

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ, ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ И ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОЖИ БОЛЬНЫХ ПОЗДНЕЙ КОЖНОЙ ПОРФИРИЕЙ

А.Хатанбаатар, Н.П. Кузнецова, С.С. Голубев

(Иркутский государственный медицинский университет, ректор — д.м.н., проф. И.В. Малов, кафедра кожных и венерических болезней, зав. — д.м.н., проф. А.И. Якубович; ГУЗ «Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр», гл. врач — к.м.н. М.Л. Меньшиков, морфологический отдел, зав. — к.м.н. С.С. Голубев)

Резюме. Представлены результаты комплексного исследования эпидермиса и дермы с применением гистологических, гистохимических и иммуноморфологических методов у 31 больного поздней кожной порфирией. Описаны иммуноморфологические изменения с характеристикой клеток воспалительного инфильтрата в коже больных этим заболеванием.

Ключевые слова: поздняя кожная порфирия, иммуноморфология, CD4+, CD8+ лимфоциты

Порфирию традиционно считают редким заболеванием, а исследования в этой области относят к узким — частным вопросам клинической медицины. Вместе с тем, проблема поздней кожной Порфирии (ПКП) остается одной из актуальных в современной медицине. Для ПКП характерно поражение лиц наиболее активного трудоспособного возраста, серьезные косметические дефекты кожи, которые отражаются на межличностных отношениях, необратимые изменения как в коже так и в других органах и системах организма [2,5].

Несмотря на большое число публикаций по проблеме нарушения порфиринового обмена и связанных с ними патологических состояний, многие вопросы остаются невыясненными, а лечение недостаточно эффективным [6].

Согласно современным представлениям, поздняя кожная порфирия, рассматривается как заболевание, в патогенезе которой определенная роль отводится иммунным нарушениям. Однако нет полной ясности в вопросах иммунопатогенеза, в частности, в понимании механизмов взаимодействия кератиноцитов и лимфоцитов, характера воспалительного процесса в коже [11]. Имеющиеся единичные работы по морфологии поздней кожной порфирии не раскрывают полностью механизмы патоморфологических изменений кожи [8,9,10].

Целью настоящего исследования явилось выявление особенностей морфологических и иммуноморфологических изменений кожи при ПКП в зависимости от давности заболевания.

Материалы и методы

Обследованы 31 больных ПКП в стадии манифестации и в стадии ремиссии, до и после лечения. Возраст больных колебался от 30 до 78 лет, мужчин было 28, женщин 3. Средний возраст 50.1 ± 1.8 года. Контрольную группу составили 10 здоровых мужчин-добровольцев, средний возраст которых составлял 44.2 ± 1.6 лет.

По давности заболевания больных распределили в 3 группы: I группа (n-11) — давность заболевания до 5 лет; II группа (n-15) — давность заболевания от 5 до 10 лет; III группа (n-5) — давность заболевания более 10 лет.

Обработку гистологических препаратов проводили гематоксилином-эозином, пикрофуксином по Ван Гизону, выявление ДНК по Фельгену, выявление РНК по Браше. Для иммуногистохимических (ИГХ) исследований использовали PAS-реакцию, иммуноморфологический PAP-метод (пероксидаз-

но-антипероксидазный) с панелью антител: CD4+, CD8+, IgA, IgM, IgG, C₃-фракция комплемента, коллагены I, II, III, IV типов. Использовали моноклональные антитела (DakoCytomation, Дания), приготовленные в рабочем разведении. CD4+ clone MT310, использовали в разведении 1:70; CD8+ clone C8/144/V — в разведении 1:100; IgG clone A 57H — 1:50; IgA clone 6E2C1 — 1:50; IgM clone R1/69 — 1:50; collagen I-IV clone CIV 19-22 — 1:50; C3c complement — 1:100.

