

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.5-002

Демяшкин Г.А.¹, Шаповалова Е.Ю.², Маланичев М.Ю.^{2,3}, Погосян Д.А.^{2,3}, Батов М.А.⁴, Зорин И.А.¹, Щекин В.И.¹

Молекулярно-биологическая характеристика промежуточных филаментов кератиноцитов интактной кожи в условии системного воспаления

¹ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет),

119048, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8/2;

²ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского», 295051, г. Симферополь, Россия, бульвар Ленина, д. 5/7;

³Клиника пластической хирургии и косметологии «Фрау Клиник»,

111116, г. Москва, Россия, Лефортовский вал, д. 5, стр. 7;

⁴ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России; 117997, г. Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1

Введение. Несмотря на определенный прогресс в изучении патоморфологических механизмов сепсиса и усовершенствовании методов терапии критических состояний, летальность при сепсисе сохраняется на высоком уровне. При тяжелом системном воспалении нарушается морфофункциональное состояние кожного покрова, однако обуславливающие этот эффект механизмы описаны поверхностно. Нуждается в уточнении роль изменения экспрессии генов кератиноцитов цитоскелета, приводящая к нарушению их дифференцировки и миграции на фоне действия эндогенного фактора, индуцированного тяжелым системным воспалением.

Цель работы – оценка молекулярно-генетического профиля дифференцировки и миграции кератиноцитов на фоне системного воспаления.

Методика. Фрагменты интактной кожи пациентов с подтвержденным сепсисом ($n=46$) были изучены методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для определения экспрессии генов промежуточных филаментов кератиноцитов *KRT1*, *KRT10*, *KRT5*, *KRT14* и *KRT16*.

Результаты. У пациентов в условии системного воспаления относительная экспрессия *KRT1*, *KRT10*, *KRT5*, *KRT14* и *KRT16* в интактной коже снижена, несмотря на сохранение уровня экспрессии генов, продукты которых поддерживают агрегацию филаментов и стабильность цитоскелета – *FLG*, *IVL*.

Заключение. В интактной коже на фоне системного воспаления в отсутствие внешнего повреждающего фактора отмечается разобщение дифференцировки и пролиферации кератиноцитов, способное привести к нарушению барьерной функции кожи.

Ключевые слова: сепсис; кератиноциты; *KRT1*; *KRT10*; *KRT5*; *KRT14*; *KRT16*.

Для цитирования: Демяшкин Г.А., Шаповалова Е.Ю., Маланичев М.Ю., Погосян Д.А., Батов М.А., Зорин И.А., Щекин В.И. Молекулярно-биологическая характеристика промежуточных филаментов кератиноцитов интактной кожи в условии системного воспаления. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(3): 34-39.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.34-39

Для корреспонденции: Демяшкин Григорий Александрович, e-mail: dr.dga@mail.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Демяшкин Г.А., Шаповалова Е.Ю.; сбор и обработка материала – Маланичев М.Ю., Погосян Д.А., Зорин И.А., Щекин В.И.; статистическая обработка – Маланичев М.Ю., Погосян Д.А., Батов М.А.; написания текста – Батов М.А., Зорин И.А., Щекин В.И.; редактирование – Демяшкин Г.А., Шаповалова Е.Ю. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.05.2020

Принята к печати 24.06.2020

Опубликована 21.08.2020

Demyashkin G.A.¹, Shapovalova E.Yu.², Malanichev M.Yu.^{2,3}, Pogosyan D.A.^{2,3}, Batov M.A.⁴, Zorin I.A.¹, Shchekin V.I.¹**Molecular and biological characteristics of keratin intermediate filaments in intact skin under systemic inflammation**¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia;²S.I. Georgievsky Medical Academy of the V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia;³Clinic of Plastic Surgery and Cosmetology «Frau Klinik», Moscow, Russia;⁴N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Introduction. Despite some progress in studying pathomorphological mechanisms of sepsis and improvement of therapy for critical conditions, mortality in sepsis remains high. In severe systemic inflammation, the morpho-functional state of skin is compromised; however, the mechanisms responsible for this effect are not completely understood. The role of mutations in keratinocyte cytoskeletal genes leading to disorders of keratinocyte differentiation and migration under the action of an endogenous factor induced by severe systemic inflammation, needs to be clarified.

