

К.В.Романенко

Донецкий национальный
медицинский университет
им. М.Горького

Ключевые слова: ограниченная склеродермия, склероз, иммуногистохимические маркеры, дермальные дендрциты, иммунные клетки.

Надійшла: 18.10.2009

Прийнята: 16.12.2009

УДК 616.5-004.1-03-07-018.1-097

СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И ФАКТОРОВ РАЗВИТИЯ СКЛЕРОЗА ПРИ ОГРАНИЧЕННОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ НА СТАДИИ ОТЕКА: ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Разработать новые методы лечения хронических распространенных дерматозов и сексуально-трансмиссивных инфекций на основании изучения современных клинико-эпидемиологических особенностей их течения с учетом сопутствующей соматической патологии» (номер государственной регистрации 0109U008725).

Резюме. С целью выявления иммуногистохимических особенностей состояния дермы и эпидермиса при ограниченной склеродермии в стадии отека было проведено исследование маркеров: CD3, CD8, CD20, CD79α, CD68, CD1α, CD34, CD105, αSMA, виментин, eNOS, Ki67, коллаген IV, bcl2, каспаза 3. На этой стадии в периваскулярных инфильтратах, мононуклеарных скоплениях вокруг придатков кожи преобладают незрелые формы В-лимфоцитов (20-40%) и Т-лимфоциты (20-40%), среди последних – Т-супрессоры. В инфильтратах присутствуют макрофаги (до 30%). Активность eNOS в эндотелии сосудов повышена. Синтез CD105 наблюдался в дермальных дендрцитах, иммунных клетках инфильтратов и в единичных макрофагах. Среди иммунных макрофаги составляли наибольшее число CD105+ клеток. Количество CD34+ дендрцитов было сниженным, а клеток Ланхгерганса (CD1α+), виментин+ и αSMA+ дендритических клеток увеличивалось. В участках вокруг придатков изменения клеточного состава были более существенны. С участками иммунного воспаления связана повышенная пролиферативная и апоптотическая активность, а так же активация антиапоптотических программ. Таким образом, стадия отека при ограниченной склеродермии обуславливает активные изменения, как со стороны иммунной системы, так и местные перестройки тканей кожи.

Морфология. – 2009. – Т. III, № 4. – С. 79-84.

© К.В.Романенко, 2009

Romanenko K.V. Cellular populations and sclerosis factors at limited scleroderma on the edema stage: immunohistochemical research.

Summary. The purpose of the current study was to reveal immunohistochemical features of derma and epidermis in the edema stage of localized scleroderma using markers: CD3, CD8, CD20, CD79α, CD68, CD1α, CD34, CD105, αSMA, vimentin, eNOS, Ki67, collagen IV, bcl2, caspase 3. T-lymphocytes (20-40%), among last suppressors, and the immature forms of B-lymphocytes (20-40%) prevail in perivascular infiltrates and mononuclear accumulations around the appendages of skin during this stage. There are macrophages in infiltrates (to 30%). Activity of eNOS in endothelium of vessels is increased. The CD105 synthesis was observed in dermal dendrocytes, immune cells of infiltrates and in single macrophages. The latters give the most number of CD105+ among immune cells. Amount of CD34+ dendrocytes was reduced, in the same time Lanhgergan's cells (CD1α+), vimentin+ and αSMA+ of dendrytic cells was multiplied. The change of cellular composition was more substantial in areas round the appendages. The active immune inflammation leads to the local promoted proliferation and apoptotic activity, and similarly to activation of the antiapoptotic programs. Thus, the edema stage of localized scleroderma is related to the most active changes both from the side of the immune system and by local alterations of skin tissues.

Key words: localized scleroderma, sclerosis, immunohistochemical markers, dermal dendrocytes, immune cells.

