

Коллектив авторов, 2016  
УДК 616-092

Елистратова И.В.<sup>1</sup>, Иванченко О.Б.<sup>2</sup>, Захарова И.А.<sup>4</sup>, Гречко А.В.<sup>3</sup>, Морозов С.Г.<sup>4</sup>

## **Измерение уровня митохондриального шаперона DNAJC15/MCJ в клетках крови больных с atopическим дерматитом средней тяжести**

<sup>1</sup> — ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России», 143930, Балашиха, мкр. Никольско-Архангельский, ш. Вишняковское, д. 101

<sup>2</sup> — ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого, институт «Торгово-экономический университет», 194021, Санкт-Петербург, ул. Новороссийская, д. 50

<sup>3</sup> — ФГБНУ «Госпиталь для incurабельных больных — Научный лечебно-реабилитационный центр», 109240, Москва, ул. Солянка, д. 14, стр. 3

<sup>4</sup> — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

**Цель исследования** — изучить экспрессию белка теплового шока DNAJC15/MCJ семейства HSP40 в лимфоцитах и нейтрофилах крови больных atopическим дерматитом средней степени тяжести (индекс SCORAD от 20 до 40) в остром периоде заболевания. **Методика.** Бактериальную контаминацию кожи больных atopическим дерматитом определяли методом ПЦР в реальном времени. Клетки крови получали из локтевой вены, окрашивали антителами к рецепторам плазматической мембраны и митохондриальному белку DNAJC15/MCJ. Для измерения уровня индуцированного апоптоза нейтрофилов использовали C2-церамид. Клетки анализировали методом проточной цитометрии. **Результаты.** Установлено, что экспрессия молекулярного шаперона DNAJC15/MCJ в CD8+ цитотоксических лимфоцитах и в нейтрофилах периферической крови больных atopическим дерматитом статистически значимое выше по сравнению со здоровыми донорами. При наличии бактериальной контаминации кожи уровень экспрессии белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах крови больных atopическим дерматитом в 2 раза превышает соответствующие показатели у больных без верифицированной контаминации кожи. Увеличение экспрессии белка DNAJC15/MCJ сопряжено с возрастанием уровня церамид-индуцированного апоптоза нейтрофилов крови больных atopическим дерматитом. **Выводы.** Повышение экспрессии митохондриального белка DNAJC15/MCJ в лимфоцитах и нейтрофилах больных atopическим дерматитом средней степени тяжести в острой стадии заболевания отражает изменения метаболизма в клетках крови.

**Ключевые слова:** atopический дерматит, лимфоциты, нейтрофилы, HSP40, DNAJC15/MCJ

**Для корреспонденции:** Морозов С.Г., доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, зав. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ВРИО директора ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: biopharm@list.ru

**Для цитирования:** Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Захарова И.А., Гречко А.В., Морозов С.Г. Измерение уровня митохондриального шаперона DNAJC15/MCJ в клетках крови больных с atopическим дерматитом средней тяжести. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; (2): 4–12.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.12.15

Elistratova I.V.<sup>1</sup>, Ivanchenko O.B.<sup>2</sup>, Zakharova. I.A.<sup>4</sup>, Grechko A.V.<sup>3</sup>, Morozov S.G.<sup>4</sup>

## **Mitochondrial chaperon DNAJC15/MCJ level measuring in the blood cells of patients with atopic dermatitis of moderate severity**

<sup>1</sup> — Main military clinical hospital of internal troops of the MIA Russia, 143930, Balashikha, Nikol'sko-Archangelsky, 101 Sh. Vishnyakovskoe

<sup>2</sup> — The Peter the Great St.-Petersburg's Polytechnic University, 194021, St. Petersburg, 50 Novorossiyskaya St.

<sup>3</sup> — Federal State Budgetary Scientific Institution «Hospital for Incurable Patients — the Scientific Medical and Rehabilitation Center, 109240, Moscow, 14 — 3 Solyanka St.

<sup>4</sup> — Scientific research institute of the general pathology and pathophysiology, 125315, Moscow, 8 Baltiyskaya St.

**The purpose.** Heat shock protein DNAJC15/MCJ expression has been measured in lymphocytes and neutrophils obtained from patients with atopic dermatitis of moderate severity (SCORAD index from 20 to 40) in acute phase compared with healthy donors. **Methods.** Real time PCR method has been used to verify the bacterial contamination of the skin of pa-

tients with atopic dermatitis. Peripheral blood lymphocytes and neutrophils have been double stained with antibodies to the plasma membrane receptors and mitochondrial protein DNAJC15/MCJ. C2-ceramide has been used to induce an apoptosis in neutrophils separated on Percoll gradient. Cells were analyzed by flow cytometry. **Results.** In the first time it is established that molecular chaperone DNAJC15/MCJ expression in CD8<sup>+</sup> T cells of patients with atopic dermatitis were significantly higher compared to the healthy donors ( $P < 0.05$ ). Expression DNAJC15/MCJ in neutrophils of atopic patients was much dependent on the bacterial contamination of skin that raised the level of DNAJC15/MCJ expression twice. The increased expression of DNAJC15/MCJ protein in neutrophils of atopic patients has been found to be associated with the elevated level of ceramide-induced apoptosis in these cells. **Conclusions.** Increased expression of the mitochondrial protein DNAJC15/MCJ in lymphocytes and neutrophils of patients with atopic dermatitis of moderate severity reflects the changes of metabolism in blood cells under this disease.

