

**К.В.Романенко**

Донецкий национальный  
медицинский университет  
им. М.Горького

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

Надійшла: 04.03.2010

Прийнята: 22.03.2010

УДК 616.5-004.1-03-07-018.1-097

## **ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И ФАКТОРОВ РАЗВИТИЯ СКЛЕРОЗА НА ПОЗДНИХ СТАДИЯХ ОГРАНИЧЕННОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ**

*Исследования проведены 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 на поздних стадиях развития ограниченной склеродермии в стадии отека было проведено исследование экспрессии маркеров: CD3, CD8, CD20, CD79α, CD68, CD1α, CD34, CD105, αSMA, виментин, eNOS, Ki67, коллаген IV, bcl2, каспаза 3. Обнаружено, что по мере ослабления воспалительных процессов в составе мононуклеарных инфильтратов происходят следующие изменения: частичное замещение Т-лимфоцитов на В-лимфоциты, преобладание зрелых В-лимфоцитов, увеличение относительной доли Т-супрессоров. По мере развития склероза активность eNOS постоянно снижается. Маркер CD105 преобладает в эндотелиальных клетках. Количество CD34+ дендрцитов в сосочковом и поверхностных участках сетчатого слоя дермы постоянно снижается, что приводит к формированию градиента. Количество CD1α+, виментин+ и αSMA+ дендритных клеток максимально на стадии отека и уплотнения и снижается на стадии склероза. В участках вокруг придатков изменения клеточного состава более существенны. К стадии склероза существенно снижается количество клеток, позитивных на Ki67, каспазы 3 и bcl2+ как среди иммунных, так и дендритных клеток.

**Морфологія.** – 2010. – Т. IV, № 1. – С. 40-46.

© К.В.Романенко, 2010

**Romanenko K.V. Immunohistochemical characteristics of cellular populations and factors of sclerosis development on the late stages of localized scleroderma.**

**Summary.** The purpose of the current study was to reveal immunohistochemical features of derma and epidermis in the late stage of localized scleroderma using markers: CD3, CD8, CD20, CD79α, CD68, CD1α, CD34, CD105, αSMA, vimentin, eNOS, Ki67, collagen IV, bcl2, caspase 3. It was determined that as far as inflammatory processes weakens there are the followings changes in mononuclear infiltrates: partial substitution of T-limphocytes on B, predominance of mature B-lymphocytes, increase in T-suppressors amount. The eNOS activity decreases constantly. The CD105 marker prevails in endothelium. CD34+ dendrocytes in papillary and superficial areas of the dermal reticular layer reduce in number constantly that results in forming of gradient. CD1α+, vimentin+ and αSMA+ of dendritic cells are maximal in number on the stage of edema and induration and break down on the stage of sclerosis. The change of cellular composition was more substantial round the appendages of skin. Till the sclerosis stage Ki67+ cells amount decreases substantially, as well as caspase 3+ and bcl2+ cells, both among immune and dendritic cells.

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

### **Введение**

Склеродермия относится к диффузным заболеваниям соединительной ткани, при которых иммунологические нарушения сопровождаются глубокими изменениями внутриклеточного синтеза и метаболизма белков внеклеточного матрикса, клеточного состава соединительной ткани, поражением сосудов и придатков кожи (Tu J.H., Eisen A.Z., 1999; Yokoyama E., 2005; Xie Y. et al.,

2008). В последние годы возможности изучения патогенеза этого заболевания расширились благодаря иммуногистохимическим методам. Так, В.В.Савенкова (2008) при исследовании кожи при очаговой склеродермии на склеротической стадии выявила увеличение количества CD4+ и CD8+ клеток, а также активацию CD16+ макрофагов. Учитывая, что указанные клетки являются продуцентами интерлейкинов 1 и 2, автор пред-

положила путь нарушения синтеза коллагена через активацию интерлейкинами синтеза эндотелина-1 в эндотелиальных клетках и, как следствие, нарушение их проницаемости и отек. Также в патогенезе фибротических изменений ряд авторов предполагает участие эндоглина – дополнительного рецептора к трансформирующему фактору роста (TGF $\beta$ ) (Dharmapathi A.A. et al., 2001), системы синтеза оксида азота (Dooley A. et al., 2008). Однако сохраняется множество вопросов о взаимодействии иммунных клеток, эндотелия и дермальных дендритов при прогрессировании склеродермии.

