

УДК 616.5-004.1-018.2-078.73-018

© К.В. Романенко, 2010.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ПОРАЖЕННОЙ КОЖИ ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

К.В. Романенко

Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького

THE IMMUNOHISTOCHEMICAL PROFILE OF DEFECTIVE SKIN IN SYSTEMIC SCLERODERMA

K.V. Romanenko

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, CD79b, CD68, CD16, CD34, CD105, aSMA, vimentin, eNOS, Ki67, collagen IV, bcl2, caspase 3. In systemic scleroderma the composition of inflammatory infiltrates and their localization are similar to the ones that can be observed at the stage of sclerosis in a localized form of the disease. Mature B-lymphocytes prevail around the appendages of skin. As to the amount distribution of CD105+ cells, CD34+, vimentin-positive and aSMA+ cells, collagen IV, Ki67, bcl2 as well as the cells which positive to caspase 3 the state of skin in systemic scleroderma is similar to the one that can be seen at the sclerotic stage of a localized form. There at the amount of Langerhans' cells remains increased.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ ПРОФІЛЬ УРАЖЕНОЇ ШКІРИ ПРИ СИСТЕМНІЙ СКЛЕРОДЕРМІЇ

К.В. Романенко

РЕЗЮМЕ

З метою виявлення імуногістохімічних особливостей стану дерми і епідермісу при системній склеродермії було проведено дослідження маркерів: CD3, CD8, CD20, CD79b, CD68, CD16, CD34, CD105, aSMA, виментин, eNOS, Ki67, колаген IV, bcl2, каспаза 3. При системній склеродермії склад запальних інфільтратів та їх локалізація близькі до того, що спостерігаються на стадії склерозу при обмеженій склеродермії. Навкруги придатків шкіри переважають зрілі В-лімфоцити. По кількості та розподілу CD105+ клітин, CD34+, виментин-позитивних та aSMA+ клітин, колагену IV, Ki67+, bcl2+, а також клітин, позитивних на каспазу 3, стан шкіри при системній склеродермії схожий з тим, що спостерігається при склеротичній стадії обмеженої форми. При цьому кількість клітин Лангерганса в епідермісі зберігається підвищеною.

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

Системная склеродермия – аутоиммунное полиорганное диффузное заболевание соединительной ткани, поражающее кожу, сосуды и многие внутренние органы, в том числе сердце, легкие, ЖКТ. Поражение кожи сводится к воспалению, склерозу и сосудистым нарушениям. Иммунологические нарушения сопровождаются глубокими изменениями внутриклеточного синтеза и метаболизма белков внеклеточного матрикса, клеточного состава соединительной ткани, поражением сосудов и придатков кожи [7, 10, 9].

В последние годы возможности изучения патогенеза этого заболевания расширились, благодаря иммуногистохимическим (ИГХ) методам. Так, [1] на склеротической стадии очаговой склеродермии (ОС) выявила увеличение количества CD4+ и CD8+ клеток, а также активацию CD16+ макрофагов. Учитывая, что указанные клетки являются продуцента-

ми 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 эндотелина – дополнительного рецептора к трансформирующему фактору роста (ТГФ β) [3], системы синтаза оксида азота [4]. Однако сохраняется множество вопросов о взаимодействии иммунных клеток, эндотелия и дермальных дендритов при прогрессировании склеродермии.

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для морфологического и иммуногистохимического исследования использовали парафиновые блоки биопсийного материала пораженной кожи, взятого у 6 больных системной склеродермией (СС). После рутинного патогистологического исследования срезы толщиной 4-6 мкм наносили на адгезивные стекла SuperFrost Plus и депарафинировали 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), CD79б (клон SP18, LabVision), CD68 (клон KP1, LabVision), CD1б (клон МТВ1, LabVision), CD34 (клон QBEnd/10, LabVision), CD105 (клон SN6h, LabVision), бSMA (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 подбирали 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

При системной склеродермии в поверхностных и глубоких слоях дермы наблюдались моноцитарные инфильтраты, содержащие все виды иммунокомпетентных клеток. Они были периваскулярными или локализовались вокруг придатков кожи. CD3+ и CD8+ клетки находились, в основном, в составе скоплений вокруг сосудов. Там же обнаруживались CD20+, CD79б+, CD68+ клетки, которые вместе составляли до 60% от всех клеток инфильтрата.

Часто инфильтраты локализовались в подкожной жировой клетчатке (рис. 1), при этом инфильтрат содержал большее количество CD3+ клеток, чем мононуклеарные скопления в дерме. Вокруг придатков кожи находились в основном В-лимфоциты. Клетки Лангерганса (CD1б+), как правило, присутствовали в эпидермисе при СС в большем по сравнению с нормой количестве (рис. 2).

