

# ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616-091

**Н.М. Хмельницкая\***, **В.Н. Эллиниди\***,  
**С.А. Жилин\*\***

E-mail: ellinidiv@rambler.ru

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КОЖНО-МЫШЕЧНОГО ЛОСКУТА У БОЛЬНЫХ С ПЕРВИЧНЫМИ И ВТОРИЧНЫМИ ВАСКУЛИТАМИ

\*ГОУ ДПО Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования;

\*\*С-Пб городское учреждение здравоохранения, городская поликлиника № 24

### ВВЕДЕНИЕ

Васкулит представляет собой иммуноопосредованное воспаление сосудистой стенки. В зависимости от этиологии все васкулиты можно подразделить на первичные, причина которых неизвестна, и вторичные, которые возникают на фоне диффузных болезней соединительной ткани (ДБСТ) (ревматоидный артрит (РА), системная красная волчанка (СКВ), системная склеродермия (ССД), полимиозит (ПМ), а также на фоне различных инфекций и опухолей.

Морфологической сущностью как первичных системных васкулитов, так и вторичных васкулитов, обусловленных ДБСТ, являются прогрессирующая дезорганизация соединительной ткани и воспалительная инфильтрация сосудистой стенки [1-4]. Однако в литературе отсутствуют данные, которые позволяли бы судить о том, существуют ли какие-либо различия в морфологических проявлениях первичных системных васкулитов и вторичных васкулитов, обусловленных ДБСТ.

Цель исследования – изучить морфологические изменения в биоптатах кожно-мышечного лоскута у больных первичными системными васкулитами и вторичными васкулитами, обусловленными ДБСТ, оценить иммуногистохимический профиль клеток воспалительного инфильтрата. Имеются лишь единичные работы, посвященные исследованию кластеров дифференцировки (CD) лимфоцитов, участвующих в

воспалении при первичных и вторичных васкулитах, а также отложению иммунных комплексов в сосудистой стенке [5,10,11]. При этом отсутствуют работы, в которых проводился бы сравнительный анализ данных иммуногистохимического исследования при различных ревматических заболеваниях.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 68 больных с различными ревматическими заболеваниями с длительностью процесса от 1 месяца до 22 лет (в среднем  $2,8 \pm 0,5$  года). В группу больных с первичными системными васкулитами (ПСВ) были включены 29 больных (12 мужчин и 17 женщин), из них у 15 пациентов был диагностирован микроскопический полиангиит (МПА), у 11 больных – узелковый полиартериит (УП), ещё в трех случаях был верифицирован гранулематоз Вегенера. Средний возраст больных в данной группе составил  $41,1 \pm 16$  лет. В группу больных со вторичными васкулитами были включены 26 больных (10 мужчин и 16 женщин). В данной группе больных у восьми пациентов был диагностирован РА, в одном случае – СКВ, диагноз ССД выставлялся у 6 больных, ПМ – в 11 случаях (в трех случаях был верифицирован дерматополимиозит). Средний возраст составил  $48,7 \pm 13,5$  года.

Диагнозы ревматических заболеваний верифицировались в соответствии с общепринятыми диагностическими критериями [2, 5, 8, 9]. В том случае, если проявления заболевания не соответствовали общепринятым диагностическим критериям, но имелись признаки, указывающие на аутоиммунный характер болезни (сочетание суставного синдрома, кожных высыпаний, лихорадки, анемии, повышения СОЭ), выставлялся диагноз неуточненного системного поражения соединительной ткани (13 случаев, из них – 2 мужчины и 11 женщин). В данной группе средний возраст составил  $50,3 \pm 10,1$  года.

В 68 случаях проводилось исследование биоптата кожно-мышечного лоскута, полученного прижизненной биопсией из верхней трети голени, в одном случае исследовался прижизненный биоптат лёгкого. Срезы для исследования на светооптическом уровне готовились толщиной 5-7 мкм, согласно общепринятой методике [10, 11]. Срезы тканей окрашивались гематоксилином и эозином, соединительную ткань окрашивали по Ван-Гизону и по Маллори. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводили на компьютерной интерактивной системе анализа изображения «Видеотест» («ИСТА-Видеотест», Россия). В 16 случаях выполнялось иммуногистохимическое исследование (ИГХ) по общепринятой методике [12]. Распределение больных по нозологическим формам, которым проводилось ИГХ: МПА – 3 больных, гранулематоз Вегенера – 1 больная, ПМ – 5 больных, РА – 4 пациента, ССД – 1 больная, двое больных – с неуточненным системным поражением соединительной ткани.