Визуализация изображений осуществлялась с помощью компьютерной микроскопической видеосистемы «Quantimet 550IW» фирмы «Leica» (Англия), для цифрового анализа патоморфологического и цитологического материала с камерой высокого разрешения, позволяющей проводить количественный анализ изображения по реальным цветам или оптическим плотностям с форматом изображения 6000x4000 пикселей.

Результаты и обсуждение

При анализе препаратов, окрашенных гематоксилином-эозином, выявили следующие морфологические изменения. В манифестной стадии заболевания эпидермис был тонким, роговой слой разрыхлен, частично наблюдалось отслоение рогового слоя. В эпидермисе отмечался выраженный акантоз с папилломатозом. Наряду с акантозом, имелся гипергранулез. Базальные клетки в местах акантоза правильной, цилиндрической формы. Очень часто имел место выраженный гиперкератоз. Субэпидермальные пузыри со скудным количеством клеток (рис. 1). Дно

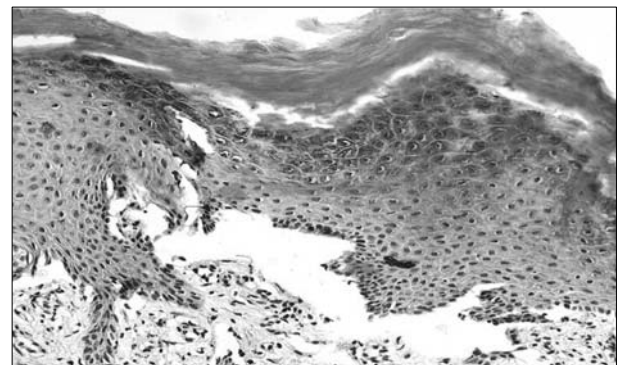


Рис.1. Акантоз, гиперкератоз, гипергранулез, формирующийся субэпидермальный пузырь. Окр. гем-эоз. Увл.х200.

пузыря шероховато, складчато. Эпидермис имел гетерогенную структуру в виде двух зон примерно одинаковой толщины. В поверхностной зоне была выражена дистрофия эпителиальных клеток, во внутренней — исчезновение базофилии цитоплазмы и снижение количества суммарного белка, выявляемых окраской по Брассе. В клетках базального слоя выявлено очаговое значительное увеличение пигмента в меланоцитах. Также отмечается очаговая дегенерация коллагена, в процессе которой наблюдается гомогенизация пучков коллагеновых волокон (рис. 2).

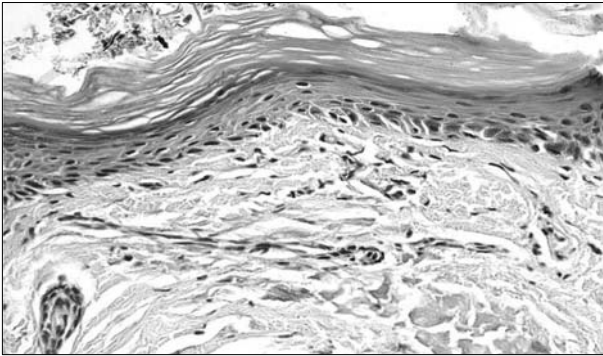


Рис.2. Очаговое накопление пигмента в клетках базального слоя, очаги дегенерации коллагена. Окр.гем-оз. Увл.х200.

Капилляры дермы резко расширены, больше в поверхностных отделах. Вокруг сосудов выявлены лейкоциты, а в некоторых случаях нити фибрина, скопления которых обнаружены под базальной мембраной. Соединительнотканная часть кожи была пропитана PAS-положительными веществами типа гликозаминогликанов.

У больных I и II групп в стадии обострения в стенках сосудов сосочкового слоя и верхней части дермы чаще выявлялись иммуноглобулины IgG и C3-компоненты комплемента и реже — IgA, IgM (рис.3).