Вступление

Склеродермия рассматривается как комплексное заболевание соединительное ткани, сосудов и иммунной системы со сложным патогенезом. Взаимодействия между этими элемен-

тами и системами играют ключевую роль в развитии склеродермии (Xie Y. et al., 2007). Как при системной, так и при ограниченной форме заболевания, существенным перестройкам подвергаются все клеточные популяции кожи, а также

клетки иммунного ряда (Yokoyama E., 2005; Савенкова В.В., 2008; Xie L. et al., 2008). В патогенезе заболевания большую роль отводят факторам, стимулирующим развитие фиброза, таким как повышение синтеза эндоглина – дополнительного рецептора к трансформирующему фактору (TGF β) (Dharmapathi A.A. et al., 2001), изменения в системе синтаз оксида азота (Dooley A. et al., 2008) и другим, активно исследуемым с помощью иммуногистохимических (ИГХ) методов. В изучении взаимодействий и связей факторов прогрессирования как ограниченной, так и системной склеродермии, остается ряд невыясненных вопросов, касающихся роли различных клеточных популяций в активации фиброза, этапности изменений в иммунных клетках, дермальных дендритах и сосудах.

Цель

Целью работы было выявление изменений в составе клеток дермы и эпидермиса, участия иммунного звена, особенностей синтеза коллагена IV типа, эндотелиальной синтазы оксида азота, эндоглина на стадии отека при ограниченной склеродермии.

Материалы и методы

Для морфологического и иммуногистохимического исследования использовали парафиновые блоки биопсийного материала, взятого у 12 больных ограниченной склеродермией на стадии отека. После рутинного патогистологического исследования срезы толщиной 4-6 мкм наносили на адгезивные стекла SuperFrost Plus и депарафинизировали по стандартной методике. Затем проводили нагревание в цитратном буфере с pH=6,0 в автоклаве (8 минут при температуре +121°C). С целью определения экспрессии ИГХ маркеров использовали спектр антител, которые включали маркеры: CD3 (клон SP7, LabVision), CD8 (клон SP16, LabVision), CD20 (клон L26, LabVision), CD 79 α (клон SP18, LabVision), CD68 (клон KP1, LabVision), CD1 α (клон MTB1, LabVision), CD34 (клон QBEnd/10, LabVision), CD105 (клон SN6h, LabVision), α SMA (клон 1A4, LabVision), виментин (клон SP20, LabVision), eNOS (клон LabVision), Ki67(клон SP6, LabVision), коллаген IV (клон PHM-12, LabVision), bcl2 (клон 100/D5, LabVision), каспаза 3 (клон 3CSP01, LabVision). Инкубацию срезов с первичными антителами проводили во влажных камерах при температуре 23-25°C в течение 30 минут. Титр антител подбирался индивидуально. Следующий этап ИГХ исследования проводили с использованием систем визуализации UltraVision LP (LabVision), идентификация реакций проводилась с помощью хромогена DAB под контролем микроскопа от 20 секунд до 3 минут. Срезы докрашивали гематоксилином Майера.

Результаты и их обсуждение

Лимфоциты, позитивные на CD3, обнару-

живались на стадии отека при ограниченной склеродермии в значительном количестве в участках инфильтрации, как правило, периваскулярной (рис. 1). Часто такие периваскулярные инфильтраты находились вблизи придатков кожи. При незначительной инфильтрации поверхностных слоев дермы обнаруживалось относительно меньшее количество CD3+ клеток, при этом в более глубоких слоях с выраженными инфильтративными изменениями CD3+ клетки составляли до 40% всех клеток инфильтрата. В некоторых случаях на стадии отека при незначительно выраженной инфильтрации доля CD3+ клеток могла составлять до 20%, и редко наблюдались небольшие инфильтраты, состоящие полностью из CD3+ лимфоцитов. При инфильтрации интерстиция вокруг придатков кожи на стадии отека большинство клеток также могли составлять Т-лимфоциты. CD8+ клетки на стадии отека в значительном количестве обнаруживались вокруг придатков кожи, а также в периваскулярных инфильтратах, где их относительная доля могла составлять 20-30%. В изученных случаях ограниченной склеродермии в стадии отека встречались единичные CD8+ клетки, рассеянные во всех слоях дермы.