Анализ результатов ИГХ проводили при помощи микроскопа DM LS2 фирмы Leica с использованием объектива с увеличением 10 или 20 и окуляр с увеличением 10. Использовали моноклональные антитела к CD3 – RTU (DAKO, Дания); к CD56– RTU-1B6 (Novocastra, Великобритания); CD4 RTU-1F6 (Novocastra); CD8 RTU-295 (Novocastra) CD16- NCL-CD16 (Novocastra) в разведении 1:50; CD 20 RTU-L26 (Novocastra).

Ig A–RTU – поликлональные кроличьи антитела (DAKO), IgG–RTU – поликлональные кроличьи антитела (DAKO), IgM–RTU – поликлональные кроличьи антитела (DAKO), фибриноген RTU – поликлональные кроличьи антитела (DAKO), система визуализации – LSAB2 System – HRP (DAKO), проявляющая система DAB-kit (DAKO).

Локализация иммуноглобулинов различных классов, фибриногена в строме и сосудах, а также количество иммунокомпетентных клеток в биоптате оценивались полуколичественным методом. Обнаружение до 10 клеток одного CD-фенотипа оценивалось как слабая экспрессия, обнаружение 11-30 клеток в препарате расценивалось как экспрессия средней выраженности, более 30 клеток в препарате – выраженная экспрессия.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Изучены морфологические особенности структур тканей кожно-мышечных лоскутов от 68 больных с системными заболеваниями соединительной ткани. В 7 наблюдениях при обычной световой микроскопии видимые изменения морфологических структур отсутствовали. При обычных методах окраски различий в морфологической структуре первичных и вторичных васкулитов не установлено. В 61 случае имело место поражение сосудов микроциркуляторного русла в сосочковом слое кожи, при этом у больных УП (11 случаев) отмечалось вовлечение в процесс сосудов среднего калибра. Как правило, воспалительный процесс носил продуктивный характер, клеточная инфильтрация захватывала внутренний и средний слои стенок сосудов (продуктивный эндомезоваскулит). Периваскулярная инфильтрация не имела выраженного характера, в её состав входили преимущественно лимфоциты, иногда наблюдалась примесь плазмочитов. Обнаруженные изменения имели место при длительно существующем заболевании (средняя длительность заболевания составила  $2,8 \pm 0,5$  года). Признаки дезорганизации соединительной ткани в виде мукоидного или фибриноидного набухания межучеточного вещества и фибриноидного некроза отмечались в единичных случаях при клинических признаках обострения заболевания.

При анализе CD-фенотипов лимфоцитов, входящих в состав клеточных воспалительных инфильтратов, при ИГХ выявлена экспрессия CD 3(+)-лимфоцитов T-клеточного звена в дерме кожно-мышечного лоскута, что характерно для всех изученных первичных

системных васкулитов, причем наиболее выраженная экспрессия CD 3(+) установлена при гранулематозе Вегенера. При вторичных васкулитах (у 7 из 12 больных) следует отметить преобладание экспрессии CD 56(+) по сравнению с первичными васкулитами.

Экспрессия CD 4(+)- и CD 8(+)-лимфоцитов выявлялась в единичных случаях при хроническом системном аутоиммунном заболевании, МПА (в двух случаях), ССД (один случай) и РА (один случай). В двух случаях (в одном случае – у больного с МПА, в другом случае – у больного с РА) отмечалась экспрессия CD 3(+) и CD 56 (+) на структурных элементах дермы. Во всех исследуемых случаях в дерме, эпидермально-дермальной зоне, эпидермисе, роговом слое, в стенке сосудов была обнаружена массивная экспрессия Ig G и фибриногена (рис. 1).

