

## Information about the authors

Y.R. Bikreva\* - student of Pediatric Faculty

E.V. Dyudya - student of Pediatric Faculty

Y.E. Katyreva - Department assistant

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

bikrevayana@mail.ru

УДК 616.5-002.2

## ИММУННАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

Боковой Вячеслав Дмитриевич, Десятова Мария Анатольевна, Коротков Артем Владимирович, Макеев Олег Германович

Кафедра медицинской биологии и генетики

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

Екатеринбург, Россия

### Аннотация

**Введение.** Согласно современным исследованиям, атопический дерматит является мультифакторным заболеванием, патогенез которого связан как с мутациями в генах, кодирующих структурные белки эпидермиса, так и с эпигенетическими изменениями экспрессии генов, в частности, снижением экспрессии гена *IFN-gamma*. Общепринятые методы лечения повреждений кожи при атопическом дерматите позволяют достичь ремиссии, но не полного излечения. **Цель исследования** – разработать эффективный метод иммунотерапии атопического дерматита, с минимизацией побочных эффектов. **Материал и методы.** Получение экзосом из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток крыс, трансфицированных плазмидным вектором, несущим в качестве полезного ген *IFN-gamma*. Экзосом наносили на поврежденную поверхность кожи крыс на модели атопического дерматита. **Результаты.** Спустя 9 суток наблюдалась нормализация структуры участков поврежденной кожи. Последующее наблюдение не выявило обострения заболевания у подопытных животных в течение 2 месяцев. **Выводы.** Применение генно-модифицированных экзосом для терапии поврежденной поверхности кожи позволяет рассматривать данный метод в качестве перспективного для наружной терапии атопического дерматита.

**Ключевые слова:** атопический дерматит, эпидемиология, генетика, эпигенетика.

## THE IMMUNE COMPONENT IN THE PATHOGENETIC THERAPY OF ATOPIC DERMATITIS

Bokovoy Vyacheslav Dmitrievich, Desyatova Maria Anatolievna, Korotkov Artem Vladimirovich, Makeev Oleg Germanovich

Department of Medical Biology and Genetics

Ural State Medical University

Yekaterinburg, Russia

### Abstract

**Introduction.** According to modern research, atopic dermatitis is a multifactorial disease, the pathogenesis of which is associated with both mutations in genes encoding structural proteins of the epidermis and epigenetic changes in gene expression, particularly a decrease in the expression of the *IFN-gamma* gene. Conventional methods of treating skin lesions in atopic dermatitis allow for remission, but not complete cure. **The aim of the study** is to develop an effective method of immunotherapy for atopic dermatitis, minimizing side effects. **Material and methods.** Preparation of exosomes from multipotent mesenchymal stromal cells of rats transfected with a plasmid vector carrying the *IFN-gamma* gene as a useful one. A suspension of exosomes was applied to the damaged surface of the skin of rats on a model of atopic dermatitis. **Results.** After 9 days, normalization of the structure of the damaged skin areas was observed. Follow-up did not reveal an exacerbation of the disease in experimental animals for 2 months. **Conclusion.** The use of genetically modified exosomes for the treatment of damaged skin surface makes it possible to consider this method as promising for the external therapy of atopic dermatitis.

**Keywords:** atopic dermatitis, epidemiology, genetics, epigenetics.

## ВВЕДЕНИЕ

Атопический дерматит (АтД) является основным хроническим часто рецидивирующим воспалительным заболеванием кожи. Заболевание сопровождается зудом и экзематозными поражениями кожи [1]. В последнее время повсеместно наблюдается быстрый рост

заболеваемостью данной патологией, что выводит ее на первое место среди серьезных проблем общественного здравоохранения во всем мире [2].

Патогенез АД до конца не изучен. Важными факторами, определяющими развитие заболевания, являются генетические нарушения, эпигенетические перестройки в ответ на воздействие факторов окружающей среды и дисбактериоз кожных покровов. Возникающая в результате их действия дисфункция иммунной системы, по-видимому, играет определяющую роль в развитии АД.

Возникновение и прогрессирование заболевания связано с увеличением количества Т-хелперных лимфоцитов второго типа (Th2) и базофилов с подавлением активности Т-хелперных лимфоцитов первого типа (Th1) [3].

Неэффективность и побочные эффекты ограничивают применение существующей терапии АД. Поэтому в последнее время разрабатываются новые методы лечения со сниженными побочными эффектами [4]. Применение разработанных нами ранее экзосом с повышенным содержанием трансмембранной формы белка Klotho оказывает фенотипически значимый эффект. Однако 3-х кратной аппликации данных экзосом недостаточно для предотвращения обострений, поскольку активированный сигнальный путь Th2 способный к самоподдержанию реактивности, что и обеспечивает продолжительность заболевания.

В настоящее время установлено, что недостаток продукции IFN-gamma у пациентов, страдающих АД, играет важную роль в развитии заболевания [5].