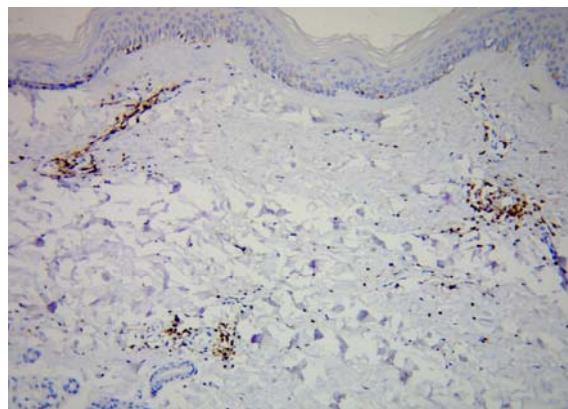


Рис. 1. Периваскулярные инфильтраты, содержащие Т-лимфоциты, в дерме при ограниченной склеродермии на стадии отека. ИГХ реакция с CD3. $\times 40$.

CD79 α + клетки в наибольшем количестве обнаруживались при активной инфильтрации дермы лимфоидными клетками. Они составляли до 20-40% от общего количества всех лимфоидных клеток при выраженных воспалительных изменениях на стадии отека. CD20+ клетки составляли до половины всех клеток периваскулярных инфильтратов, а также инфильтратов вокруг придатков кожи (рис. 2).

CD68+ клетки в лимфоцитарных инфильтратах составляли до 15 % на стадии отека. В большом количестве как единичные они встречались вокруг зон мононуклеарной инфильтрации, а также в инфильтратах вокруг придатков

кожи (рис. 3). В некоторых случаях большинство клеток, инфильтрирующих околопридаточные зоны, составляли CD68+ макрофаги. В сосочковом слое эти клетки практически не обнаруживались, но в глубоких слоях дермы во всех изученных случаях встречались единичные макрофаги. На стадии отека общая тенденция в их распределении состояла в том, что большинство CD68+ клеток концентрировалось около областей с выраженной инфильтрацией. На этой стадии заболевания состав инфильтратов около придатков кожи и участках без придатков отличался: вокруг придатков находилось больше CD68+ макрофагов, чем в периваскулярных инфильтратах. На стадии отека макрофаги чаще, чем иммунные клетки другого типа, встречались как единичные в разных слоях дермы и, в особенности, вокруг участков инфильтрации. Судя по распределению этих клеток и существенному их количеству на всех стадиях ограниченной склеродермии, по-видимому, им принадлежит основное значение среди всех клеток иммунного ряда в запуске фибротических изменений.

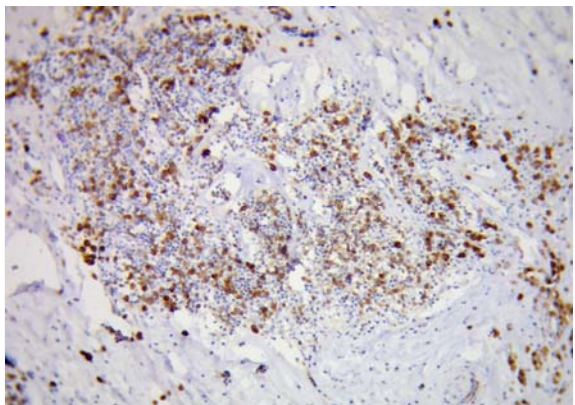


Рис. 2. Накопление В-лимфоцитов в выраженных периваскулярных инфильтратах в дерме при ограниченной склеродермии на стадии отека. ИГХ реакция с CD20. $\times 200$.

