

УДК 616.5-002.

## ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОММУНИКАЦИЙ ИНТАКТНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ ПРИ СЕПСИСЕ

Е.Ю. Шаповалова<sup>1</sup>, Г.А. Демьяшкин<sup>2</sup>, М.Ю. Маланичев<sup>1,3</sup>, Д.А. Погосян<sup>1,3</sup>, В.И. Щекин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Медицинская академия имени С.И. Георгиевского

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»;

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;

<sup>3</sup>Клиника пластической хирургии и косметологии «Фрау Клиник»

В настоящем исследовании рассмотрена роль межклеточных коммуникаций эпидермиса (клаудин-1, окклюдин и ZO) при сепсисе (аутопсийный материал;  $n = 30$ ) иммуногистохимическим методом. Обнаруженное уменьшение иммуномечения на белки межклеточных коммуникаций, клаудин-1 –  $(64,1 \pm 1,1) \%$ ; окклюдин –  $(19,3 \pm 2,1) \%$ ; ZO –  $(17,5 \pm 1,4) \%$ , вызывает незначительные структурные изменения, проявляющиеся нарушением местного гомеостаза и эпидермальной барьерной дисфункцией.

*Ключевые слова:* эпидермис, сепсис, межклеточные коммуникации, плотные соединения.

DOI 10.19163/1994-9480-2020-4(76)-84-87

## IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERISTIC OF INTERCELLULAR COMMUNICATION OF INTACT KERATINOCYTES IN SEVERE SEPSIS

E.Y. Shapovalova<sup>1</sup>, G.A. Demyashkin<sup>2</sup>, M.Yu. Malanichrev<sup>1,3</sup>, D.A. Pogasyan<sup>1,3</sup>, V.I. Shchekin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>S.I. Georgievsky Medical Academy of the FSAEI HE «Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky»;

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;

<sup>3</sup>Clinic of Plastic Surgery and Cosmetology «Frau Klinik»

The present study examined the role of intercellular communication of the epidermis (claudin-1, occludin and ZO) in sepsis (autopsy material;  $n = 30$ ) by immunohistochemical method. The detected decrease in immunostaining for proteins of intercellular communication, claudin-1 –  $(64,1 \pm 1,1) \%$ ; occludin –  $(19,3 \pm 2,1) \%$ ; ZO –  $(17,5 \pm 1,4) \%$  causes minor structural changes, manifested by a violation of local homeostasis and epidermal barrier dysfunction.

*Key words:* epidermis, sepsis, intercellular communication, tight junctions.

Сепсис остается одной из ведущих причин смерти среди пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии. Несмотря на прогресс в изучении патогенеза системного воспаления и усовершенствовании методов терапии критических состояний, летальность при сепсисе сохраняется на неопределенно высоком уровне – 30–90 %. Отечественные и зарубежные клинико-эпидемиологические исследования описывают влияние значительного количества факторов на течение и исходы сепсиса.

Эмпирически установлено, что сепсис нарушает сохранность функций кожи и угнетает ее заживление. Однако механизмы данных изменений мало описаны или носят гипотетический характер.

В настоящем исследовании мы рассмотрим роль межклеточных коммуникаций, а именно плотных контактов, расположенных преимущественно в поверхностных слоях эпидермиса и обеспечивающих вторичный барьер [13].

Данные межклеточные контакты образованы комплексом трансмембранных и внутриклеточных белков, которые располагаются непосредственно под цитолемой и герметизируют субплазмолемальное пространство кератиноцитов шиповатого (zonula occludens, ZO) и других слоев эпидермиса

(клаудин-1, окклюдин) [2, 3]. Согласно проведенным исследованиям плотные контакты играют важную роль в дифференцировке эпидермиса [11].

В эксперименте на мышах с дефицитом клаудина-1 было выявлено выраженное нарушение эпидермального барьера, приводящее к обезвоживанию и гибели животных. Это объясняется мутацией в гене кодирующего *клаудин-1*, который приводит к потере белка, что характерно для ихтиоза. При некоторых других кожных заболеваниях также происходят структурные изменения белков и локализации плотных контактов. При псориазе отмечали увеличение экспрессии *окклюдина*, ZO по сравнению со здоровой кожей [6]. Аналогичный эффект наблюдали при инфицировании кожи патогенными бактериями [9]. Комбинаторное или постмутационное действие окклюдина и клаудина-1 изменяет функцию плотных контактов и усиливает эффект параклеточного барьера [5].