Показано, что системное применение IFN-gamma у пациентов, страдающих АД, приводит к снижению клинических проявлений заболевания. Однако, системное применение IFN-gamma сопровождается риском развития иммунодефицитных заболеваний и онкопатологии [6]. Принципиально важной задачей с позиции терапии атопического дерматита является доставка IFN-gamma непосредственно в жизнеспособные клетки в очаге поражения. В качестве такового пути таргентной доставки могут являться экзосомы.

**Цель исследования** – разработать эффективный метод иммунотерапии атопического дерматита, с минимизацией побочных эффектов.

#### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки в процессе культивирования трансфицировали плазмидными векторами, обеспечивающими внедряемую экспрессию гена *IFN-gamma* (Addgene Plasmid #10954), с использованием Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) для трансфекции согласно протоколу производителя. Эффективность трансфекции оценивали по количеству живых клеток в среде, содержащей 1 мкг/мл пуромицина (Sigma).

Спустя четыре пассажа после получения резистентной к пуромицину клеточной культуры, клетки в ходе культивирования, секретируют в культуральную среду экзосомы, содержащие белок IFN-gamma и иные биологически активные вещества.

С целью получения экзосом применяли метод ступенчатого центрифугирования в три этапа (600g, 60 мин. / 15000–17000 g, 220 мин. / 100000 g, 300 мин.). Полученный осадок ресуспендировали до 1/10 от его исходного объема в PEG буфере с дополнительным концентрированием раствора экзосом путем центрифугирования при 100000g в течение 120 минут. Супернатант стерилизовали фильтрованием на нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 220 нм.

Количественный подсчет плазмидной ДНК (пДНК) проводили на спектрофотометре (BIO-RAD) при длине волны 260 нм. Качественный анализ проводили по соотношению  $OD_{260}/OD_{280}$ . Образцы считали пригодными при  $OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \pm 0.1$ . Копийность полученных растворов пДНК определяли по формуле: (количество ДНК (нг)  $\times 6,022 \times 10^{23}$ ) / (длина плазмиды (п.о.)  $\times 1 \times 10^9 \times 650$ ).

Для получения клеточных культур были использованы эксплантаты кожи хвостовой области крыс. Материал в виде образцов, взятых методом панч-биопсии, забирали в асептических условиях.

После забора образцы помещали в стерильные одноразовые полипропиленовые пробирки или стаканчики, содержащие от 5 до 50 мл смеси питательной среды DMEM/F-

12, в соотношении 1:1, с добавлением культуральных антибиотиков пенициллина, стрептомицина и амфотерицина-В (SigmaAldrich, США). При температуре +4°C пробы доставляли в лабораторию не более чем в течение 4 часов. Полученные образцы ткани промывали в фосфатном буферном растворе PBS (Биолот, Россия) для удаления форменных элементов крови и помещали в свежую питательную среду DMEM/F-12 с 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) в культуральные флаконы с площадью посеваемой поверхности 25 см<sup>2</sup> (Orange, Бельгия).

Клетки культивировали в течение 48 часов при 37°C, 95% влажности и 5% содержании углекислого газа. По истечении двухсуточного срока наблюдения, флаконы подвергали тщательной оценке признаков возможной микроорганизменной контаминации. При отсутствии макро- и микроскопических признаков тех или иных инфекционных агентов, в первичную культуру добавляли коллагеназу (Биолот, Россия) в концентрации 200 ед/мл. После достижения полной химической деструкции ткани (в течение 24-48 часов), первичные культуры клеток отмывали от фермента путем центрифугирования при 200g с последующим ресуспендированием клеточного осадка в свежей культуральной среде. Гомогенизированную клеточную суспензию переносили в новые малые культуральные флаконы.

Трансфекцию клеток выполняли липосомальным методом с использованием комплекса поликатионных липидов Lipofectamin 2000 (Sigma Aldrich, США), согласно протоколу производителя. В качестве контрольной группы использовали так называемый ген «домашнего хозяйства» - *ABL 1* (abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1).

Исследование продемонстрировало, что эффективность амплификации фрагментов *IFN-gamma* и *ABL1* была соизмеримой и составила 91 и 99% соответственно (относительная экспрессия в контрольной группе составила в среднем в 13,55 раза меньшее значение, чем в опытной группе ( $p < 0,001$ )).

Концентрация белка *IFN-gamma* в клеточных лизатах контрольной группы клеток составила  $74,22 \pm 6,73$  и  $93,03 \pm 6,65$  в экспериментальной группе (пг белка *IFN-gamma*/мкг общего белка). Выявленные различия также являются статистически достоверными,  $p < 0,05$

В культуральной среде концентрация белка *IFN-gamma* в контроле составила  $7,82 \pm 2,11$  пг/мл по сравнению с опытом:  $115,1 \pm 13,24$  пг/мл. Следовательно, трансфекция клеток плазмидой, несущей ген *IFN-gamma* сама по себе способствовала увеличению количества белка *IFN-gamma* в культуральной среде генномодифицированных ММСК более чем в 14 раз ( $p < 0,001$ ).