**Keywords:** atopic dermatitis, lymphocytes, neutrophils, HSP40, DNAJC15/MCJ.

**For citation:** Elistratova I.V., Ivanchenko O.B., Zakharova. I.A., Grechko A.V., Morozov S.G. Mitochondrial chaperon DNAJC15/MCJ level measuring in the blood cells of patients with atopic dermatitis of moderate severity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 4–12. (in Russ).

**For correspondence:** Morozov S.G., PhD, professor, corresponding member of Russian Academy of Sciences, acting director of Scientific research institute of the general pathology and pathophysiology, e-mail: biopharm@list.ru

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

**Funding.** The study had no sponsorship.

Information about authors:

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

Ivanchenko O.B., <http://orcid.org/0000-0003-2715-8935>

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

Grechko A.V., <http://orcid.org/0000-0003-2366-3117>

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

Received 17.12.15

## Введение

Изучение механизмов развития атопического дерматита (АД) является актуальной проблемой дерматологии в связи с ростом частоты встречаемости данной патологии и отягощением его клинической картины. В обострении АД немалую роль играет стресс, который на уровне клеток активирует систему молекулярных шаперонов, исторически называемых белками теплового шока (Heat Shock Proteins). Так, нами впервые было показано, что у больных АД активируются HSP90 [1]. Продолжением наших исследований явилось изучение другой группы шаперонов — HSP40. Семейство белков теплового шока 40 кДа (HSP40) входит в состав суперсемейства, состоящего из HSP90, HSP70, HSP40, малых белков теплового шока и шаперонинов. Семейство HSP40 человека включает 49 белков — шаперонов, основная функция которых — защита клеток от последствий стресса. В подсемейство А белков HSP40 входят 4 белка, в подсемейство В — 14 белков, к подсемейству С относятся 30 белков, выполняющих функции шаперонов и ко-шаперонов во всех компартментах клетки [2]. Семейство белков HSP40 названо DNAJ (J домен способен связы-

вать ДНК) по терминологии, используемой для обозначения этого белка у *E.coli*. Белок DNAJC15 имеет 75% гомологии с идентичными белками клеток других млекопитающих и более 57% гомологии с клетками прокариот и низших эукариот [3]. Все белки HSP40 включают консервативный J домен и классифицируются на основании его структурной организации. J домен необходим для связывания с HSP70, ко-шапероном которого является HSP40 [4]. HSP40 также могут связывать HSP90 и выполнять роль ко-шаперонов при фолдинге нативных и поврежденных белков, перемещении полипептидов через клеточные мембраны и т.д.

В ответ на стресс, инициированный в органеллах клетки, в ядре клетки повышается транскрипционная активация генов и синтез стресс-зависимых белков, специфичных для данных органелл. Большое число публикаций посвящено роли ко-шаперонов семейства HSP40 при стрессе в эндоплазматическом ретикулуме, а также их роли в цитозоле, однако, активности HSP40 в митохондриях посвящено значительно меньше работ, хотя по значимости для клетки митохондриальный стресс имеет глобальное значение в связи с изменениями её энергетического статуса [5].

В митохондриях человека обнаружено несколько белков семейства HSP40. Белок DNAJC15 (также называется MCJ — Methylation — Controlled J protein, поэтому далее указывается как белок DNAJC15/MCJ) заякорен С-концом во внутреннюю мембрану митохондрий, его J домен направлен в сторону матрикса митохондрии. DNAJC15/MCJ участвует в биогенезе митохондрий, взаимодействует с компонентами первого комплекса электронно-транспортной (дыхательной) цепи митохондрий. DNAJC15/MCJ — это эндогенный митохондриальный репрессор дыхательной цепи, он препятствует формированию суперкомплексов из белков дыхательной цепи [3]. DNAJC15/MCJ регулирует митохондриальные поры (Mitochondrial Permeability Transition Pore, МРТР): повышение его экспрессии открывает поры и индуцирует апоптоз, снижение уровня DNAJC15/MCJ супрессирует активность пор и повышает способность клеток к выживанию. DNAJC15/MCJ связывает регулятор циклофилин D (cyclophilin D) и переносит его на МРТР [6]. DNAJC15/MCJ формирует комплексы с MAGMAS — митохондриальным мотором и регулятором транслоказ, обеспечивающим импорт пре-белков через мембрану митохондрий. MAGMAS транспортируется молекулярным шапероном DNAJC15/MCJ к индивидуальной транслоказе, требуемой для переноса специфического белка [7]. DNAJC15/MCJ взаимодействует с препротейнотранслоказой внутренней мембраны митохондрий TIM23 (Translocase of the Inner Mitochondrial membrane), компонентом которой является митохондриальный HSP70 морталин (mortalin). DNAJC15/MCJ стимулирует АТФ-азную активность морталина и обеспечивает работу транслоказы TIM23 [8]. Митохондриальное дыхание зависит от метаболической активности клетки. DNAJC15/MCJ регулирует ответ клетки на поступление питательных веществ и контролирует метаболизм митохондрий, поэтому уровень белка DNAJC15/MCJ регулируется в соответствии с изменениями метаболизма.

