель резко снижался (до 26,92 нг/мл).

Известно, что LL-37 вызывает увеличение продукции Т-клетками цитокина интерлейкина-31 [11], который является мощным стимулятором зуда кожи [18]. Кроме того, LL-37 способствует высвобождению гистамина из тучных клеток [19], что также ведет к усилению зуда у больных atopическим дерматитом. Исходя из полученных данных, можно полагать, что при тяжелых формах заболевания повышение уровня LL-37 в сыворотке крови в большей степени обусловлено процессами хронического аллергического воспаления, проявляющегося лихенификацией; а при выраженных островоспалительных проявлениях atopического дерматита

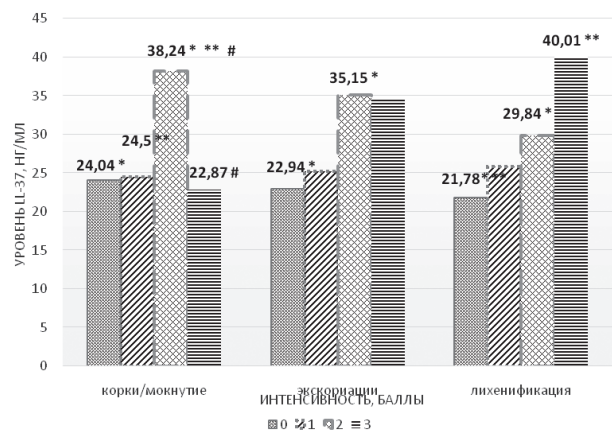


Рисунок. Уровень антимикробного пептида LL-37 при различной интенсивности показателей индекса SCORAD (0–3 балла) у детей с atopическим дерматитом. *, **, # – Различия в группах достоверны.

Таблица. Уровни антимикробных пептидов (LL-37, HNP1-3) у детей с различной тяжестью atopического дерматита (на момент осмотра), Me[Q₁; Q₃]

Показатель	Тяжесть клинических проявлений (n=70)		
	легкие (SCORAD <20 баллов) (n=13)	среднетяжелые (SCORAD 20–40 баллов) (n=20)	тяжелые (SCORAD >40 баллов) (n=37)
LL-37, нг/мл	22,98 [19,34; 26,82]	24,5 [20,47; 37,97]	30,82 [22,16; 41,57]
HNP1-3, пг/мл	369,2* [303,6; 535,6]	577* [410,2; 695,0]	464,9 [328,8; 589,8]

Примечание. * – Различия в группах достоверны.

(корки/мокнутые) происходит декомпенсация соотношения синтеза и потребления LL-37.

В группе детей с лейкоцитозом (более $9000 \cdot 10^9/\text{л}$) уровень LL-37 оказался достоверно выше (39,21 [26,96; 46,35] нг/мл) ($p=0,018$), чем в группе с меньшим уровнем лейкоцитов (24,99 [20,47; 37,97] нг/мл). Уровень HNP1-3 достоверно не различался в этих группах. Уровень LL-37 и HNP1-3 коррелировал с количеством сегментоядерных нейтрофилов в периферической крови ($R=0,357$; $p=0,0055$ для LL-37 и $R=0,298$; $p=0,0206$ для HNP1-3). Вероятно, воспаление (инфекционного и неинфекцион-

ного генеза), вызывающее лейкоцитоз, способствует и увеличению продукции LL-37.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования установлена взаимосвязь между концентрацией LL-37 в сыворотке крови и отдельными клиническими проявлениями атопического дерматита, что обосновывает дифференцированные подходы к использованию индукторов синтеза антимикробных пептидов, в том числе витамина D у больных с этим заболеванием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boguniewicz M., Leung D.Y. Recent Insights into Atopic Dermatitis and Implications for Management of Infectious Complications. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 1: 4–13.
2. Ong P.Y., Leung D.Y. The infectious aspects of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2010; 30: 3: 309–321.
3. Ong P.Y., Patel M., Ferdman R.M. et al. Association of staphylococcal superantigen-specific IgE with mild and moderate atopic dermatitis. *J Pediatr* 2008; 153: 6: 803–806.
4. Цывкина Е.А., Феденко Е.С., Будихина А.С., Пинегин Б.В. Оценка уровня антимикробных пептидов (α -дефензинов) в лейкоцитах периферической крови больных атопическим дерматитом и пиодермией. *Рос аллерг журн* 2010; 5: 43–47. (Tsyvkina E.A., Fedenko E.S., Budikhina A.S., Pinegin B.V. Assessment of antimicrobial peptides (alpha-defensins) in atopic dermatitis and pyoderma patients blood. *Rus Ros allergol zhurn* 2010; 5: 43–47.)
5. Selsted M.E., Ouellette A.J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 2005; 6: 551–557.
6. Zaiou M., Gallo R.L. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J Mol Med (Berl)* 2002; 80: 549–561.
7. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 710–720.
8. Witte M.B., Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 3: 509–528.
9. De Y., Chen Q., Schmidt A.P. et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 2000; 192: 1069–1074.
10. Soehnlein O., Kai-Larsen Y., Frithiof R. et al. Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J Clin Invest* 2008; 118: 10: 3491–3502.
11. Kanda N., Hau C.S., Tada Y. et al. Decreased serum LL-37 and vitamin D3 levels in atopic dermatitis: relationship between IL-31 and oncostatin M. *Allergy* 2012; 67: 6: 804–812.
12. Leung T.F., Ching K.W., Kong A.P. et al. Circulating LL-37 is a biomarker for eczema severity in children. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2012; 26: 4: 518–522.
13. Mallbris L., Carlén L., Wei T. et al. Injury downregulates the expression of the human cathelicidin protein hCAP18/LL-37 in atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2010; 19: 5: 442–449.
14. Ballardini N., Johansson C., Lilja G. et al. Enhanced expression of the antimicrobial peptide LL-37 in lesional skin of adults with atopic eczema. *Br J Dermatol* 2009; 161: 1: 40–47.
15. Howell M.D., Gallo R.L., Boguniewicz M. et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity* 2006; 24: 341–348.
16. Howell M.D., Wollenberg A., Gallo R.L. et al. Cathelicidin deficiency predisposes to eczema herpeticum. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 836–841.
17. European Task Force on Atopic Dermatitis. Severity scoring of atopic dermatitis the SCORAD index. Consensus report of the European task force on atopic dermatitis. *Dermatology* 1993; 186: 1: 23–26.
18. Dillon S.R., Sprecher C., Hammond A. et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 2004; 5: 7: 752–760.
19. Brogden N.K., Mehalick L., Fischer C.L. et al. The emerging role of peptides and lipids as antimicrobial epidermal barriers and modulators of local inflammation. *Skin Pharmacol Physiol* 2012; 25: 4: 167–181.

Поступила 11.02.15