

На правах рукописи

КАРАЧЕВА ЮЛИЯ ВИКТОРОВНА

**ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА И КЛИНИКО-
МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ БУЛЛЕЗНЫХ ДЕРМАТОЗОВ
С УЧЕТОМ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭПИДЕРМИСА И
КОЛЛАГЕН-ПРОТЕОГЛИКАНОВОГО
КОМПЛЕКСА ДЕРМЫ**

14.01.10 – кожные и венерические болезни

14.03.02 – патологическая анатомия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Новосибирск – 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные консультанты: доктор медицинских наук, профессор
Новиков Александр Иванович

доктор медицинских наук
Гайдаш Александр Александрович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Зуев Андрей Викторович

доктор медицинских наук, профессор
Надеев Александр Петрович

доктор медицинских наук, профессор
Кохан Муза Михайловна

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___»_____2012 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета ДМ208.062.06 при Новосибирском государственном медицинском университете (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52)

Автореферат разослан «___»_____2012г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Т. Б. Решетникова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В группу буллезных дерматозов относят акантолитическую и неакантолитическую пузырчатку, герпетиформный дерматоз Дюринга и врожденный буллезный эпидермолиз [Лыкова С. Г., 1996; Stranley J. R. et al., 1999, 2001; Robinson N. D. et al., 1999].

Акантолитическая пузырчатка (АП) – аутоиммунное заболевание, характерным признаком которого являются пузыри, формирующиеся в эпидермисе и слизистых оболочках [Robinson N. D. et al., 1999; Lucas S., 1997]. Основным механизмом формирования пузырей является акантолиз. Установлена роль специфических аутоантител, связывающих десмоглеины – структурные белки десмосом, что приводит к разрушению межклеточных связей, высвобождению кератиноцитов, формированию пузырей в эпидермисе [Amagai M., 1992-2002; Udey M. C., 1999]. Некоторые авторы утверждают, что в патогенезе акантолиза ведущее значение имеет анойкис – разновидность апоптоза, вызванного нарушением клеточной адгезии, где основная роль принадлежит взаимодействию Fas/Fas лигандов [Gniadecki K. et al., 1998; Wang X. et al., 2004; Puviani M. et al., 2003; Matz H., Ruocco E., 2005]. Согласно другим данным, кератиноциты входят в апоптоз и эволюционируют до его терминальной стадии на фоне сохранившихся межклеточных контактов [Hashimoto K., Lever W. F., 1970].

Основное внимание исследователи при изучении ультраструктуры пузырчатки уделяли описанию вне- и внутриклеточных феноменов: лизис десмосом и тонофибрилл, расширение межклеточных пространств, заполнение детритом щелевых дефектов, деформация ядра [Лыкова С. Г., 1996; De Dobbeleer G., 1982; Lever W. F., 1997; Lucas S., 1997]. При этом сведений об изучении клеток Лангерганса при буллезных дерматозах недостаточно, а имеющиеся – противоречивы [Торсуев Н. А., 1979; Nestor M. S., 1987]. Вместе с тем в последние годы большое внимание уделяется роли дендритических клеток, в частности клеток Лангерганса в происходящих иммунных процессах в коже [Тухватуллина З. Г., 1995.; Макаренкова В. П., 2002; Пашенков М. В.,

2002]. Работ по изучению ультраструктуры клеток Лангерганса при акантолитической пузырьчатке и других буллезных дерматозах в изученной литературе не найдено.

Остаются слабо изученными вопросы перераспределения тканевой жидкости в коже при буллезных дерматозах, не изучены ультраструктурные изменения межклеточного матрикса дермы.

Герпетиформный дерматоз относится в группу аутоиммунных буллезных дерматозов, при которых находят антитела в базальной мембране. Вместе с тем, точных данных, полученных методами молекулярной диагностики, к каким белкам базальной мембраны вырабатываются иммуноглобулины, в отличие от пузырьчатки, четко не установлено.