**Целью** работы было выявление изменений в составе клеток дермы и эпидермиса, клеток иммунного ряда, синтезе коллагена IV типа, эндотелиальной синтазы оксида азота, эндоглина на стадии отека и уплотнения и стадии склероза при ограниченной склеродермии.

#### **Материалы и методы**

Для морфологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования использовали материал, взятый у 12 больных ограниченной склеродермией на стадии отека и уплотнения и стадии склероза. 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 $^{\circ}$ 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 $\alpha$  (клон SP18, LabVision), CD68 (клон KP1, LabVision), CD1 $\alpha$  (клон MTB1, LabVision), CD34 (клон QBEnd/10, LabVision), CD105 (клон SN6h, LabVision),  $\alpha$ 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 $^{\circ}$ 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**

На стадии отека и уплотнения при ограниченной склеродермии выраженность воспалительных изменений была существенно меньшей, чем на стадии отека. В мононуклеарных инфильтратах мы наблюдали сохранение либо, что чаще, уменьшение относительной доли зрелых

Т-лимфоцитов. При этом мы обнаружили следующую тенденцию: чем меньше инфильтрат, тем меньше в нем CD3+ клеток. Количество CD8+ клеток на всех стадиях склеродермии было значительным. CD20+ клетки составляли до 50% клеток инфильтратов. CD79 $\alpha$ + клетки обнаруживались в незначительных количествах и, как правило, находились в составе инфильтратов. На стадии отека и уплотнения количество CD68+ как в инфильтратах, так и вокруг придатков кожи было существенным, в дерме также встречались единичные макрофаги. На стадии склероза общее количество CD68+ уменьшалось, при этом сохранялась их основная локализация вокруг инфильтратов и придатков кожи. Таким образом, по мере ослабления воспалительных процессов на стадиях отека и уплотнения и стадии склероза в составе мононуклеарных инфильтратов происходят следующие изменения: частичное замещение Т-лимфоцитов на В-лимфоциты, в популяции последних преобладание зрелых форм, о чем свидетельствует увеличение количества CD20+ и снижение в их популяции относительной доли CD79 $\alpha$ + лимфоцитов; увеличение относительной доли Т-супрессоров. В целом, изменения в иммунном статусе при развитии ограниченной склеродермии сходны с теми, что наблюдаются при хроническом воспалении (Xie Y. et al., 2007).

Количество CD1 $\alpha$ + клеток в эпидермисе было повышенным на стадии отека и уплотнения и снижалось при формировании выраженных склеротических изменений в дерме. При резкой атрофии эпителия на поздней стадии развития склеродермии CD1 $\alpha$ + клетки могли полностью отсутствовать. Клетки Ланхгерганса никогда не формировали скоплений и часто их распределение имело равномерный характер. При начальных изменениях в эпидермисе при ограниченной и системной склеродермии увеличение количества клеток Ланхгерганса может играть роль в запуске атрофических и склеротических изменений. На стадиях, когда атрофия становится выраженной, по-видимому, их размножение в эпидермисе подавляется так же, как и других видов клеток в этом слое кожи.

На стадии отека и уплотнения, кроме сосудистого эндотелия, позитивная окраска на CD105+ обнаруживались в соединительнотканых клетках дермы, оболочках сосудов, часто клетки инфильтрата также имели положительную реакцию с этим маркером (рис. 1). На поздних стадиях как в участках дермы, расположенных вокруг зон с воспалительными изменениями, так и в зонах с фиброзными перестройками, все сосуды имели эндотелий, интенсивно окрашенный на CD105. Следует отметить, что на стадии склероза, количество неэндотелиальных CD105+ клеток существенно снижалось. На всех изученных стадиях очагового поражения в разных слоях дермы встречались единичные клетки,