The aim of this work was to assess the molecular genetic profile of keratinocyte differentiation and migration under systemic inflammation.

Methods. Fragments of intact skin from patients with confirmed sepsis (n=46) were studied with real-time polymerase chain reaction to determine the expression of keratin intermediate filament *KRT1*, *KRT10*, *KRT5*, *KRT14*, and *KRT16* genes.

Results. In patients with systemic inflammation, the relative expression of *KRT1*, *KRT10*, *KRT5*, *KRT14*, and *KRT16* in intact skin was reduced, despite the normal expression of genes whose products support filament aggregation and cytoskeletal stability (*FLG* and *IVL*).

Conclusion. In the intact skin under systemic inflammation in the absence of an external damaging factor, uncoupling of the keratinocyte differentiation from the keratinocyte proliferation was observed, which may lead to dysfunction of the skin barrier.

Keywords: sepsis; keratinocytes; *KRT1*; *KRT10*; *KRT5*; *KRT14*; *KRT16*.

For citation: Demyashkin G.A., Shapovalova E.Yu., Malanichev M.Yu., Pogosyan D.A., Batov M.A., Zorin I.A., Shchekin V.I. Molecular and biological characteristics of keratin intermediate filaments in intact skin under systemic inflammation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 34-39. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.34-39

For correspondence: **Grigory Demyashkin**, PhD, MD; ass. professor of the Department of Pathology of Sechenov University (Moscow, Russia). 119048, Moscow, st. Trubetskaya, 8, e-mail: dr.dga@mail.ru

Contribution. The concept and design of the study – Demyashkin G.A., Shapovalova E.Yu.; collection and processing of material – Malanichev M.Yu., Pogosyan D.A., Zorin I.A., Shchekin V.I.; statistical processing – Malanichev M.Yu., Pogosyan D.A., Batov M.A.; text writing – Batov M.A., Zorin I.A., Shchekin V.I.; editing – Demyashkin G.A., Shapovalova E.Yu. Approval of the final version of the article, responsibility of the integrity of all parts of the article – all co-authors.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:Demyashkin G., <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>Shapovalova Ye., <http://orcid.org/0000-0003-2544-7696>Malanichev M., <https://orcid.org/0000-0003-3043-2739>Pogosyan D., <https://orcid.org/0000-0003-3304-0968>Batov M., <https://orcid.org/0000-0002-3780-4358>Zorin I., <https://orcid.org/0000-0002-1621-7015>Shchekin I., <https://orcid.org/0000-0003-3763-7454>

Received 13.05.2020

Accepted 24.06.2020

Published 21.08.2020

Введение

Сепсис остается одной из ведущих причин смерти среди пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии. Несмотря на определенный прогресс в изучении патогенеза сепсиса и усовершенствовании

методов терапии критических состояний, летальность при сепсисе сохраняется на высоком уровне – 30–90% [1-3]. В отечественных и зарубежных клинико-эпидемиологических исследованиях сообщается о влиянии

значительного количества факторов на течение и исходы сепсиса [3-5].

При тяжелом системном воспалении происходят дистрофические и некротические изменения внутренних органов. В том числе нарушается морфофункциональное состояние кожного покрова, однако обуславливающие этот эффект механизмы описаны поверхностно. У пациентов с тяжелым сепсисом часто обнаруживают различные формы поражения интактных кожных покровов вне инфекционного очага (формирование пролежней, гематом или серозных пузырей) [5-7].