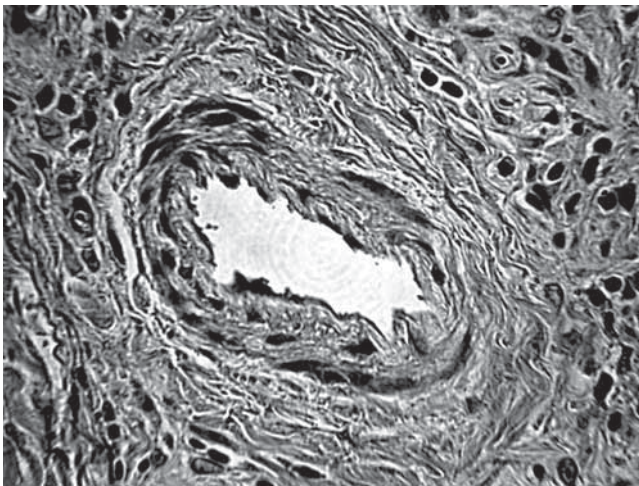
### **ОБСУЖДЕНИЕ**

Длительно протекающие первичные и вторичные васкулиты, как правило, сопровождаются поражением сосудов мелкого и среднего калибра. Установлено, что системная и прогрессирующая дезорганизация соединительной ткани, составляющая морфологическую сущность ревматических заболеваний, обусловлена иммунным воспалением, в основе которого лежат гуморальные и клеточные механизмы. Повреждающие агенты вызывают выделение провоспалительных цитокинов; TNF- $\alpha$ , интерлейкин-1 и интерлейкин-6 приводят к синтезу интерлейкина-8, к ангиоматозу, формируются венулы с «высоким» эндотелием, утолщаются базальные мембраны, усиливается синтез коллагена IV типа [1, 3, 13].

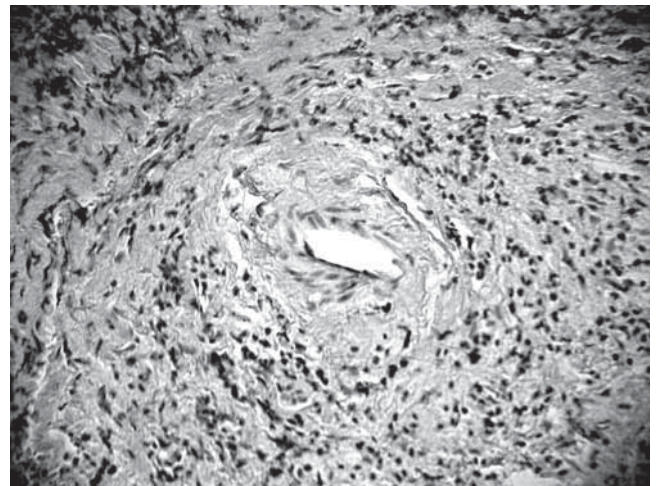
Результаты иммуногистохимического исследования в биоптатах кожи у больных с различной ревматологической патологией имели общие закономерности иммунного ответа и наличие в дерме CD3 (+)-лимфоцитов, продуцирующих основные провоспалительные цитокины: TNF  $\alpha$ , интерферон  $\gamma$  и интерлейкин 6.

Особый интерес представляют случаи с обнаружением экспрессии маркеров CD 3(+)-лимфоцитов и CD56 (+) на самих кератиноцитах, эндотелиоцитах, коллагеновых волокнах, структурных элементах эпидермиса и дермы, что согласуется с данными литературы о том, что при аутоиммунных заболеваниях сами клеточные элементы кожи могут выступать при местном иммунном ответе в качестве антиген-презентирующих клеток и продуцировать провоспалительные цитокины [13, 14].

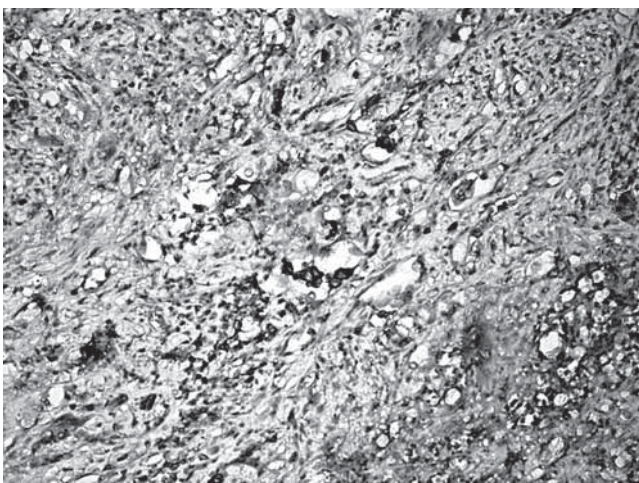
Структурные изменения сосудистой стенки в результате воспаления провоцируют тромбообразование. Известно, что процесс тромбообразования сопровождается отложением фибрина, предшественником которого является фибриноген. По нашему мнению, выраженную экспрессию фибриногена во всех наблюдаемых системных васкулитах можно рассматривать как маркер нарушения проницаемости сосудистой стенки даже в тех случаях, когда структурные изменения не выявляются на уровне обычной световой микроскопии.



