

Елистратова И.В.¹, Морозов С.Г.², Захарова И.А.²

ЭКСПРЕССИЯ ПРОТЕАЗОАКТИВИРОВАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ PAR-2 НА НЕЙТРОФИЛАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И ИХ СВЯЗЬ С БЕЛКАМИ ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP90

¹ФГКУ Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России, 143915, г. Балашиха, Московская область, Россия; ²ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия.

Цель работы – исследование уровня экспрессии протеазоактивированных рецепторов PAR-2 на плазматической мембране нейтрофилов периферической крови больных atopическим дерматитом в зависимости от тяжести течения заболевания, определенной по индексу SCORAD. В период обострения atopического дерматита при минимальной активности процесса одновременно определяли экспрессию белков теплового шока HSP90. Популяцию нейтрофилов периферической крови получали на градиенте плотности Перколл. Клетки окрашивали антителами к рецепторам PAR-2 и белкам теплового шока HSP90 и анализировали на проточном цитометре. Показано, что рецепторы PAR-2 присутствуют на плазматической мембране нейтрофилов периферической крови больных atopическим дерматитом. Число клеток, экспрессирующих PAR-2 на мембране, увеличивается в зависимости от тяжести течения заболевания. Интенсивность флуоресценции внутриклеточных PAR-2 нейтрофилов также повышается по мере увеличения площади поражения кожи и усиления тяжести течения процесса. Установлено, что на ранних сроках обострения atopического дерматита одновременно повышается экспрессия рецепторов PAR-2 и белков теплового шока HSP90. Экспрессия рецепторов PAR-2 повышена на плазматической мембране и в цитозоле нейтрофилов больных atopическим дерматитом по сравнению со здоровыми донорами. Уровень экспрессии PAR-2 и процент PAR-2-положительных нейтрофилов возрастает по мере усиления тяжести течения atopического дерматита. Установлено одновременное повышение экспрессии PAR-2 и HSP90 при обострении atopического дерматита.

Ключевые слова: atopический дерматит; нейтрофилы; плазматическая мембрана; рецепторы PAR-2; белки теплового шока HSP90.

Для цитирования: Елистратова И.В., Морозов С.Г., Захарова И.А. Экспрессия протеазоактивированных рецепторов PAR-2 на нейтрофилах периферической крови больных atopическим дерматитом и их связь с белками теплового шока HSP90. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2016; 19(1): 53-59. DOI 10.18821/1560-9588-2016-19-1-53-58

Elistratova I.V.¹, Morozov S.G.² Zakharova I.A.²

EXPRESSION OF PROTEASE-ACTIVATED RECEPTOR PAR-2 ON NEUTROPHILS PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS AND THEIR RELATION WITH HEAT SHOCK PROTEINS HSP90

¹Main Military Clinical Hospital of Internal Troops of the Ministry of Internal Affairs of Russia, 143915, Balashiha, Russia; ²Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Russia

Expression of protease-activated receptors PAR-2 has been investigated on neutrophils isolated from atopic dermatitis patient peripheral blood and has been analyzed with index SCORAD. The simultaneous expression of both, PAR-2 receptors and heat shock protein 90 (HSP90) was measured on neutrophils at the first week of acute phase of atopic dermatitis.

Methods. Peripheral blood neutrophils were isolated on the Percoll gradient. Cells were stained with antibodies to PAR-2 receptor and HSP90 followed by the flow cytometry.

Results. The PAR-2 receptors have been shown to be expressed on the plasma membrane of neutrophils obtained from patients with atopic dermatitis. The percentage of PAR-2+ neutrophils was positive correlated with diseases severity. HSP90 was found to be elevated simultaneously with PAR-2 receptors on neutrophils at the acute phase of atopic relapse.

Conclusions. Atopic dermatitis patients have the higher level of PAR-2 receptor expression compared with healthy donors. Percentage of PAR-2+ neutrophils is elevated with the increasing of disease severity. Simultaneous elevation of PAR-2 receptors and HSP90 was found at the first week of acute atopic dermatitis.

Key words: atopic dermatitis; neutrophils; PAR-2 receptors; plasma membrane; heat shock proteins 90; HSP90.

For citation: Elistratova I.V., Morozov S.G. Zakharova I.A. Expression protease-inhibitors receptor PAR-2 on neutrophils peripheral blood of patients with atopic dermatitis and their relation with heat shock proteins HSP90. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii Zhurnal Kozhnykh i Venericheskikh Boleznei)*. 2016; 19(1): 53-58. (in Russian). DOI 10.18821/1560-9588-2016-19-1-53-58

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 11 November 2015

Accepted 20 January 2016

Протеазоактивированные рецепторы (PAR) играют многофункциональную роль в патогенезе атопического дерматита (АД) [1]. В настоящее время открыты четыре рецептора PAR (PAR-1, -2, -3, -4), которые присутствуют на многих типах клеток, включая клетки кожи и периферической нервной системы. Рецепторы PAR-2 принимают непосредственное участие в механизме развития зуда при АД [2, 3].

