

УДК 616.529.1 – 022.33 – 079: 612.015.349 – 077.3: 576.8

ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ КАДГЕРИНОВОГО КОМПЛЕКСА И ИХ РОЛЬ В ДИАГНОСТИКЕ ПРИ АУТОИММУННЫХ БУЛЛЕЗНЫХ ДЕРМАТОЗАХ

¹Махнева Н.В., ²Белецкая Л.В.

¹ГУ Московский областной научно-клинический исследовательский институт
им. М.Ф. Владимирского, Москва, e-mail: makhneva@mail.ru;

²ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов
им. ак. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России, Москва

Кадгеринины представляют собой разнообразную группу кальций-зависимых гликозилированных протеинов. Аномалия экспрессии или дисфункция этих молекул, приводят к серьезным деструктивным последствиям. При аутоиммунных буллезных дерматозах выявлено нарушение степени экспрессии кадгеринового комплекса вплоть до его исчезновения из нормальной локализации и появление извращенной его экспрессии в зоне базальной мембраны эпидермиса. Выявленные изменения экспрессии и локализации кадгеринов свидетельствуют о том, что под действием этиологических и патогенетических факторов происходит переключение функции одних генов на другие гены, т.е. при подавлении одних и активации других. Полученные сведения могут быть использованы в качестве дополнительных диагностических маркеров в дифференциальной диагностике аутоиммунных буллезных дерматозов.

Ключевые слова: кадгериновый комплекс, непрямой метод иммунофлюоресценции, аутоиммунные буллезные дерматозы

EXPRESSION OF CELL ADHESION MOLECULES OF CADHERIN COMPLEX AND THEIR ROLE IN DIAGNOSIS OF AUTOIMMUNE BULLOUS DERMATOSES

¹ Makhneva N.V., ²Beletskaya L.V.

¹Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, e-mail: makhneva@mail.ru;

²Institute of Transplantation and Artificial Organs, Moscow

Cadherins represent a diverse group of calcium-dependent glycosylated proteins. Anomaly of expression or dysfunction of these molecules lead to serious destructive consequences. In autoimmune bullous dermatoses infringement of degree expression of cadherin complex set up to its disappearance, where in norm it is localized and distorted appearance of its expression in the area of the basement membrane of epidermis. Identified molecular biological changes in the expression and localization of cadherins suggests that under the influence of etiologic and pathogenetic factors there is a switching of functions of the genes of one kind of cells to the genes of others, i.e. the suppression of one and activation of others. The obtained data can be used as additional diagnostic markers in the differential diagnosis of autoimmune bullous dermatoses.

Keywords: cadherin complex, indirect method of immunofluorescence, autoimmune bullous dermatoses

Кадгеринины представляют собой наиболее разнообразную группу кальций-зависимых гликозилированных протеинов. Они участвуют главным образом в межклеточных взаимодействиях, обеспечивающих адгезию между двумя идентичными молекулами, которые экспрессированы на поверхности двух клеток одного и того же типа [2, 5]. Цитоплазматический домен этих молекул играет важную роль в связи с протеинами цитоскелета, способствуя сохранению формы клеток [6]. Кроме физического контакта, который обеспечивают кадгеринины между двумя клетками, они способствуют передаче ряда сигналов через структуры цитоскелета, контролируя рост и дифференцировку клеток [5]. В коже молекулы адгезии обеспечивают сложную организацию, вовлекая эпителий, дерму, сосуды, нервы, железы. И любые изменения, связанные с аномалией экспрессии или дисфункцией этих молекул, могут привести к серьезным деструктивным последствиям [2, 3, 9].

Целью исследования явилось определение степени экспрессии кадгеринового комплекса при аутоиммунных буллезных дерматозах и возможности использования полученных данных в качестве дополнительного диагностического маркера при данных заболеваниях.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на основании клинического обследования и изучения биопсийного материала кожи больных аутоиммунными буллезными дерматозами.

Изучение степени экспрессии кадгеринового комплекса проведено непрямом методом иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител (MкАТ) мыши против кадгеринового комплекса, anti-pan cadherin (SIGMA, США) на 47 биоптатах клинически интактных участков кожи и биоптатах пораженных участков кожи 45 больных, из которых 23 больных аутоиммунной пузырчаткой (11 больных вульгарной пузырчаткой, 9 – себорейной пузырчаткой, один больной вегетирующей пузырчаткой, один – листовидной пузырчаткой, один – пранеопластической пузырчаткой), 16 больных буллезным пемфигоидом, 2 – линейным IgA-зависимым бул-

лезным дерматозом, 4 – приобретенным буллезным эпидермолизом. В качестве контроля использовали криостатные срезы разных видов тканей. Срезы кожи практически здоровых лиц, больных, страдающих дилатационной кардиомиопатией, срезы почек человека и срезы сердца быка. При этом экспрессия кадгеринового комплекса была выявлена в межклеточных пространствах базального и шиповатого слоев эпидермиса (рисунок а), волосяного фолликула, в стенке артериол дермы, во вставочных пластинках кардиомиоцитов, в местах межклеточных контактов почечных канальцев и клубочков.

