

Махнева Н.В.

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ ДЕСМОСОМАЛЬНОГО АППАРАТА И ЦИТОСКЕЛЕТА ЭПИДЕРМИСА ПРИ БОЛЕЗНИ ХЕЙЛИ–ХЕЙЛИ

Кафедра дерматовенерологии и дерматоонкологии факультета усовершенствования
врачей ГБУ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», 129110, г. Москва, Россия

Болезнь Хейли–Хейли (доброкачественная хроническая семейная пузырчатка Гужеро–Хейли–Хейли) – наследственный везикуло-буллезный дерматоз, при котором морфологические изменения возникают в результате мутаций гена ATP2C1, приводящих к аномальному расположению молекул межклеточной адгезии. Считают, что в развитии патологии могут участвовать как белки внутренней поверхности плазматической мембраны кератиноцитов, так и десмосомальные и адгезивные молекулы межклеточных соединений эпидермиса. В работе представлены результаты иммуногистохимического исследования по изучению распределения десмосомальных кадгеринов (десмоглеины 1, 2, 3), протеинов десмосомальной пластины (плакоглобин, десмоплакин I, периплакин), молекул межклеточных соединений (Е-кадгерин, кадгериновый комплекс) десмосомального аппарата и белков цитоскелета (цитокератины 5, 14, супрабазальных слоев эпидермиса) в клинически интактных и пораженных участках кожи больных, страдающих болезнью Хейли–Хейли. Обнаружено нарушение локализации изучаемых белковых компонентов системы межклеточных соединений и цитоскелета: от выраженной иммуногистохимической реакции вплоть до исчезновения и появления в местах не типичных для ее локализации. Так, наиболее выраженная экспрессия белковых молекул наблюдалась в местах акантолиза и формирования внутриэпидермальных пузырей с проникновением специфического материала в цитоплазму некоторых кератиноцитов и акантолитических клеток. При этом в клинически интактных участках кожи больных наиболее интенсивное повреждение (практически полное отсутствие экспрессии или ее «маскировка») выявлено с кадгериновыми молекулами адгезии. Парадоксальное явление – внутриядерное и/или перинуклеарное свечение – отмечено с цитокератином 5, десмоглеинами и кадгеринами. Сложный механизм развития болезни Хейли–Хейли с вовлечением различных белковых молекул адгезии и компонентов системы межклеточного соединения требуют продолжения детального изучения экспрессии многочисленных молекул адгезии, ассоциированных с системой межклеточных соединений. Приобретенные знания приведут к пониманию последовательности событий развития патологии (акантолиза) и выявлению ряда дополнительных дифференциально-диагностических признаков болезни Хейли–Хейли.

Ключевые слова: болезнь Хейли–Хейли; иммуногистохимическая картина; десмоглеин I; десмоглеин 2; десмоглеин 3; плакоглобин; десмоплакин I; периплакин; кадгериновый комплекс; Е-кадгерин; цитокератин 5; цитокератин 14; цитокератины дифференцированных слоев эпидермиса.

Для цитирования: Махнева Н.В. Экспрессия белковых компонентов десмосомального аппарата и цитоскелета эпидермиса при болезни Хейли–Хейли. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2017; 20(1): 21-29. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9588-2017-20-1-21-29>

Makhneva N.V.

EXPRESSION OF PROTEIN COMPONENTS DESMOSOMAL APPARATUS AND CYTOSKELETON OF THE EPIDERMIS IN HAILEY–HAILEY DISEASE

Department of dermato-venereology and dermato-oncology, Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, 129110, Russian Federation

Hailey–Hailey disease (benign familial chronic pemphigus Guzhero-Hailey-Hailey) – hereditary vesiculobullous dermatosis, where mutation of ATP2C1 gene results in morphological changes, which cause an abnormal location of molecules in intercellular adhesion. It is believed that the pathology may involve both the inner surface of the plasma membrane proteins of keratinocytes and desmosomal and adhesion molecules in epidermal intercellular connections. This present research provides the results of immunohistochemical study on the distribution of desmosomal cadherin (desmogleins 1, 2, 3), desmosomal proteins (plakoglobin, desmoplakin I, periplakin), intercellular junctions molecules (E-cadherin, cadherin complex) in desmosomal apparatus and cytoskeletal proteins (cytokeratins 5, 14, suprabasal layers of epidermis) in clinically intact and affected skin of patients with Hailey–Hailey disease. The research also detected violation in localization of the protein components in the system of intercellular junctions and the cytoskeleton from severe immunohistochemical reaction to disappearance and appearance in places not typical for its localization. Thus, the most severe expression of protein molecules was observed in the areas of acantholysis and the formation of intra-epidermal blisters with the penetration of specific material into the cytoplasm of keratinocytes and some acantholytic cells. Besides, in the clinically intact skin areas of patients the most intense damage (almost complete absence of expression or its “masking”) was identified as a damage with the cadherin adhesion molecules. The paradoxical phenomenon – intranuclear and/or perinuclear luminescence was marked by cytokeratin 5, desmogleins and cadherins. The complex mechanism of Hailey–Hailey disease involving various adhesion molecules and protein components of intercellular connections system

requires ongoing detailed study of the expression of multiple adhesion molecules associated with the system of intercellular junctions. The acquired knowledge will bring understanding of the sequence of events in pathology (acantholysis) development and the identification of a number of additional differential diagnostic signs of Hailey–Hailey disease.

Key words: Hailey–Hailey disease; immunohistochemical pattern; desmoglein 1; desmoglein 2; desmoglein 3; plakoglobin; desmoplakin I; periplakin; pan-cadherin; E-cadherin; cytokeratin 5; cytokeratin 14; cytokeratins of suprabasal cells.

For citation: Makhneva N.V. Expression of protein components desmosomal apparatus and cytoskeleton of the epidermis in disease Hailey–Hailey. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskiy Zhurnal Kozhnykh i Venericheskikh Bolezney)*. 2017; 20(1): 21–29. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9588-2017-20-1-21-29>

Acknowledgments. The author is grateful to the mentor and teacher – Professor L.V. Beletskaya (1923–2016), and members of the laboratory for transplantation immunology “Federal Research Center of Transplantation and Artificial Organs n.a. academician V.I. Shumakov” for the opportunity to carry out this experimental work.

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

Received 10 Jan 2017

Accepted 24 Jan 2017

Болезнь Хейли–Хейли (доброкачественная хроническая семейная пузырчатка Гужеро–Хейли–Хейли) – везикуло-буллезный дерматоз с аутосомно-доминантным типом наследования. Основным патогистологическим признаком данного генодерматоза является акантолиз (разрушение межклеточных контактов между кератиноцитами) с формированием внутриэпидермальных щелей и пузырей [1–4]. Ранее было показано, что ген, ответственный за развитие болезни, локализуется на хромосоме 3q21-q24 [5, 6]. Позднее продемонстрировано, что морфологические изменения возникают в результате мутаций гена *ATP2C1*, кодирующего аденозин трифосфат-питающие кальциевые (Ca^{2+}) насосы [7–10]. Однако роль Ca^{2+} -насосов в регуляции клеточной адгезии между кератиноцитами пока не имеет четкого научного объяснения. Предполагают, что увеличение концентрации цитозольного кальция и уменьшение ее в аппарате Гольджи при болезни Хейли–Хейли приводит к снижению гликозилирования и неправильному (дефектному) расположению молекул межклеточной адгезии [11]. Результатом последнего является повреждение десмосомального аппарата эпидермиса. При этом считают, что в развитии патологии могут участвовать как белки внутренней поверхности плазматической мембраны кератиноцитов, так и десмосомальные и адгезивные молекулы межклеточных соединений эпидермиса [3, 12, 13].