У человека рецептор PAR-2 (М 44 кД) состоит из 397 аминокислотных остатков (а.к.о.), включает экстраклеточный N-концевой домен (75 а.к.о.), трансмембранный домен (155 а.к.о.), семь ленточных последовательностей, соединенных тремя экстраклеточными и тремя внутриклеточными петлями (по 117 а.к.о.) с малой петлей цитозольного C-концевого домена (50 а.к.о.). При протеолитическом расщеплении N-концевого домена протеазами образуется так называемый «привязанный» лиганд (tethered ligand), который вновь прикрепляется к консервативному региону и, таким образом, активирует рецептор PAR-2 [4].

Рецепторы PAR сопряжены с G-протеинами, могут быть активированы протеазами различных каталитических классов: трипсинами, тканевыми калликреинами (KLK2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK14), факторами свертывания крови (FVIIa, FXa), металлопротеазами, трансмембранной протеазой эпителизином и бактериальными протеазами, а также синтетическими пептидами (H-Ser-Leu-Ile-Gly-Lys-Val-NH₂) [5]. В сыворотке крови больных АД в 4 раза повышена концентрация триптазы – эндогенного агониста рецептора PAR-2. Природным активатором рецептора PAR-2 является матриптаза тучных клеток, поэтому роль тучных клеток в молекулярных нарушениях и в развитии зуда при АД является фундаментальной. Эластаза нейтрофилов активирует PAR-2 рецептор, что стимулирует продукцию интерлейкина (IL)-13 макрофагами и Th2-лимфоцитами [6]. Активация PAR-2 сопряжена с IgE-индуцированным ответом на аллергены клеца домашней пыли в модельной системе АД у мышей [7]. Повышенная протеолитическая активность за счет протеаз микроорганизмов, а также нарушения функции природных внутриклеточных ингибиторов протеаз, способствуют постоянной активации PAR-2 и сопряженных сигнальных путей цитокинов, что поддерживает воспалительный процесс в коже и интенсивность зуда [8, 9].

Рецепторы PAR экспрессируются на мембране клеток практически всех органов и систем, регулируют многочисленные физиологические функции, в том числе, сокращение гладкомышечных клеток, чувствительность к боли, высвобождение липидных медиаторов, цитокинов, нейропептидов. Активация PAR связана с клиническими проявлениями в виде воспаления, вазодилатации, отека, боли [10, 11].

У больных АД повышена экспрессия рецепторов PAR-2 на первичных афферентных нервных волокнах. На пептидэргических нейронах TRP каналы функционально связаны с PAR-2, в частности, экспрессия PAR-2 коррелирует с экспрессией TRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1) [12]. Экспрессия PAR-2 повышена на кератиноцитах,

эндотелиальных и гладкомышечных клетках, а также в клетках иммунной системы. При активации PAR-2 повышается высвобождение IL-6 и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) из кератиноцитов у больных АД [13, 14].

Гранулоциты – первые клетки, которые мигрируют в очаг воспаления. Помимо фагоцитарных функций, синтеза антимикробных пептидов, нейтрофилы генерируют метаболиты кислорода и протеолитические ферменты. Показано присутствие рецепторов PAR-2 на нейтрофилах. Рецепторы PAR-2 стимулируют секрецию лактоферина и IL-8 нейтрофилами, модулирует экспрессию молекул адгезии, стимулирует миграцию нейтрофилов. Показано, что циркулирующие нейтрофилы экспрессируют исключительно PAR-2 и PAR-3, в покоящихся нейтрофилах полностью отсутствуют PAR-1 и PAR-4, при этом функционально активными являются только рецепторы PAR-2, весь пул предшественников которых локализуется во внутриклеточных гранулах, на поверхности клеток экспрессия PAR не регистрируется без специальной активации. Активация рецепторов Fcγ обуславливает мобилизацию гранул к поверхности клетки и повышению экспрессии PAR-2 на мембране, причем независимо от транскрипции или синтеза белка. При стимуляции бактериями экспрессия PAR-2 на поверхности нейтрофилов повышается через 5 мин и достигает пика через 60 мин [15].

Несмотря на значительное число работ, посвященных изучению роли PAR-2 рецепторов в патогенезе АД, отсутствуют публикации, касающиеся экспрессии рецепторов PAR-2 на нейтрофилах при АД. Только в одной обзорной работе [3] косвенно затронута эта тема. Учитывая патогенетическую значимость таких исследований, была поставлена цель определить уровень экспрессии рецепторов PAR-2 на нейтрофилах в зависимости от тяжести течения заболевания. Поскольку очевидно наличие связи между стрессом и уровнем экспрессии рецепторов PAR-2, также параллельно определяли экспрессию белков теплового шока HSP90 и рецептора PAR-2 на клетках крови больных АД в начальный период обострения.