Ген *mcj* человека имеет локализацию 13q14, его экспрессия высока в CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах и почти не определяется в CD4<sup>+</sup> Т-хелперах и в В-клетках, уровень белка DNAJC15/MCJ высок в цитотоксических лимфоцитах, а в хелперах существенно ниже. Эти различия могут, в частности, определяться тем, что активированные цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты являются источником секретируемого интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ). Ген *mcj* является транскрипционной мишенью IFN- $\gamma$ , обуславливающей динамическую адаптацию тканей к стрессу. У больных атопическим дерматитом в дерме и в эпидермисе в зоне воспаления кожи повышено содержание CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- $\gamma$ , IL-13 и IL-22 [9]. IFN- $\gamma$  репрес-

сирует транскрипцию гена *mcj* в макрофагах, транскрипционный регулятор Ikaros связывает промотор *mcj* и обуславливает репрессию его гена, в сигнальный путь входит казеин-киназа-II [10]. Экспрессия гена *mcj* в макрофагах регулирует их ответ на воспалительные стимулы. Ген *mcj* необходим для продукции TNF- $\alpha$  макрофагами в ответ на связывание TLR рецепторов бактериями и другими лигандами [11].

Таким образом, изучение белка DNAJC15/MCJ представляет несомненный интерес для оценки метаболической активности клеток.

*Цель исследования* — количественное измерение экспрессии белка DNAJC15/MCJ в клетках периферической крови больных атопическим дерматитом по сравнению с показателями здоровых доноров.

## Методика

### Пациенты и доноры

Работа проведена на клетках крови 68 молодых мужчин в возрасте от 18 до 34 лет, больных АД средней тяжести (с индексом SCORAD от 20 до 40). У всех обследованных лиц обострение заболевания началось в пределах одной недели до взятия крови. Донорами были 32 здоровых мужчины в возрасте от 18 до 32 лет.

Все пациенты и доноры подписывали форму информированного согласия. Критериями исключения пациентов из исследования были острые вирусные или бактериальные инфекции, системные аллергические или воспалительные заболевания, онкологические заболевания, патология нервной системы и соматическая патология, которые могли бы существенно изменить полученные результаты.

### Определение контаминации кожи патогенами

Взятие соскоба кожи проводили по правилам МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории». Пробы брали с предплечья в местах, внешне не затронутых воспалительным процессом. Наличие бактериальной или грибковой контаминации верифицировали методом ПЦР в реальном времени с парами праймеров, синтезированными на основании соответствующих олигонуклеотидов патогенов, известных из базы данных [12]. В работе использовали методику, применяемую для клинических исследований [13, 14].

### Работа с клетками крови

Кровь получали из локтевой вены в вакуутайнеры с ЭДТА, освобождали от эритроцитов лизирующим буфером (Vecton Dickinson), отмывали в фосфатном

буфере (PBS). Очищенные популяции нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов крови выделяли на градиенте плотности Перколла. Изотонический раствор Перколла (90%) получали из 27 мл исходного Перколла и 3 мл 10-кратного фосфатного буфера, его использовали для получения остальных ступеней градиента плотностью 81%, 70%, 60% и 55%, которые соответствовали известной средней плотности клеток крови. Градиенты центрифугировали 20 мин при  $t +22^{\circ}\text{C}$  и ускорении 500g. После центрифугирования на дне пробирки концентрировались эритроциты, нейтрофилы выделялись в интерфазе между слоями плотностью 81% и 70%; лимфоциты — между слоями 70% и 60%. После этого клетки отмывали, переводили в полную среду RPMI 1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и инкубировали 2 ч при  $+37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  для восстановления метаболизма. Для исследования рецепторов плазматической мембраны (CD16, CD32, CD3, CD4, CD8 и др.) клетки окрашивали антителами, затем фиксировали в 4% параформальдегиде. Для исследования внутриклеточных белков клетки сначала фиксировали в 4% параформальдегиде с 0,001% Тритоном X-100, отмывали, а затем окрашивали антителами к белку теплового шока

DNACJ15/MCJ [EPR12823] (ab179820) (Abcam). Вторыми антителами были изотипспецифические F(ab)2 фрагменты иммуноглобулинов, меченные FITC или фикоэритрином. Для изучения спонтанного апоптоза клетки фиксировали немедленно после выделения, затем окрашивали пропидиумом иодидом в гипотоническом буфере с цитратом натрия, что позволяет получать как диплоидные пики ДНК, так и пики ДНК, соответствующие апоптозу или некрозу. Для определения уровня индуцированного апоптоза использовали 20 мкМ С2-церамида, проникающего в клетку, который стандартно используется для этих целей [15]. Через 2 ч инкубации с церамидом клетки отмывали, фиксировали и далее окрашивали, как указано выше. Интенсивность флуоресценции измеряли на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson) по программе SimulSet. В каждом образце регистрировали 10 000 событий.