Целью настоящего исследования явилось изучение иммуногистохимической картины распределения некоторых белковых компонентов десмосомального аппарата и цитоскелета эпидермиса у больных, страдающих болезнью Хейли–Хейли.

Для корреспонденции:

Махнева Наталья Викторовна, доктор мед. наук, профессор кафедры дерматовенерологии и дерматоонкологии факультета усовершенствования врачей ГБУ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», 129110, г. Москва. E-mail: makhneva@mail.ru.

For correspondence:

Makhneva Natalie V., MD, PhD, Professor, Department of Dermatology and Dermatooncology, Postgraduate Training Faculty, Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, 129110, Russian Federation. E-mail: makhneva@mail.ru.

Information about authors:

Makhneva N.V., <http://orcid.org/0000-0001-6238-1804>.

Материал и методы

Исследованы криостатные срезы клинически интактных и пораженных участков кожи 21 больного болезнью Хейли–Хейли непрямым методом иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител и люминесцирующей сыворотки против иммуноглобулинов мыши или кролика (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАН РФ; ИМТЕК, Москва) (см. таблицу).

Серийные криостатные срезы толщиной 4–5 мкм готовили в криостате ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) и использовали в нефиксированном или фиксированном виде (см. таблицу). Подсушивали, промывали физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS), pH 7,0–7,5, в течение 3–5 мин с последующим нанесением антител на срезы. После каждой инкубации препараты промывали в течение 3–5 мин PBS (pH 7,0–7,5), подсушивали и заключали под покровное стекло в 60% нейтральный глицерин. Исследовали препараты с помощью люминесцентного микроскопа LABORLUX (“LEIKA”) с объективом $\times 40$.

Диагноз каждого больного, страдающего болезнью Хейли–Хейли был основан на типичной клинической картине, семейном анамнезе и характерных гистопатологических признаках заболевания [1, 2, 4, 14]. В качестве контроля были исследованы криостатные срезы кожи здоровых лиц.

Результаты

Состояние экспрессии белковых компонентов десмосомального аппарата и цитоскелета многослойного плоского эпителия изучали как в клинически интактном, так и пораженном участках кожи больных болезнью Хейли–Хейли. При этом в клинически интактных участках кожи каждого больного наблюдалась микроскопическая картина начинающегося акантолиза с формированием внутриэпидермальных щелей и пузырей.

При болезни Хейли–Хейли картина экспрессии изучаемых антигенных структур тканей кожи больных отличалась от таковой, которая наблюдалась у здоровых лиц. Кроме того, выявлен ряд отличий иммунолокализации белковых молекул в тканевых структурах вблизи акантолиза и внутриэпидермального пузыря от клинически на вид здорового участка кожи больных.

Антитела к некоторым белковым компонентам десмосомального аппарата и цитоскелета эпидермиса, используемые в настоящем исследовании, и условия выявления изучаемых белков кожи

Антигены и антитела	Разведение	Специфичность	Фирма производитель	Условия подготовки криостатных срезов	Условия обработки криостатных срезов	
					Mab/Pab	люминесцирующей сывороткой
Десмосомальные протеины:						
<i>Десмосомальные кадгерины:</i>						
• dsg1 (H-290) (Pab ²)	1:10	Десмоглеин 1	“Santa Cruz Biotechnology, Inc.”, Европа	Фиксация в 100% холодном (4 °C) ацетоне в течение 5 мин	18 ч во влажной камере при температуре 4 °C	50 мин во влажной камере в термостате при температуре 37–37,2°C
• dsg2 (H-145) (Pab ²)	1:10	Десмоглеин 2	“Santa Cruz Biotechnology, Inc.”, Европа	Фиксация в 100% холодном (4 °C) ацетоне в течение 5 мин	18 ч во влажной камере при температуре 4 °C	50 мин во влажной камере в термостате при температуре 37–37,2°C
• dsg3 (5G11) (Mab ¹)	1:10	Десмоглеин 3	“Santa Cruz Biotechnology, Inc.”, Европа	Фиксация в 100% холодном (4 °C) ацетоне в течение 5 мин	18 ч во влажной камере при температуре 4 °C	50 мин во влажной камере в термостате при температуре 37–37,2°C
<i>Протеины десмосомальной пластины:</i>						
Белки семейства арматилло • plakoglobin (g-Catenin) (Mab ¹)	1:10	Плакоглобин	ZYMED Laboratories invitrogen immunodetection”, South San Francisco, США	Фиксация в 100% холодном (4 °C) ацетоне в течение 5 мин	18 ч во влажной камере при температуре 4 °C	50 мин во влажной камере в термостате при температуре 37–37,2°C
Белки семейства плакинов • desmosomal protein (ZK-31) (Mab ¹)	1:500	Десмоплакин I	“Santa Cruz Biotechnology, Inc.”, Европа	Фиксация в 100% холодном (4 °C) ацетоне в течение 5 мин	45 мин во влажной камере при комнатной температуре или в термостате при температуре 37–37,2°C или 18 ч при температуре 4 °C	30 мин во влажной камере при температуре 37–37,2°C
• periplakin (AE11) (Mab ¹)	1:10	Периплакин	“Santa Cruz Biotechnology, Inc.”, Европа	Фиксация в 100% холодном (4 °C) ацетоне в течение 5 мин	18 ч во влажной камере при температуре 4°C	50 мин во влажной камере в термостате при температуре 37–37,2°C
Белковые молекулы адгезии в местах сцепления межклеточных соединений						
• pan cadherin (CH-19) (Mab ¹)	1:500	Кадгериновый комплекс, характерный для разных видов и тканей (E-Cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin, V-Cadherin, R-Cadherin, T-Cadherin)	“Sigma”, США	Фиксация в 100% холодном (4 °C) ацетоне в течение 5 мин	18 ч во влажной камере при температуре 4 °C	50 мин во влажной камере в термостате при температуре 37–37,2°C
• rmE-cadherin/Fc-chimera recombinant mous (NSO-derived) (Mab ¹)	1:10	Е-кадгерин	“DakoCytomation”, Дания	Фиксация в 100% холодном (4°C) ацетоне в течение 5 мин	18 ч во влажной камере при 4 °C	50 мин во влажной камере в термостате при температуре 37–37,2 °C
Белки цитоскелета						
• Базально-клеточный антиген (A6/1)* (Mab ¹)	1:10	Цитокератин 5	НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАН РФ, Москва	Без предварительной обработки	18 ч во влажной камере при 4 °C	30 мин во влажной камере при комнатной температуре
• Базально-клеточный антиген (A4)* (Mab ¹)	1:10	Цитокератин 14	НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАН РФ, Москва	Без предварительной обработки	18 ч во влажной камере при 4 °C	30 мин во влажной камере при комнатной температуре

Продолжение табл. на стр. 24

Продолжение таблицы

Антигены и антитела	Разведение	Специфичность	Фирма производитель	Условия подготовки криостатных срезов	Условия обработки криостатных срезов	
					Mab/Pab	люминесцирующей сывороткой
• Антигены клеток дифференцированных слоев эпидермиса (B5/1)* (Mab ¹)	1:10	Цитokerатины надбазальных слоев эпидермиса	НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАН РФ, Москва	Без предварительной обработки	18 ч во влажной камере при 4 °С	30 мин во влажной камере при комнатной температуре
• Общий антиген кератиноцитов как низкодифференцированных, так и высокодифференцированных слоев эпидермиса (MM)* (Mab ¹)	1:10	Цитokerатины всех слоев эпидермиса	НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАН РФ, Москва	Без предварительной обработки	18 ч во влажной камере при 4°С	30 мин во влажной камере при комнатной температуре

Примечание. Mab – monoclonal antibody (моноклональные антитела); Pab – polyclonal antibody (поликлональные антитела); 1 – мышинные антитела; 2 – кроличьи антитела; * – Mab любезно предоставлены Э.И. Дробышевой.