Материал и методы

Обследованы 164 мужчин, больных АД в возрасте от 18 до 38 лет. Все пациенты подписывали форму информированного согласия для участия в исследовании. Критериями исключения пациентов из исследования: наличие острых вирусных или бактериальных инфекций; онкологические, соматические заболевания; системные аллергические или воспалительные заболевания; беременность, психомоторные расстройства.

Тяжесть течения АД оценивали по индексу SCORAD (менее 30 баллов – легкое течение, от 30 до 60 баллов – среднетяжелое, более 60 баллов – тяжелое).

У каждого больного собирали аллергоанамнез, при необходимости ставили кожные пробы на аллергены. Всем пациентам проводили лабораторные исследования, включающие общий анализ крови и мочи, определение уровня общего и специфического IgE, а также иммунный статус.

Здоровые доноры (21 мужчина) в возрасте от 18 до 38 лет не курили, не принимали лекарственные препараты, не имели

Для корреспонденции:

Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе и заведующий лабораторией Общей и перинатальной нейроиimmunопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия. E-mail: biopharm@list.ru.

For correspondence:

Morozov Sergey G., Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, deputy director for scientific work of Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Russian Federation. E-mail: biopharm@list.ru.

Information about authors:

Elisratova I.V., <http://orcid.org/0000-0002-0393-4947>.

Morozov S.G., <http://orcid.org/0000-0001-5822-5729>.

Zakharova I.A., <http://orcid.org/0000-0002-5648-4214>.

в анамнезе аллергических и хронических воспалительных заболеваний, не переносили острых воспалительных заболеваний в последние 2 мес и не употребляли алкоголь в течение 2 сут до обследования. Собирался семейный анамнез доноров для исключения наличия аллергических заболеваний у родственников. При осмотре кожный покров у всех доноров был свободен от высыпаний. Доноры подписывали информированное согласие, идентичное информированному согласию пациентов.

Работу с кровью людей проводили согласно международным правилам работы с биологическим материалом. Кровь брали натошак из локтевой вены в вакутейнер с ЭДТА. Исследование клеток периферической крови проводили на гематологическом анализаторе LH 700 ("Beckman Coulter Inc.", США), данные предоставлялись как число популяций клеток в 1 мл крови. Для получения лейкоцитарной взвеси кровь переносили в центрифужные пробирки и добавляли по 15 мл лизирующей жидкости (коммерческий препарат фирмы "Becton Dickinson" для удаления эритроцитов). Инкубировали 5 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали 10 мин при 200g. Супернатант удаляли, осадок встряхивали, добавляли 199 среду и отмывали суспензию клеток центрифугированием. Для получения мононуклеаров крови осадок разводили фосфатным буфером (PBS, "Sigma") 1:1 и по 2 мл наслаивали на градиент плотности фиколла-верографина 1,078 г/л. Градиенты центрифугировали 20 мин при 2000 g. Мононуклеары отбирали из интерфазы, отмывали средой 199.

Чистую популяцию нейтрофилов периферической крови выделяли на градиенте плотности Перколла (Percoll, "Sigma-Aldrich", США). Для приготовления градиента в коническую центрифужную пробирку объемом 50 мл последовательно наслаивали по 3 мл: изотонического раствора Перколла (90%), затем растворы с плотностью 81%, 70%, 60% и 55%. На готовые градиенты наслаивали 5 мл крови с ЭДТА, полученной в день исследования утром натошак, разведенную 1:1 стерильным физиологическим раствором. Градиенты центрифугировали 20 мин при температуре 22 °C при ускорении 500g.

После центрифугирования на дне пробирки концентрировались эритроциты, нейтрофилы выделялись в интерфазе между слоями Перколла плотностью 81% и 70%; лимфоциты – между 70% и 60% Перколла, на поверхности первого слоя градиента выделялись тромбоциты. Каждую популяцию клеток отбирали пастеркой, переносили в центрифужные пробирки с однократным PBS, отмывали дважды центрифугированием 10 мин при температуре 22 °C и ускорении 200g. Выход нейтрофилов из 1 мл крови составлял $1,5\text{--}5,2 \times 10^6$ клеток. Контроль выделения клеток проводили морфологически по окраске гематоксилином и эозином (анализом в световом микроскопе), а также методом проточной цитометрии.

Клетки отмывали в PBS, доводили до концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток в 50 мкл PBS, добавляли 2 мкл антител. Для окраски на рецепторы PAR-2 использованы антитела N19 (sc-8206, козы поликлональные, "Sant Cruz Biotechnology", США), к ним вторичные антитела анти-козы, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Мышинные моноклональные антитела H90-10 (ab58950, "Abcam") к белкам теплового шока HSP90, к ним вторичные антитела анти-мышинные, меченные фикоэритрином (PE) ("Abcam"). Клетки инкубировали 50 мин при температуре 4 °C, затем отмывали центрифугированием при 400g, осаждали, добавляли 50 мкл холодного 3% BSA на PBS и 10 мкл вторичных антител. Клетки тщательно перемешивали и инкубировали 40 мин при температуре 4 °C, затем отмывали центрифугированием при 400g, осадок встряхивали и фиксировали 2% параформальдегидом на PBS [www.abcam.com/protocols].