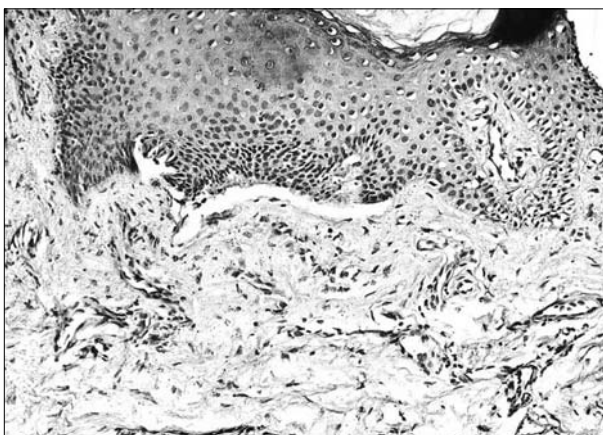


Рис.3. Интенсивное отложение IgG в стенку расширенных сосудов при манифестной стадии ПКП. ИГХ окрашивание на Ig G. Увл. х 200.

При обработке срезов сывороткой против коллагенов выявлена реакция в зоне базальной мембраны и в собственно дерме. В основном имела экспрессию иммуногистохимической реакции с антителами к коллагену I, III и

IV типов, более выраженная в I и II группах.

Иммуноморфологическое исследование включало определение CD4-маркер Т-хелперных (индукторных) лимфоцитов, CD8-маркер супрессорно-цитотоксических Т-лимфоцитов. Локализацию клеточного инфильтрата условно разделили по 3 зонам: эпидермальная, эпидермально-дермальная граница и собственно дерма. Определение количества позитивных клеток на единицу площади среза (на 1 мм²) проводили в 30 полях зрения при увеличении 1000. Характер расположения меченых Т-лимфоцитов на препаратах с ИГХ совпадал с зонами локализации лимфоидного клеточного инфильтрата на обзорных препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином. В дерме меченные лимфоциты располагались преимущественно периваскулярно. Интенсивность клеточного инфильтрата соответствовала тяжести процесса в I и II группах во всех 3 зонах и была максимально выраженной во второй группе.

При анализе локализации CD4+ и CD8+ лимфоцитов во всех группах наибольшее количество регистрируется в периваскулярном инфильтрате вне зависимости от стадии заболевания и это доказывает, что первичное и основное поражение происходит в дерме (табл.1).

При сравнении групп по количеству CD4+ достоверные различия отмечались между I и II группами только в стадии манифестации в дерме ($p < 0,05$) и дермо-эпидермальной границе ($p < 0,001$). А в стадии ремиссии количество CD4+ достоверно снизилось в III группе во всех зонах по сравнению с I и II группами ($p < 0,001$).

При манифестной стадии в воспалительном инфильтрате в эпидермисе, эпидермо-дермальной границе и дерме доминируют CD4+ лимфоциты (рис.4).

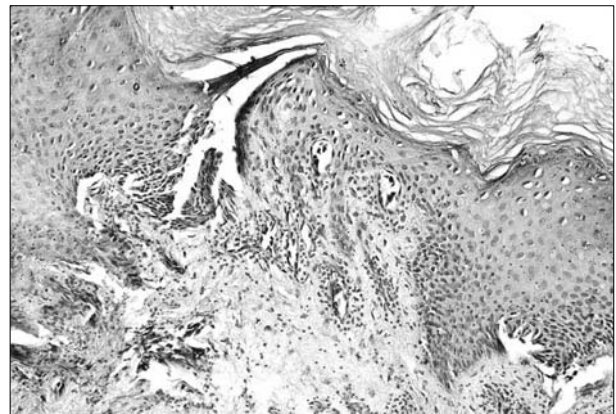


Рис.4. Интенсивные скопления лимфоцитов в эпидермисе, дермо-эпидермальном соединении и периваскулярно в поверхностных слоях дермы в манифестной стадии с преобладанием клона CD4+. ИГХ реакция с МКА CD4+ с докраской гематоксилином. Увл.х200.