Несмотря на то, что существует определенное понимание возникающего дисбаланса белков межклеточных коммуникаций при ряде инфекционных и других поражений кожи экзогенного происхождения, но отсутствуют исследования возможных структурных перестроек этих белков на фоне эндогенного поражения – при сепсисе, учитывая,

что при этом происходит активная продукция и секреция интерлейкинов, оказывающих мутагенное действие на кератиноциты.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Дать иммуногистохимическую оценку межклеточных коммуникаций (клаудин-1, окклюдин, ZO) эпидермиса при сепсисе.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работу проводили на 40 архивных парафиновых блоках фрагментов кожи. На основании анамнестических, клинических и морфологических данных были сформированы две группы. I группа ( $n = 30$ ) – аутопсийный материал кожи умерших пациентов с установленным патологоанатомическим основным диагнозом: тяжелый бактериальный сепсис, синдром полиорганной недостаточности согласно консенсусу ACCP/SCCM. Критерии включения: возрастной интервал 18–45 лет, клинически и морфологически верифицированные признаки гипоперфузии внутренних органов, повышение сывороточного лактата  $>4$  ммоль/л, олигурия, нарушение сознания. Критерии исключения: беременность, установленное онкологическое заболевание, нозокомиальная этиология сепсиса, наследственные и приобретенные заболевания с поражением кожи и/или соединительной ткани (синдром Марфана, синдром Элерса – Данлоса, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, склеродермия, анкилозирующий спондилит, псориаз, фолликулярный гиперкератоз и др.), хроническое заболевание печени, хроническая почечная недостаточность, иммуносупрессивная и гормональная терапия, патология системы гемостаза в анамнезе. II группа ( $n = 10$ ) – аутопсийный материал кожи контрольной группы пациентов, умерших по причинам, не связанным с инфекционным заболеванием. Критерии включения: возрастной интервал 18–45 лет, отсутствие клинически и морфологически верифицированных признаков гипоперфузии внутренних органов. Критерии исключения: перенесенный сепсис, беременность, установленное онкологическое заболевание, наследственные и приобретенные заболевания с поражением кожи и/или соединительной ткани (синдром Марфана, синдром Элерса – Данлоса, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, склеродермия, анкилозирующий спондилит, псориаз, фолликулярный гиперкератоз и др.), хроническое заболевание печени, хроническая почечная недостаточность, иммуносупрессивная и гормональная терапия, патология системы гемостаза в анамнезе.

Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартному протоколу в автоматическом

режиме в иммуногистостейнере Bond-Max («Leica», Германия). Первичные антитела к клаудин-1 (Clone 2H10D10), окклюдин (Clone OC-3F10) и ZO (Clone R40.76); вторичные – универсальные антитела (HiDef Detection™ HRP Polymer system, «Cell Marque», США). Характер иммуногистохимических реакций оценивали, используя полуколичественную шкалу по 3-балльной системе с подсчетом количества иммунопозитивных клеток в 10 случайно отобранных полях зрения светового микроскопа при увеличении  $\times 400$  (в %): «–» отсутствие, «+» слабая (5–25 % клеток), «++» умеренная (25–50 % клеток), «+++» выраженная ( $\geq 51$  % клеток). Полученные образцы визуализировали на светооптическом микроскопе Leica DM 4000 B («Leica», Германия), совмещенном с видеокамерой и программным обеспечением.

Полученные в результате подсчета данные обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 7.5 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование посвящено изучению плотных межклеточных контактов (клаудин-1, окклюдин и ZO) интактной кожи в условии системного воспаления.

По данным литературы известно, что при сепсисе происходит функциональная перестройка плотных соединений. Так, в легких и кишке изменения структуры и локализации изучаемых белков приводят к нарушению барьерной функции, увеличению проницаемости (отеку) [8]. В печени изменяется локализация ZO и окклюдина, приводящая к гепатобилиарной дисфункции, сопровождаемая холестатической желтухой, а в почках наблюдали мутацию экспрессии гена ZO, проявляющуюся острой почечной недостаточностью [4].

Во всех исследуемых образцах кожи пациентов при сепсисе отмечали изменение иммуномечения (целостности) плотных межклеточных контактов по сравнению с контрольной группой (табл.).