Таким образом, присутствие Т-лимфоцитов разных популяций, зрелых и незрелых В-лимфоцитов и макрофагов на стадии отека при ограниченной склеродермии свидетельствует о включении всех компонентов иммунного воспаления на начальных этапах развития этого заболевания. В целом, изменения в иммунном статусе при развитии ограниченной склеродермии сходны с описанными другими авторами (Xie L. et al., 2008).

CD1 α + клетки (Ланхгерганса) присутствовали в эпидермисе при ограниченной склеродермии на стадии отека в повышенном, по сравнению с нормой, количестве. Как правило, они выявлялись в базальном слое и, часто, в шиповатом и зернистых слоях (рис. 4). На стадии отека эндотелиальные клетки, интенсивно окрашенные

на CD105, находились в сосудах, свободных от периваскулярных инфильтратов (рис. 5).

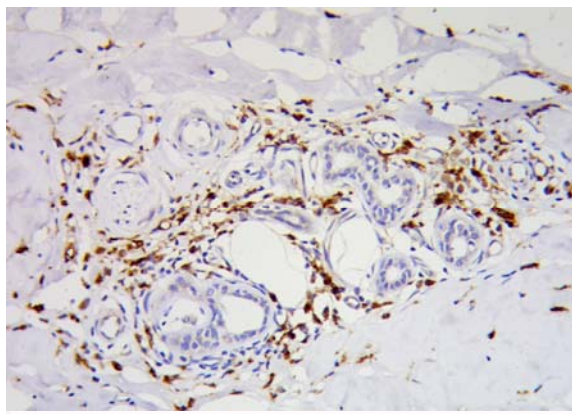


Рис. 3. Макрофагальная инфильтрация вокруг придатков кожи при ограниченной склеродермии на стадии отека. ИГХ реакция с CD68. $\times 400$.

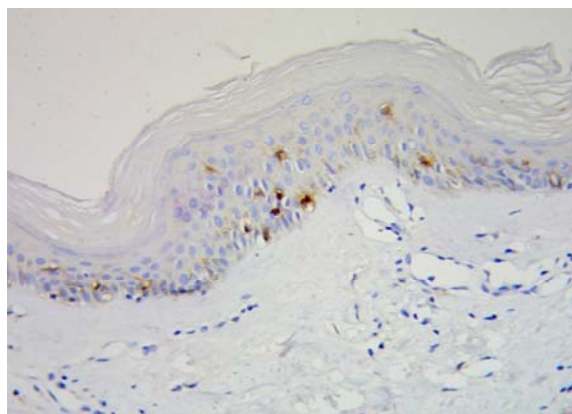


Рис. 4. Клетки Ланхгерганса в эпидермисе при ограниченной склеродермии на стадии отека. ИГХ реакция с CD1 α . $\times 400$.

Иногда в зонах выраженной инфильтрации эндотелий был слабее окрашенным на этот маркер. В отличие от наблюдений А.А.Dharmapathi и сотрудников (2001), мы также обнаружили синтез CD105 в дермальных дендроцитах, иммунных клетках инфильтратов и в единичных иммунных клетках. Судя по распределению CD105+ клеток в участках воспаления, ими, вероятнее всего, были макрофаги, что указывает на возможность активации синтеза дополнительных рецепторов к ростовым факторам и, таким образом, включение в патогенетические цепи склероза иммунных клеток определенных типов.

eNOS+ эндотелиоциты наблюдались во всех сосудистых структурах на стадии отека при ограниченной склеродермии. На этой стадии заболевания метка распределялась неравномерно. Так, в очагах инфильтрации большая часть сосудов имели эндотелий, позитивный на eNOS (рис.

