

УДК 616.5-004.1-03-07-018.1-097

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОРАЖЕННОЙ КОЖИ
ПРИ ОГРАНИЧЕННОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ
В СТАДИИ ОТЕКА И УПЛОТНЕНИЯ И СТАДИИ СКЛЕРОЗА**

К.В.Романенко

Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького

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

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 [6, 10, 8]. В последние годы возможности изучения патогенеза этого заболевания расширились, благодаря иммуногистохимическим (ИГХ) методам. Так, [1] 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 предположила 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 ростовому фактору (TGFβ) [4], системы синтаза оксида азота [5]. Однако, сохраняется множество вопросов о взаимодействии иммунных клеток, эндотелия и дермальных дендрцитов при прогрессировании склеродермии.

Цель работы - 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 (ОС).

Материал и методы исследования. Для морфологического и иммуногистохимического исследования использовали парафиновые блоки биопсийного материала, взятого у 16 больных ОС 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 +121⁰C). С целью определения экспрессии ИГХ маркеров использовали спектр антител, которые включали маркеры: CD3 (клон SP7, LabVision), CD8 (клон SP16, LabVision), CD20 (клон L26, LabVision), CD79α (клон SP18, LabVision), CD68 (клон KP1, LabVision), CD1α (клон MTB1, LabVision), CD34 (клон QBEnd/10, LabVision), CD105 (клон SN6h, LabVision), αSMA (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 23-25⁰C 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 ОС выраженность воспалительных изменений была существенно меньшей, чем на стадии отека. В мононуклеарных инфильтратах мы

наблюдала сохранение, либо, чаще, уменьшение в них относительной доли зрелых Т-лимфоцитов. При этом мы обнаружили 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. CD79α+ 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, в популяции последних преобладание зрелых форм, о чем свидетельствует увеличение количества CD20+ и снижение в их популяции относительной доли CD79α+ лимфоцитов; увеличение относительной доли Т-супрессоров. В целом, изменения в иммунном статусе при развитии ОС сходны с теми, что наблюдаются при хроническом воспалении [9]. Количество CD1α+ 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 ОС CD1α+ клетки могли полностью отсутствовать. Клетки Лангерганса никогда не формировали скоплений и часто их распределение имело равномерный характер. При начальных изменениях в эпидермисе при ОС увеличение количества клеток Лангерганса может играть роль в запуске склеротических и атрофических 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+ обнаруживалась 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 не эндотелиальных 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 дендрциты наблюдались редко, в основном, все CD105+ клетки были эндотелиальными или концентрировались в стенке сосудов. При прогрессировании ОС постоянно снижалось количество сосудов с активной реакцией на eNOS, что было показано ранее другими авторами [2]. Включение механизмов, усиливающих синтез eNOS на начальных стадиях развития (ОС), особенно в очагах воспаления, по нашему мнению, демонстрирует усиление защитных механизмов в эндотелиальных клетках, которые истощаются на последующих стадиях развития склеродермии. 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 ОС, 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 сни-

жению 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 [3], в клетках эндотелия и клетках других типов. При ОС в стадии отека и уплотнения мы наблюдали существенное снижение количества CD34+ позитивных клеток по сравнению со стадией отека. Это происходило как за счет популяции CD34+ позитивных клеток вокруг придатков кожи, так и за счет позитивных на этот маркер дендритических клеток. Уменьшение числа CD34+ дендроцитов наблюдалось также вокруг базальной мембраны придатков кожи и в участках, лишенных придатков кожи. При ОС 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 ОС 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 α SMA+ клеток изменялось в сторону накопления вокруг придатков кожи, также их число значительно возрастало в интерстиции глубоких участков дермы, лишенных придатков кожи (рис. 3). При прогрессировании воспалительных изменений 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 ОС их число снижалось, особенно в интерстиции вокруг придатков кожи по сравнению со стадией отека, однако, оставалось увеличенным по сравнению с нормой. При ОС 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 отека и уплотнения 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-позитивных и α SMA+ клеток максимально до стадии отека и уплотнения, а затем их число снижается в соответствии с общей тенденцией снижения количества дендроцитов. То есть, при ОС изменяется соотношение между дендроцитами 1 и 2 типа. Виментин+ и α SMA+ дендритические клетки пролиферируют и обуславливают развитие фиброза, что также описано в исследованиях [9], а CD34+ дендроциты, по видимому, малоактивны, и не являются первостепенными участниками фибротических изменений. На поздних стадиях ОС уменьшалась толщина слоя коллагена IV типа в базальной мембране эпидермиса наряду с усилением окрашивания вокруг мелких сосудов (рис. 4). На стадии склероза при ОС резко уменьшалось количество коллагена IV вокруг придатков кожи. На стадии уплотнения и склероза снижалось количество Ki67+ в инфильтратах, а среди дендроцитов дермы пролиферирующих клеток не обнаруживалось. На стадии склероза количество Ki67+ клеток в эпидермисе, дерме и в придатках кожи было минимальным. Клетки с активацией антиапоптотических программ (bcl2+) присутствовали в периваскулярных инфиль-