Под местной анестезией 2,0%-м раствором новокаина проводилась биопсия кожи (из пораженных и клинически не пораженных участков) размером 0,5×0,5 см. Кусочки тканей замораживали при –20 °С. Серийные криостатные срезы толщиной 4–5 мкм готовили в микротом-криостате (–20 °С) и использовали в фиксированном виде (в 100%-м холодном (4 °С) ацетоне в течение 10 мин). Затем срезы промывали физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS), pH 7,0–7,4, в течение 3–5 мин. При нанесении МкАТ на срезы препараты выдерживали в течение 18 ч при 4 °С во влажной камере. После промывки в течение 3–5 мин PBS (pH 7,0–7,4) срезы обрабатывали люминесцирующей сывороткой против иммуноглобулинов мыши ((НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Г.Гамалеи АМН РФ; ИМТЕК, Москва) в течение 50–60 мин во влажной камере в термостате при 37,0–37,2 °С, вновь промывали PBS 3–5 мин и заключали под покровное стекло в 60%-й нейтральный глицерин. Исследовали препараты с помощью люминесцентного микроскопа LEITZ LABORLUX S (LEIKA). Препараты фотографировали на пленку РФ-3 с объективом х40 и окуляр-гомалем х3.

Часть срезов использовали в нефиксированном виде с целью обнаружения фиксированного иммуноглобулина в межклеточных пространствах и в зоне базальной мембраны эпидермиса при аутоиммунной пузырчатке и аутоиммунных буллезных дерматозах с поражением дермо-эпидермального соединения (буллезный пемфигоид, линейный IgA-зависимый буллезный дерматоз, приобретенный буллезный эпидермолиз) соответственно. Криостатные срезы, фиксированные 96° этанолом, окрашивали гематоксилином и эозином с целью морфологического контроля.

Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании как клинически интактных, так и пораженных участков кожи 23 больных с различными формами пузырчатки выявлено нарушение экспрессии кадгеринового комплекса. Так, во всех исследованных 11 случаях вульгарной пузырчатки, наряду с участками нормальной экспрессии кадгеринов в межклеточных пространствах, выявлено их исчезновение из этой локализации или маскировка при одновременной экспрессии кадгерин-положительного материала в роговом слое и/или на поверхности кожи (рисунок б). Кроме того, в 5 случаях дополнительно обнаружена перинуклеарная экспрессия в отдельных клеточных элементах базально-

го и шиповатого слоев с одновременной реакцией в зоне базальной мембраны эпидермиса. Подобную иммуногистохимическую картину наблюдали в случаях вегетирующей (1) и паранеопластической (1) пузырчатки. Если в случае вегетирующей пузырчатки отмечена только перинуклеарная экспрессия кадгеринов в отдельных клеточных элементах, то в случае паранеопластической пузырчатки – дополнительно участками и в зоне базальной мембраны эпидермиса. Кроме того, в том и другом случаях отмечено скопление кадгерин-положительного материала в роговом слое и секвестрация его на поверхность кожи.

Интересно, что экспрессия кадгеринового комплекса при вульгарной пузырчатке отмечалась преимущественно (в 8 случаях из 11) в межклеточных пространствах базального и шиповатого слоев эпидермиса. При этом интенсивность свечения при иммуногистохимической реакции была различной, от выраженной экспрессии кадгеринового комплекса до полного ее отсутствия в местах начала формирования внутриэпидермального пузыря. В случаях образования внутриэпидермального надбазального пузыря обнаружено парадоксальное явление: усиление экспрессии кадгеринов в супрабазальных слоях, составляющих покрывку пузыря.

Во всех 9 исследованных случаях себорейной пузырчатки в клинически интактных участках, а также в очагах поражения кожи выявлена четкая картина нарушения экспрессии кадгеринов: от различной степени экспрессии их в межклеточных пространствах базального и шиповатого слоев до полного исчезновения со скоплением специфического материала в роговом слое и секвестрацией его на поверхность кожи. При этом в месте формирования внутриэпидермального пузыря, как и в случае вульгарной пузырчатки, отмечена выраженная экспрессия кадгеринов в супрабазальных слоях эпидермиса, составляющих его покрывку. Кроме того, в 5 случаях из 9 дополнительно обнаружена перинуклеарная экспрессия в отдельных клеточных элементах, а в 3 других случаях – в зоне базальной мембраны эпидермиса.