#### Статистический анализ

Полученные результаты анализировались по программе ANOVA и представлены как  $M \pm m$ . Сравнение между двумя группами проводили по критерию Стьюдента, статистический анализ нескольких групп проводился с помощью непараметрического анализа

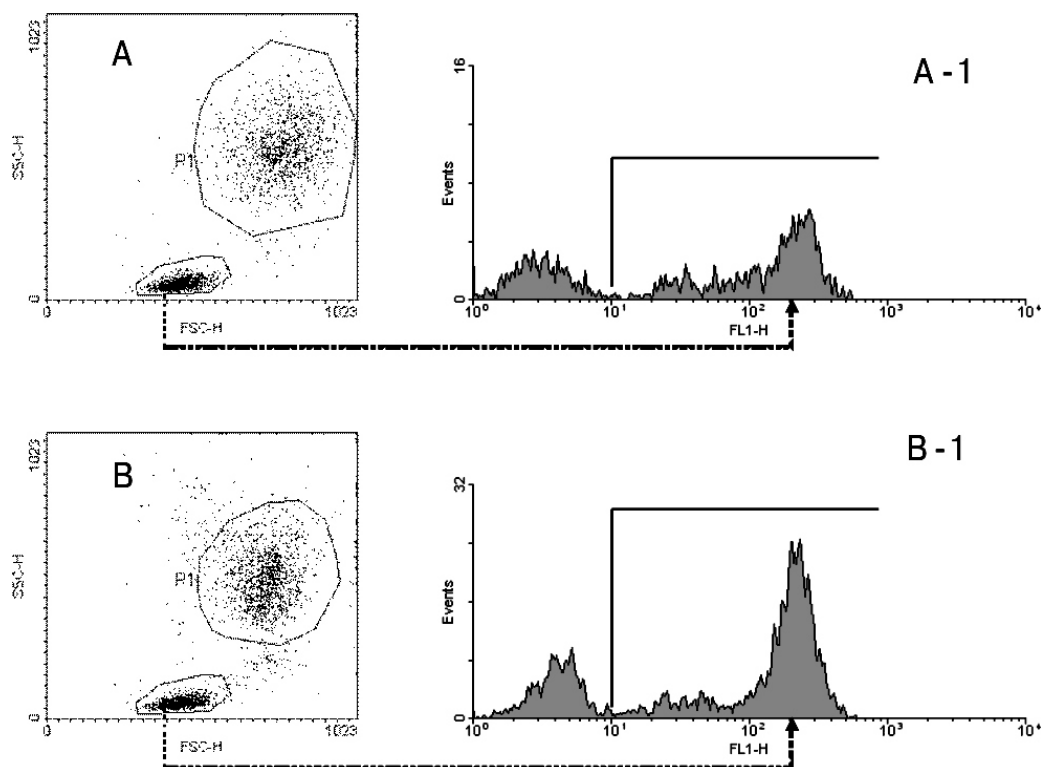


Рис. 1. Данные проточной цитометрии по экспрессии белка теплового шока DNACJ15/MCJ в лимфоцитах крови.

Представлены данные проточной цитометрии (DotPlot) основных популяций клеток крови, (A) — пример здорового донора, (B) — пример больного с atopическим дерматитом. Гейт лимфоцитов обведен. (A-1) — гистограмма экспрессия белка DNACJ15/MCJ в лимфоцитах донора, (B-1) — гистограмма экспрессия белка DNACJ15/MCJ в лимфоцитах больного.

методом множественного сравнения по критерию Ньюмена—Кейлса,  $p \leq 0,05$  дается как статистически значимое различие между группами.

### Результаты и обсуждение

#### Экспрессия белка теплового шока DNAJC15/MCJ в лимфоцитах крови

В связи с тем, что нарушение дифференцировки и активации лимфоцитов играет важную роль в патогенезе АД, была исследована экспрессия белка DNAJC15/MCJ в лимфоцитах. Лимфоциты крови больных АД и доноров были окрашены антителами к белку DNAJC15/MCJ и проанализированы на проточном цитометре. На гистограммах донора и больного левый негативный пик соответствует изотипическому контролю, а правый пик соответствует положительно окрашенным лимфоцитам. Бимодальность положительного пика определяется тем, что лимфоциты разных субпопуляций имеют различный уровень экспрессии митохондриального белка DNAJC15/MCJ [3] (рис. 1). Анализ интенсивности внутриклеточной флуоресценции (измеряется в условных единицах и соответствует уровню экспрессии изучаемого белка) не выявил статистически значимого различия между больными atopическим дерматитом и донорами в связи с существенным разбросом данных (рис. 2). При этом имелась явная тенденция к повышению экспрессии белка DNAJC15/MCJ у больных, что даёт возможность

#### Экспрессия DNAJC15/MCJ в лимфоцитах

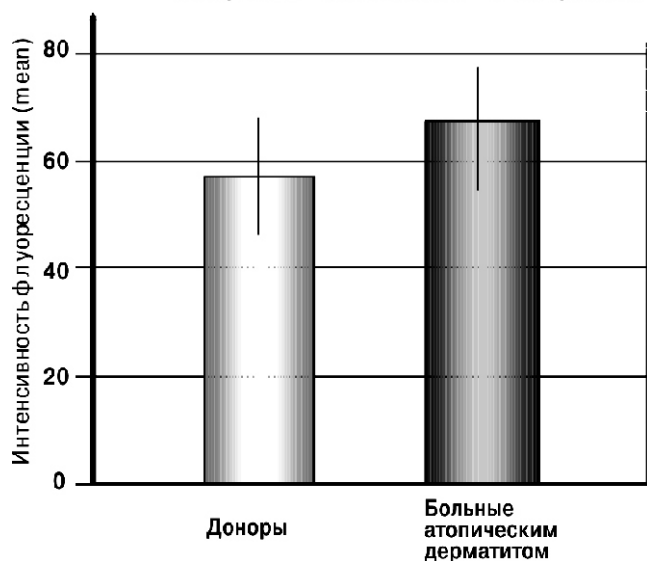


Рис. 2. Интенсивность внутриклеточной флуоресценции белка теплового шока DNAJC15/MCJ в лимфоцитах крови. Представлены данные проточной цитометрии. Интенсивность флуоресценции (mean) (в условных единицах) отражает уровень экспрессии белка DNAJC15/MCJ в лимфоцитах здоровых доноров ( $n = 32$ ) и больных atopическим дерматитом ( $n = 68$ ).