Роль КЛ в морфогенезе ГДД не ясна, есть отдельные упоминания о том, что при ГДД количество КЛ резко снижено и они большей частью разрушены [Connor B. L., 1972]. Не изученными остаются и другие вопросы морфогенеза акантолитической пузырьчатки и герпетиформного дерматоза Дюринга, в частности ультраструктурные механизмы формирования пузыря, изменение системы коллаген-протеогликаны, механизмы секвестрации тканевой жидкости в данной системе. До сих пор не ясны механизмы функционирования наноструктур межклеточного вещества дермы при буллезных дерматозах. Исследование межклеточного вещества дермы и структуры комплекса коллаген-протеогликаны стали возможны после внедрения атомно-силовой микроскопии, так как данный метод не требует фиксации препаратов и исследование можно проводить с нативной кожей.

Актуальной проблемой является разработка методов прогнозирования течения пузырьчатки, данной теме посвящены единичные работы [Матушевская Е. В., 1996; Cheng S. W. et al., 2002]

Изложенное выше легло в основу настоящей работы, определив ее цель и задачи.

Цель исследования. Установить роль клеток Лангерганса и системы коллаген-протеогликанового комплекса кожи в морфогенезе акантолитической

пузырчатки и герпетиформного дерматоза Дюринга, исследовать возможности контактной биомикроскопии и прижизненной микрофлюориметрии кожи как методов диагностики и прогнозирования течения дерматоза.

Задачи исследования:

1. Исследовать структуру и клинические формы буллезных дерматозов, зарегистрированных в г. Красноярске за 20 лет (1988-2008 гг.).

2. Изучить морфологию клеток Лангерганса в здоровой коже и их роль в морфогенезе акантолитической пузырьчатки по данным иммуногистохимических методов и трансмиссионной электронной микроскопии.

3. Описать структуру системы коллаген–протеогликаны дермы в здоровой коже и ее изменения по данным атомно-силовой микроскопии и ИК спектроскопии при акантолитической пузырьчатке.

4. Установить ультраструктурные изменения кератиноцитов и их значение в морфогенезе герпетиформного дерматоза Дюринга по данным иммуногистохимических методов и трансмиссионной электронной микроскопии.

5. Исследовать состояние системы коллаген-протеогликаны кожи по данным спектроскопии при герпетиформном дерматозе Дюринга.

6. Оценить возможности контактной биомикроскопии при дифференциальной диагностике буллезных поражений кожи и прижизненной микрофлюориметрии кожи (ПМФ) в качестве метода прогнозирования течения акантолитической пузырьчатки.

Научная новизна. Впервые установлены специфические особенности изменений системы коллаген-протеогликаны при акантолитической пузырьчатке и герпетиформном дерматозе Дюринга, что дало возможность разработать гипотезу механизма секвестрации тканевой жидкости коллагеновыми волокнами при данной патологии.

Впервые методом атомно-силовой микроскопии изучена наноструктура межклеточного вещества дермы при акантолитической пузырьчатке и

герпетиформном дерматозе Дюринга и впервые описаны специфически для данных дерматозов ультраструктурные изменения дермы (изменение величины и числа нанопор, формирование наноканалов, агрегации частиц, полимеризации межклеточного матрикса).

Выявленные ультраструктурные изменения клеток Лангерганса при акантолитической пузырчатке, локализация этих морфологических изменений в очагах акантолиза позволили впервые связать активность клеток Лангерганса с процессами акантолиза и анойкиса. Изучение метода контактной биомикроскопии впервые показало диагностические возможности его при буллезных дерматозах. Впервые установлено прогностическое значение собственной флюоресценции кожи и ее динамики при выборе терапии и прогнозирование течения пузырчатки.

Практическая значимость работы. Разработан комплекс дифференциально-диагностических критериев при буллезных дерматозах, включающий ультраструктурные изменения клеток Лангерганса и особенностей изменения коллаген-протеогликанового комплекса дермы, характерных для акантолитической пузырчатки и герпетиформного дерматоза Дюринга.