Десмосомальные кадгерин (десмоглеины)

В норме десмоглеины 1, 2, 3 экспрессируются в плазматической мембране кератиноцитов [3, 15, 16]. При этом десмоглеин 1 представлен преимущественно в клетках нижних слоев (базальный, шиповатый) эпидермиса, десмоглеин 3 – преимущественно в

клетках верхних (шиповатый, зернистый) слоев эпидермиса, десмоглеин 2 – исключительно в клетках базального слоя эпидермиса (рис. 1, а–в).

При исследовании криостатных срезов кожи больных болезнью Хейли–Хейли независимо от места взятия биопсийного материала выявлено нарушение

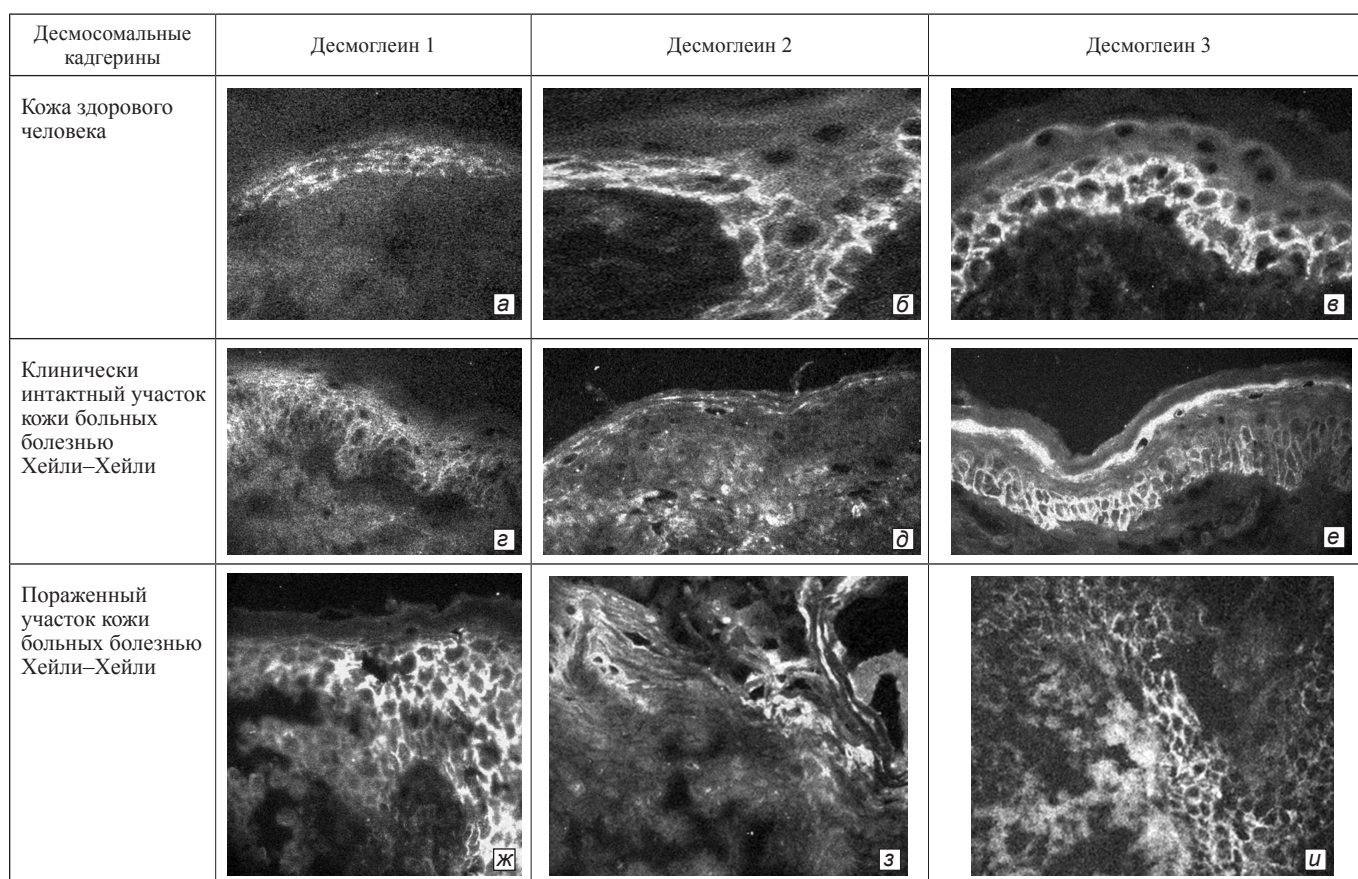


Рис. 1. Локализация десмосомальных кадгерин в тканевых структурах эпидермиса. Обработка моноклональными антителами к десмоглеинам 1, 2, 3. Непрямой метод иммунофлюоресценции. Ув. 400.

а–в – криостатные срезы кожи здорового человека: десмоглеин 1 (а) выявляется в межклеточных пространствах шиповатого и зернистого слоев эпидермиса; десмоглеин 2 (б) – в межклеточных пространствах базального слоя; десмоглеин 3 (в) – в межклеточных пространствах базального и шиповатого слоев эпидермиса; г–е – криостатные срезы клинически интактных участков кожи больных болезнью Хейли–Хейли. На фоне нормальной локализации десмоглеина 1 (г), десмоглеина 2 (д), десмоглеина 3 (е) отмечается снижение их экспрессии вплоть до полного исчезновения и появления специфического материала на поверхности кожи с перинуклеарным/внутридермальным включением в некоторых кератиноцитах (д, е); ж–и – криостатные срезы пораженных участков кожи больных болезнью Хейли–Хейли. В местах акантолиза и внутриэпидермального пузыря отмечается выраженная экспрессия десмоглеина 1 (ж), десмоглеина 2 (з), десмоглеина 3 (и) с проникновением специфического материала в цитоплазму некоторых кератиноцитов и акантолитических клеток.