предполагать нарушения метаболизма лимфоцитов больных atopическим дерматитом, так как DNAJC15/MCJ является репрессором I комплекса дыхательной цепи митохондрий.

В связи с тем, что *in vitro* было показано различие в экспрессии белка DNAJC15/MCJ в популяциях CD4+ и CD8+ клеток [3], была проанализирована его экспрессия в CD8+ и CD4+ Т-лимфоцитах периферической крови больных с АД. Примеры двойной окраски лимфоцитов на антиген CD8 и белок DNAJC15/MCJ (или CD4 и DNAJC15/MCJ), представлены на рис. 3.

Экспрессия белка DNAJC15/MCJ статистически значимо различается в CD4+ Т-хелперах и CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитах (рис. 4). У больных АД экспрессия DNAJC15/MCJ несколько повышается в CD4+ Т-лимфоцитах, хотя основной вклад в повышение экспрессии этого белка вносят CD8+ Т-клетки. Статистический анализ результатов указывает на значимые различия в экспрессии белка DNAJC15/MCJ в цитотоксических лимфоцитах доноров и больных АД.

Значение полученных результатов определяется тем, что CD8+ Т-лимфоциты играют роль в патогенезе АД. У больных в CD8+ Т-лимфоцитах периферической крови, экспрессирующих антиген, ассоциированный с кожей (CLA+), повышена экспрессия перфорина и гранзима-В, которые индуцируют апоптоз клеток и поддерживают воспаление [16]. CD8+ Т-лимфоциты обеспечивают защиту организма от патогенов, при контакте с которыми они быстро пролиферируют, при этом 90—95% CD8+ Т-лимфоцитов погибает, а часть клеток дифференцируется в клетки памяти [17]. Микробные суперантигены, в частности, стафилококковый энтеротоксин, обуславливают клональную экспансию Т-клеток, повышение Th2 и CD8+ Т-клеток на фоне супрессии Т регуляторных клеток, что поддерживает воспаление при АД [18].

#### Экспрессия белка теплового шока DNAJC15/MCJ в нейтрофилах крови

Нейтрофилы играют важную роль в патогенезе АД [19]. Поскольку нейтрофилы и лимфоциты значительно различаются по числу митохондрий, то следующим этапом работы было определение экспрессии белка DNAJC15 в нейтрофилах. Данные проточной цитометрии представлены на рис. 5. Фигуры А (донор), В (больные АД, без верификации инфицирования кожи) и С (больные с бактериальной инфекцией кожи, что подтверждено методом ПЦР) показывают распределение окрашенных антителами нейтрофилов. На гистограмме (картина D) отражено существенное увеличение экспрессии белка DNAJC15 у больных