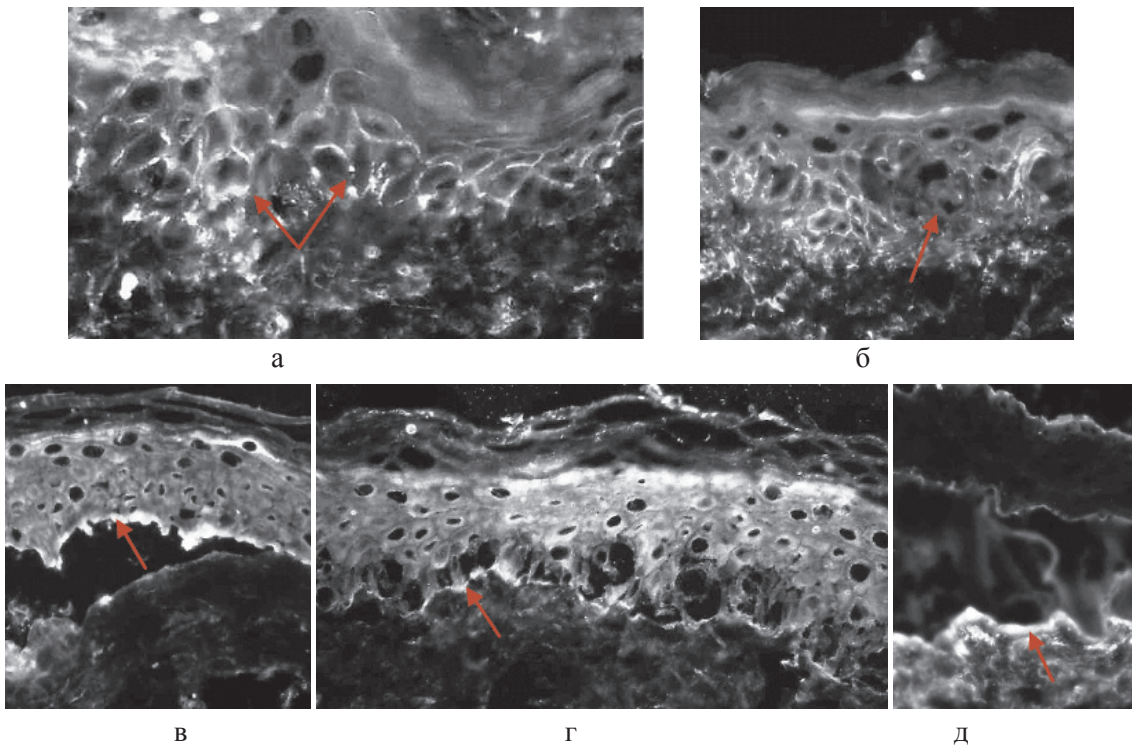
В местах формирования внутриэпидермальных пузырей отмечено поражение межклеточных соединений на более протяженных участках эпидермиса с участием всех его слоев и образованием как надбазальных (глубоких), так и поверхностных (на уровне зернистого слоя) внутриэпидермальных пузырей. Интересно, что у одного и того же больного можно наблюдать одновременно формирование пузырей на разных уровнях слоев эпидермиса. При этом усиление экспрессии кадгеринов выявлялось

в цитоплазме кератиноцитов верхних слоев эпидермиса, а в некоторых случаях (3 случая) одновременно и участками в зоне базальной мембраны эпидермиса.

При одновременном исследовании клинически интактных и пораженных участков кожи двух больных себорейной пузырьчаткой выявлена идентичная иммуноморфологическая картина – ослабление экспрессии кадгеринового комплекса на поверхности клеток базального и шиповатого слоев с периплазматической или перинуклеарной экспрессией в отдельных клеточных элементах и секвестрацией специфического материала на поверхность кожи. Причем в одном случае выявлена экспрессия в зоне базальной мембраны эпидермиса.

В случае листовидной пузырьчатки отмечено исчезновение экспрессии молекул адгезии кадгеринов в широких зонах эпидермиса, несмотря на морфологическую патологию классической локализации поверхностного внутриэпидермального пузыря с выраженной экспрессией в нем кадгеринового комплекса.