В исследовании периферической крови крыс, которую забирали после отсечения кончика хвоста, применяли наборы фирмы Cusabio Biotech (China) в соответствии с протоколом производителя. Результаты анализировали на вертикальном спектрофотометре Multi Scan Go, Thermo Fisher Scientific (USA) при 450 нм по входящей в набор реагентов калибровочной кривой. Определяли IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IgE, IgA, IFNg, TNF $\alpha$

Статистический анализ проведен в программе R-Studio (Version 1.1.419 – © 2009-2018 R-Studio, Inc.). Нормальность распределения значений в группе определяли тестом Шапиро-Уилка. Для определения статистически значимых различий количественных параметров двух групп использовался Т-критерий Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни. Величина параметра  $p < 0,05$  принималась как статистически значимая. Расчет уровня экспрессии проводили при коэффициентах детерминации ( $R^2$ )  $\geq 0,98$

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Испытание подхода проводилось на модели атопического дерматита, основанной на нокауте гена филаггрина у лабораторных крыс. По сравнению с здоровыми животными, у крыс с моделью АД наблюдалось статистически значимое снижение секреции *IFN-gamma*.

Полученные экзосомы в виде взвеси в физиологическом растворе наносили на поврежденную поверхность кожи из расчета 1,0 мкг белка на см<sup>2</sup> при влажном ведении.

В результате однократного нанесения экзосом, полученных от ММСК с гиперэкспрессией гена *IFN-gamma* на пораженную поверхность, концентрация белка *IFN-gamma* в крови лабораторных животных возросла почти в 3 раза (2,99), и статистически не

отличалась от показателей контрольной группы здоровых животных. Уровни интерлейкинов, фактора некроза опухолей и исследованных иммуноглобулинов практически достигли исходных величин. Спустя 9 суток наблюдалась нормализация участков поврежденной кожи. Последующие наблюдения не выявило обострения заболевания у подопытных крыс в течение 2 месяцев.

### **ОБСУЖДЕНИЕ**

Таким образом, использование экзосом, полученных из кондиционной среды генно-модифицированных плазмидой с трансмембранным геном *IFN-gamma* культивируемых мультипотентных мезинхимальных стромальных клеток позволяет снизить сроки лечения атопического дерматита с 3–4 недель до 8–9 суток и повысить качество терапии в сравнении с существующими способами.

### **ВЫВОДЫ**

1. Предложен подход к иммунотерапии атопического дерматита, в основе которого - нанесение экзосом от ММСК трансфицированных плазмидным геном *IFN-gamma*, на область кожного дефекта.

2. В условиях моделирования атопического дерматита, достигнута высокая результативность терапии с сокращением сроков лечения (до 8–9 суток).

3. Требуется проведение исследования по верификации метода, в качестве стандартной терапии атопического дерматита.

### **СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Safety of tralokinumab in adult patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: pooled analysis of five randomized, double-blind, placebo-controlled phase II and phase III trials / E. L. Simpson, J. F. Merola, J. I. Silverberg [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2022. – Vol. 187, № 6. – P. 888-899.
2. Mostafa, N. Improving Psychological Health Outcomes in Children with Atopic Dermatitis / M. Mostafa, S. D. Smith // *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. – 2023. – Vol. 16. – P. 2821-2827.
3. In vitro evolution of allergy vaccine candidates, with maintained structure, but reduced B cell and T cell activation capacity / O. B. Nilsson, J. Adedoyin, C. Rhyner [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 9. – P. 24558.
4. Williams, D. M. Clinical Pharmacology of Corticosteroids / D. M. Williams // *Respiratory care*. – 2018. – Vol. 63, № 6. – P. 655-670.
5. Kimura, M. IFN- $\gamma$  plays a dominant role in upregulation of Candida-specific IgE synthesis in patients with atopic dermatitis / M. Kimura, S. Tsuruta, T. Yoshida // *International archives of allergy and immunology*. – 2000. – Vol. 122, № 3. – P. 195-199.
6. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion / F. Castro, A. P. Cardoso, R. M. Gonçalves [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 337-341.

### **Сведения об авторах**

В.Д. Боковой – студент медико-профилактического факультета

М.А. Десятова - младший научный сотрудник, ассистент кафедры

А.В. Коротков – старший научный сотрудник, доцент кафедры

О.Г. Макеев - профессор кафедры, доктор медицинских наук

### **Information about the authors**

V.D. Bokovoy - Student of the Faculty of Medicine and Prevention

M.A. Desyatova – Junior Researcher, Department Assistant

A.V. Korotkov – Senior Researcher, Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor

O.G. Makeev – Chief Researcher, Doctor of Sciences (Medicine), Professor

УДК 577.1

## **АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ПЕПТИДОВ В РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗАТА ФАБРИЦИЕВОЙ СУМКИ, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ПРОЛИФЕЛИРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Борзунова Татьяна Игоревна<sup>1</sup>, Фертикова Наталья Сергеевна<sup>1</sup>, Кольберг Наталья Александровна<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра биохимии

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет» Министерства науки и высшего образования РФ

Екатеринбург, Россия