Клетки отмывали в PBS, добавляли 100 мкл 1% параформальдегида на PBS, оставляли на 10 мин, затем добавляли 100 мкл 0,1% сапонина на PBS, инкубировали еще 15 мин при комнатной температуре. Клетки трижды отмывали в PBS, доводили до концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток в 50 мкл, добавляли 2 мкл соответствующих mAb, и инкубировали в течение 50 мин при температуре 4 °C. Далее клетки отмывали и докрашивали вторичными антителами. Суспензию клеток в объеме 100 мкл 1% параформальдегида на PBS хранили в темноте при температуре 4 °C.

Флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитометре FACSCalibur по программе SimulSet. Флуоресценцию FITC измеряли на канале FL1-A при длине волны 530 ± 5 нм. Флуоресценцию PE измеряли на канале FL2-A при длине волны

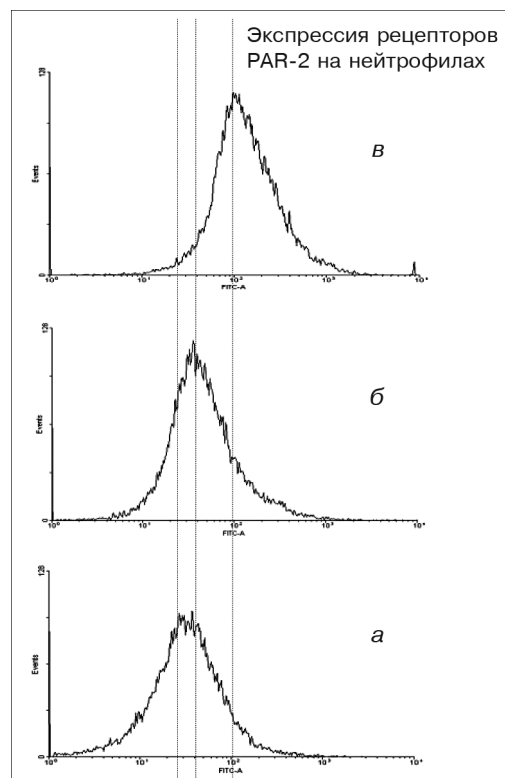


Рис. 1. Примеры гистограмм, соответствующих флюоресценции рецептора PAR-2 на нейтрофилах периферической крови больных atopическим дерматитом.

а – гистограмма экспрессии рецепторов PAR-2 на плазматической мембране нейтрофилов больных atopическим дерматитом с легким течением; б – гистограмма экспрессии рецепторов PAR-2 на плазматической мембране нейтрофилов больных atopическим дерматитом средней тяжести; в – пример экспрессии рецепторов PAR-2 на мембране нейтрофилов больного с тяжелым течением atopического дерматита.

605 ± 5 нм. Интенсивность флюоресценции приводили к внутреннему стандарту. В качестве контроля измеряли флюоресценцию изотипспецифичных $F(ab')_2$ фрагментов иммуноглобулинов. В каждом образце анализировали 10 тыс. событий на гейт каждой из популяций клеток (лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов).

Данные анализировали по программе ANOVA и представлены как $M \pm m$. Сравнение между двумя группами проводили по *t*-критерию Стьюдента, статистический анализ нескольких групп проводили с помощью непараметрического анализа методом множественного сравнения по критерию Ньюмена–Кейлса, $p \leq 0,05$ считали как статистически значимое различие между группами.

Результаты

Согласно данным литературы [12] у молодых здоровых людей рецепторы PAR-2 на нейтрофилах локализируются не на поверхности клеток, а находятся в гранулах и появляются на поверхности только в результате активации клеток.

Мы считали отсутствие экспрессии PAR-2 на плазматической мембране клеток как вариант нормы. Для подтверждения этой установки была определена экспрессия рецепторов PAR-2 на поверхности нейтрофилов здоровых доноров. Однако у 2 юношей 18 лет экспрессия PAR-2 на нейтрофилах была положительной (на 32% и 36% клеток соответственно при интенсивности флюоресценции 28 и 31 усл.ед.) [12]. При бактериологическом анализе смывов кожного покрова у этих лиц обнаружена контаминация золотистым стафилококком. Эти лица были исключены из исследования: дальнейшую работу проводили с 34 донорами.