При анализе содержания CD8+ лимфоцитов между группами выявлено, что количество цитотоксических Т-лимфоцитов достоверно увеличивалось в дерме по мере возрастания давности заболевания (в I группе $13,23 \pm 3,46$ и во II группе $19,11 \pm 3,51$ в стадии манифестации, $p < 0,01$; в стадии ремиссии в I группе $11,00 \pm 3,24$ и в III группе $16,4 \pm 3,70$, $p < 0,05$). Такое статистически достоверное увеличение прослеживается для манифестной

стадии во всех трех зонах, а при ремиссии только в эпидермисе и дерме (рис. 5).

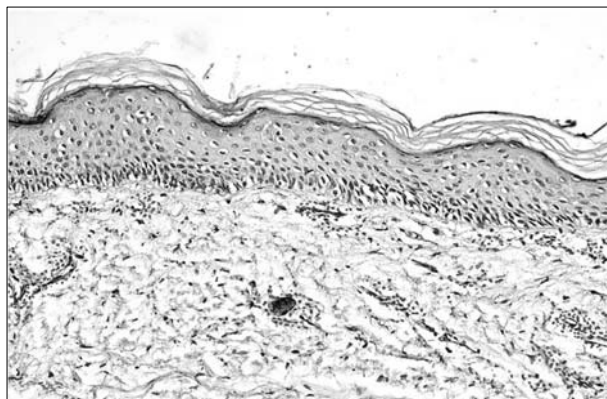


Рис.5. Слабо выраженные скопления лимфоцитов в эпидермисе, дермо-эпидермальном соединении и периваскулярно в поверхностных слоях дермы с преобладанием клона CD8+ в III группе. ИГХ реакция с МКА CD8+ с докраской гематоксилином. Увл.х200.

При сравнении групп во всех трёх зонах количественное соотношение CD4+/CD8+ было резко сдвинуто в сторону хелперного звена в I и II группах вне зависимости от стадии.

По мере возрастания давности заболевания, интенсивность инфильтрации снижается, параллельно этому снижается число CD4+. Эти изменения отражаются на соотношении CD4+/CD8+, которое сдвигается в сторону цитотоксического звена.

Повышенную экспрессию коллагена I и III типов можно объяснить увеличением скорости размножения фибробластов, при котором фибробласты не успевают синтезировать полноценный зрелый коллаген. Такой закономерностью может быть объяснено параллельное повышение экспрессий грубых и молодых коллагенов. Дальнейшее развитие коллагена приводит к образованию рубцующей ткани. А коллаген IV типа идет на восстановление базальной мембраны.

Выявленное статистически достоверное увеличение CD8+ лимфоцитов у больных с большой давностью заболевания, косвенно свидетельствует об уменьшении остроты воспалительного процесса за счет накопления в коже Т-лимфоцитов памяти, опеспечивающих быстрое включение

вторичного иммунного ответа и активное уничтожение антигенов.

Роль CD4+ лимфоцитов, преобладающих в очагах поражения с небольшой давностью заболевания (I и II группа) заключается в помощи В-клеткам, продуцирующим иммуноглобулины. Кроме того, посредством CD4+ клеток осуществляется индукция и созревание цитотоксических CD8+ лимфоцитов, через продукцию ряда цитокинов [3].

Таким образом, изменения в коже больных поздней кожной порфирией характеризуется повышенной экспрессией маркеров, участвующих в развитии воспалительной иммунной реакции по механизму гиперчувствительности замедленного типа. Это позволяет отнести позднюю кожную порфирию к группе хронических дерматозов, опосредованных иммунным воспалением, что соответствует представлениям и других авторов [1,4].