тратах, однако, в существенно меньшем количестве. Также мы обнаруживали их в составе эпителиальных клеток придатков кожи. Позитивные на каспазу дендроциты концентрировались вокруг придатков кожи, внутри и вокруг зон остаточных воспалительных реакций. Количество позитивных на каспазу клеток в инфильтратах уменьшалось в соответствии со снижением активности воспалительного процесса, в основном, за счет практически полного исчезновения апоптотической активности иммунных клеток, при этом количество позитивных на этот маркер дендритических клеток оставалось довольно высоким на всех стадиях ОС. Часто при отсутствии позитивной реакции на этот фермент в клетках мононуклеарного инфильтрата, дендроциты внутри и вокруг него демонстрировали выраженную апоптотическую активность. Высокий уровень каспазы в дермальных клетках на всех стадиях ОС свидетельствует о постоянной стимуляции клеточной гибели, что проявляется уменьшением количества всех видов дендроцитов и микрососудов. Снижение как позитивных на каспазу, 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. Дальнейшие исследования в области патогенеза склеродермии должны выявить новые связи факторов развития фиброза и динамики изменений в

клеточных популяциях кожи и иммунной системы.

Выводы. 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 ограниченной склеродермии, и постоянно снижается до стадии склероза. К стадии склероза сохраняются, в основном, эндотелиальные CD105+ клетки. При развитии ограниченной склеродермии количество CD34+ дендроцитов постоянно снижается. К стадии отека и уплотнения формируется градиент, связанный с уменьшением числа CD34+ дендроцитов в сосочковом и поверхностных участках сетчатого слоя дермы. Количество клеток Лангерганса (CD1a+), виментин-позитивных и αSMA+ дендритических клеток максимально на стадии отека и уплотнения и снижается на стадии склероза. В участках вокруг придатков кожи изменения клеточного состава более существенны. С участками иммунного воспаления связана повышенная пролиферативная и апоптотическая активность, а также активация антиапоптотических программ. К стадии склероза существенно снижается количество клеток, позитивных на каспазу и bcl2+, как среди иммунных, так и дендритических клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савенкова В.В. Морфогенез кожи больных очаговой склеродермией в склеротической стадии // Укр. журнал дерматології, венерології, косметології. – 2008. – № 4. – С. 14-17.
2. Cotton S.A., Herric A.L., Jayson M.I., Freemont A.J. Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin // J. Pathol. – 1999. – Vol. 189, № 2. – P. 273-278.
3. Dallas N.A., Samuel S., Xia L. et al. Endoglin (CD105): A Marker of Tumor Vasculature and Potential Target for Therapy // Clin. Cancer Res. – 2008. – Vol. 14, № 7. – P. 1931-1937.
4. Dharmapatni A.A., Smith M.D., Ahern M.J. et al. The TGF beta receptor endoglin in systemic sclerosis // Asian Pac. J. Allergy Immunol. – 2001. – Vol. 19, № 4. – P. 275-282.
5. Dooley A., Low S.Y., Holmes A. et al. Nitric oxide synthase expression and activity in the tight-skin mouse model of fibrosis // Rheumatology. - 2008. - Vol. 47, № 3. - P. 272-280.

6. Tu J.H., Eisen A.Z. Scleroderma. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine // 5th Ed. Editors J.M. Freedberg et al. – NY: McGraw-Hill, 1999. – Vol. 2. – P. 2023-2033.
7. Walters R., Pulitzer M., Kamino H. Elastic fiber pattern in scleroderma/morphea // J. Cutaneous Pathology. – 2009. – Vol. 36, № 9. – P. 952-957.
8. Xie Y., Zhang X., Inoue Y. et al. Expression of CD1a and CD86 on scleroderma Langerhans cells // Eur. J. Dermatol. – 2008. – Vol. 18, № 1. – P. 50-54.
9. Xie Y., Zhang X., Wakasugi Sh. et al. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in localized scleroderma // International J.Dermatol. - 2007. - Vol. 47, № 5. - P. 438-442.
10. Yokoyama E. Immunohistochemical evaluation of dermal mesenchymal cells in relation to the development of scleroderma // Bull. Yamaguchi Med. – 2005. – Vol. 52, № 3-4. – P. 43-53.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА УРАЖЕНОЇ ШКІРИ ПРИ ОБМЕЖЕНІЙ СКЛЕРОДЕРМІЇ В СТАДІЇ НАБРЯКУ І УЩІЛЬНЕННЯ ТА СТАДІЇ СКЛЕРОЗУ