6). В свободных от воспалительных инфильтратов зонах наблюдались сосуды как с высоким, так и с низким уровнем eNOS. Иногда вокруг сосудов с позитивным на этот маркер эндотелием также встречались периваскулярные клетки, имеющие повышенный уровень eNOS. Учитывая тесную связь между активностью eNOS и синтезом эндоглина (Dallas et al., 2008), мы предполагаем, что начальная активация эндотелиальной синтазы оксида азота может повышать выработку эндоглина, одного из посредников склеротических изменений, в клетках эндотелия и клетках других типов.

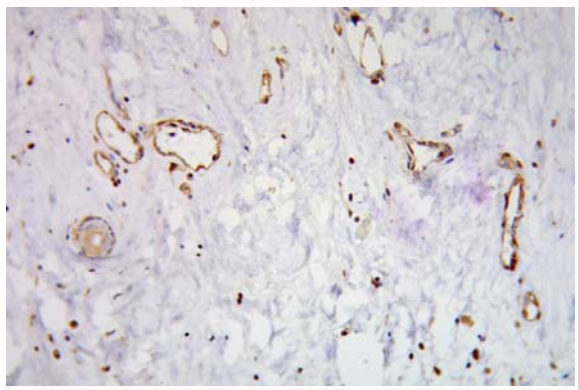


Рис. 5. Клетки, позитивные на эндоглин, в сосудах и дерме при ограниченной склеродермии на стадии отека. ИГХ реакция с CD105. $\times 400$.

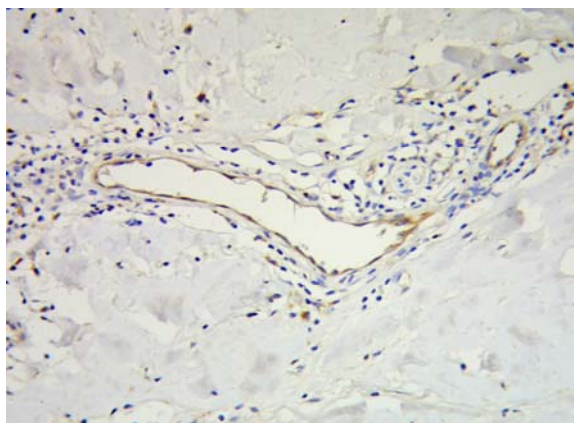


Рис. 6. Эндотелий сосудов дермы с активной реакцией на эндотелиальную синтазу оксида азота при ограниченной склеродермии на стадии отека. ИГХ реакция с eNOS. $\times 400$.

Дендрциты дермы, позитивные на CD34, или дермальные дендритические клетки 2 типа, при ограниченной склеродермии в стадии отека обнаруживались в количестве, несколько меньшем, чем в норме, что было описано ранее (Савенкова В.В., 2008). Распределение дендрцитов могло быть относительно равномерным во всех слоях дермы при незначительной инфильтрации,

а в случаях выраженной инфильтрации относительно больше CD34+ дендрцитов наблюдалось в слоях дермы, свободных от инфильтратов. Эти клетки концентрировались в оболочке сосудов, а также вокруг придатков кожи, сохраняющих на этой стадии обычное строение. В некоторых случаях на стадии отека количество CD34+ дендрцитов около базальной мембраны потовых и сальных желез было уменьшенным. α SMA+ клетки в интактных участках кожи наблюдались в миоцитах мышц, поднимающих волосы, гладкомышечных клетках сосудов и в перичитах капилляров и мелких сосудов дермы. При ограниченной склеродермии в стадии отека количество этих клеток существенно возрастало. Динамика накопления этих клеток соответствовала прогрессированию воспалительных изменений и инфильтрации. Распределение α SMA+ клеток изменялось в сторону накопления вокруг придатков кожи, также их число значительно возрастало в интерстиции глубоких участков дермы, лишенных придатков. Количество виментин-позитивных клеток резко увеличивалось в стадии отека при ограниченной склеродермии по сравнению с нормой. Распределение этих клеток находилось в существенной зависимости от выраженности воспалительных изменений. Так, в зонах лимфоидной инфильтрации и, в особенности, вокруг них мы наблюдали существенное накопление виментин-позитивных клеток, независимо от того, где происходила инфильтрация, – в глубоких слоях дермы или же в сосочковом слое и поверхностных участках сетчатого слоя. Паттерн распределения виментин-позитивных клеток в некоторых случаях совпадал с распределением α SMA+ клеток. Количество коллагена IV в базальной мембране эпидермиса практически не изменялось. Он также присутствовал в базальной мембране вокруг придатков кожи и вокруг мелких сосудов.