позитивные на этот маркер, однако, на стадии склероза позитивные на CD105 иммунные клетки и дендроциты наблюдались редко. В основном, все CD105+ клетки были эндотелиальными или концентрировались в стенке сосудов. При прогрессировании ограниченной склеродермии постоянно снижалось количество сосудов с активной реакцией на eNOS, что было показано

ранее другими авторами (Cotton S.A. et al., 1999). Включение механизмов, усиливающих синтез eNOS на начальных стадиях развития ограниченной склеродермии, особенно в очагах воспаления, по нашему мнению, демонстрирует усиление защитных механизмов в эндотелиальных клетках, которые истощаются на последующих стадиях развития склеродермии.

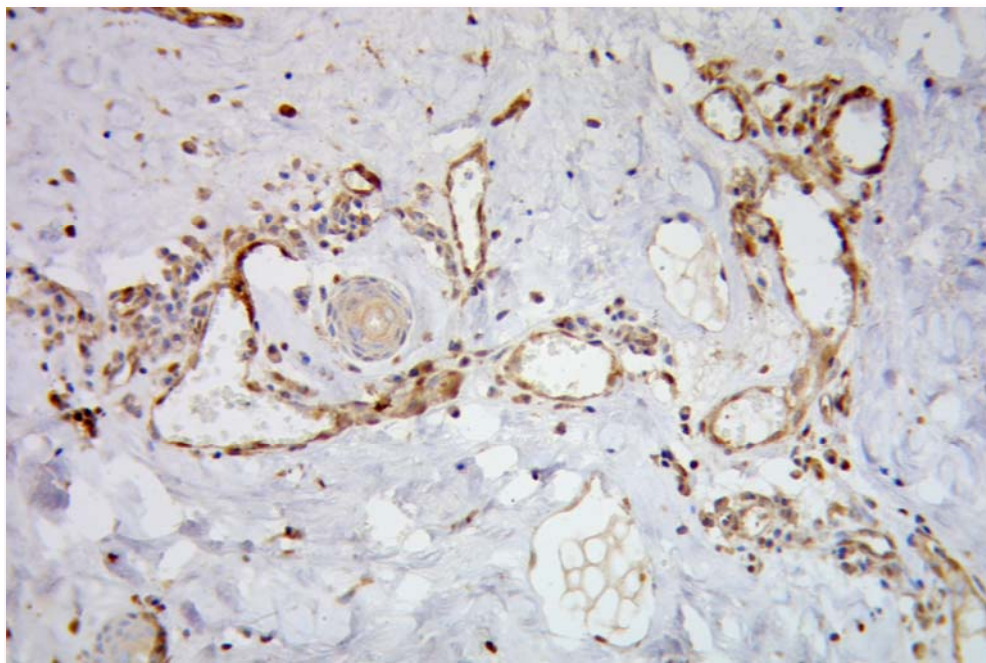


Рис. 1. Клетки позитивные на эндоглин в инфильтратах, стенке сосудов и дерме при ограниченной склеродермии на стадии отека и уплотнения. ИГХ реакция с CD105.  $\times 400$ .

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. Однако динамика снижения количества CD105+ клеток была более активной, чем уменьшение количества макрофагов. Это свидетельствует о том, что по мере развития ограниченной склеродермии, происходит постепенная смена механизмов, поддерживающих склероз. Возможно, что только начальные фибротические изменения требуют активного синтеза рецепторов к ростовым факторам в клетках иммунного ряда. Параллельно развитию склероза и снижению активности eNOS уменьшается количество CD105+ клеток, которые на ранних стадиях заболевания стимулируют фибротические изменения. Мы предполагаем, что начальная активация эндотелиальной синтазы оксида азота может повышать выработку эндоглина, одного из посредников склеротических изменений (Dallas N.A. et al., 2008), в клетках эндотелия и клетках других типов.