К.В.Романенко

При обмеженій склеродермії на пізніх стадіях розвитку було проведено дослідження маркерів: CD3, CD8, CD20, CD79 α , CD68, CD1 α , CD34, CD105, α SMA, віментин, eNOS, Ki67, 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, переважання зрілих В-лімфоцитів, збільшення відносної частки Т-супресорів. При розвитку склерозу активність eNOS постійно знижується. Маркер CD105 переважає в ендотеліальних клітинах. Кількість CD34+ дендроцитів постійно знижується, що призводить до формування градієнта, пов'язаного із зменшенням кількості CD34+ дендроцитів в сосочковому та поверхневих ділянках сітчастого шару дерми. Кількість CD1 α +, віментин+ і α SMA+ дендритичних клітин максимальна на стадії набряку і ущільнення і знижується на стадії склерозу. У ділянках навколо придатків зміни клітинного складу істотніші. До стадії склерозу істотно знижується кількість клітин, позитивних на Ki67, каспазу і bcl2+, як серед імунних, так й дендритичних клітин.

THE IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF DEFECTIVE SKIN ON EDEMA-INDURATION AND SCLEROSIS STAGES OF LOCALIZED SCLERODERMA

K.V.Romanenko

In the late stage of limited scleroderma using markers: CD3, CD8, CD20, CD79 α , CD68, CD1 α , CD34, CD105, α SMA, 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-supressors amount. The eNOS activity decreases constantly. The CD105 marker prevails in endothelium. CD34+ dendrocytes reduce in number constantly that result in forming of gradient with the minimal number of CD34+ dendrocytes in mammillary and superficial areas of the dermal reticular layer. CD1 α +, vimentin+ and α SMA+ of dendrytic 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. Ki67+ cells amount decreases substantially, as well as caspase+ and bcl2+ cell, to the sclerosis stage both among immune and dendrytic cells.

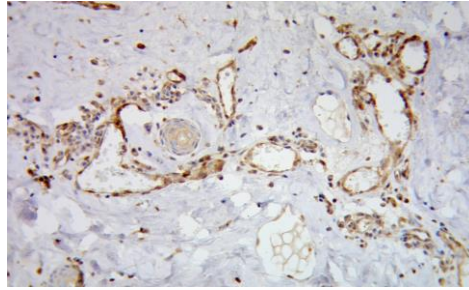


Рис. 1. Клетки, позитивные на эндоглин, в инфильтратах, стенке сосудов и дерме при ограниченной склеродермии на стадии отека и уплотнения. ИГХ реакция с CD105. $\times 400$.

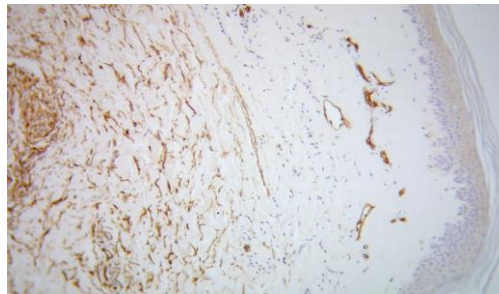


Рис. 2. Градиент в распределении CD34+ дендроцитов при ограниченной склеродермии в стадии отека и уплотнения. ИГХ реакция с CD34. $\times 400$.

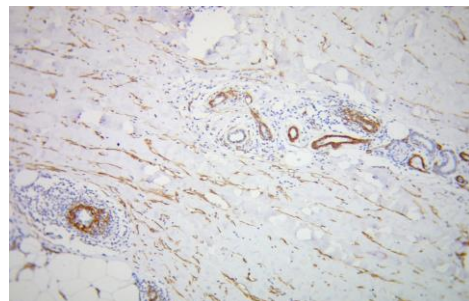


Рис. 3. α SMA+ клетки в дерме и вокруг придатков кожи при ограниченной склеродермии в стадии отека и уплотнения. ИГХ реакция с α SMA+. $\times 400$.