Таблица 1
Экспрессия рецепторов PAR-2 на плазматической мембране нейтрофилов при atopическом дерматите в зависимости от тяжести течения

Показатель	Классификация по индексу SCORAD			
	легкое течение менее 20 (n = 55)	средней тяжести 20–40 (n = 81)	тяжелое течение	
			40–60 (n = 22)	более 60 (n = 6)
PAR-2 ⁺ -клеток, %	51 ± 12	71 ± 5	78 ± 4	82 ± 1
Интенсивность флюоресценции PAR-2, усл.ед.	29 ± 5	44 ± 7	121 ± 8	139 ± 12

На первом этапе работы определяли экспрессию рецепторов на поверхности непермеабилizованных клеток. У всех больных АД на плазматической мембране клеток крови присутствовали рецепторы PAR-2. Пример данных проточной цитометрии по интенсивности флюоресценции клеток, окрашенных антителами к PAR-2, приведен на **рис. 1**. По мере усиления тяжести течения повышается число клеток, экспрессирующих рецепторы PAR-2 на мембране, а также плотность этих рецепторов, на что указывает повышение интенсивности флюоресценции. При анализе данных, полученных в обследованной группе больных, было установлено, что уровень экспрессии рецепторов PAR-2 на плазматической мембране нейтрофилов определяется степенью тяжести заболевания (**табл. 1**).

Статистически значимое различие получено между группами больных с легким и более тяжелым течением, как по проценту нейтрофилов, экспрессирующих PAR-2 на поверхности плазматической мембраны, так и по интенсивности флюоресценции PAR-2 ($p < 0,05$). Между группами больных с легким и тяжелым течением АД достоверное различие было более значимо ($p < 0,001$). Следующим этапом анализа было определение экспрессии рецепторов PAR-2 в зависимости от площади поражения тела (**табл. 2**).

Получено статистически значимое различие по проценту PAR-2-положительных нейтрофилов только для группы с минимальной площадью поражения и распространенным или диффузным поражением кожи ($p < 0,05$). По интенсивности флюоресценции (относительной плотности рецепторов PAR-2 на клетке), статистически значимые различия получены между группами с ограниченным и распространенным поражением ($p < 0,05$).

Среди больных АД с нормальными значениями IgE в сыворотке крови колебания уровня экспрессии рецепторов PAR-2 были значительными (от 18 до 64%, в среднем $45 \pm 14\%$). Разброс данных при высоком уровне IgE в сыворотке крови был также выраженным (от 52 до 85%, в среднем $71 \pm 11\%$), но показатели экспрессии PAR-2 для IgE-положительных больных статистически достоверно выше ($p < 0,05$).

Для установления внутриклеточного уровня рецепторов PAR-2 проведена окраска фиксированных и пер-

меабилizованных клеток антителами N19 к рецепторам PAR-2. На **рис. 2** приведены примеры интенсивности внутриклеточной флюоресценции при окраске антителами к рецепторам PAR-2.

Установлено повышение экспрессии внутриклеточного PAR-2 при увеличении тяжести течения заболевания и распространенности процесса. При измерении интенсивности внутриклеточной флюоресценции рецепторов PAR-2, экспрессированных на нейтрофилах, было установлено, что при легкой степени тяжести АД (менее 20 по индексу SCORAD) ($n = 55$) mean флюоресценции (т.е. интенсивность флюоресценции), составляла 135 ± 4 условные единицы (усл.ед.), что несколько повышено по сравнению с показателями доноров (126 ± 4 усл.ед.), но статистически недостоверно. При АД средней тяжести (20–40 по SCORAD) ($n = 81$) mean флюоресценции 148 ± 7 усл.ед. ($p < 0,05$ по сравнению с донорами). При тяжелом течении АД (40–60 по SCORAD) ($n = 22$) mean флюоресценции рецепторов PAR-2 была 165 ± 6 усл.ед. ($p < 0,05$ по сравнению с донорами, а также по сравнению с группой больных легкой степенью АД). У 6 больных с индексом SCORAD более 60 mean флюоресценции рецепторов PAR-2 составляла 172 ± 9 усл.ед., что также достоверно выше, чем у доноров и больных АД легкой степенью ($p < 0,05$).

При анализе интенсивности флюоресценции рецепторов PAR-2 с зависимости от площади поражения кожи при ограничено-локализованной распространенности процесса, когда площадь поражения кожи не превышала 1% (площадь ладони) ($n = 18$) mean флюоресценции составляла 137 ± 6 усл.ед., что не являлось статистически достоверным отличием от показателей доноров. При ограниченно-локализованном АД ($n = 41$) mean флюоресценции была 144 ± 7 усл.ед. ($p < 0,05$ по сравнению с донорами). При распространенном процессе ($n = 77$) mean флюоресценции 161 ± 9 усл.ед. ($p < 0,05$ по сравнению с донорами), при диффузном поражении кожи ($n = 28$) mean флюоресценции составляла 169 ± 12 усл.ед. ($p < 0,05$ по сравнению с донорами и больными с ограниченно-локализованным АД).