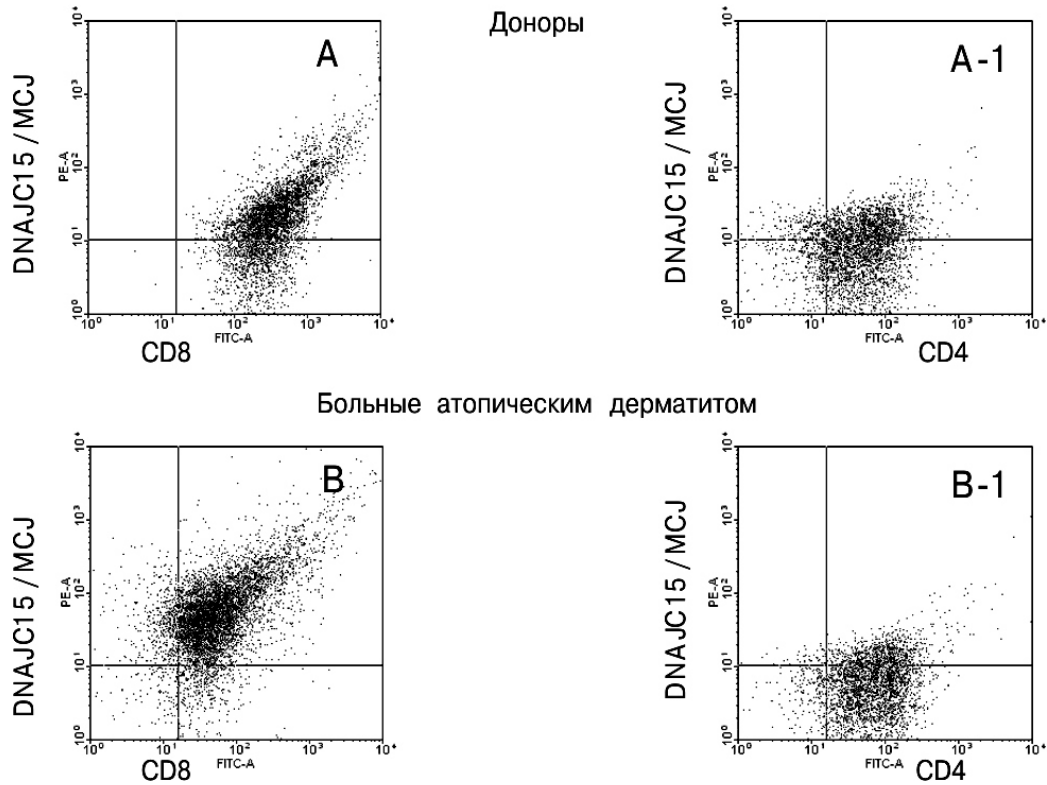


Рис. 3. Двойная окраска лимфоцитов периферической крови доноров и больных с atopическим дерматитом антителами к белку теплового шока DNAJC15/MCJ и рецепторам лимфоцитов. Представлены примеры проточной цитометрии по двойной окраске лимфоцитов периферической крови антителами к рецепторам лимфоцитов (CD8 или CD4) (канал FITC-A) и антителами к митохондриальному белку DNAJC15/MCJ (канал PE-A).

atopическим дерматитом ( $n = 41$ ), с верифицированной методом ПЦР бактериальной контаминацией кожи (наиболее часто определялся золотистый стафилококк) по сравнению с группой больных АД без верифицированной инфекции ( $n = 27$ ). Количественные результаты измерения интенсивности флуоресценции белка DNAJC15 приведены на рис. 6. Следует отметить, что отсутствие бактериальной контаминации во внешне здоровых участках кожи не отражает её отсутствия (или наличия) в пораженных участках кожи. Однако задачей работы было изучение реакции клеток всего организма на стресс, вызванный заболеванием, а не локальное поражение клеток в очаге воспаления.

Очищенная фракция нейтрофилов была получена на градиенте плотности, после чего клетки были отмыты, переведены в полную среду с сывороткой и инкубированы для восстановления их метаболизма.

Это исключало подавление функции митохондрий в связи с экспериментальными условиями. Далее нейтрофилы исследовали на предмет спонтанного и индуцированного апоптоза. Примеры гистограмм, отражающих состояние ДНК в нейтрофилах, приведены на рис. 7.

Экспрессия DNAJC15/MCJ в CD8+ и в CD4+ лимфоцитах

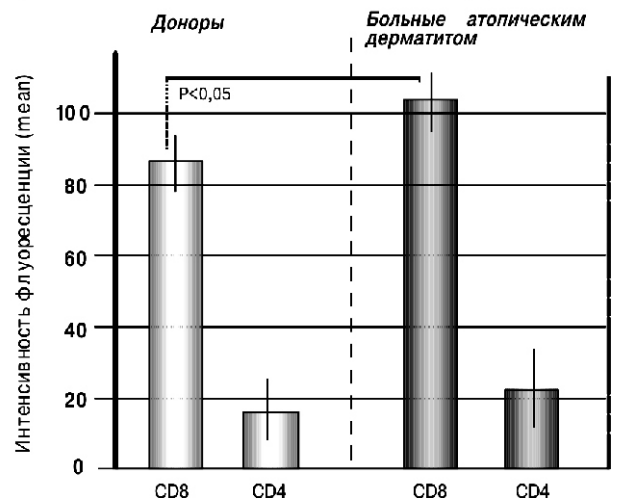


Рис. 4. Интенсивность внутриклеточной флуоресценции белка теплового шока DNAJC15/MCJ в CD8+ и в CD4+ лимфоцитах периферической крови.

Представлены данные проточной цитометрии. Интенсивность флуоресценции (mean) (в условных единицах) отражает уровень экспрессии белка DNAJC15/MCJ в CD8+ лимфоцитах и в CD4+ лимфоцитах здоровых доноров ( $n = 32$ ) и больных с atopическим дерматитом ( $n = 68$ ).