При ограниченной склеродермии в стадии отека и уплотнения мы наблюдали существенное снижение количества CD34+ клеток по сравнению со стадией отека. Это происходило как за счет популяции CD34+ клеток вокруг придатков кожи, так и за счет позитивных на этот маркер дендритных клеток. Уменьшение числа CD34+ дендроцитов наблюдалось также вокруг базальной мембраны придатков кожи и в участках, лишенных придатков. При ограниченной склеродермии в стадии отека и уплотнения распределение CD34+ дендроцитов имело относительно равномерный характер в сетчатом слое дермы. Они часто не наблюдались в сосочковом слое и поверхностных слоях сетчатого слоя дермы. При ограниченной склеродермии в стадии отека и уплотнения начинал формироваться выраженный градиент в распределении CD34+ дендроцитов (рис. 2), связанный с ослаблением реакции в слоях, близких к эпидермису. В стадии склероза наблюдалось минимальное число CD34+ дендроцитов вокруг желез и волосяных фолликулов. По мере усиления выраженности фиброзных изменений усиливалась диффузность в расположении этих клеток. Снижалось количество CD34+



дендроцитов дермы в глубоких слоях дермы. При этом их практически не наблюдалось в сосочковом слое, который к этому времени подвергался значительным фибротическим изменениям.

Распределение  $\alpha$ SMA+ клеток изменялось в сторону накопления вокруг придатков кожи, также их число значительно возрастало в интерстиции глубоких участков дермы, лишенных придатков (рис. 3). При прогрессировании вос-

палительных изменения они обнаруживались вдоль волокон соединительной ткани, подобно тому, как это наблюдалось для CD34+ дендроцитов. В стадиях отека и уплотнения их число было максимальным. В стадии склероза при ограниченной склеродермии их число снижалось, особенно в интерстиции вокруг придатков кожи по сравнению со стадией отека, однако, оставалось увеличенным по сравнению с нормой.

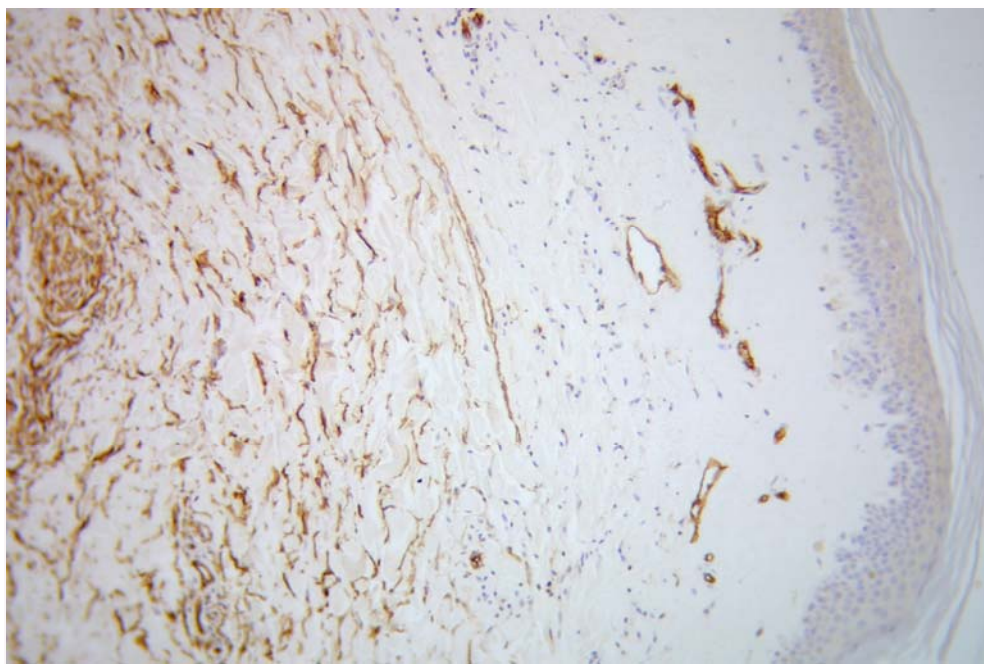


Рис. 2. Градиент в распределении CD34+ дендроцитов при ограниченной склеродермии в стадии отека и уплотнения. ИГХ реакция с CD34.  $\times 40$ .