Из группы с локализованным типом поражения (не более 1% площади тела) была выделена группа пациентов ($n = 18$) с давностью обострения заболевания не более одной недели (!). В этой группе одновременно с исследованием экспрессии рецепторов PAR-2 была определена экспрессия белков теплового шока HSP90 с целью определения возможной роли HSP90 в индукции рецепторов PAR-2 на нейтрофилах.

Идея этого исследования заключалась в том, что белки теплового шока HSP90 могут регулировать экспрессию PAR-2 за счет перекрестного связывания рецептора CD16, который необходим для активации PAR-2 бактериальными протеазами. Рецепторы для Fc-фрагментов IgG (FcγR) I–III: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), присутствуют на клетках крови. HSP90 – компонент многомерного рецепторного комплекса на плазматической мембране нейтрофилов, включающего рецепторы хемокинов, инте-

Таблица 2
Экспрессия рецепторов PAR-2 на поверхности нейтрофилов периферической крови у больных atopическим дерматитом в зависимости от площади поражения

Показатель	Классификация типов распространенности процесса (по согласительному протоколу 2002 г.)			
	ограниченно локализованный, площадь поражения менее 1% (n = 18)	ограниченно локализованный (n = 41)	распространенный (n = 77)	диффузный (n = 28)
PAR-2 ⁺ -клеток, %	31 ± 7	59 ± 7	77 ± 8	78 ± 1%
Интенсивность флюоресценции PAR-2, усл.ед.	23 ± 5	58 ± 7	115 ± 9	126 ± 12 усл.ед.

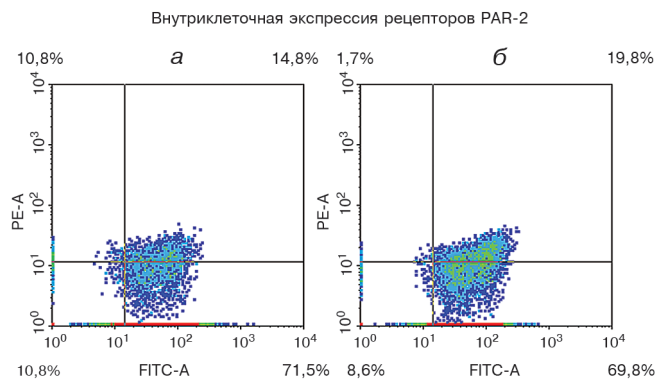


Рис. 2. Примеры интенсивности флюоресценции фиксированных и пермеабилizованных нейтрофилов периферической крови, окрашенных антителами N19 к рецепторам PAR-2.

a – флюоресценция внутриклеточных рецепторов PAR-2 в нейтрофилах больных atopическим дерматитом с легким течением; *б* – флюоресценция внутриклеточных рецепторов PAR-2 в нейтрофилах больных atopическим дерматитом средней тяжести.

гринов, TLR, CD11b и CD16. Одна из функций HSP90 – перемещение и экстернализация рецептора CD16 [16].

Для данной выборки лиц с минимальными клиническими проявлениями АД нам удалось установить определенную закономерность в повышении экспрессии рецепторов PAR-2 на нейтрофилах одновременно с повышением экспрессии белков теплового шока HSP90. При минимальном значении экспрессии рецепторов PAR-2 на плазматической мембране часть клеток содержала крайне низкое количество белка HSP90 (рис. 3, *a*). По мере усиления тяжести течения у больных АД установлено одновременное повышение экспрессии рецепторов PAR-2 и белков теплового шока HSP90 (рис. 3, *б*). Можно сделать вывод об определенном влиянии индуцированного под влиянием стресса белка теплового шока HSP90 на повышение экспрессии рецепторов PAR-2 на нейтрофилах.

Обсуждение

Проведен анализ экспрессии рецепторов PAR-2 (как поверхностных, так и внутриклеточных) на нейтрофилах периферической крови больных АД. Показано, что по мере усиления тяжести течения заболевания и увеличения площади поражения одновременно повышается процент клеток, экспрессирующих PAR-2 на плазматической мембране. Учитывая многогранную роль рецепторов PAR-2 в регуляции воспалительного процесса можно говорить о функциональном значении повышения экспрессии рецепторов PAR-2 на нейтрофилах в патогенезе АД.

Наиболее значимые результаты работы касаются двойной окраски клеток на рецепторы PAR-2 и белки теплового шока HSP90. Белки теплового шока HSP90 регулируют стабильность, активность, внутриклеточный сортинг клиентских белков, вовлеченных в многочисленные внутриклеточные процессы. Мы впервые обнаружили, что в начальном периоде обострения АД повышается уровень экспрессии HSP90 и это повышение происходит одновременно с увеличением флюоресценции рецепторов PAR-2. Для HSP90 известно, что они работают и как транспортеры рецепторов, перемещая их из цитозоля или эндосомальных компартментов к плазматической мембране. Полученные нами данные указывают на определенную роль HSP90 в повышении экспрессии PAR-2, что показано впервые и имеет фундаментальное значение. Для изучения молекулярных механизмов этого явления мы планируем продолжение экспериментов и проведение дополнительных исследований.