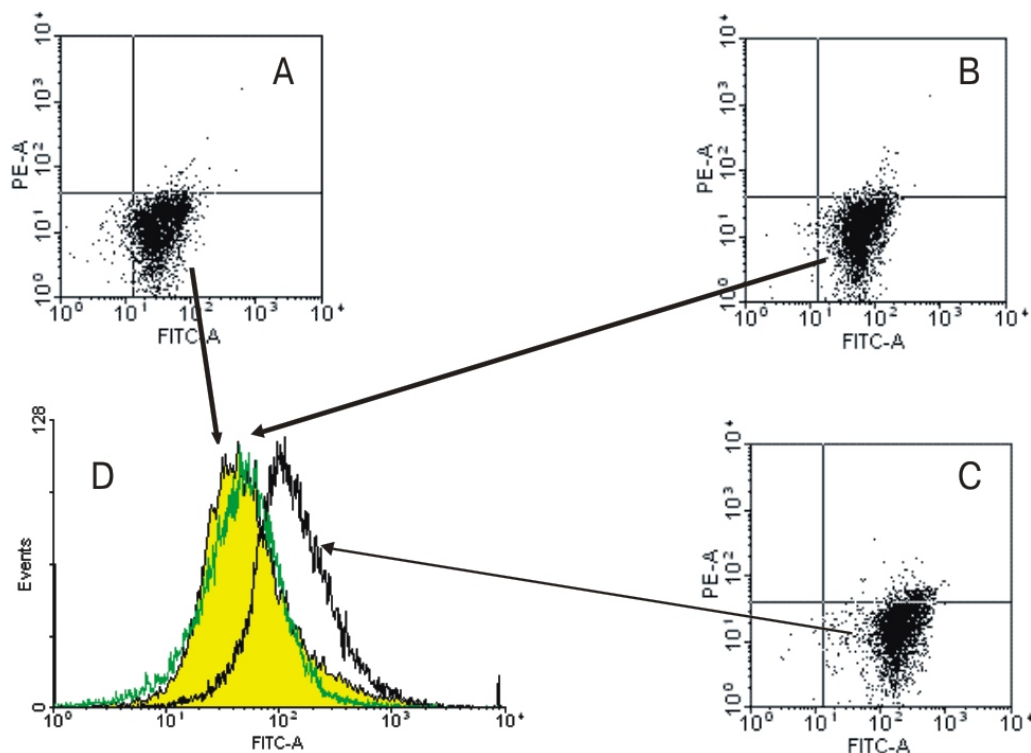


Рис. 5. Экспрессия белка теплового шока DNAJC15/MCJ в нейтрофилах периферической крови. Представлены данные проточной цитометрии по экспрессии белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах крови здорового донора (А), больного с atopическим дерматитом без установленной бактериальной контаминации кожи (В), больного atopическим дерматитом с верифицированной бактериальной контаминацией кожи. Гистограммы экспрессии белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах (D).

Экспрессия белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах

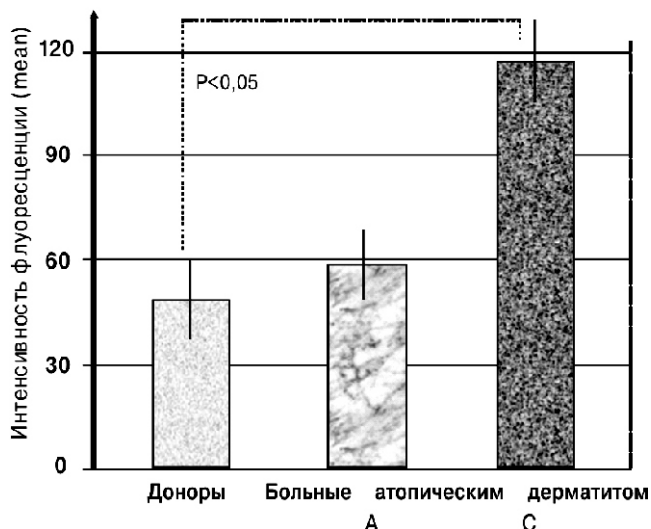


Рис. 6. Интенсивность флуоресценции белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах периферической крови доноров и больных с atopическим дерматитом в зависимости от бактериальной контаминации кожи. Представлены данные проточной цитометрии по экспрессии белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах крови здоровых доноров (n = 32) и больных с atopическим дерматитом (А) без установленной бактериальной контаминации кожи (n = 27) и (С) с верифицированной бактериальной контаминацией кожи (n = 41).

Апоптоз нейтрофилов

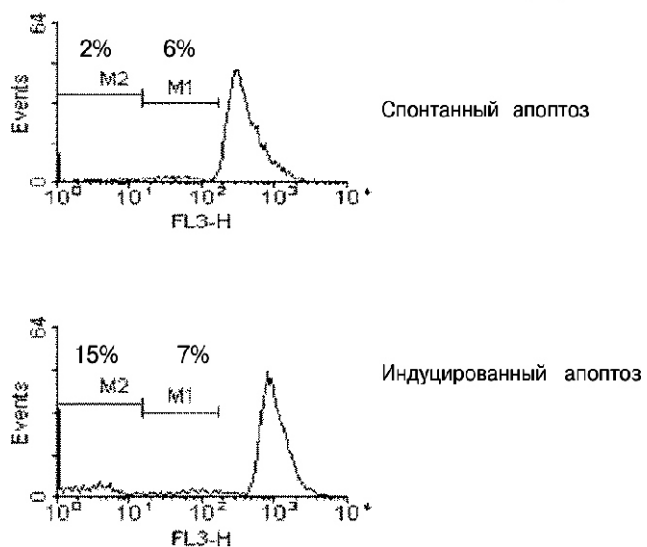


Рис. 7. Примеры апоптоза нейтрофилов. Правый (диплоидный) пик соответствует живым клеткам. Слева от диплоидного пика курсором M1 обозначен пик, отражающий уровень апоптоза. Крайний левый пик, обозначенный курсором M2, отражает уровень распавшихся в результате некроза клеток.

Уровень спонтанного апоптоза нейтрофилов составлял  $5 \pm 3\%$  у доноров и  $7 \pm 4\%$  у больных с АД. Обработка фракционированных нейтрофилов С2-церамидом вызвала гибель  $21 \pm 6\%$  нейтрофилов доноров и  $38 \pm 5\%$  нейтрофилов больных с АД. У больных с АД с верифицированной методом ПЦР бактериальной контаминацией уровень индуцированной гибели нейтрофилов был статистически значим ( $29 \pm 5\%$  против  $44 \pm 5\%$ ), при этом большая часть нейтрофилов больных АД с бактериальной инфекцией кожи распадалась в результате некроза. Полученные данные указывают на связь между экспрессией митохондриального репрессора — молекулярного шаперона DNAJC15/MCJ, с нарушениями метаболизма клеток крови при atopическом дерматите.