Во всех изученных случаях СС CD105+ клетки обнаруживались в основном в эндотелии и иногда в клетках периваскулярных инфильтратов.

В целом, их количество и распределение приближалось к тому, что наблюдается на стадии склероза при очаговой склеродермии. На низком уровне находилась активность eNOS в эндотелиальных клетках сосудов разной локализации, что было показано ра-

нее другими авторами [2]. В образцах кожи, полученных от больных СС, изменения количества и распределения CD34+ клеток носили тот же характер, что и при ограниченной склеродермии в стадии склероза [1, 10]. Выраженное снижение CD34+ клеток было характерным как для сосочкового, так и для сетчатого слоев дермы. При СС число аSMA+ клеток также снижалось. Активно эти клетки исчезали в интерстиции вокруг придатков кожи. Виментин-позитивные клетки обнаруживались в незначительном количестве вокруг придатков кожи и в сетчатом слое дермы (рис. 3). Локализация их часто совпадала с местами расположения аSMA+ клеток.

Таким образом, при СС изменяется соотношение между дендритами 1 и 2 типа. Согласно [8], виментин+, бSMA+ и FXIIIa+ дендритические клетки пролиферируют и обуславливают развитие фиброза, а CD34+ дендрциты, по-видимому, малоактивны и не являются первостепенными участниками фибротических изменений. По данным [10], при прогрессировании СС не было особых популяционных и топографических различий в интерстиции вокруг придатков кожи и в участках без придатков. В наших исследованиях обнаружилось более существенное снижение CD34+ клеток вокруг базальной мембраны волосяных фолликулов и желез кожи. Снижение количества дендрцитов 2 типа и увеличение клеток 1 типа в наших исследованиях наблюдалось при атрофических изменениях эпидермиса и придатков кожи. В целом, как отмечает [10], при СС общее количество дендрцитов не изменяется, а только их ИГХ профиль.

В базальной мембране эпидермиса количество коллагена IV типа было уменьшенным по сравнению с нормой, несколько возростала толщина прослойки этого вида коллагена вокруг мелких сосудов. Снижение прослойки коллагена под эпидермисом можно объяснить нарушениями в синтезе белка в дерме, а воспалительные изменения со стороны сосудов, напротив, вызывают накопление этого белка вокруг базальной мембраны капилляров и мелких сосудов [8].

Повышенная пролиферативная активность при СС была связана с мононуклеарными инфильтратами и уменьшалась по мере ослабления воспаления. Закономерным было угнетение процессов клеточного деления в эпидермисе и придатках кожи [5].

Ki67+ клетки при СС находились в составе базального слоя эпидермиса и в эпителии придатков в сниженном количестве по сравнению с нормой. Изредка пролиферативная активность определялась в клетках инфильтратов вокруг придатков кожи и в периваскулярных скоплениях иммунных клеток. Позитивные на каспазу дендрциты наблюдались вокруг придатков кожи, внутри инфильтратов и, как единичные, в разных слоях дермы. Иммунные клетки также демонстрировали активацию каспазы 3, но доля этих

клеток не превышала 5% от всех клеток инфильтрата. Снижение как позитивных на каспазу, так и bc12+ клеток происходило одновременно, это свидетельствовало об общности реакции кожи на факторы,

обуславливающие прогрессирование заболевания, в разных клеточных популяциях. На низком уровне находилась как пролиферативная, так и антиапоптотическая активность дермальных дендроцитов.