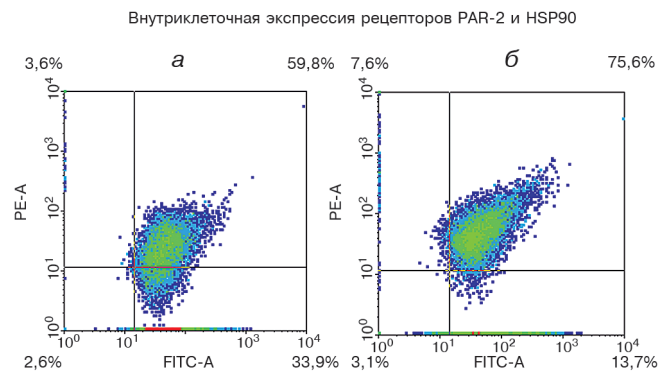


Рис. 3. Примеры интенсивности флюоресценции фиксированных и пермеабилizованных нейтрофилов периферической крови, одновременно окрашенных антителами N19 к рецепторам PAR-2 (FITC) и HSP90 (PE).

a – флюоресценция внутриклеточных рецепторов PAR-2 (окрашенных FITC) и белков теплового шока HSP90 (окрашенных фикоэритрином – PE) в нейтрофилах больных atopическим дерматитом; *б* – флюоресценция внутриклеточных рецепторов PAR-2 (окрашенных FITC) и белков теплового шока HSP90 (окрашенных PE) в нейтрофилах больных atopическим дерматитом средней тяжести.

Известно, что в норме PAR-2 не находится на поверхности нейтрофилов, и только после связывания Fcg-RIII (CD16) рецепторов бактериальными лигандами они перемещаются из цитозоля на плазматическую мембрану. Учитывая роль HSP90 не только как молекулярного шаперона, но и как транспортера некоторых рецепторов, вполне вероятно предположить, что стресс вызывает также повышение экспрессии PAR-2 на плазматической мембране клеток. Повышение экспрессии PAR-2 способствует развитию клинических проявлений АД.

Выводы

1. На плазматической мембране нейтрофилов больных АД повышена экспрессия рецепторов PAR-2 по сравнению со здоровыми донорами.
2. По мере усиления тяжести течения АД, увеличения площади поражения экспрессия рецепторов PAR-2 на плазматической мембране нейтрофилов также повышается.
3. В начале обострения процесса при минимальной площади поражении кожи на нейтрофилах периферической крови обнаружено одновременное повышение экспрессии рецепторов PAR-2 и белков теплового шока HSP90.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Lee S., Jeong S., Lee S. Protease and protease-activated receptor-2 signaling in the pathogenesis of atopic Dermatitis. *Yonsei. Med. J.* 2010; 51(6): 808–22.
2. Nakagawa H., Hiura A. Four possible itching pathways related to the TRPV1 channel, histamine, PAR-2 and serotonin. *Malays. J. Med. Sci.* 2013; 20(4): 5–12.
3. Kempkes C., Buddenkotte J., Cevikbas F., Buhl T., Steinhoff M. Role of PAR-2 in Neuroimmune Communication and Itch. *Frontiers in Neuroscience*: Carstens E., Akiyama T. editors; Itch: Mechanisms and Treatment. Boca Raton (FL): CRC Press; 2014. Chapter 11.
4. Yau M., Liu L., Fairlie D. Toward drug for protease-activated receptor 2 (PAR2). *J. Med. Chem.* 2013; 56(19): 7477–97.
5. Rothmeier A., Ruf W. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. *Semin. Immunopathol.* 2012; 34(1): 133–49.
6. Yamaguchi R., Yamamoto T., Sakamoto A., Ishimaru Y., Narahara S., Sugiuchi H., et al. Mechanism of interleukin-13 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophages via protease-activated receptor-2. *Blood Cells Mol. Dis.* 2015; 55(1): 21–6.
7. Post S., Heijink I., Petersen A., de Bruin H., van Oosterhout A., Nawijn M. Protease-activated receptor-2 activation contributes to house dust