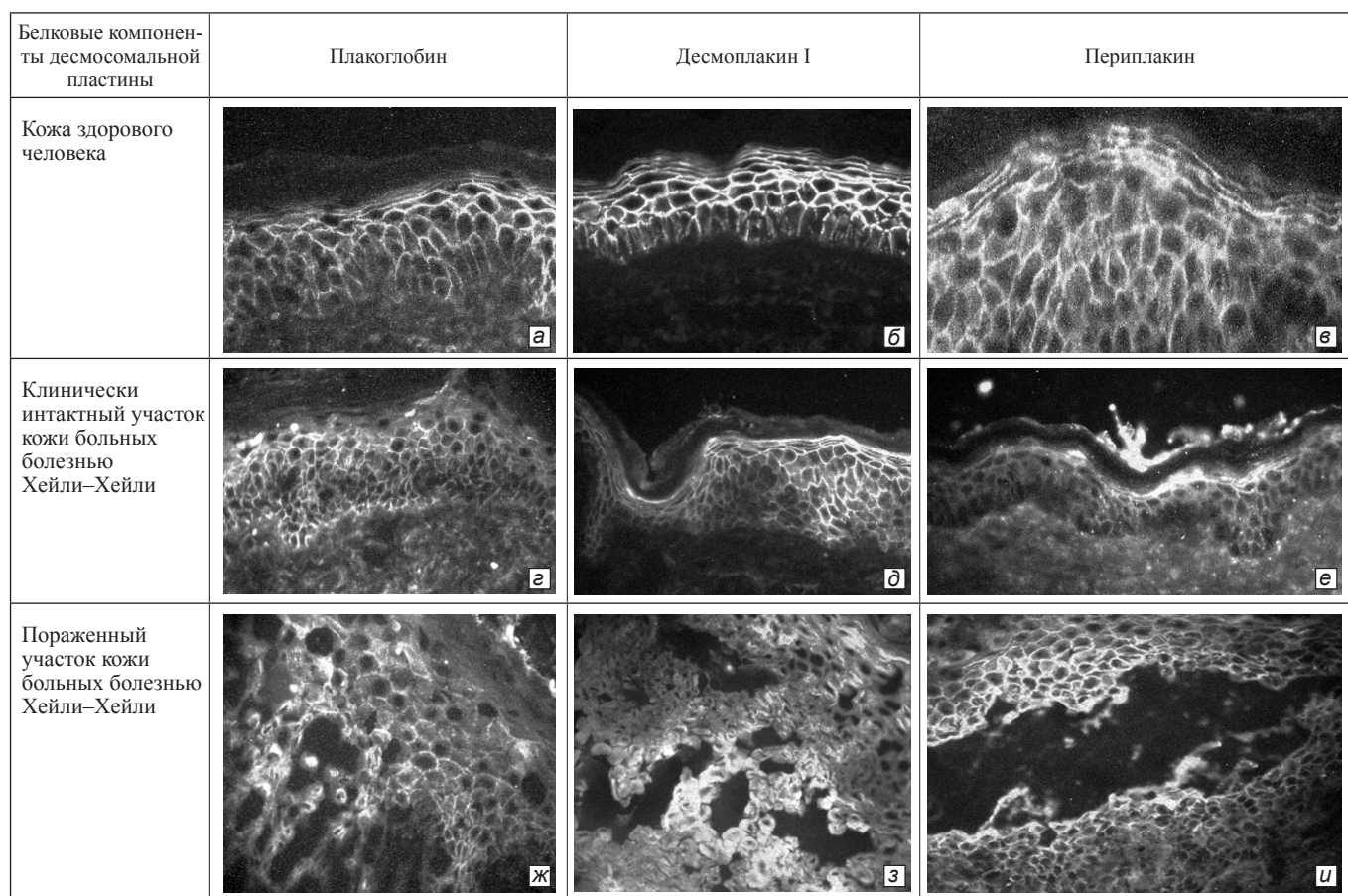


Рис. 2. Локализация протеинов десмосомальной пластины в тканевых структурах эпидермиса. Обработка моноклональными антителами к плакоглобину, десмоплакину I и периплакину. Непрямой метод иммунофлюоресценции. Ув. 400.

a–e – криостатные срезы кожи здорового человека: экспрессия плакоглобина (*a*), десмоплакина I (*b*) и периплакина (*e*) в межклеточных пространствах всех слоев эпидермиса; *z–e* – криостатные срезы клинически интактных участков кожи больных болезнью Хейли-Хейли. На фоне нормальной локализации плакоглобина (*z*), десмоплакина I (*d*), периплакина (*e*) отмечаются участки снижения их экспрессии с секвестрацией специфического материала на поверхность кожи; *ж–u* – криостатные срезы пораженных участков кожи больных болезнью Хейли-Хейли. В местах акантолиза и внутриэпидермального пузыря отмечается выраженная экспрессия плакоглобина (*ж*), десмоплакина I (*z*), периплакина (*u*) с проникновением специфического материала в цитоплазму некоторых кератиноцитов и секвестрацией его на поверхность кожи.

экспрессии десмоглеинов (1, 2, 3) в виде изменения интенсивности иммунофлюоресцентной реакции в системе десмосомального аппарата вплоть до ее исчезновения и появления специфического материала на поверхности кожи с внутриядерным, перинуклеарным или диффузным цитоплазматическим свечением в единичных кератиноцитах (рис. 1, *z–u*). В местах, расположенных непосредственно вблизи пузыря, наблюдалась выраженная экспрессия десмоглеинов (1, 2, 3) в межклеточных пространствах эпидермиса с проникновением специфического материала в цитоплазму акантолитических клеток (при их наличии).

Протеины десмосомальной пластины (внутриклеточные молекулы десмосом)

В коже здорового человека протеины десмосомальной пластины – плакоглобин, десмоплакин I и периплакин – экспрессируются в плазматической мембране кератиноцитов всех слоев эпидермиса [3, 12, 15] (рис. 2, *a–e*).

При исследовании как клинически интактных, так и пораженных участков кожи больных болезнью Хейли-Хейли выявлено нарушение экспрессии плакоглобина, десмоплакина I и периплакина. Так, при исследовании клинически интактных участков кожи больных данным генодерматозом наряду с участками

нормальной экспрессии выше указанных протеинов десмосомальной пластины в межклеточных пространствах эпидермиса выявлено их подавление с экспрессией специфического положительного материала на поверхности кожи (рис. 2, *z–e*). При этом в участках формирования внутриэпидермальных щелей экспрессия протеинов десмосомальной пластины носила более выраженный характер. Подобное явление наблюдали и при исследовании пораженных участков кожи больных болезнью Хейли-Хейли: наряду с нормальной экспрессией плакоглобина, десмоплакина I и периплакина наблюдалась картина выраженной их экспрессии как в местах формирования пузыря, так и в близко расположенных участках от него с появлением этих протеинов в цитоплазме кератиноцитов, а в ряде случаев – на поверхности кожи (рис. 2, *ж–u*). Это связано с перераспределением экспрессии данных протеинов для поддержания сохранности и функциональной способности кожи [17]. В ряде случаев одновременно с участками нормальной и/или выраженной экспрессии протеинов десмосомальной пластины можно было наблюдать участки снижения интенсивности свечения иммунофлюоресцентной реакции в межклеточных пространствах эпидермиса со скоплением специфического