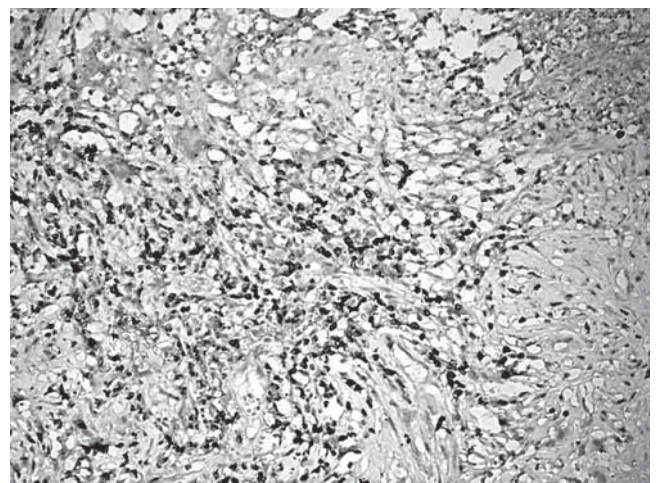
а)



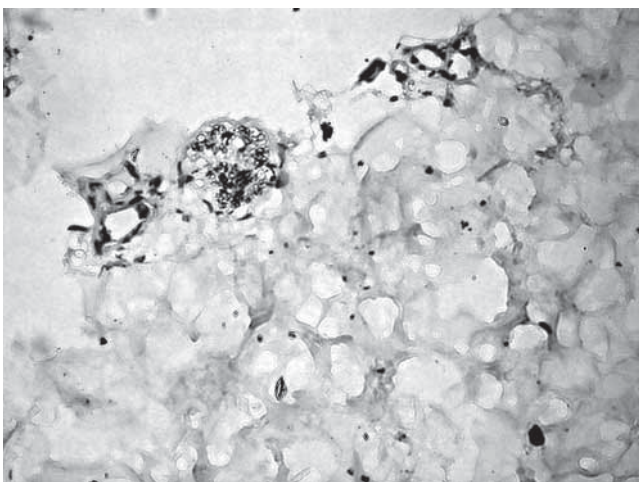
б)



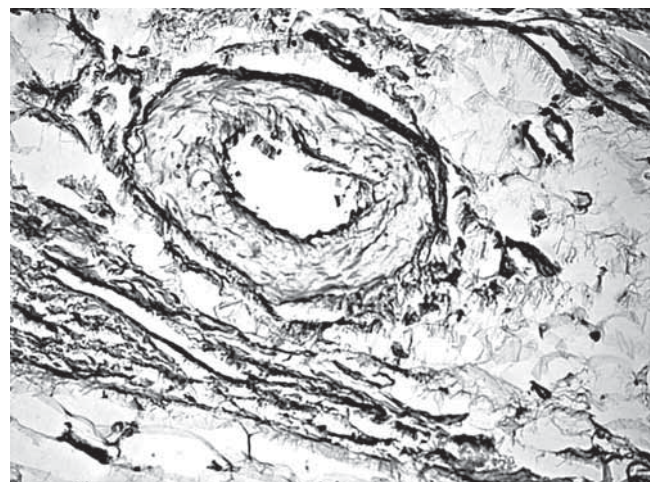
в)



г)



д)



е)

Рис. 1. Морфологические изменения в сосудах микроциркуляторного русла при системных васкулитах.