Следовательно, морфологические изменения в коже больных ПКП с небольшой давностью заболевания в стадии манифестации характеризуются выраженным акантозом, субэпидермальными пузырями со скудным количеством клеток, истончением и разрывами базальной мембраны, с массивным отложением PAS-положительного вещества вокруг сосудов, за счет накопления IgG и C3-компонента комплемента. С нарастанием давности заболевания в базальных клетках эпидермиса обнаруживается огромное большое количество меланина, коллагеновые волокна атрофируются, располагаясь более рыхло, преобладают грубые коллагены I типа.

Проведенные иммуноморфологические исследования выявили преобладание Т-лимфоцитов в клеточном инфильтрате кожи больных ПКП. Т-лимфоциты располагались преимущественно в дерме в периваскулярном инфильтрате. Т — лимфоциты обнаружены также в эпидермисе.

У больных ПКП с небольшой давностью заболевания в манифестной стадии преобладали CD4+ Т-лимфоциты. В стадии ремиссии количество CD4+ клеток было сниженным, хотя они количественно превосходили число CD8+ Т-лимфоцитов.

В более поздние сроки заболевания (10 лет и более) соотношение CD4+/CD8+ было сдвинуто в сторону цитотоксических CD8+ клеток. Это свидетельствует об участии иммунной системы в формировании патологических изменений в коже.

Таблица 1

Содержание популяций Т-лимфоцитов в коже больных поздней кожной порфирией на единицу площади среза (мм²)

Давность заболевания	Стадия	Эпидермис		Дермо-эпидермальная граница		Дерма	
		CD4+	CD8+	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
0-5 лет n ₁ -11	Манифестация	22,96±4,98	7,67±1,54**	17,74±3,42**	10,56±2,56**	36,03±5,44**	13,23±3,46**
	Ремиссия	15,55±6,43*	7,35±2,18***	11,45±3,85*	6,45±1,35**	22,95±11,34*	11,00±3,24*
5-10 лет n ₁ -15	Манифестация	28,67±6,75	15,78±3,36	24,11±4,2	14,33±3,16	44,00±6,51	19,11±3,51
	Ремиссия	16,24±4,77*	12,48±2,29	14,32±4,47	9,6±1,65*	24,8±6,14*	13,08±2,13
Больше 10 лет n ₁ -5	Манифестация	-	-	-	-	-	-
	Ремиссия	3,4±0,6	12,1±2,9	2,3±0,7	6,4±1,7	6,3±0,8	16,4±3,7

Примечание. Различия статистически достоверны:

** — со II группой в соответствующих стадиях (p<0,001-0,05)

* — с III группой в соответствующих стадиях (p<0,001)

ЛИТЕРАТУРА

1. Вавилов М.А. Иммуноморфологическая характеристика клеток воспалительного инфильтрата в коже больных красным волосатым лишаем Девержи // Вестник дерматологии и венерологии. — 2006. — № 4. — С. 4-7.
2. Кривошеев Б.Н., Куимов А.Д., Кривошеев А.Б. Латентные и манифестные нарушения порфиринового обмена. — Новосибирск: СО РАМН, 2005. — 248 с.
3. Ярилин А.А. Основы иммунологии. — М.: Медицина, 1998. — С.608.
4. Elder G.H. Immunoreactive uroporphyrinogen decarboxylase in the liver in porphyria cutanea tarda // Lancet. — 1985. — Vol.2. — №8449. — P.229-232.
5. Elder G.H. Porphyria cutanea tarda // Semin Liver Dis. — 1998. — Vol.18. — P.67-75.
6. Falkiewicz B. Porphyria cutanea tarda — new views on its pathogenesis and therapy // Wiad. Lek. — 1997. — Vol.50. — P.106-111.
7. Krajnc I., Viziak A., Hvala A., Jureic V. The significance of histological analysis of skin lesions in porphyria cutanea tarda // Wiener Klinische Wochenschrift. — 1998. — Bd.110/18. — S.651-654.
8. Kemmer C., Reitmann I., Kostler E., Riedel H. Das morphologische Hautschadensbild Der Porphyria cutanea tarda // Zentralbl. Allg. Pathol. Anat. — 1988. — Vol.134. — P.227-234.
9. Lewer W.E. Histopathology of the skin. — USA: J.B.Lippincott, 1989. — P.462-464.
10. Milne J.A. An Introduction to the Diagnostic Histopathology of the skin. — London: Edward Arnold, 1972. — P.190, 211-213.
11. Timonen K. Skin morphology in porphyria cutanea tarda does not improve despite clinical remission // Clin. Exp. Dermatol. — 1991. — Vol.355. — P.358.