Стабильность, дифференцировка и миграция кератиноцитов является одной из главных составляющих гомеостаза эпидермиса. Механическая целостность и прочность кератиноцитов напрямую зависят от состояния цитоскелета, образованного актиновыми микрофиламентами, промежуточными филаментами и микротрубочками. Каждая филаментная система построена из определенных белков, кодируемых соответствующими семействами генов. Так, промежуточные филаменты построены по меньшей мере 60 различными белками, наиболее распространенным из которых является кератин, кодируемый мультигенным семейством. Номенклатура генов и белков включает 28 кератинов I типа (*K9, K10, K12 – K20, K23 – K28, K31 – K40*) и 26 II типа (*K1 – K8; K71 – K86*), которые вместе образуют два кластера из 27 генов каждый. В геноме человека гены, кодирующие кератины I и II типов, в основном сгруппированы в двух разных локусах в хромосомных областях *17q12-q21* и *12q11-q13* соответственно [8, 9]. Мутации в этих генах, в частности *K1* и *K10*, могут приводить к нарушению целостности кератиноцитов, повреждая защитный барьер, что увеличивает риск бактериальных кожных инфекций. При этом, нельзя исключить, что подобное изменение экспрессии генов, приводящее к нарушению дифференцировки и миграции кератиноцитов, может возникать в интактной коже на фоне действия эндогенного фактора, индуцированного тяжелым системным воспалением. Данная гипотеза нуждается в уточнении для понимания механизмов сепсиса.

Цель исследования – оценка молекулярно-генетического профиля дифференцировки и миграции кератиноцитов на фоне системного воспаления.

Методика

На основании анамнестических, клинических и морфологических данных были сформированы две группы: 1-я группа ($n = 46$) – аутопсийный материал кожи пациентов с установленным патолого-анатоми-

ческим диагнозом: тяжелый бактериальный сепсис, синдром полиорганной недостаточности согласно консенсусу АССР/SCCM. Критерии включения: возрастной интервал 18 – 45 лет, клинически и морфологически верифицированные признаки гипоперфузии внутренних органов, повышение сывороточного лактата выше 4 ммоль/л, олигурия, нарушение сознания. 2-я группа (контрольная; $n = 10$) – аутопсийный материал кожи пациентов, умерших по причинам, не связанным с инфекционным заболеванием. 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, дерматомиозит, склеродермия, анкилозирующий спондилит, псориаз, фолликулярный гиперкератоз), хроническое заболевание печени, хроническая почечная недостаточность, иммуносупрессивная и гормональная терапия, патология системы гемостаза в анамнезе.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Выделение тотальной РНК производили из полученных фрагментов кожи пациентов с использованием готового реагента Trizol (Invitrogen, США). Синтез комплементарной ДНК (кДНК) с матрицы изолированной РНК осуществляли с помощью набора SuperScript™ VIL0™ master mix (Invitrogen, США). Выделенные кДНК подверглись ПЦР-РВ с использованием готовой смеси реагентов Absolute blue QPCR mix (Thermo scientific, США) с флуоресцентным красителем SYBR green I. ПЦР-РВ проводилась с использованием StepOne System (Applied Biosystems, США) и штатного программного обеспечения. Анализ экспрессии генов проведен с использованием метода определения порогового цикла (ΔCt) и вычисления относительной экспрессии генов согласно протоколу [11]. Нормирование и внутренний контроль выполнены относительно гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Статистический контроль проводился относительно контрольной группы. Подбор праймеров был осуществлён на основании общедоступных материалов о последовательностях ДНК и мРНК генов в базе данных NCBI с использованием программы Primer-BLAST.

Изучаемые гены кератиноцитов у пациентов на фоне системного воспаления: *KRT1, KRT5, KRT6A, KRT10, KRT14, KRT16, FLG, IVL*.

Результаты

Для исследования экспрессии целевых генов нормализованные уровни мРНК, измеренные в образцах

интактной кожи пациентов с тяжелым системным воспалением (1-я группа), сравнивали с образцами кожи, полученными в контрольной группе.

Несмотря на расположение генов *KRT1* и *KRT10* на разных хромосомах их экспрессия скоординирована. В ходе терминальной дифференцировки кератиноцитов продукты генов образуют белковый димер *KRT1/10* с формированием промежуточных филаментов. Аналогичный признак справедлив для экспрессии *KRT5* и *KRT14*, а также для *KRT16* и *KRT6A/KRT6B*.