При исследовании криостатных срезов кожи больных буллезным пемфигоидом во всех 16 исследованных случаях выявлено нарушение экспрессии кадгеринового комплекса. Так, в большинстве случаев (в 14 из 16) наряду с участками сохранения кадгеринов на поверхности клеток эпидермиса, выявлено исчезновение или маскировка молекул адгезии с проявлением их экспрессии в зоне базальной мембраны эпидермиса и перинуклеарной зоне отдельных клеточных элементов со скоплением кадгерин-положительного материала под роговым слоем и секвестрацией на поверхность кожи. Экспрессия кадгеринового комплекса в зоне базальной мембраны эпидермиса отмечена в 10 случаях из 14, а в месте образования подэпидермального пузыря также – на его крышке и дне. При этом наиболее выраженная экспрессия наблюдалась на крышке подэпидермального пузыря (рисунков в). В двух случаях буллезного пемфигоида экспрессии кадгеринового комплекса не было отмечено ни в одной из структур эпидермиса.



*Экспрессия кадгеринового комплекса. Обработка моноклональными антителами к *rap-cadherin*. Непрямой метод иммунофлюоресценции. x400:*
а – криостатный срез практически здорового человека. Экспрессия кадгеринового комплекса в десмосомах межклеточных пространств (стрелка) эпидермиса; б – е: криостатные срезы клинически интактных участков кожи больных аутоиммунными буллезными дерматозами. Участки нормальной экспрессии кадгеринов перемежаются с участками подавления (стрелка) их экспрессии в десмосомах межклеточных пространств при аутоиммунной пузырьчатке (б); в – буллезный пемфигоид. Выраженная экспрессия кадгеринов на крышке (стрелка) подэпидермального пузыря; г – линейный IgA-зависимый буллезный дерматоз. Реакция в зоне базальной мембраны эпидермиса (стрелка) с секвестрацией специфического материала на поверхность кожи; д – приобретенный буллезный эпидермолиз. Выраженная реакция на дермальной части (стрелка) подэпидермального пузыря

В двух исследованных случаях линейного IgA-зависимого буллезного дерматоза отмечена перинуклеарная экспрессия молекул адгезии в некоторых кератиноцитах и в зоне базальной мембраны эпидермиса с секвестрацией кадгерин-положительного материала на поверхность кожи (рисунок г). Подобную иммуногистохимическую картину наблюдали и в 4 исследованных случаях приобретенного буллезного эпидермолиза. При этом в месте расслоения дермо-эпидермального соединения экспрессия молекул адгезии выявлена как на эпидермальной, так и на дермальной частях. Наиболее выраженная иммуногистохимическая реакция отмечена на дне подэпидермального пузыря (рисунок д).

Заключение

При различных аутоиммунных буллезных дерматозах (аутоиммунная пузырчатка, буллезный пемфигоид, линейный IgA-зависимый буллезный дерматоз, приобретенный буллезный эпидермолиз) происходит нарушение экспрессии белков кадгеринового комплекса вплоть до его исчезновения и проявления в тех структурах эпидермиса, где в норме он отсутствует [1]. Отсутствие экспрессии кадгеринового комплекса в межклеточных пространствах эпидермиса свидетельствует о вовлечении его в иммунопатологический процесс при аутоиммунных буллезных дерматозах. При этом кадгериновый комплекс при аутоиммунной пузырчатке является непосредственно антигеном-мишенью для аутоантител. При аутоиммунных буллезных дерматозах с поражением дермо-эпидермального соединения кадгерина вовлекаются опосредованно с одновременной извращенной их экспрессией в зоне базальной мембраны эпидермиса. Последнее явление было выявлено в большинстве случаев (72,7%) аутоиммунных буллезных дерматозов с поражением дермо-эпидермального соединения и в ряде случаев (26,1%) различных форм аутоиммунной пузырчатки, включая паранеопластический генез. Следует отметить, что при буллезном пемфигоиде и приобретенном буллезном эпидермолизе в месте образования подэпидермального пузыря экспрессия кадгеринового комплекса выявлена как на крышке пузыря, так и на его дне. Однако выраженная иммуногистохимическая реакция наблюдалась в месте локализации антигена-мишени. Вероятно, под действием патогенетических факторов происходит переключение экспрессии генов одних клеток на гены других (при подавлении одних

и активации других). Кроме того, при аутоиммунной пузырчатке вопреки логическому мышлению обнаружено парадоксальное явление усиления экспрессии кадгеринового комплекса в местах формирования внутриэпидермального пузыря. Возможно, это связано с компенсаторным эффектом этих функционально близких молекул адгезии, т.е. исчезновение одних молекул и появление других [8]. Подобное явление наблюдали и другие авторы при различных буллезных дерматозах [7]. Для объяснения такого необычного явления выдвигают несколько гипотез. Одна из них заключается в ассоциации синтеза кадгеринов с нарушенной пролиферацией и дифференцировкой клеток [4, 7], другая – с нарушением концентрации кальция в кератиноцитах или мутацией генов, кодирующих кальциевые насосы, ответственные за акантолиз [7, 10].