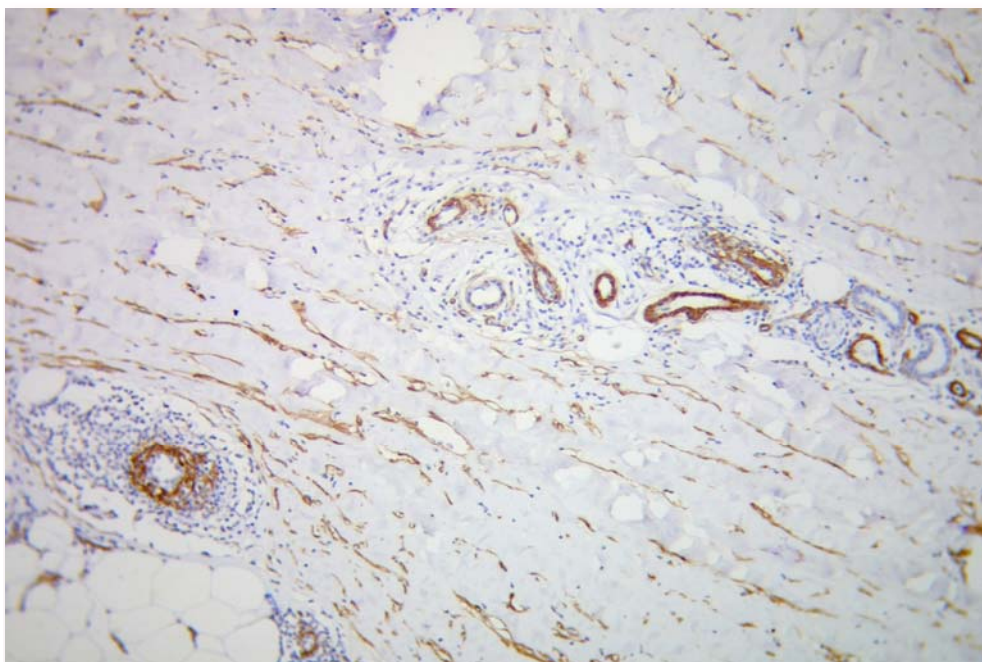


Рис. 3.  $\alpha$ SMA+ клетки в дерме и вокруг придатков кожи при ограниченной склеродермии в стадии отека и уплотнения. ИГХ реакция с  $\alpha$ SMA+.  $\times 40$ .

При ограниченной склеродермии в стадии отека и уплотнения реакция на виментин обнаруживались в глубоких слоях дермы в клетках, лежащих на поверхности коллагеновых волокон. Они концентрировались также в зонах инфильтрации и в поверхностных слоях дермы. На стадиях отека и последующей стадии эти клетки всегда обнаруживались вокруг придатков кожи. На стадии склероза количество виментин-позитивных клеток снижалось во всех слоях дермы, также обращало на себя внимание снижение их числа вокруг придатков кожи. Более выраженная отрицательная динамика была характерна для сосочкового слоя и поверхностных участков сетчатого слоя. Таким образом, количество виментин<sup>+</sup> и  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> клеток максимально до стадии отека и уплотнения, а затем их число

снижается в соответствии с общей тенденцией снижения количества дендроцитов. Таким образом, при склеродермии изменяется соотношения между дендритами 1 и 2 типа. Виментин<sup>+</sup> и  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> дендритные клетки пролиферируют и обуславливают развитие фиброза, что также описано в исследованиях R.Walters с соавторами (2009), а CD34<sup>+</sup> дендроциты, по-видимому, малоактивны и не являются первостепенными участниками фибротических изменений.

На поздних стадиях ограниченной склеродермии уменьшалась толщина слоя коллагена IV типа в базальной мембране эпидермиса наряду с усилением окрашивания вокруг мелких сосудов (рис. 4). На стадии склероза при очаговой склеродермии резко уменьшалось количество коллагена IV вокруг придатков кожи.