Получен патент на изобретение «Способ дифференциальной диагностики буллезных дерматозов» (№ 2408279, зарегистрирован 10 января 2011 г). Применение контактной биомикроскопии в диагностике буллезных дерматозов сокращает сроки морфологической диагностики на 10-14 дней (эти сроки необходимы для гистопатологического исследования биоптатов). Применение прижизненной микрофлюориметрии кожи при акантолитической пузырчатке способствует прогностической оценке и выбору рациональной терапии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При акантолитической пузырчатке выявлено резкое увеличение количества клеток Лангерганса в эпидермисе. Локализация их в очагах акантолиза, признаки активации (удвоение ядер, увеличение числа гранул Бирбека), множественные контакты дендритических отростков с

кератиноцитами, акантолитическими клетками, моноцитами свидетельствуют об их активном участии при формировании акантолиза.

2. При акантолитической пузырьчатке в дерме при атомно-силовой микроскопии отмечены гипергидратация межучного вещества, с формированием крупнодисперстных молекулярных комплексов, структурирование в виде слоистости и формирования наноканалов с одновременным увеличением числа нанопор. Гипергидратация межучного вещества происходит в результате секвестрации (сброса) воды коллагеновыми волокнами в дерму, в результате снижения их гидрофильности.

3. При герпетиформном дерматозе Дюринга в повреждении кератиноцитов и механизме образования пузырей ведущее значение имеет гидропическая дистрофия с исходом в колликвационный некроз кератиноцитов.

4. У больных герпетиформным дерматозом Дюринга выявлено первичное уплотнение («полимеризация») матрикса межучного вещества, сокращение количества нанопор, секвестрация воды с коллагеновых волокон в дерму. Учитывая выраженные изменения базальной мембраны (расслоение и сквозные дефекты в блестящей и плотной пластинах), изменения межлеточного матрикса дермы можно рассматривать как филогенетически ранний механизм защитной функции кожи.

5. Прижизненная контактная биомикроскопия в сочетании с прижизненной микрофлюориметрией кожи позволяют по результатам регистрации первичной и вторичной флюоресценции кожи определить глубину формирования пузыря (эпидермальный, субэпидермальный). Нарастание желто-зеленого спектра флюоресценции ($\lambda_{\text{мах}}$ 530 нм) свидетельствует о выраженных репаративных процессах в области эрозий. Сдвиг максимума свечения в синюю часть спектра отражает отсутствие восстановительных процессов в коже при проводимой терапии.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на 4-м Российско-Японском международном симпозиуме (Иркутск, 1996), на 15-й, 19-й и 21-й научно-практических конференциях «Актуальные вопросы

дерматовенерологии» (Красноярск, 2005, 2009, 2010), на Втором Всероссийском конгрессе дерматовенерологов (Санкт-Петербург, 2007).

Внедрение результатов работы. Результаты диссертационной работы внедрены в диагностический процесс поликлинического и стационарного отделений Красноярского краевого кожно-венерологического диспансера № 1, в учебный процесс кафедры дерматовенерологии с курсом косметологии и ПО Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого и кафедры дерматовенерологии и косметологии Омской государственной медицинской академии.

Публикации. По материалам диссертации опубликована 21 печатная работа, в том числе 14 статей – в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых для публикаций основных результатов исследований, и получен 1 патент на изобретение. Напечатаны 2 монографии (в соавторстве).

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 234 страницах машинописного текста и содержит 89 рисунков, 13 таблиц. Диссертация состоит из введения, 4 глав описаний материалов, методов и полученных результатов исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы, включающего 244 источника (90 отечественных и 154 зарубежных авторов).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Красноярского краевого кожно-венерологического диспансера № 1 (протокол № 2 от 30.11.2009 г). Для анализа клинической картины, течения и динамики заболеваемости изучены архивные материалы Красноярского краевого кожно-венерологического диспансера № 1 за 1988 – 2008 г.г., представленные 212 историями болезни. При этом у 112 больных была диагностирована пузырчатка (у 78 – вульгарная пузырчатка, у 16 – себорейная пузырчатка, у 8 – герпетиформная, у 6 – паранеопластическая, у 2 больных – вегетирующая пузырчатка, у 2 – IgA-зависимая пузырчатка). Кроме этого проанализированы 70 историй болезни больных герпетиформным дерматозом Дюринга.