HISTOLOGIC, HISTOCHEMICAL WITH AND IMMUNOMORPHOLOGIC RESEARCHES OF THE SKIN OF PATIENTS PORPHYRIA CUTANEA TARDA

A. Hatanbaatar, N.P. Kuznetsova, S.S. Golubev

(Irkutsk State Medical University, Irkutsk Regional Clinical Advisory Diagnostic Center)

Results of complex research of epidermis and derma with application of histologic, histochemical and immunohistochemical methods in 31 patients with porphyria cutanea tarda are presented. Are described immunomorphologic changes with the characteristic of cells inflammatory infiltrate in a skin of patients with this disease.

© ГИБАДУЛИН Н.В., СОНГОЛОВ Г.И. НОВОКРЕЩЕННЫХ А.С., ГИБАДУЛИНА И.О., ЗАХАРОВ А.Н. — 2006

К ВОПРОСУ О ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХИ

Н.В. Гибадулин, Г.И. Сонголов, А.С. Новокрепленных, И.О. Гибадулина, А.Н. Захаров

(Томский военно-медицинский институт, директор — генерал-майор м/с О.Н. Жаткин, кафедра военно-полевой хирургии, зав. — полковник м/с Р.С. Баширов;

Иркутский государственный медицинский университет, ректор — д.м.н., проф. И.В. Малов, кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, зав. — к.м.н., доц. Г.И. Сонголов)

Резюме. В работе анализируются результаты экспериментальной разработки и клинического применения арефлюксного билиодигестивного холедоходуоденоанастомоза в хирургии механической желтухи. В эксперименте доказана возможность формирования из слизисто-подслизистых слоев двенадцатиперстной кишки двустворчатого инвагинационного клапана в области желчеотводящего соустья. При этом сформированный арефлюксный клапан сохранял свою форму и жизнеспособность во все контрольные сроки наблюдения, не приводил к нарушению желчеоттока, надежно препятствовал развитию послеоперационного рефлюкс-холангита. Результаты клинического применения разработанного способа хирургической коррекции механической желтухи свидетельствуют о хорошей функциональной активности арефлюксных билиодигестивных анастомозов, способствующих скорейшей реабилитации пациентов и восстановлению показателей уровня качества жизни оперированных больных.

Ключевые слова: арефлюксный билиодигестивный анастомоз, инвагинационный клапан, механическая желтуха.

С ростом заболеваемости органов гепатопанкреатодуоденальной зоны в последние годы отмечается неуклонное увеличение числа пациентов с синдромом механической желтухи. По данным ряда авторов, оперативные вмешательства при доброкачественном поражении внепеченочных желчных протоков в 15–25% случаев заканчиваются наложением обходных билиодигестивных анастомозов, а при злокачественном поражении панкреатодуоденальной зоны — количество подобных операций увеличивается до 80–85% [3, 5].

Основным недостатком широко применяемых в хирургической гастроэнтерологии классических

вариантов внутреннего дренирования печеночного дерева является ретроградное затекание пищевых масс в желчные протоки с развитием рефлюкс-холангитов и стриктур сформированных анастомозов [1–4].

Таким образом, проблема улучшения непосредственных и отдаленных результатов хирургического лечения пациентов с механической обструкцией желчных протоков путем выполнения функционально выгодных операций, предполагающих формирование арефлюксных билиодигестивных соустьев, является актуальной и требует своего дальнейшего совершенствования.