В ходе анализа результатов ПЦР-РВ *KRT1*, *KRT10*, *KRT5* и *KRT14* показали схожие паттерны экспрессии нормализованные по *GAPDH*. Однако относительная экспрессия *KRT10* и *KRT14* была выше *KRT1* и *KRT5* в исследуемых группах соответственно (рис. 1).

Уровни экспрессии *KRT1* и *KRT10* статистически значимо отличались между группами сепсиса и контроля ($p=0.003$). Отмечали снижение относительной экспрессии *KRT1* и *KRT10* в образцах кожи пациентов в условиях системного воспаления по сравнению с контролем — 4.12 ± 0.73 vs 6.54 ± 0.89 и 5.23 ± 0.96 vs 8.12 ± 0.37 , $p < 0.01$ соответственно. Относительная экспрессия *KRT5* и *KRT14* также была ниже в экспериментальной группе по сравнению с контролем — 2.34 ± 0.94 vs 5.71 ± 0.87 и 3.32 ± 0.96 vs 7.31 ± 0.96 , $p < 0.01$ соответственно (рис. 2).

Несмотря на более низкий уровень экспрессии *KRT16* в 1-й группе по сравнению с 2-й (1.34 ± 0.15 vs 2.15 ± 0.47 , $p < 0.01$), экспрессия *KRT6A* статистически значимо не отличалась между исследуемыми группами, однако наиболее низкая экспрессия была определена в группе пациентов сепсисом — 0.87 ± 0.11 , $p < 0.01$.

Вместе с тем результаты, указывающие на изменение профиля экспрессии кератиноцитов, не коррелируют с изменением экспрессии генов, продукты которых непосредственно задействованы в организации и поддержании барьерной функции эпидермиса. Различия в экспрессии *FLG*, *IVL* не имели статистической значимости между группами контроля и пациентов с сепсисом, что, возможно, обусловлено высокой степенью базовой экспрессии вне зависимости от состояния макроорганизма (рис. 3).

Обсуждение

Кератиновые промежуточные филаменты (КПФ) являются наиболее распространенными среди элементов цитоскелета кератиноцитов, образующих эпидермис. Они образуют плотную, трехмерную трансклеточную и высокодинамичную сеть, охватывающую ядро, простирающуюся до периферии клетки, где они закрепляются и взаимодействуют с десмосомами и другими адгезионными комплексами [5, 12, 13].

Частичная или полная дезорганизация элементов цитоскелета, приводящая к нарушению целостности кератиноцитов и снижению барьерной функции эпидермиса, может быть результатом мутаций определенных генов, ответственных за сборку КПФ. Эпидермальные гены кератина I типа, например *KRT1*, *KRT2* и *KRT5* содержат по 9 экзонов каждый, а гены, кодирующие эпидермальные кератины II типа, например *KRT10* и *KRT14*, состоят из 8 экзонов [9].

Сравнивая полученные в ходе настоящего исследования результаты с литературными данными об ответных реакциях кожи на повреждение, физиологическое повышение уровня *KRT14* и *KRT5* при поражении

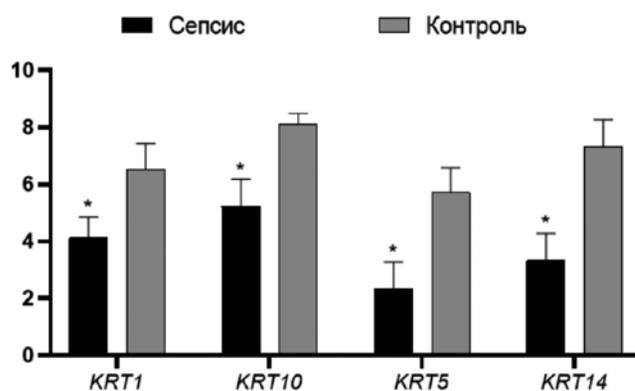


Рис. 1. Экспрессия генов кератиноцитарного профиля димеров *KRT1/10* и *KRT5/14* в интактной коже пациентов с сепсисом по сравнению с контрольной группой. По вертикали: нормализованный уровень относительной экспрессии мРНК, усл. ед.