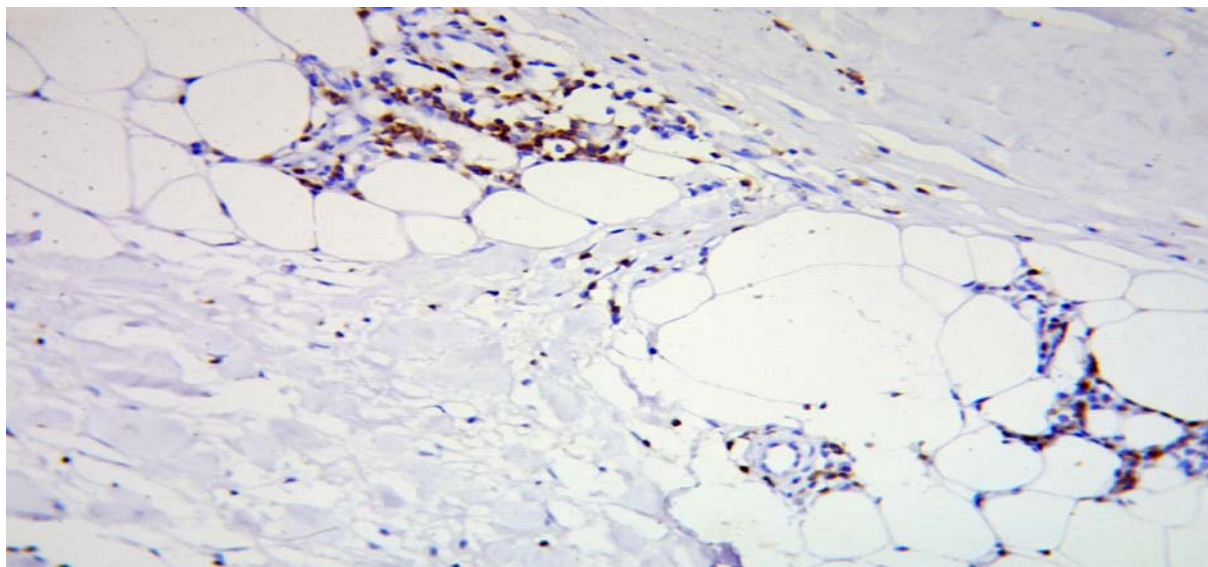


Рис. 1. Инфильтрация Т-лимфоцитами подкожной жировой клетчатки при системной склеродермии. ИГХ реакция с CD3. х200.

Таким образом, при системной склеродермии состав инфильтрата приближался к тому, что наблюдается в стадии склероза при ОС, однако, сами инфильтраты часто были более выраженными и захватывали гиподерму. В большем количестве, чем при ОС, вокруг придатков кожи обнаруживались В-лимфоциты, что возможно указывает на различные иммунные механизмы, приводящие к потере придатков при системной и ограниченной форме заболевания.

Как и при ОС, при системной склеродермии существенную роль в развитии фиброза играют CD105+ клетки и снижение уровня эндотелиальной синтазы оксида азота.

В целом, при системной склеродермии ИГХ картина приближалась к тому, что мы наблюдали в стадии склероза при ОС, что указывает на общность патогенетических изменений при обеих формах болезни.

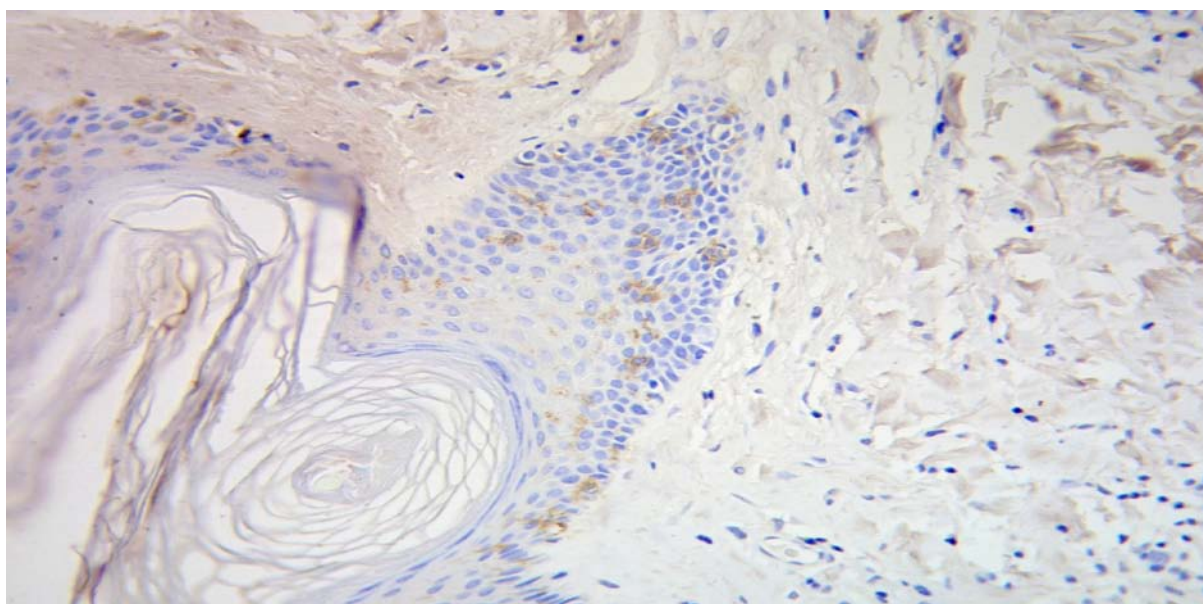


Рис. 2. Клетки Лангерганса в эпидермисе при системной склеродермии. ИГХ реакция с CD16. х400.