Под влиянием различных факторов, в том числе аутоантител, происходит диссоциация интра- и экстрацеллюлярных доменов кадгеринов. При этом экстрацеллюлярные домены кадгеринов отрываются от поверхности клеток в ходе акантолиза, но цитоплазматический домен остается на мембране, сохраняя связь с цитоскелетом, скрепляемый катенином. В ходе иммуногистохимических исследований этот цитоплазматический/внутриклеточный домен кадгерина является вполне достаточным для связывания антител, результатом чего оказываются положительные реакции в нетипичной локализации.

Таким образом, данное исследование позволило установить не только вовлечение кадгеринового комплекса в иммунопатологический процесс при аутоиммунных буллезных дерматозах, но и выявить особенности его экспрессии при данных заболеваниях. Последнее можно использовать в качестве дополнительного диагностического маркера для дифференциальной диагностики аутоиммунных буллезных дерматозов, в частности буллезного пемфигоида и приобретенного буллезного эпидермолиза. Такая диагностика аутоиммунных буллезных дерматозов в ранние сроки заболевания позволяет провести адекватную терапию с уменьшением риска продолжения углубления патологического процесса у больных, страдающих аутоиммунным буллезным дерматозом.

Список литературы

1. Махнева Н.В., Белецкая Л.В. Способ диагностики аутоиммунных буллезных дерматозов: патент России № 2352947.2009. Бюл. № 11.

2. Пальцев М.А., Иванов А.А. Межклеточные взаимодействия. – М.: Медицина, 1995. – 224 с.
3. Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation / M. Chidgey, C. Brakebusch, E. Gustafsson, A. Cruchley, C. Haill, S. Kirk, A. Mernitt, A. North, C. Tselepis, J. Hewitt // *J. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 155, № 5. – P. 821–832.
4. Expression of cadherin cell adhesion molecules during human skin development: morphogenesis of epidermis, hair follicles and eccrine sweat ducts / M. Fujita, F. Furukawa, K. Fujii, Y. Horiguchi, M. Takeichi, S. Imamura // *Arch. Dermatol. Res.* – 1992. – Vol. 284, № 3. – P. 159–166.
5. Getsios S., Huen A.C., Green K.L. Working out the strength and flexibility of desmosomes // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 5, № 4. – P. 271–281.
6. Kottke M., Delva E., Kowalczyk A.P. The desmosome: cell science lessons from human diseases // *J. Cell Sci.* – 2006. – Vol. 119, Pt. 5. – P. 797–806
7. Immunohistochemical examination of P-cadherin in bullous and acantholytic skin diseases / A. Kovacs, E. Schmidt, A. Begany, J. Hunyadi, A. Szegedi // *Acta Derm.Venereol.* – 2004. – Vol. 84, № 2. – P. 116–119.
8. Postnatal lethality of P-cadherin/desmoglein3 double knockout mice: demonstration of a cooperative effect of these cell adhesion molecule in tissue homeostasis of stratified squamous epithelia / J.M. Lenox, P.J. Koch, M.G. Mahoney, M. Lieberman, J.R. Stanley, G.L. Radice // *J. Invest. Dermatol.* – 2000. – Vol. 114, № 5. – P. 948–952.
9. Nicolas J.F., Staquet M.J. Molecules de l'adhérence cellulaire et pathologie cutanée // *Ann. Dermatol. Venereol.* – 1995. – Vol. 122, № 1–2. – P. 50–57.
10. Mutations in ATP2C1, encoding a Ca²⁺ pump, cause Darier disease / A. Sakuntabhai, V. Ruiz-Perez, S. Carter, N. Jacobsen, S. Burge, S. Monk, M. Smith, C.S. Munro, M. O'Donovan et al. // *Nat. Genet.* – 1999. – Vol. 21, № 3. – P. 271–277.

Рецензенты:

Сускова В.С., д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунодиагностики и иммунокоррекции ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России, г. Москва;

Снарская Е.С., д.м.н., профессор кафедры кожных и венерических болезней факультета послевузовского профессионального образования врачей ГОУ ВПО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздравсоцразвития РФ, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 28.11.2011.