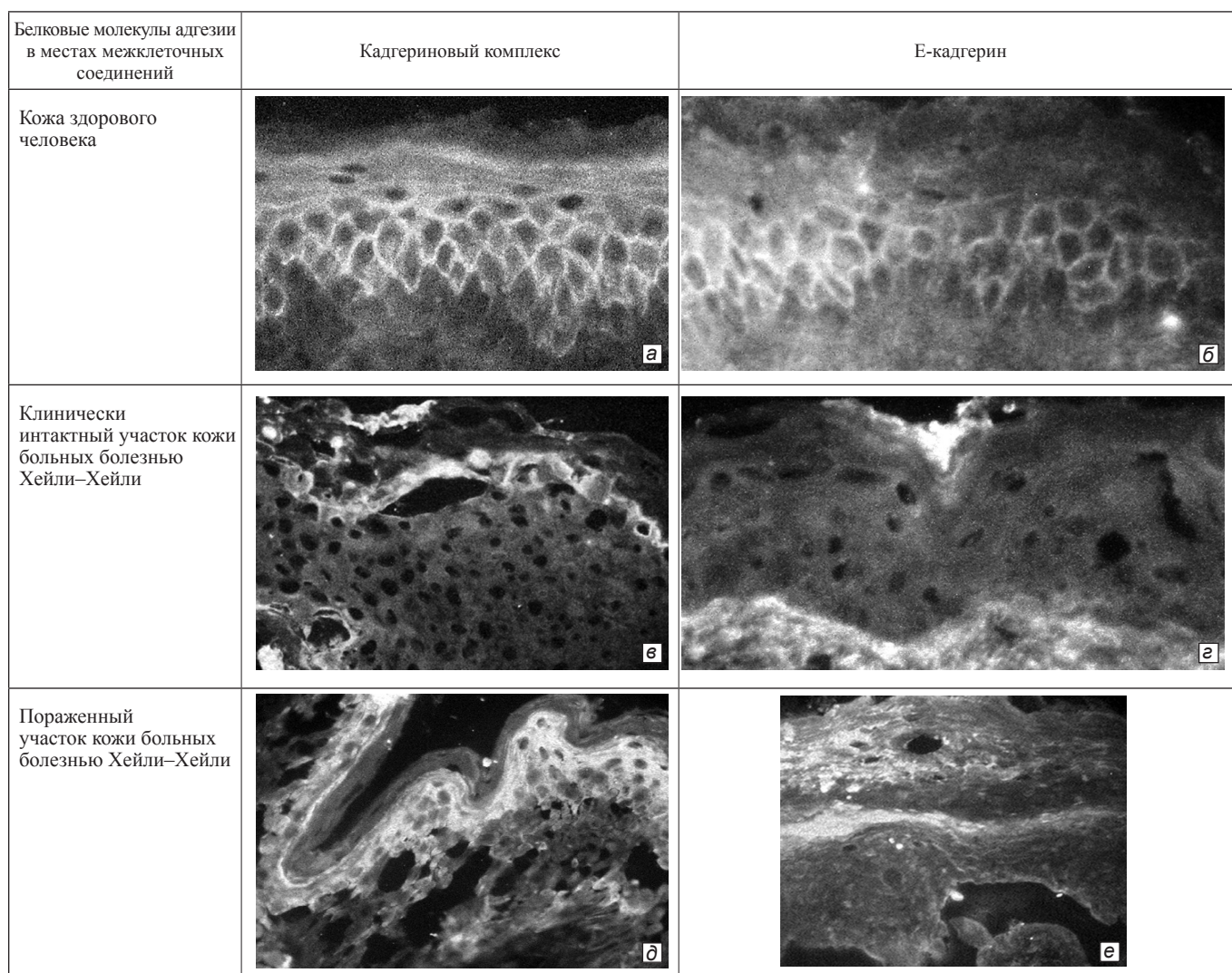


Рис. 3. Локализация белковых молекул адгезии в местах межклеточных соединений в тканевых структурах эпидермиса. Обработка моноклональными антителами к кадгериновому комплексу и Е-кадгерину. Непрямой метод иммунофлюоресценции. Ув. 400.

a, б – криостатные срезы кожи здорового человека: экспрессия кадгеринового комплекса (*a*) и Е-кадгерина (*б*) в межклеточных пространствах базального и шиповатого слоев эпидермиса; *в, з* – криостатные срезы клинически интактных участков кожи больных болезнью Хейли–Хейли. Отсутствие экспрессии кадгеринового комплекса (*в*) и Е-кадгерина (*з*) в межклеточных пространствах эпидермиса со специфической иммунофлюоресцентной реакцией в роговом слое эпидермиса и на его поверхности; *д, е* – криостатные срезы пораженных участков кожи больных болезнью Хейли–Хейли. На фоне подавления экспрессии кадгеринового комплекса (*д*) и Е-кадгерина (*е*) отмечается выраженная реакция иммунофлюоресценции в местах формирования внутриэпидермального пузыря с проникновением специфического материала в цитоплазму кератиноцитов супрабазальных слоев эпидермиса (*д*) и секвестрацией его на поверхность кожи (*е*).

ческого материала в роговом слое и секвестрацией его на поверхности кожи. Это связано с выделительной функцией кожи и элиминацией патологического материала на ее поверхность [17]. В случае полной отслойки эпидермиса от дермы, как завершения патологического процесса, наблюдалась выраженная экспрессия протеинов в цитоплазме кератиноцитов низкодифференцированных и дифференцированных слоев эпидермиса, составляющих дно эрозивного дефекта.

Белковые молекулы адгезии в местах межклеточных соединений

В коже здорового человека кадгериновый комплекс и Е-кадгерин экспрессируются в межклеточных пространствах базального и шиповатого слоев эпидермиса (рис. 3, *a, б*) [3, 17, 18].

При исследовании различных участков кожи больных болезнью Хейли–Хейли выявлено нарушение экспрессии Е-кадгерина и кадгеринового комплекса.

Так, при исследовании клинически интактных участков кожи больных данным генодерматозом выявлено отсутствие экспрессии кадгеринов в межклеточных пространствах эпидермиса или их маскировка с экспрессией кадгеринположительного материала в роговом слое и/или на поверхности кожи (рис. 3, *в, з*). При этом в ряде случаев можно было наблюдать перинуклеарную или внутриядерную экспрессию в отдельных клеточных элементах эпидермиса, а в местах формирования внутриэпидермального пузыря – в цитоплазме единичных кератиноцитов, расположенных непосредственно вблизи пузыря.

При исследовании пораженных участков кожи больных болезнью Хейли–Хейли наряду с подавлением или маскировкой экспрессии Е-кадгерина и кадгеринового комплекса со скоплением кадгеринположительного материала прослойками в роговом слое и секвестрацией его на поверхность кожи наблюдали парадоксальное явление в местах начинающегося