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0.01$.

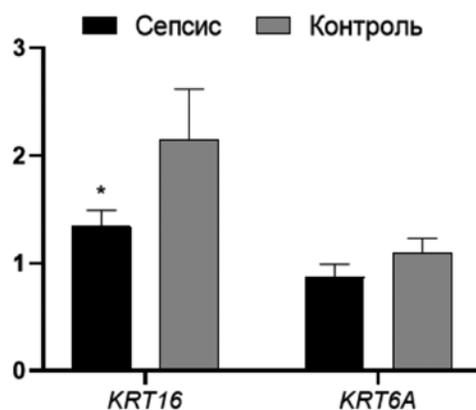


Рис. 2. Экспрессия генов кератиноцитарного профиля димеров *KRT16/6A* в интактной коже пациентов с сепсисом по сравнению с контрольной группой. По вертикали: нормализованный уровень относительной экспрессии мРНК, усл. ед.

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0.01$.

кожных покровов может быть ограничено или вовсе отсутствовать в условиях сепсиса.

По нашим данным, экспрессия генов кератиноцитарного профиля интактной кожи снижена у пациентов с системным воспалением по сравнению с образцами контрольной группы. В основе обнаруженных признаков может лежать следующий каскад биохимических реакций.

На фоне системного воспаления происходит избыточная активация Т-хелперов, продуцирующих различные интерлейкины, в первую очередь IL4 или IL13 [14, 15]. Последние снижают экспрессию мРНК *KRT1*, *KRT10* и других генов, кодирующих структурные компоненты кератиноцитов на ранних стадиях, уменьшая когезивность рогового слоя и экспрессию *DSG1* [12]. Снижение или отсутствие филагрина, лорикрина и инволюкрина (экспрессии *FLG* и *IVL*) приводит к нарушению барьера и, следовательно, снижает воспалительный порог для местных раздражителей и гаптенов, что в свою очередь влияет на пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов.

Таким образом, исследование прямо продемонстрировало, что действие эндогенного фактора, индуцированного системным воспалением, способно приводить к нарушению защитного барьера эпидермиса. Наши результаты будут полезны для понимания механизмов появления кожных осложнений при сепсисе.

Заключение

У пациентов в условии системного воспаления относительная экспрессия *KRT1*, *KRT10*, *KRT5*, *KRT14* и *KRT16* в интактной коже снижена, что характеризует разобщение процессов дифференцировки и пролифе-

рации кератиноцитов и способно привести к нарушению барьерной функции кожи в отсутствие внешнего повреждающего фактора, несмотря на сохранение уровня экспрессии генов, продукты которых поддерживают агрегацию филаментов и стабильность цитоскелета — *FLG*, *IVL*.

Литература

(п.п. 1; 2; 4-15 см. References)

3. Сажин В.П., Карсанов А.М., Кульчиев А.А., Ремизов О.В., Маскин С.С., Юдин В.А. Реальность и перспективы изучения эпидемиологии сепсиса. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2018; (8): 85-9. DOI: 10.17116/hirurgia2018885