Во всех исследованных образцах кожи Ki67+ клетки обнаруживались в составе базального слоя эпидермиса и в эпителии придатков. Мы наблюдали клетки с пролиферативным потенциалом в составе мононуклеарных инфильтратов. При этом они составляли до 7-10% от общего количества клеток инфильтрата. Также клетки, позитивные на этот маркер, находились в дерме в участках, прилегающих к периваскулярным инфильтратам. Bcl2+ клетки на стадии отека при ограниченной склеродермии в большом количестве обнаруживались среди клеток мононуклеарных инфильтратов. При этом они могли составлять около 40 % всех клеток в участках с воспалительными изменениями. В образцах, где выраженность инфильтрации была меньшей, было хорошо заметно, что bcl2+ клетки также были представлены популяцией дендрцитов дермы в участках активного воспаления.

Клетки, позитивные на каспазу 3, на стадии

отека концентрировались в участках с выраженными воспалительными изменениями, причем мононуклеарные клетки были окрашенными на этот маркер (до 10%). Внутри инфильтрированных участков большинство дермальных клеток демонстрировали позитивную реакцию. Вокруг зон с выраженным воспалением обнаруживалось множество единичных дермальных дендроцитов и иммунных клеток, позитивных на каспазу 3. Также обнаруживались положительные на этот фермент эндотелиальные клетки.

Таким образом, на стадии отека при ограниченной склеродермии апоптотические изменения наблюдались параллельно включению антиапоптотических программ и имели максимальную выраженность в клетках инфильтратов и в дендроцитах дермы. На этой стадии мы наблюдали наибольший процент запрограммированных на гибель клеток в составе иммунных, а также в составе дендроцитов вокруг участков воспаления. Возможно, что иммунные клетки активизируют гибель клеток, окружающих инфильтрированные участки, либо эта стимуляция происходит одновременно благодаря действию других факторов. Судя по активности каспазы в эндотелиальных клетках, исчезновение сосудов связано с активацией апоптоза через этот фермент. Высокий уровень каспазы в дермальных клетках свидетельствует о постоянной стимуляции клеточной гибели, что проявляется начальным уменьшением количества CD34+ дендроцитов и микрососудов.

Заключение

Стадия отека при ограниченной склеродермии связана с наиболее активными изменениями, как со стороны иммунной системы, так и местными перестройками тканей. На этой стадии в периваскулярных инфильтратах, мононуклеар-

ных скоплениях вокруг придатков кожи преобладают незрелые формы В-лимфоцитов (20-40%) и Т-лимфоциты (20-40%), среди последних – Т-супрессоры. В инфильтратах на ранних стадиях заболевания также присутствуют макрофаги (до 30%). Активность eNOS несколько повышена, также как и синтез CD105 (эндоглина) в дермальных дендроцитах, иммунных клетках инфильтратов и в единичных макрофагах клеток. Среди всех иммунных CD105+ клеток макрофаги составляют наибольшее число, что, возможно, указывает на их ведущую роль в запуске фиброза. На стадии отека количество CD34+ дендроцитов в сосочковом и поверхностных слоях сетчатого слоя дермы снижается, а клеток Лангерганса (CD1α+), виментин-позитивных и αSMA+ дендритических клеток увеличивается. В участках вокруг придатков изменения клеточного состава более существенны. С участками воспаления связана повышенная пролиферативная активность клеток иммунного ряда, апоптотическая их активность и гибель эндотелиоцитов сосудов. Параллельный запуск антиапоптотических программ в большей степени сопровождает перестройки в иммунных клетках. Высокий уровень каспазы 3 наблюдается в дендритических клетках вокруг участков воспаления, что проявляется уменьшением количества CD34+ дендроцитов.