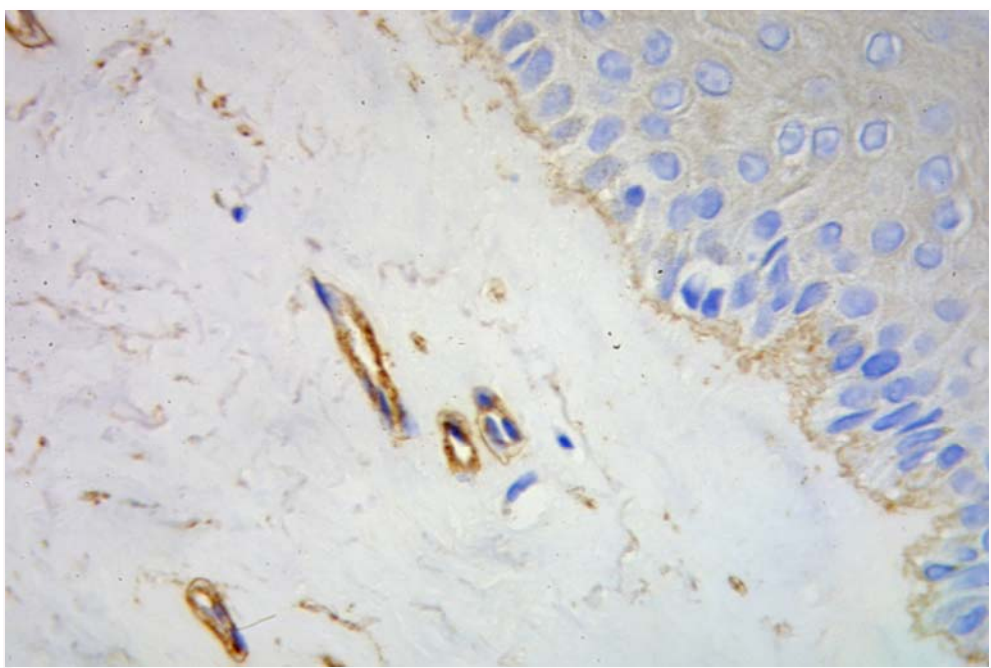


Рис. 4. Коллаген IV в базальной мембране эпидермиса и мелких сосудов при ограниченной склеродермии в стадии склероза. ИГХ реакция с коллагеном IV.  $\times 400$ .

На стадии уплотнения и склероза снижалось количество Ki67<sup>+</sup> в инфильтратах, а среди дендроцитов дермы пролиферирующих клеток не обнаруживалось. На стадии склероза количество Ki67<sup>+</sup> клеток в эпидермисе, дерме и в придатках кожи было минимальным. Клетки с активацией антиапоптотических программ (bcl2<sup>+</sup>) присутствовали в периваскулярных инфильтратах, однако, в существенно меньшем количестве. Также мы обнаруживали их в составе эпителиальных клеток придатков. Позитивные на каспазу 3 дендроциты концентрировались вокруг придатков кожи, внутри и вокруг зон остаточных воспалительных реакций. Количество позитивных на каспазу 3 клеток в инфильтратах уменьшалось в соответствии со снижением активности воспали-

тельного процесса. Это происходило в основном за счет практически полного исчезновения апоптотической активности иммунных клеток, при этом количество позитивных на этот маркер дендритных клеток оставалось довольно высоким на всех стадиях очаговой склеродермии. Часто при отсутствии позитивной реакции на этот фермент в клетках мононуклеарного инфильтрата, дендроциты внутри и вокруг него демонстрировали выраженную апоптотическую активность. Высокий уровень каспазы 3 в дермальных клетках на всех стадиях ограниченной склеродермии свидетельствует о постоянной стимуляции клеточной гибели, что проявляется в уменьшении количества всех видов дендроцитов и микрососудов. Снижение как позитивных на каспазу 3, так и

bcl2+ клеток на стадии отека и уплотнения и стадии склероза происходило одновременно и было взаимосвязанным. По нашему мнению, это свидетельствовало об общности реакции на факторы, обуславливающие прогрессирование заболевания, в разных клеточных популяциях.