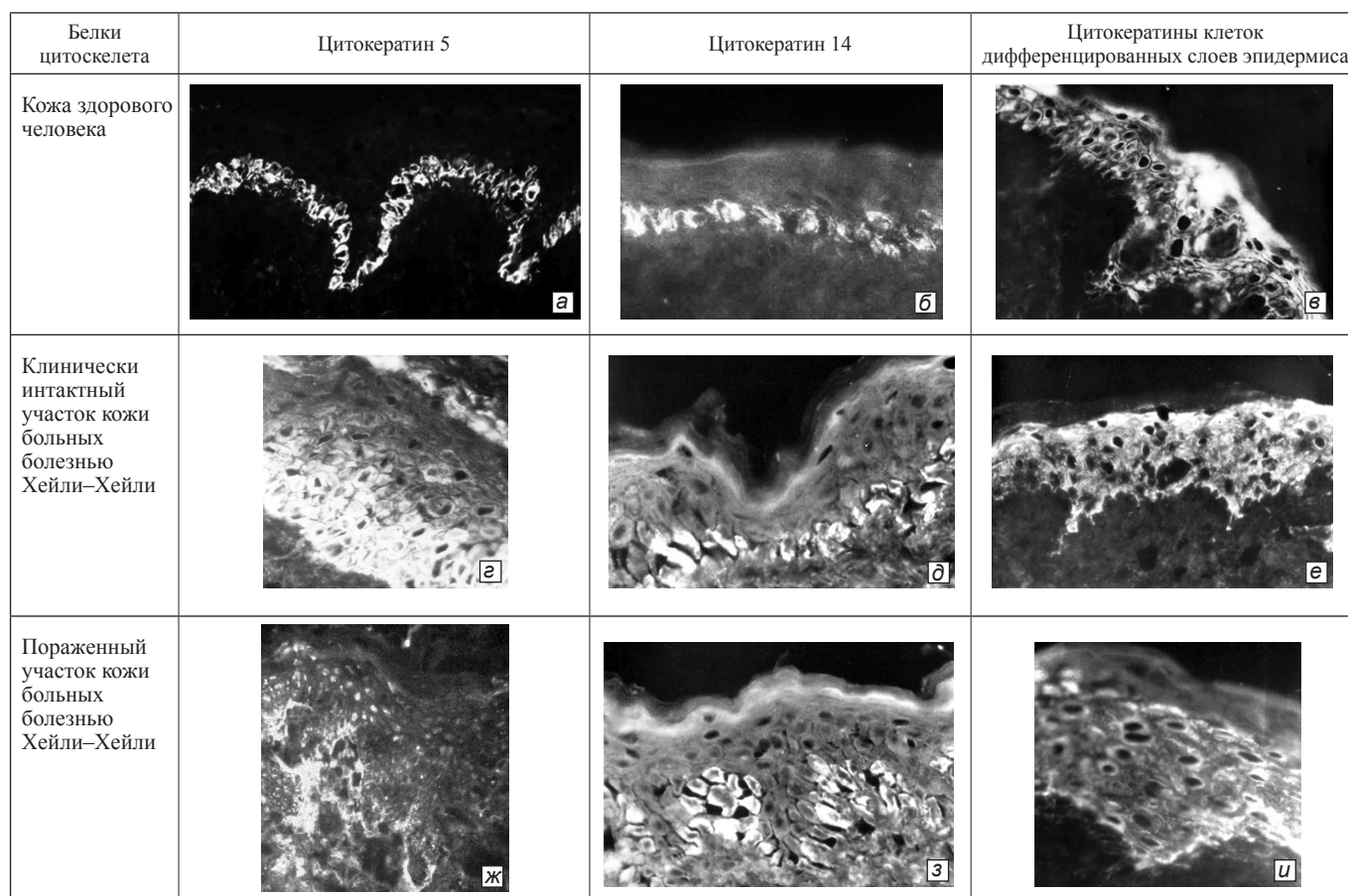


Рис. 4. Локализация протеинов цитоскелета в тканевых структурах эпидермиса. Обработка моноклональными антителами к цитокератину 5, цитокератину 14 и цитокератинам дифференцированных слоев эпидермиса. Непрямой метод иммунофлюоресценции. Ув. 400. *a–в* – криостатные срезы кожи здорового человека: реакция иммунофлюоресценции в цитоплазме клеток базального (*a, б*) и дифференцированных (*в*) слоев эпидермиса; *z–e* – криостатные срезы клинически интактных участков кожи больных болезнью Хейли–Хейли: *z* – синтез цитокератина 5 в базальном и дифференцированных слоях эпидермиса со скоплением специфического материала в роговом слое эпидермиса; *д* – участки снижения синтеза цитокератина 14 клетками базального слоя эпидермиса; *е* – сохранение синтеза цитокератинов клетками надбазальных слоев эпидермиса; *жс–и* – криостатные срезы пораженных участков кожи больных болезнью Хейли–Хейли: *жс* – отсутствие синтеза цитокератина 5 в базальном слое эпидермиса с внутриядерным/перинуклеарным свечением в кератиноцитах дифференцированных слоев эпидермиса и специфической иммунофлюоресцентной реакцией в цитоплазме разрушенных кератиноцитов в местах акантолиза; *з* – участки снижения с участками полного подавления синтеза цитокератина 14; *и* – снижение синтеза цитокератинов дифференцированных слоев эпидермиса (ослабление иммунофлюоресцентной реакции в шиповатом слое эпидермиса).

акантолиза и формирования надбазального пузыря в виде выраженной экспрессии кадгеринов в супрабазальных слоях эпидермиса с цитоплазматической иммуногистохимической реакцией в диссоциированных и акантолитических клетках эпидермиса (рис. 3, *д, е*).

Белки цитоскелета

Цитоскелет, как известно, представляет собой совокупность нерастворимых макромолекул протеиновой природы, которые присутствуют в цитоплазме всех эукариотических клеток. Эти белки (цитокератины) играют важную роль в функциональной подвижности клеток и их способности к сокращению, а также участвуют в поддержании клеточной формы и транспортировке веществ [19, 20]. В многослойном плоском эпителии каждая клетка синтезирует определенные белки цитоскелета в зависимости от стадии эмбрионального развития или дифференцировки [21, 22]. При этом цитокератины всегда экспрессируются парой, состоящей из одного кислого цитокератина, другого – основного цитокератина, который всегда имеет более высокий молекулярный вес, чем кислый [23, 24]. Так, в коже практически здорового человека цитокератины 5 и 14 синтезируются клетками только базального слоя многослойного плоского эпителия.

Реакция иммунофлюоресценции наблюдается строго в цитоплазме клеток базального слоя (рис. 4, *а, б*) и отсутствует в клетках дифференцированных слоев многослойного плоского эпителия [22, 25]. В дальнейшем, покидая базальный слой, кератиноциты прекращают свою митотическую активность и начинают свою конечную дифференцировку индукцией генов, отвечающих за синтез цитокератинов дифференцированных (супрабазальных) слоев эпидермиса [22, 25]. Волокнистая сеть из цитокератинов супрабазальных слоев эпидермиса, замещая активно волокнистую сеть из цитокератинов низкодифференцированных слоев, формирует из тонофиламентов более плотный и густой цитоскелет. Реакция иммунофлюоресценции при этом приобретает свою специфичность: в коже здорового человека выявляется только в клетках супрабазальных слоев эпидермиса (рис. 4, *в*) [22, 25].

Синтез цитокератинов клетками базального слоя эпидермиса

При исследовании криостатных срезов различных участков кожи больных болезнью Хейли–Хейли отмечено нарушение синтеза цитокератина 5 клетками камбиального (базального) слоя эпидермиса: от «истощения» до «возбуждения». Так, при исследовании

криостатных срезов кожи больных болезнью Хейли–Хейли, независимо от места взятия биопсийного материала, экспрессия цитокератина 5 выявлялась не только в цитоплазме клеток базального слоя, но и в клетках дифференцированных слоев эпидермиса, причем отмечались одновременно места ослабления иммунофлюоресцентной реакции или ее отсутствия в клетках базального слоя эпидермиса с цитоплазматическим свечением в акантолитических клетках (при их наличии), внутриядерным или перинуклеарным свечением в некоторых кератиноцитах и скоплением специфического материала прослойками в роговом слое эпидермиса и его секвестрацией на поверхность кожи (рис. 4, г, ж). В ряде случаев дополнительно наблюдалась выраженная иммунофлюоресцентная реакция в зоне базального полюса клеток камбиального слоя с вовлечением дермо-эпидермального соединения или сохранением ее только на уровне базальной мембраны эпидермиса.

При исследовании криостатных срезов клинически интактного и пораженного участка кожи больных болезнью Хейли–Хейли другой детерминанты базально-клеточного антигена (цитокератин 14) выявлено снижение ее синтеза клетками базального слоя вплоть до отсутствия иммунофлюоресцентной реакции с сохранением экспрессии в цитоплазме акантолитических клеток (при их наличии) (рис. 4, д, з).

Синтез цитокератинов клетками супрабазальных слоев эпидермиса

При исследовании криостатных срезов клинически интактных участков кожи больных болезнью Хейли–Хейли синтез цитокератина надбазальных слоев эпидермиса не был нарушен (рис. 4, е). Напротив, в пораженных участках кожного покрова отмечалось ослабление реакции в шиповатом слое эпидермиса, что свидетельствует о некотором снижении синтеза цитокератинов супрабазальных слоев эпидермиса (рис. 4, и). Подобную картину наблюдали и при определении синтеза цитокератинов, характерных для всех слоев эпидермиса: определялась картина слабой диффузной реакции во всех слоях эпидермиса как в пораженных, так и клинически интактных участках кожи больных болезнью Хейли–Хейли.