### Выводы

1. У больных atopическим дерматитом повышена экспрессия молекулярного шаперона DNAJC15/MCJ в CD8+ цитотоксических лимфоцитах периферической крови по сравнению со здоровыми донорами.
2. При наличии бактериальной контаминации кожи выявлено статистически значимое увеличение экспрессии белка DNAJC15/MCJ в нейтрофилах больных АД.
3. Экспрессия белка DNAJC15/MCJ взаимосвязана с чувствительностью нейтрофилов к индукторам апоптоза.

### References

1. Elistratova I.V., Morozov S.G., Zakharova I.A. PAR-2 receptor expression on the peripheral blood neutrophils of atopic dermatitis patients and its association with heat shock proteins HSP90. *Russian J. Skin Ven. Diseases*, 2016, (1): 53-57. (in Russian)
2. HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee), Available at [www.genenames.org/genefamilies/HSP#HSP40](http://www.genenames.org/genefamilies/HSP#HSP40).
3. Hatle K., Gummadidala P., Navasa N., Bernardo E., Dodge J., Silverstrim B. et al. MCJ/DnaJC15, an endogenous mitochondrial repressor of the respiratory chain that controls metabolic alterations. *Mol. Cell. Biol.*, 2013, 33(11): 2302-14.
4. Feng P., Lin H., Chen W., Zuo Y. Predicting the types of J-proteins using clustered amino acids. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 2014: 935719.
5. Zhao Q., Wang J., Levichkin I., Stasinopoulos S., Ryan M., Hoogenraad N. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.*, 2002, 21(17): 4411-9.
6. Sinha D., D'Silva P. Chaperoning mitochondrial permeability transition: regulation of transition pore complex by a J-protein DnaJC15. *Cell. Death Dis.*, 2014, 5: e1101.
7. Sinha D., Srivastava S., Krishna L., D'Silva P. Unraveling the intricate organization of mammalian mitochondrial presequence translocases: existence of multiple translocases for maintenance of mitochondrial function. *Mol. Cell. Biol.*, 2014, 34(10): 1757-75.
8. Schusdziarra C., Blanowska M., Azem A., Hell K. Methylation-controlled J-protein MCJ acts in the import of proteins into human mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* 2013; 22(7): 1348-57.
9. Hijnen D., Knol E., Gent Y., Giovannone B., Beijin S., Kupper T. et al. CD8+ T cells in the lesional skin of atopical dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-17, and IL-22. *J. Invest. Dermatol.* 2013, 133(4): 973-9.
10. Navasa N., Martin-Ruiz I., Atondo E., Sutherland J., Pascual-Itoiz M., Carreras-Gonzalez A. et al. Ikaros mediates the DNA methylation-independent silencing of MCJ/DNAJC15 gene expression in macrophages. *Sci. Rep.* 2015, 5(1): 4692-9.
11. Navasa N., Martin I., Iglesias-Pedraz J., Beraza N., Atondo E., Izadi H. et al. Regulation of oxidative stress by methylation-controlled J protein controls macrophage responses to inflammatory insults. *J. Infect. Dis.* 2015, 211(1):135-45.
12. GenBank database, Available at <http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>
13. White T., Bruns S., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: Innis M., Gelfand J., Sninsky J., White T., eds. *PCR protocols. A guide to methods and applications*. San Diego, CA: Academic Press, 1990; 315-24.
14. Buitrago M., Aguado J., Ballen A., Bernal-Martinez L., Prieto M., Garcia-Reyne A. et al. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013, 19(6): E271-277.
15. Kandalova O.V., Taratutina N.V., Martinova E.A. Spontaneous and ceramide-induced apoptosis in the skin cells obtained from patients with atopical dermatitis, eczema, and psoriasis, compared with donors. *Pathogenesis*. 2012, 10(4): 60-5. (in Russian)
16. Zhang B., Lyu J., Liu H., Feng D., Zhang D., Bi X. et al. Attenuation of peripheral regulatory T-cell suppression of skin-homing CD8+T cells in atopical dermatitis. *Yonsei. Med. J.* 2015, 56(1): 196-203.
17. Ahmed K., Wang L., Griebel P., Mousseau D., Xiang J. Differential expression of mannose-6-phosphate receptor regulates T cell contraction. *J. Leukoc. Biol.* 2015, 98(3): 313-8.
18. Barnes P. Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens. *Clin. Exp. Allergy*. 2009; 39(8): 1145-51.
19. Elistratova I.V., Morozov S.G., Zakharova I.A., Tarasova M.V. Peripheral blood cells luminol-dependent chemiluminescence at the different stages of atopical dermatitis. *Path. Physiol. Exp. Therapy*. 2015, 59(4): 35-40. (in Russian)



**Сведения об авторах:**

*Елистратова Ирина Владимировна*, врач дерматовенеролог отделения дерматовенерологии ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России»

*Иванченко Ольга Борисовна*, канд. биол. наук, доцент кафедры химии и биотехнологии ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого, институт «Торгово-экономический университет»

*Гречко Андрей Вячеславович*, доктор мед. наук, проф., директор ФГБНУ «Госпиталь для инкурабельных больных — Научный лечебно-реабилитационный центр»

*Захарова Ирина Александровна*, канд. биол. наук, старший науч. сотр. лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»