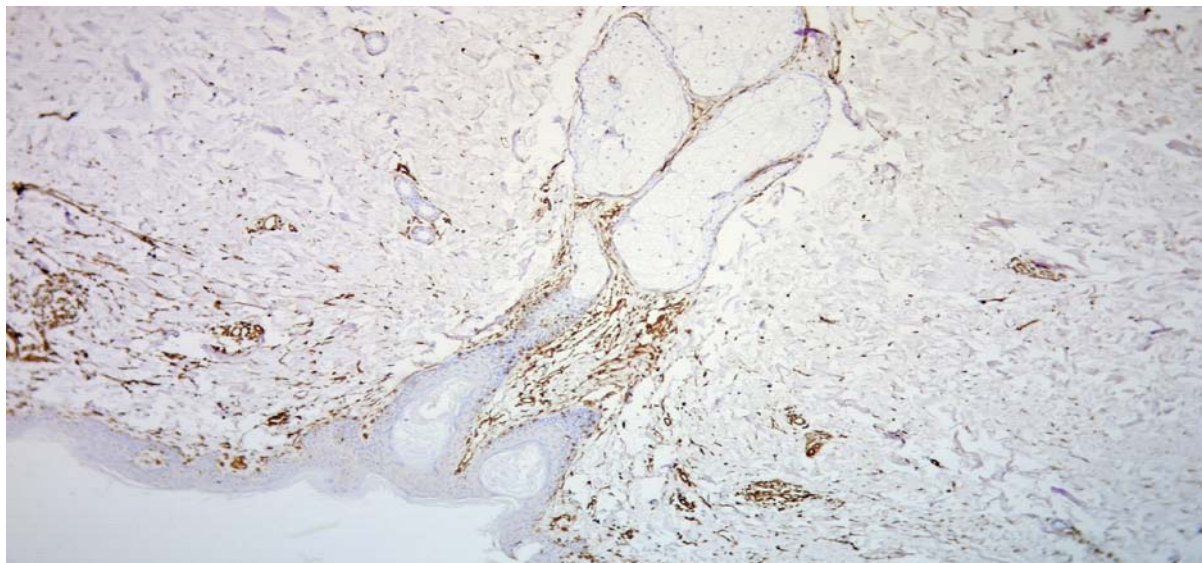


Рис. 3. Виментин-позитивная реакция в коже и вокруг придатков кожи при системной склеродермии. ИГХ реакция с виментином. х400.

Это было справедливо для состава воспалительных инфильтратов, за исключением инфильтратов вокруг придатков кожи, где было относительно больше зрелых В-лимфоцитов, и для клеток Лангерганса, хотя, в целом, количество этих клеток могло быть большим. Аналогичные изменения были характерными для количества и распределения CD105+ клеток, CD34+, виментин-позитивных и αSMA+ клеток, коллагена IV, Ki67+, bcl2+, а также клеток, позитивных на каспазу 3.

ВЫВОДЫ

При системной склеродермии состав воспалительных инфильтратов и их локализация близки к тому, что наблюдаются на стадии склероза при ограниченной склеродермии. Вокруг придатков кожи преобладают зрелые В-лимфоциты. По количеству и распределению CD105+ клеток, CD34+, виментин-позитивных и αSMA+ клеток, коллагена IV, Ki67+, bcl2+, а также клеток, позитивных на каспазу 3, состояние кожи при системной склеродермии сходно с тем, что наблюдается при склеротической стадии ограниченной склеродермии. При этом количество клеток Лангерганса в эпидермисе сохраняется повышенным.

ЛИТЕРАТУРА

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. 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.

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

5. Kwong O.S., Chung J.H., Kim J.A. et al. Apoptosis in scleroderma: differences with regard to clinical subsets and duration // Korean. J. Invest. Dermatol. – 1997. – Vol.4, №2. – P.166-173.

6. Rowell N.R. The skin in Systemic Sclerosis. In "Systemic Sclerosis: Scleroderma". Ed. by M.I.V. Jason and C.M. Black. – 1988: John Wiley and Sons Ltd. – P.133-150.

7. 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.

8. Walters R., Pulitzer M., Kamino H. Elastic fiber pattern in scleroderma/morphea // J. Cutaneous Pathology. – 2009. – Vol.36, №9. – P.952-957.

9. 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.

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.