- mite-induced IgE responses in mice. *PLOS One*. 2014; 9(3): e91206.
8. Zhu Z., Stricker R., Li R., Zündorf G., Reiser G. The intracellular carboxyl tail of the PAR-2 receptor controls intracellular signaling and cell death. *Cell Tissue Res*. 2015; 359(3): 817–27.
 9. Botham A., Guo X., Xiao Y., Morice A., Compton S., Sadofsky L. Palmitoylation of human proteinase-activated receptor-2 differentially regulates receptor-triggered ERK1/2 activation, calcium signalling and endocytosis. *Biochem. J*. 2011; 438(2): 359–67.
 10. Zhao P., Lieu T., Barlow N., Sostegni S., Haerteis S., Korbmayer C., et al. Neutrophil elastase activates protease-activated receptor-2 (PAR2) and transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) to cause inflammation and pain. *J Biol. Chem*. 2015; 290(22): 13875–87.
 11. Helyes Z., Sándor K., Borbély E., Tékus V., Pintér E., Elekes K., et al. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in protease-activated receptor-2-induced joint inflammation and nociception. *Eur. J. Pain*. 2010; 14(4): 351–8.
 12. Dai Y., Wang S., Tominaga M., Yamamoto S., Fukuoka T., Higashi T., et al. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Invest*. 2007; 117(7): 1979–87.
 13. Takei-Taniguchi R., Imai Y., Ishikawa C., Sakaguchi Y., Nakagawa N., Tsuda T., et al. Interleukin-17- and protease-activated receptor 2-mediated production of CXCL1 and CXCL8 modulated by cyclosporine A, vitamin D3 and glucocorticoids in human keratinocytes. *J. Dermatol*. 2012; 39(7): 625–31.
 14. Kim J., Kim do Y., Son H., Kim Y., Oh S. Protease-activated receptor-2 activates NQO-1 via Nrf2 stabilization in keratinocytes. *J. Dermatol. Sci*. 2014; 74(1): 48–55.
 15. St-Onge M., Lagarde S., Laflamme C., Rollet-Labelle E., Marois L., Naccache P., Pouliot M. Proteinase-activated receptor-2 up-regulation by Fcγ-receptor activation in human neutrophils. *FASEB J*. 2010; 24(6): 2116–25.
 16. Bzowska M., Hamczyk M., Skalniak A., Guzik K. Rapid decrease of CD16 (FcγRIII) expression on heat-shocked neutrophils and their recognition by macrophages. *J. Biomed. Biotechnol*. 2011; 2011: 284759.

Поступила 11.11.15
Принята к печати 20.01.16

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ДЕРМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.45.03:616.5-007.23-053.9

Кожина К.В.¹, Волкова Е.Н.¹, Сабурова И.Н.^{2,3}, Морозов С.Г.², Зурина И.М.², Кошелева Н.В.^{2,4}, Горкун А.А.², Григорьева А.А.¹

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕПТИДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ НА ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЖИ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ МОДЕЛИ В 3D-ФОРМАТЕ

¹ ООО Центр восстановительной медицины, 117997, г. Москва, Россия; ² ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, 125315, г. Москва, Россия; ³ ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ, 125993, г. Москва, Россия; ⁴ Биологический факультет ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, г. Москва, Россия

Проведено изучение действия инъекционного препарата для мезотерапии (Meso-Wharton P199™) на культуры дермальных фибробластов, моделирующих состояние клеток в (зрелой) стареющей коже. Материал и методы. В работе использовали культуру фибробластов на 4-м пассаже (P4), которая соответствовала по своим характеристикам фибробластам молодой кожи (контроль) и культуру фибробластов после 18-го пассажа (P18), в которой все признаки старения дермальных фибробластов (преобладание крупных плащевидных и парусовидных клеток, снижение темпов клеточного деления) были хорошо заметны. Биоактивность оценивали по морфологии клеток, эпителио-мезенхимной пластичности и экспрессии характерных для фибробластов маркеров: цитокератина 19, эластана, α-гладкомышечного актина (αSMA), PCNA (маркера пролиферации), коллагенов типов I, III, IV и фибронектина.

Результаты. При культивировании фибробластов P18 с исследуемым инъекционным препаратом происходит формирование сфероидов, по срокам сопоставимое с формированием сфероидов из молодых фибробластов P4. Из культуры фибробластов P18, культивированных без препарата не происходит формирования полноценного сфероида, а наблюдается агрегация клеток и их постепенная гибель с некротической массой внутри агрегата. Присутствие в ростовой среде препарата стимулирует «омоложение» клеток и последующее восстановление мезенхимо-эпителиальной пластичности культивируемых фибробластов за счет восстановленной способности синтезировать в достаточном для установления межклеточных контактов количестве компонентов внеклеточного матрикса (фибронектина и коллагенов), что влияет на способность формировать сфероиды. Культивирование образовавшихся сфероидов с препаратом стимулирует экспрессию эластана, коллагена IV типа, фибронектина, белка внеклеточного матрикса, поддерживающего упругость кожи, а поверхностные клетки активно экспрессируют цитокератин 19.

Для корреспонденции:

Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе и заведующий лабораторией Общей и перинатальной нейроинопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия. E-mail: biopharm@list.ru

For correspondence:

Morozov Sergey G., Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, deputy director for scientific work of Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Russian Federation. E-mail: biopharm@list.ru

Information about authors:

Morozov S.G., <http://orcid.org/0000-0001-5822-5729>.
Volkova E.N., <http://orcid.org/0000-0002-1063-8345>.