Результаты иммуногистохимических реакций с белками межклеточных коммуникаций в интактном слое эпидермиса при сепсисе (доля иммунопозитивных клеток, %)

Белок	Эпидермис при сепсисе (I группа)	Здоровая кожа (II группа)
Claudin-1	64,1 ± 1,1	87,2 ± 2,4
Occludin	18,3 ± 2,1	24,3 ± 1,8
ZO	19,5 ± 1,4	21,1 ± 2,5

Клаудин-1-позитивную мембранную ИГХ-реакцию наблюдали во всех слоях эпидермиса, с уменьшением окрашивания от базального к зернистому слою: в I группе она была в 1,35 раза меньше, чем в здоровой коже (рис. 1).

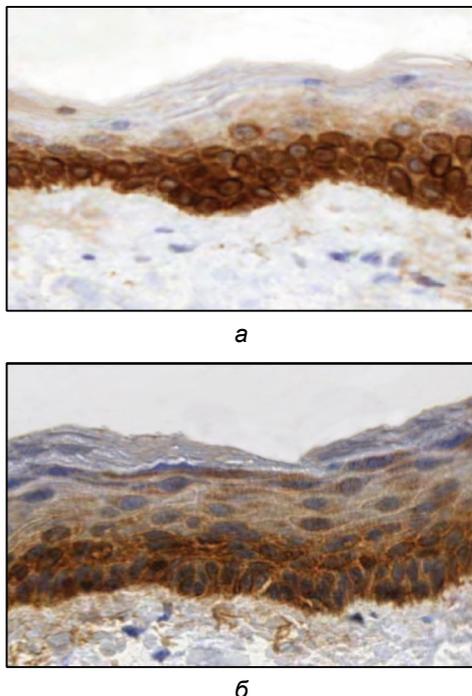


Рис. 1. Иммуногистохимическое исследование кожи человека при сепсисе (а) и здоровой кожи (б) с антителом к клаудину-1, докрасивание ядер гематоксилином, увелич.  $\times 200$

Во многих работах показана важнейшая роль клаудина-1 в регуляции эпидермального барьера, а уменьшение его концентрации сопровождается обезвоживанием и нарушением местного гомеостаза [7]. При сепсисе активируются провоспалительные цитокины (в первую очередь IL-1 $\beta$  и др.), которые снижают количество клаудина-1, и, как следствие, увеличивается доля макрофагов и автономная продукция IL-1 $\beta$  кератиноцитами, которые еще больше усиливают воспалительную инфильтрацию – то есть формируется «порочный круг».

Кроме того, усилению локального воспаления способствует нарушение первичного и вторичного эпидермальных барьеров, а также нарушение дифференцировки кератиноцитов [12].

Напротив, на поздних стадиях системного воспаления наблюдается незначительное повышение клаудина-1, что оказывает компенсаторное действие, характеризующееся угнетением иммунной системой и снижением секреции цитокинов макрофагами [10].

Снижение интенсивности окрашивания отмечали с окклюдинам, где в эпидермисе пациентов с сепсисом оно было уменьшено в 1,2 раза по сравнению с образцами контрольной группы (рис. 2).

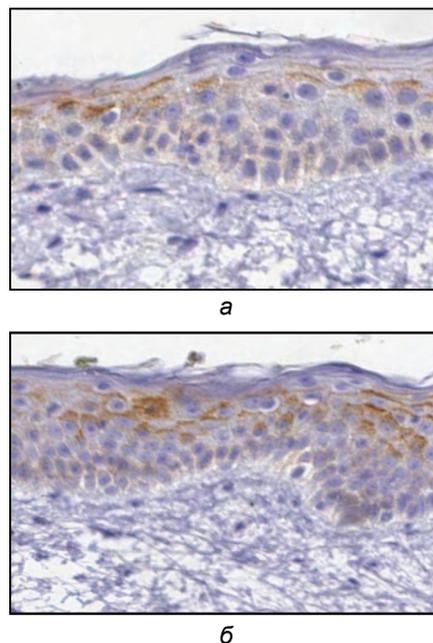


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование кожи человека при сепсисе (а) и здоровой кожи (б) с антителом к окклюдину, докрасивание ядер гематоксилином, увелич.  $\times 200$

Обнаруженное уменьшение интегрального белка окклюдина, комбинаторно взаимодействующего с клаудином-1 для обеспечения эффективного параклеточного барьера, в условиях системного воспаления ослабляет межклеточный барьер и тем самым усиливает проницаемость интрацеллюлярного пространства [7, 14].

Положительная ИГХ-реакция на ZO была диффузной и практически тождественной в эпидермисе обеих групп (рис. 3).