Под собственным наблюдением находились 114 больных буллезными дерматозами, из них 71 больной акантолитической пузырьчаткой и 43 больных герпетиформным дерматозом Дюринга. Возраст обследованных колебался от 26 до 76 лет, средний возраст $51,1 \pm 7,1$ лет, при этом количество женщин было – 70 (61,4 %), мужчин – 44 (38,6 %). Количество городских и сельских жителей было почти равным: 61 (53,5 %) и 53 (46,5 %) соответственно.

Все наблюдавшиеся больные подвергались общеклиническому обследованию, а также специальным методам исследования: проводилась цитологическая диагностика, гистопатологическое исследование биоптатов, их иммуногистохимическое исследование, контактная биомикроскопия и прижизненная микрофлюориметрия кожи, трансмиссионная электронная микроскопия кожи, атомно-силовая микроскопия биоптатов, а также ИК-спектрометрия кожи (табл. 1). Контрольную группу составили 35 человек. При этом у 15 человек (7 мужчин и 8 женщин) получали биоптаты при косметических оперативных вмешательствах в ООО «Институт косметологии».

Средний возраст лиц контрольной группы составил $48,4 \pm 6,7$ лет. Биоптаты контрольной группы исследовались с помощью иммуногистохимических методов, атомно-силовой микроскопии и ИК-спектрометрии (табл. 1).

У 20 здоровых лиц (8 мужчин и 12 женщин, средний возраст $39,4 \pm 7,6$ лет) исследовалась люминесценция поверхности кожи методом прижизненной микрофлюориметрии (табл. 1). Данная контрольная группа была представлена лицами, проходившими медицинский осмотр в Красноярском краевом кожно-венерологическом диспансере № 1. При осмотре кожных покровов и слизистых больных с АП и ГДД выявляли наличие пузырей или других морфологических элементов. При обнаружении пузырей отмечали их количество, величину, форму, цвет содержимого, толщину покрывки, фон, на котором располагались пузыри, склонность пузырей к слиянию или группировке, наличие симптома Никольского. Специальные методы исследования, которым подвергались больные буллезными дерматозами, представлены в таблице 1.

Методы исследования больных буллезными дерматозами

| Клинические форма | Всего обследованных | Цитологическая диагностика | Гистопатологическое исследование биоптата | Иммуногистохимическое исследование биоптата | Контактная биомикроскопия и ПМК кожи | Трансмиссионная электронная микроскопия | Атомно-силовая микроскопия | ИК-спектроскопия |
|---------------------------------|---------------------|----------------------------|---|---|--------------------------------------|---|----------------------------|------------------|
| Вульгарная пузырчатка | 46 | 46 | 42 | 26 | 34 | 24 | 19 | 19 |
| Себорейная пузырчатка | 9 | 9 | 9 | 6 | 6 | 3 | 3 | 3 |
| Герпетиформная пузырчатка | 8 | 8 | 6 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| Паранеопластическая пузырчатка | 6 | 6 | 6 | 4 | – | – | – | – |
| IgA-зависимая | 2 | 2 | 2 | – | – | – | – | – |
| Герпетиформный дерматоз Дюринга | 43 | 43 | 39 | 29 | 39 | 19 | 18 | 16 |
| Контрольная группа | 35 | – | 15 | 15 | 20 | 15 | 15 | 15 |
| Итого | 149 | 114 | 119 | 84 | 103 | 64 | 58 | 56 |

2. *Методы гистопатологического исследования биоптатов.* Биопсию кожи производили циркулярным ножом, для фиксации биоптатов применяли 10 % нейтральный формалин. Парафиновые срезы кожи окрашивались гематоксилином Эрлиха не менее 30 мин с докраской эозином. Препараты просматривались на микроскопе, LOMO NTT195 (объективы 10, 20, 40, окуляры 7х) с использованием телевизионной установки.

3. *Методы иммуногистохимических исследований биоптатов кожи.* Иммуногистохимические исследования выполняли на парафиновых срезах с применением стрептавидин-биотинового метода («DAKO», Дания, LSAB2 Systems, HRP). В качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела CD1α + («DAKO», Дания). Биотинилированные антитела второго слоя и стрептавидин, меченный пероксидазой, входили в систему визуализации «LSAB2 Systems, HRP» («DAKO», Дания).