Обсуждение

Результаты проведенного иммуногистохимического исследования демонстрируют сложный механизм развития болезни Хейли–Хейли с вовлечением различных белковых молекул адгезии и компонентов системы межклеточного соединения. Так, в процессе исследования тканевых структур эпидермиса и дермы различных участков кожного покрова больных, страдающих данным генодерматозом, обнаружено нарушение локализации десмосомальных кадгеринов (десмоглеины 1, 2, 3), протеинов десмосомальной пластины (плакоглобин, десмоплакин I, периплакин) и молекул межклеточных соединений (Е-кадгерин, кадгериновый комплекс) десмосомального аппарата: от выраженной иммуногистохимической реакции вплоть до ее исчезновения и появления в местах не типичных для локализации изучаемых белковых компонентов. Наиболее выраженная их экспрессия наблюдалась в местах акантолиза и формирования внутриэпидермальных пузырей с проникновением специфического

материала в цитоплазму некоторых кератиноцитов и акантолитических клеток. Подобную картину наблюдали и другие авторы [3, 12, 18, 26, 27]. Предполагают, что это связано либо с нарушением концентрации кальция в кератиноцитах или мутацией генов, кодирующих кальциевые насосы, ответственные за акантолиз, либо – с кооперативно-компенсаторным эффектом этих функционально близких молекул адгезии [10, 18]. Наблюдаемые изменения локализации реакции иммунофлюоресценции можно объяснить и извращением молекулярно-биологических процессов дифференцировки клеток в результате нарушения процесса димеризации кислых и основных белков в клетках базального слоя. При этом белки, характерные только для камбиального слоя, могут сохраняться в клетках, переходящих в вышележащие слои эпидермиса. В приведенном исследовании наряду с процессом торможения «созревания» цитокератина 5 наблюдалось уменьшение его количества в клетках, что выражалось в ослаблении реакции иммунофлюоресценции или полном ее отсутствии. Подобную картину наблюдали и с цитокератином 14. Такой дефект синтеза цитокератинов 5 и 14, вероятно, может быть связан с действием на генетически измененную структуру ткани антител и комплекса на начальном этапе патологического процесса с вовлечением дополнительных патогенетических факторов, в частности цитокинов, ферментов и широкого спектра медиаторов [10, 28]. Последние связаны с функцией десмосомального аппарата, ответственного, как за целостность структуры ткани, так и за нормальные процессы пролиферации и дифференцировки клеточных элементов. Наблюдалось также скопление цитокератина 5 вокруг и/или внутри ядер клеток, что характерно для нарушения метаболизма в кератиноцитах. Подобное парадоксальное явление (внутриядерное и/или перинуклеарное свечение) со скоплением специфического материала под роговым слоем и на поверхности эпидермиса обнаружено в клинически интактных участках кожи больных с десмоглеинами (1, 2, 3) и кадгеринами (Е-кадгерин, кадгериновый комплекс). При этом наиболее интенсивное повреждение (практически полное отсутствие экспрессии или ее «маскировка») выявлено с кадгериновыми молекулами адгезии. В противоположность этому, в местах начинающегося акантолиза и формирования надбазального пузыря, как указывалось выше, наблюдалась выраженная экспрессия кадгеринов в супрабазальных слоях эпидермиса с цитоплазматической иммуногистохимической реакцией в некоторых кератиноцитах и акантолитических клетках. Вероятно, что под влиянием различных факторов происходит диссоциация интра- и экстрацеллюлярных доменов кадгеринов [17, 18, 29]. При этом в ходе акантолиза экстрацеллюлярные домены отрываются от поверхности клеток, а цитоплазматический домен остается на мембране, сохраняя связь с цитоскелетом, скрепляемый протеинами десмосомальной пластины. В процессе иммуногистохимических исследований этот цитоплазматический/внутриклеточный кадгериновый домен является вполне достаточным для связывания антител, результатом чего оказываются иммуноположительные реакции нетипичной локализации, т.е. на поверхности кератиноцитов, наблюдаемые в местах поражения.

Таким образом, приведенные результаты исследований с применением методов меченых антител свидетельствуют об аномальном распределении белковых компонентов системы межклеточных соединений и цитоскелета как в пораженных, так и клинически интактных участках кожи больных, страдающих болезнью Хейли–Хейли. Как известно, любые отклонения в структуре десмосомального аппарата приводят к нарушению клеточной адгезии и патологическим состояниям с клиническими проявлениями различных болезней, в том числе болезни Хейли–Хейли [30–35]. При этом важную патофизиологическую роль могут играть любые белковые адгезивные молекулы десмосом как со стороны десмоглеи, так и десмосомальных пластин. Возможно, детальное изучение по выявлению распространения и распределения многочисленных идентифицированных и пока еще неизвестных молекул адгезий, ассоциированных с системой межклеточных соединений, приведет к пониманию последовательности неопределенных до сегодняшнего дня событий развития патологии (акантолиза) при болезни Хейли–Хейли и выявлению ряда дополнительных дифференциально-диагностических ее признаков.

Благодарность. Автор признателна наставнику и учителю – профессору Л.В. Белецкой (1923–2016), а также сотрудникам лаборатории трансплантационной иммунологии «Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова» за предоставленную возможность осуществить данную экспериментальную работу.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беренбейн Б.А. Буллезные дерматозы. В кн.: Беренбейн Б.А., Студницын Б.А., ред. *Дифференциальная диагностика кожных болезней: руководство для врачей*. М.: Медицина; 1989: 218–70.
2. Бутов Ю.С., Самсонов В.А. Буллезные дерматозы. В кн.: Скрипкин Ю.К., Бутов Ю.С., ред. *Клиническая дерматовенерология: руководство для врачей*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. т. 2: 277–329.
4. Цветкова Г.М., Мордовцева В.В., Вавилов А.М., Мордовцев В.Н. *Патоморфология болезней кожи*. М.: Медицина; 2003.
10. Махнева Н.В., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. Роль кальциевых насосов аппарата Гольджи и иммунной системы в патогенезе семейной пузырчатки Гужеро–Хейли–Хейли. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2015; 18(6): 18–28.
14. Махнева Н.В., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. Болезнь Хейли–Хейли: эпидемиология и характер клинического течения. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2015; 18(5): 16–21.
15. Махнева Н.В., Белецкая Л.В. Молекулярно-биологическая характеристика десмосом как системы межклеточного соединения. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2009; 2: 25–38.
17. Махнева Н.В., Белецкая Л.В. *Иммунопатологические аспекты аутоиммунных буллезных дерматозов*. Palmarium Academic Publishing; 2012.
22. Белецкая Л.В., Махнева Н.В. *Меченые антитела в нормальной и патологической морфологии*: атлас. М.: МНП; 2000.
28. Махнева Н.В., Давиденко Е.Б., Черныш Е.С., Белецкая Л.В. Доброкачественная семейная пузырчатка Гужеро–Хейли–Хейли в аспекте иммунопатологии. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2014; 17(2): 32–6.

Остальные источники литературы см. в References.