#### **Заключение**

По мере ослабления воспалительных процессов на стадиях отека и уплотнения и стадии склероза в составе инфильтратов происходят следующие изменения: частичное замещение Т-лимфоцитов на В, преобладание зрелых В-лимфоцитов, увеличение относительной доли Т-супрессоров. Активность eNOS повышается на начальных стадиях развития очаговой склеродермии, и постоянно снижается до стадии склероза. К стадии склероза сохраняются, в основном, эндотелиальные CD105+ клетки. При развитии очаговой склеродермии количество CD34+ дендроцитов постоянно снижается. К стадии отека и уплотнения формируется градиент, связанный с уменьшением числа CD34+ дендроци-

тов в сосочковом и поверхностных участках сетчатого слоя дермы. Количество клеток Лангерганса (CD1α+), виментин-позитивных и αSMA+ дендритических клеток максимально на стадии отека и уплотнения и снижается на стадии склероза. В участках вокруг придатков изменения клеточного состава более существенны. С участками иммунного воспаления связана повышенная пролиферативная и апоптотическая активность, а так же активация антиапоптотических программ. К стадии склероза существенно снижается количество клеток, позитивных на каспазу 3 и bcl2+ как среди иммунных, так и дендритических клеток.

#### **Перспективы дальнейших исследований**

Дальнейшие исследования в области патогенеза склеродермии должны выявить новые связи факторов развития фиброза и динамики изменений в клеточных популяциях кожи и иммунной системы.

#### **Литературные источники**

Савенкова В. В. Морфогенез кожи больных очаговой склеродермией в склеротической стадии / Савенкова В. В. // Український журнал дерматології, венерології, косметології. – 2008. – № 4. – С. 14-17.

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.

Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin / S. A. Cotton, A. L. Herrick, M. I. Jayson, A. J. Freemont // J. Pathol. – 1999. – Vol. 189, № 2. – P. 273-278.

Expression of CD1a 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.] // Intern. 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 (Oxford). – 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.

Tu J. H. Scleroderma. Fitzpatrick's dermatology in general medicine / Tu J. H., Eisen A. Z. ; [5<sup>th</sup> Ed. Editors J. M. Freedberg et al.]. – NY : McGraw-Hill, 1999. – Vol. 2. – P. 2023-2033.

Walters R. Elastic fiber pattern in scleroderma/morphea / Ruth Walters, Melissa Pulitzer, Hideko Kamino // J. Cutan. Pathol. – 2009. – Vol. 36, № 9. – P. 952-957.

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. Імуногістохімічна характеристика клітинних популяцій та чинників розвитку склерозу на пізніх стадіях обмеженої склеродермії.**

**Резюме.** З метою виявлення імуногістохімічних особливостей стану дерми та епідермісу при обмеженій склеродермії на пізніх стадіях розвитку було проведено дослідження маркерів: CD3, CD8, CD20, CD79α, CD68, CD1α, CD34, CD105, αSMA, виментин, eNOS, колаген IV, bcl2, каспаза 3. Виявлено, що по мірі ослаблення запальних процесів у складі мононуклеарних інфільтратів відбуваються наступні зміни: часткове заміщення Т-лімфоцитів на В-лімфоцити, переважаання зрілих В-лімфоцитів, збільшення відносної частки Т-супресорів. При розвитку склерозу активність eNOS постійно знижується. Маркер CD105 переважає в ендотеліальних клітинах. Кількість CD34+ дендроцитів в сосочковому та поверхне-

вих ділянках сітчастого шару дерми постійно знижується, що призводить до формування градієнта. Кількість CD1 $\alpha$ +, виментин+ і  $\alpha$ SMA+ дендритичних клітин максимальна на стадії набряку і ущільнення і знижується на стадії склерозу. У ділянках навколо придатків зміни клітинного складу більш істотні. До стадії склерозу значно знижується кількість клітин, позитивних на Ki67, каспазу 3 та bcl2+ як серед імунних, так і дендритних клітин.

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