Для дифференциальной диагностики пузырных дерматозов применялся прямой метод иммунофлюоресценции. Использовались иммуноглобулины диагностические флюоресцирующие против IgG, IgA, IgM человека сухие (НПО МЕДБИОСПЕКТР).

4. *Метод трансмиссионной электронной микроскопии кожи при буллезных дерматозах.* Биоптаты брали с диагностической целью из области пузырей, а также с участков кожи без видимых высыпаний. Образцы для электронной микроскопии погружали в 1,5 % раствор глутаральдегида, охлажденный до 4 С°, приготовленный на PBS, и фиксировали в 1 % осмиевой кислоте. После обезвоживания в этаноле заливали в аралдит в смеси с эпоном. Срезы толщиной до 50 нм делали на ультратоме LKB-50, контрастировали уранилацетатом и докрашивали углекислым свинцом. Препараты просматривали на микроскопе JEM-100S.

5. *Метод атомно-силовой микроскопии межклеточного вещества дермы.* Электронно-микроскопические исследования поверхности тканевых структур кожи выполнены методом сканирующей зондовой электронной микроскопии. Диаметр пучка – 10 нм, ускоряющее напряжение – 15 кВ. Образцы кожи не

подвергали какой-либо фиксации с целью сохранения нативной структуры. С одного образца регистрировали по 25-30 сканов из различных участков кожи с поверхности кератиноцитов области дна пузырей и в интактных областях эпидермиса, а также с поверхности коллагеновых волокон и межучного вещества дермы. Исследования проводились на атомно-силовом микроскопе Solver Bio NT-MDT. В атомно-силовой микроскопии микрорельеф поверхности исследовался с помощью подвижного зонда, представляющего собой кремниевую пластинку размерами 3x1.5x0.3 мм с острой иглой, оканчивающейся одним или кластером из нескольких атомов и расположенной на торце балки (кантилевер). При подводе кантилевера к образцу на расстояние в несколько ангстрем на острие иглы действуют упругие силы отталкивания, а на больших – силы притяжения, что дало возможность фиксировать адгезионные силы на коллагеновых волокнах и аморфном веществе кожи. Радиусы закругления острия наиболее разработанных кантилеверов близки к длине волны рентгеновского рассеяния (1,5 нм) и колеблются в пределах от 1 до 50 нм.

6. Метод исследования коллаген-протеогликанового комплекса кожи с помощью ИК-спектроскопии. ИК-спектры поглощения кожи регистрировали на Фурье-спектрометре фирмы BRUKER IFS-125M. Широкий диапазон работы спектрометра позволял регистрировать целиком полосы воды в области 2000-9000 см⁻¹ и, следовательно, корректно определить базовую линию, что особенно важно при проведении данных исследований. Спектральное разрешение прибора составляло 1-10 см⁻¹. Измерения спектров поглощения воды в образцах кожи были проведены при использовании динамической методики выделения и поглощения воды из вакуумированных образцов кожи. Для этого была изготовлена вакуумная кювета, в которую помещался образец. Поглощение воды в образце характеризуется коэффициентом поглощения K_w , в отличие от коэффициента поглощения сухого образца K_o . Поэтому общее поглощение образца представляет собой сумму поглощения сухого образца и воды $K_{\Sigma} = K_o + K_w$.

7. *Метод контактной биомикроскопии и микрофлюориметрии кожи.* Для дерматологических исследований использовали комплекс готовых блоков: ОИ-18, ОИ-30, ФМН-ПА, с объективами ЛК 10x0,40, ЛК 60x1,15. Монтирование указанных блоков на штатив позволяло обследовать любой участок кожи больного с увеличением от 50x до 600x.

При проведении контактной биомикроскопии кожи применяли микроскоп ЛЮМАМ И-3, который имеет в комплексе контактные объективы ЛК 10x0,40, ЛК 25x0,75, Ж 43x1,0, ЛК 60x1,15.

Для проведения прижизненной микрофлюориметрии кожи (ПМК) использовали микроскоп ЛЮМАМ И-3 с микрофлюориметром ФМЭЛ-1А и насадкой ОЛК-2, контактный микроскоп на основе блоков ОИ-30, ОИ-18, ОИ-21 с насадкой ФМЭЛ-1А.