REFERENCES

1. Berenbein B.A. Bullous dermatosis. In: Berenbein B.A., Studnitsyn B.A., eds. *Differential diagnosis of cutaneous diseases: guide for physicians*. Moscow: Medicine; 1989: 218–70. (in Russian)
2. Butov Yu.S., Samsonov V.A. Bullous dermatosis. In: Skripkin Yu.K., Butov Yu.S., eds. *Clinical dermatology. Handbook for doctors*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. vol. 2: 277–329. (in Russian)
3. Hakuno M., Shimizu H., Akiyama M., Amagai M., Wahl J.K., Wheelock M.J., Nishikawa T. Dissociation of intra- and extracellular domains of desmosomal cadherins and E-cadherin in Hailey–Hailey disease and Darier’s disease. *Br. J. Dermatol.* 2000; 142(4): 702–11.
4. Tsvetkova G.M., Mordovtseva V.V., Vavilov M.A., Mordovtsev V.N. *Pathomorphology of skin diseases*. Moscow: Medicine; 2003. (in Russian)
5. Ikeda S., Welsh E.A., Peluso A.M., Leyden W., Duvic M., Woodley D.T.,

- Epstein E.H. Localization of the gene whose mutations underlie Hailey–Hailey disease to chromosome 3q. *Hum. Mol. Genet.* 1994; 3(7): 1147–50.
6. Richard G., Korge B.P., Wright A.R., Mazzanti C., Harth W., Annicchiarico-Petruzzelli M., et al. Hailey–Hailey disease maps to a 5 cM interval on chromosome 3q21–q24. *J. Invest. Dermatol.* 1995; 105(3): 357–60.
7. Hu Z., Bonifas J.M., Beech J., Bench G., Shighara T., Ogawa H., et al. Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey–Hailey disease. *Nat. Genet.* 2000; 24(1): 61–5.
8. Sudbrak R., Brown J., Dobson-Stone C., Carter S., Ramser J., White J., et al. Hailey–Hailey disease is caused by mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca(2+) pump. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9(7): 1131–40.
9. Leinonen P.T., Hagg P.M., Peltonen S., Jouhilahti E.M., Melkko J., Korkiamaki T., et al. Reevaluation of the normal epidermal calcium gradient, and analysis of calcium levels and ATP receptors in Hailey–Hailey and Darier epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 2009; 129(6): 1379–87. doi: 10.1038/jid.2008.381.
10. Makhneva N.V., Chernysh E.S., Beletskaya L.V. Role of Golgi complex calcium pumps and the immune system in the pathogenesis of Gougerot–Hailey–Hailey’s familial benign pemphigus. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii Zhurnal Kozhnykh i Venericheskikh Boleznei)*. 2015; 18(6): 18–28. (in Russian)
11. Missiaen L., Raeymaekers L., Dode L., Vanoevelen J., Van Baelen K., Parys J.B., et al. SPCA1 pumps and Hailey–Hailey diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 322(4): 1204–13.
12. Setoyama M., Choi K.C., Hashimoto K., Ishihara M., Predeteanu G. S., Dinehart S., et al. Desmoplakin I and II in acantholytic dermatoses: preservation in pemphigus vulgaris and pemphigus erythematosus and dissolution in Hailey–Hailey’s disease and Darier’s disease. *J. Dermatol. Sci.* 1991; 2(1): 9–17.
13. Tada J., Hashimoto K. Ultrastructural localization of cell junctional components (desmoglein, plakoglobin, E-cadherin, and beta-catenin) in Hailey–Hailey disease, Darier’s disease, and pemphigus vulgaris. *J. Cutan. Pathol.* 1998; 25(2): 106–15.
14. Makhneva N. V., Chernysh E. S., Beletskaya L. V. Hailey–Hailey’ disease: epidemiology and clinical pattern. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii Zhurnal Kozhnykh i Venericheskikh Boleznei)*. 2015; 18(5): 16–21. (in Russian)
15. Makhneva N.V., Beletskaya L.V. Molecular and biological characteristics of desmosomes as an intercellular connective system. *Journal of dermatology and venerology. Russian Journal (Vestnik dermatologii i venerologii)*. 2009; 2: 25–38. (in Russian)
16. Hartlieb E., Kempf B., Partilla M., Vigh B., Spindler V., Waschke J. Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – №1: e53739. Doi: 10.1371/journal.pone.0053739
17. Makhneva N.V., Beletskaya L.V. *Immunopathological aspects of autoimmune bullous dermatoses*. Palmarium Academic Publishing; 2012. (in Russian)
18. Kovacs A., Schmidt E., Begany A., Hunyadi J., Szegedi A. Immunohistochemical examination of P-cadherin in bullous and acantholytic skin diseases. *Acta Derm. Venereol.* 2004; 84(4): 116–9.
19. Lazarides E. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Rev. Biochem.* 1982; 51: 219–50.
20. Nagle R.B. Intermediate filaments: a review of the basic biology. *Am. J. Surg. Pathol.* 1988; 12(Suppl. 1): 4–16.
21. Coulombe P. The cellular and molecular biology of keratins: beginning of a new era. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993; 5(1): 17–29.
22. Beletskaya L.V., Makhneva N.V. *Labeled antibody in normal and pathological morphology*. Atlas. Moscow: MNPI; 2000. (in Russian)
23. Kanitakis J. Anti-cytoskeleton antibodies and their value in cutaneous histopathology (Les anticorps anti-cytosquelette et leur interet en histopathologie cutanee). *Ann. Dermatol. Venereol.* 1989; 116(5): 431–6. (in French)
24. Cribier B., Grosshans E. Cytokeratins of the skin and malpighian mucos (Les cytokeratines dans la peau et les muqueuses malpighiennes). *Ann. Dermatol. Venereol.* 1993; 120(4): 327–35. (in French)
25. Viac J., Reano A., Brochier J., Staquet M. J., Thivolet J. Reactivity pattern of a monoclonal antikeratin antibody. *J. Invest. Dermatol.* 1983; 81(2): 351–4.
26. Burge S.M., Garrod D.R. An immunohistological study of desmosomes in Darier’s disease and Hailey–Hailey disease. *Br. J. Dermatol.* 1991; 124(3): 242–51.
27. Hashimoto K., Fujiwara K., Tada J., Harada M., Setoyama M., Eto H. Desmosomal dissolution in Grover’s disease, Hailey–Hailey’s disease and Darier’s disease. *J. Cutan. Pathol.* 1995; 22(6): 488–501.
28. Makhneva N.V., Davidenko E.B., Chernysh E.S., Beletskaya L.V. Gougerot–Hailey–Hailey benign familial chronic pemphigus as an immunopathology. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii Zhurnal Kozhnykh i Venericheskikh Boleznei)*. 2014; 17(2): 32–6.
29. Hakuno M., Akiyama M., Shimizu H., Wheelock M. J., Nishikawa T. Upregulation of P-cadherin expression in the lesional skin of pemphigus, Hailey–Hailey disease and Darier’s disease. *J. Cutan. Pathol.* 2001; 28(6): 277–81.
30. Burge S.M., Schomberg K.H. Adhesion molecules and related protein in Darier’s disease and Hailey–Hailey disease. *Br. J. Dermatol.* 1992; 127(4): 335–43.
31. Mchet M.C., Arbeille B., Vaillant L. Desmosomes and acantholytic diseases (Desmosomes et maladies acantholytiques). *Ann. Dermatol. Venereol.* 1994; 121(8): 581–92. (in French)
32. McGrath J.A. Hereditary diseases of desmosomes. *J. Dermatol. Sci.* 1999; 20(2): 85–91.
33. Dhitavat J., Fairclough R.J., Hovnanian A., Burge S.M. Calcium pumps and keratinocytes: lessons from Darier’s disease and Hailey–Hailey disease. *Br. J. Dermatol.* 2004; 150(5): 821–8.
34. Hamada T., Tsuruta D., Fukuda S., Ishii N., Teye K., Numata S., et al. How do keratinizing disorders and blistering disorders overlap? *Exp. Dermatol.* 2013; 22(2): 83–7. doi: 10.1111/exd.12021.
35. Bouameur J.E., Favre B., Borradori L. Plakins, a versatile family of cytolinkers: roles in skin integrity and in human diseases. *J. Invest. Dermatol.* 2014; 134(4): 885–94. doi: 10.1038/jid.2013.498.

Поступила 10. 01.17
Принята к печати 24. 01.17