References

1. Fleischmann C., Thomas-Rueddel D.O., Hartmann M., Hartog C.S., Welte T., Heublein S. et al. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2016; 113(10): 159-66. doi:10.3238/arztebl.2016.0159
2. Fedeli U., Piccinni P., Schievano E., Saugo M., Pellizzer G. Growing burden of sepsis-related mortality in northeastern Italy: a multiple causes of death analysis. *BMC infectious diseases*. 2016; 16, 330. doi: 10.1186/s12879-016-1664-2
3. Sazhin V.P., Karsanov A.M., Kulchiev A.A., Remizov O.V., Maskin S.S., Yudin V.A. Reality and prospects of sepsis epidemiology research. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova*. 2018; (8): 85-9. doi: 10.17116/hirurgia2018885. (in Russian)
4. SepNet Critical Care Trials Group (2016). Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive care medicine*. 2016; 42(12): 1980-9. doi: 10.1007/s00134-016-4504-3
5. Compton F., Hoffmann F., Hortig T., Strauss M., Frey J., Zidek W. et al. Pressure ulcer predictors in ICU patients: nursing skin assessment versus objective parameters. *J Wound Care*. 2008; 17: 417-20, 422-4.
6. Coleman S., Gorecki C., Nelson E.A., Closs S.J., Defloor T., Halfens R. et al. Patient risk factors for pressure ulcer development: Systematic review. *Int J Nurs Stud*. 2013; 50: 974-1003.
7. Hattori Y., Hattori K., Suzuki T., Matsuda N. Recent advances in the pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and challenges. *Pharmacology & therapeutics*. 2017; 177: 56-66. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.040
8. Zhang L.-J. *Keratins in Skin Epidermal Development and Diseases*. In: Blumenberg M., editor. Keratin. Volume 79050. IntechOpen; London, UK: 2018. pp. 1-17.
9. Jacob J.T., Coulombe P.A., Kwan R., Omary M.B. Types I and II Keratin Intermediate Filaments. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2018; 10 doi: 10.1101/cshperspect.a018275
10. Seymour C.W., Liu V.X., Iwashyna T.J. et al., Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8): 762-74.
11. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008; 3(6): 1101-8. doi:10.1038/nprot.2008.73

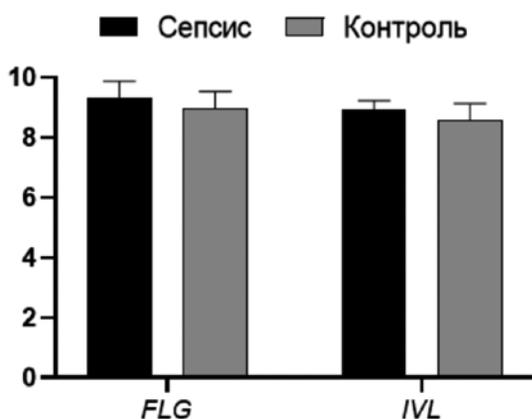


Рис. 3. Экспрессия *FLG*, *IVL* в интактной коже пациентов с сепсисом по сравнению с контрольной группой. По вертикали: нормализованный уровень относительной экспрессии мРНК, усл. ед.

12. Zhang X., Yin M., Zhang L.J. Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells*. 2019; 8(8): 807. Published 2019 Aug 1. doi:10.3390/cells8080807
13. Lessard J.C., Piña-Paz S., Rotty J.D. et al. Keratin 16 regulates innate immunity in response to epidermal barrier breach. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(48): 19537-42. doi:10.1073/pnas.1309576110
14. Omori-Miyake M., Yamashita M., Tsunemi Y., Kawashima M., Yag J. In Vitro Assessment of IL-4- or IL-13-Mediated Changes in the Structural Components of Keratinocytes in Mice and Humans. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014; 134, 1342–50. doi:10.1038/jid.2013.503
15. Hobbs R.P., Lessard J.C., Coulombe P.A. Keratin intermediate filament proteins—novel regulators of inflammation and immunity in skin. *J. Cell Sci*. 2012; 125: 5257–8. doi: 10.1242/jcs.122929

Сведения об авторах:

Демяшкин Григорий Александрович, канд. мед. наук, доцент каф. патологической анатомии им. акад. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет);

Шаповалова Елена Юрьевна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского;

Маланичев Михаил Юрьевич, аспирант каф. гистологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского; врач-хирург;

Погосян Давид Ашотович, аспирант каф. гистологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского; врач-хирург;

Батов Максим Александрович, Институт клинической медицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова;

Зорин Илья Алексеевич, Институт клинической медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет);

Щекин Владимир Иванович, Институт клинической медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).