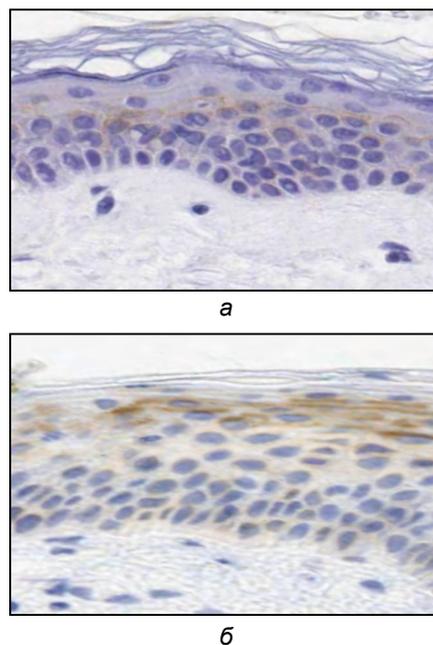


Рис. 3. Иммуногистохимическое исследование кожи человека при сепсисе (а) и здоровой кожи (б) с антителом к ZO, докрасивание ядер гематоксилином, увелич.  $\times 200$

Диффузное иммуномечение ZO интактного эпидермиса при системном воспалении не показывает существенные изменения. Тем не менее, увеличение поляризации кератиноцитов приводит к нарушению его связывания с интегральными белками и образованию плотных соединений, о чем свидетельствуют проведенные ранее исследования [1].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Снижение количества белков плотных соединений (клаудин-1, окклюдин, ZO), играющих важную роль в селективной проницаемости эпидермиса и контролирующего межклеточный поток биологически активных веществ, вызывает незначительные структурные изменения, проявляющиеся нарушением местного гомеостаза и эпидермальной барьерной дисфункцией.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bauer H., Zweimueller-Mayer J., Steinbacher P. The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins. The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, pp. 1–11. doi:10.1155/2010/402593.
2. Blais M., Parenteau-Bareil R., Cadau S., Berthod F. Concise review: tissue-engineered skin and nerve regeneration in burn treatment. Stem Cells Transl Med. 2013, vol. 2 (7), pp. 545–551.
3. Brandner J.M., Zorn-Kruppa M., Yoshida T., et al. Epidermal tight junctions in health and disease, 2015, vol. 3 (1-2), e974451.
4. Eadon M., Xu C. Endotoxemia alters tight junction gene and protein expression in the kidney. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, vol. 303 (6), pp. 821–830. doi: 10.1152/ajprenal.00023.2012.
5. Günzel D., Alan S. L. Yu. Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiol Rev, 2013, vol. 93 (2), pp. 525–569.
6. Kirschner N., Poetz C. Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. Am J Pathol, 2009, vol. 175 (3), pp. 1095–1106. doi: 10.2353/ajpath.2009.080973.
7. Koskela M., Gäddnäs F. Epidermal wound healing in severe sepsis and septic shock in humans. Crit Care, 2009, vol.13 (3), R100. doi: 10.1186/cc7932.
8. Koval M. Differential pathways of claudin oligomerization and integration into tight junctions. Tissue Barriers, 2013, vol. 1 (3), e24518. doi: 10.4161/tisb.24518.
9. Ohnemus U., Kohmeyer K., Houdek P. Regulation of Epidermal Tight-Junctions (TJ) during Infection with Exfoliative Toxin-Negative Staphylococcus Strains. Journal of Investigative Dermatology, 2008, vol. 128 (4), pp. 906–916. doi: 10.1038/sj.jid.5701070.
10. Song X.-M., Li J.-G., Wang Y.-L. The protective effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway against septic shock in rats. Shock, 2008, vol. 30,(4), pp. 468–472.
11. Sugawara T., Iwamoto N., Akashi M., Kojima T. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. J Dermatol Sci., 2013, vol. 70 (1), pp. 12–18. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.01.002.
12. Tokumasu R., Tamura A., Tsukita S. Time- and dose-dependent claudin contribution to biological functions: Lessons from claudin-1 in skin. Tissue Barriers, 2017, vol. 5 (3), e1336194. doi: 10.1080/21688370.2017.1336194.
13. Van Itallie C., Anderson J. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. Semin Cell Dev Biol., 2014, no. 36, pp. 157–165. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.08.011.
14. Yuki T., Haratake A., Koishikawa H. Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. Experimental Dermatology, 2011, vol. 16 (4), pp. 324–330. doi: 10.1111/j.1600-0625.2006.00539.x.

### Контактная информация

Демяшкин Григорий Александрович – к. м. н., доцент кафедры патологической анатомии им. академика А.И. Струкова, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, e-mail: dr.dga@mail.ru