Окраска гематоксилином и эозином. х 240 (биопсия кожно-мышечного лоскута):

- а) продуктивный васкулит, инфильтрация лимфоцитами в среднем слое сосудистой стенки (мезоваскулит), набухание эндотелия, периваскулярный склероз; б) продуктивный васкулит с поражением артериол, выраженный фиброз стенки, единичные лимфоциты, периваскулярная лимфоидная инфильтрация. Иммуногистохимическое окрашивание. Гранулематоз Вегенера (в,г); в) экспрессия Ig M периваскулярно и в строме легкого; г) экспрессия CD 3(+)-лимфоцитов в ткани легкого; д) полимиозит (вторичный васкулит): экспрессия в дерме CD 56 (+)-лимфоцитов; е) микроскопический полиангиит (первичный васкулит): экспрессия фибриногена периваскулярно и в дерме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Внутренние болезни по Т.Р. Харрисону: в 7 т. / под ред. Е. Braunwald [et al.]: Пер. с английского - М.: Практика, 2005. – Т. 5: Болезни пищеварительной системы. Болезни иммунной системы, суставов и соединительной ткани – С. 2240-2319.
2. Гусева Н. Г. Системная склеродермия – М.: Медицина, 1975. – Стр. 55-61.
3. Сигидин Я.А., Гусева Н.Г., Иванова М.М. Диффузные болезни соединительной ткани./- М.: Медицина, 1994. – С. 161-167.
4. Emslie-Smith M., Engel A. G. Microvascular changes in early and advaced dermatomyositis: a quantitative study// Ann. Neurol. – 1990. – Vol. 27, № 4 – P. 343-356.
5. Клиническая ревматология. Руководство для практических врачей / Под редакцией чл-корр. РАМН, проф. Мазурова В. И. – С-Пб: ООО «Изд-во Фолиант», 2001. – 416 стр.
6. Brons R H, Jong M. C.,de, J. M., Boer N. K., de Detection of immune deposits in skin lesions of patients with Wegener’s granulomatosis// Ann. Rheum. Dis. – 2001. – Vol. 60 -P. 1097-1102.
7. Cid M.-C, Grau J. M., Casademont J. Immunohistochemical characterization of inflammatory cells and immunological activation markers in muscle and nerve biopsy specimens from patients with systemic polyarteritis nodosa // Arthritis Rheum.-1994. – Vol. 37, № 7. – P. 1055-1061.
8. Насонов Е.Л., Баранов А.А., Шилкина Н.П. Васкулиты и васкулопатии - Ярославль: Верхняя Волга, 1999. – 616 с.
9. Jennette J. C., Falk R. J., Andrassy K. Nomenclature of systemic vasculitis. Proposal of Inernational Consensus Conference // Arthritis Rheum – 1994. – Vol. 37, № 2. – P. 187-192.
10. Волкова О. В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой– М.: Медицина, –1982. –304 стр.
11. Меркулов Г. А. Курс патолого-гистологической техники– М., 1969. – 420 с.
12. Эллиниди В.Н., Анিকেева Н.В., Максимова Н.А. Практическая иммуногистохимия – С-Пб: ВЦЭРМ МЧС России, 2001. – 36 с.
13. Krueger J. G. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biological agents//J. Am. Acad. Dermatol. – 2002– Vol. 46. – P. 1-23
14. Белецкая Л.В., Махнева Н.В. Меченые антитела в нормальной и патологической анатомии: Атлас– М.: МНПИ, 2000. – 110 с.

**MORPHOLOGIC ASSESSMENT OF CUTANEOUS-MUSCULAR FLAP CONDITION IN PATIENTS HAVING PRIMARY AND SECONDARY VASCULITES**

**N.M. Khmel'nitskaya, V.N. Ellinidi, S.A. Zhilin**

**SUMMARY**

The aim of the study was to investigate morphological evidence of primary and secondary systemic vasculites. We studied 68 biopates of cutaneous-muscular specimens. In 16 cases, immunohistochemical study was performed to assess CD-phenotypes of lymphocytes in primary and secondary vasculites. We did not find special morphological differences in primary and secondary vasculites. Immunohistochemical study revealed prevalence of CD 3(+) lymphocytes in primary and of CD 56 (+) lymphocytes in secondary vasculites.

**Key words:** vasculites, biopsy of skin-muscular flap, immune hystochemistry.