Перспективы дальнейших исследований

Дальнейшие исследования в области патогенеза склеродермии должны охватить недавно описанные факторы активации и прогрессирования фиброза, их взаимодействия с различными клеточными популяциями кожи и иммунной системы.

Литературные источники

Савенкова В. В. Особенности морфо- и патогенеза кожи больных очаговой склеродермией в острой стадии заболевания / В. В. Савенкова // Дерматология та венерология. – 2008. – № 4 (42). – С. 26-30.

Endoglin (CD105): A marker of tumor vasculature and potential target for therapy / N. A. Dallas, S. Samuel, L. Xia [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2008. – Vol. 14, № 7. – P. 1931-1937. Expression of CD1α and CD86 on scleroderma Langerhans cells / Y. Xie, X. Zhang, Y. Inoue [et al.] // Eur. J. Dermatol. – 2008. – Vol. 18, № 1. – P. 50-54.

Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in localized scleroderma / Yong Xie, Xiaoyong Zhang, Shoji Wakasugi [et al.] // Int.

J. Dermatol. – 2007. – Vol. 47, № 5. – P. 438-442.

Nitric oxide synthase expression and activity in the tight-skin mouse model of fibrosis / A. Dooley, S. Y. Low, A. Holmes [et al.] // Rheumatology. – 2008. – Vol. 47, № 3. – P. 272-280.

The TGF beta receptor endoglin in systemic sclerosis / A. A. Dharmapathi, M. D. Smith, M. J. Ahern [et al.] // Asian. Pac. J. Allergy Immunol. – 2001. – Vol. 19, № 4. – P. 275-282.

Yokoyama E. Immunohistochemical evaluation of dermal mesenchymal cells in relation to the development of scleroderma / Emi Yokoyama // Bull. Yamaguchi Med. – 2005. – Vol. 52, № 3-4. – P. 43-53.

Романенко К.В. Стан клітинних популяцій та факторів розвитку склерозу при обмеженій склеродермії на стадії набряку: імуногістохімічне дослідження.

Резюме. З метою виявлення імуногістохімічних особливостей стану дерми і епідермісу при обмеженій склеродермії у стадії набряку було проведено дослідження маркерів: CD3, CD8, CD20, CD79 α , CD68, CD1 α , CD34, CD105, α SMA, віментин, eNOS, Ki67, колаген IV, bcl2, каспаза 3. На цій стадії в периваскулярних інфільтратах, монуклеарних скупченнях навколо придатків шкіри переважають незрілі форми В-лімфоцитів (20-40%) і Т-лімфоцити (20-40%), серед останніх – Т-супресори. У інфільтратах присутні макрофаги (до 30%). Активність eNOS в ендотелії судин підвищена. Синтез CD105 спостерігався в дермальних дендроцитах, імунних клітинах інфільтратів і в одиничних макрофагах. Серед імунних, макрофаги склали найбільше число CD105+ клітин. Кількість CD34+ дендроцитів була зниженою, а клітин Лангерганса (CD1 α +), віментин+ і α SMA+ дендритичних клітин збільшувалася. У ділянках навколо придатків зміни клітинного складу були більш істотними. З ділянками імунного запалення пов'язана підвищена проліферативна та апоптотична активність, а так само й активація антиапоптотичних програм. Таким чином, на стадії набряку при обмеженій склеродермії відбуваються активні зміни як з боку імунної системи, так й місцеві перебудови тканин шкіри.

Ключові слова: обмежена склеродермія, склероз, імуногістохімічні маркери, дермальні дендроцити, імунні клітини.