8. *Метод статистической обработки материала.* Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов "STATGRAFICS" и "RHYTHMSTAT", в которых были реализованы параметрические методы Фишера-Стьюдента и непараметрическая статистика Вилькоксона-Манна-Уитни.

Сравнение неравновеликих выборок (при $n > 5$) производилось с использованием специальной формулы расчета Т-критерия Стьюдента для этой цели, а уровень степени свободы для определения достоверности различий рассчитывался по формуле: $k = N_1 + N_2 - 2$ [Лакин Г. Ф., 1980]. Сравнения с исходной выполнялись на уровнях: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническая характеристика больных буллезными дерматозами. Клинический анализ 212 больных с различными формами буллезных дерматозов за 20летний период (1988-2008гг.) выявил 112 (52,8 %) больных акантолитической пузырьчаткой, 70 (33,0 %) больных герпетиформным дерматозом Дюринга, 14 (6,6 %) больных врожденным буллезным эпидермолизом. Другие дерматозы регистрировались реже: буллезный пемфигоид Левера – 7 (3,4 %), доброкачественная семейная пузырьчатка

Гужеро-Хейли-Хейли – 4 (1,9 %), акантолитический дерматоз Гровера – 3 (1,4 %), приобретенный буллезный эпидермолиз – 2 (0,9 %). Эта группа больных составила 7,6 % всех зарегистрированных за 20 лет буллезных дерматозов (табл. 2).

Таблица 2

Больные пузырьными дерматозами зарегистрированные на территории Красноярского края с 1988 по 2008 гг.

| Клинические формы пузырьных дерматозов | Количество больных | | | Удельный вес % | Пол | | Возраст | | | | | | |
|---|--------------------|------|-------|----------------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | Всего | Край | Город | | Мужчины | Женщины | До 20 | 21–30 | 31–40 | 41–50 | 51–60 | 61–70 | ≥ 70 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| Вульгарная пузырчатка | 78 | 38 | 40 | 36,8 | 22 | 56 | – | 2 | 6 | 16 | 28 | 22 | 4 |
| Себорейная пузырчатка | 16 | 10 | 6 | 7,5 | 6 | 10 | – | – | 2 | 6 | 4 | 4 | – |
| Вегетирующая пузырчатка | 2 | 2 | – | 0,9 | 2 | – | – | – | – | 2 | – | – | – |
| Герпетиформная пузырчатка | 8 | 4 | 4 | 3,8 | 2 | 6 | – | – | – | 4 | 4 | – | – |
| Паранеопластическая пузырчатка | 6 | – | 6 | 2,9 | 1 | 5 | – | – | – | – | – | – | 6 |
| IgA зависимая пузырчатка | 2 | – | 2 | 0,9 | 2 | – | – | 2 | – | – | – | – | – |
| Акантолитический дерматоз Гровера | 3 | 1 | 2 | 1,4 | 1 | 2 | – | 1 | 1 | 1 | – | – | – |
| Доброкачественная пузырчатка Гужеро-Хейли – Хейли | 4 | 2 | 2 | 1,9 | – | 4 | – | – | 2 | 2 | – | – | – |
| Буллезный пемфигоид Лёвёра | 7 | 4 | 3 | 3,4 | 4 | 3 | – | – | – | 2 | 2 | 3 | – |
| Герпетиформный дерматоз Дюринга | 70 | 24 | 46 | 33,0 | 24 | 46 | 2 | 4 | 6 | 10 | 26 | 16 | 6 |

Продолжение таблицы 2

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|---|-----|----|-----|-----|----|------|----|---|----|----|----|----|----|
| Врожденный буллезный эпидермолиз (простая форма) | 10 | 6 | 4 | 4,7 | 4 | 6 | 10 | – | – | – | – | – | – |
| Герпетиформный простой буллезный эпидермолиз Доулинга - Меара | 2 | 2 | – | 0,9 | – | 2 | 2 | – | – | – | – | – | – |
| Врожденный буллезный эпидермолиз Криста - Сименса | 2 | – | 2 | 0,9 | 2 | – | 2 | – | – | – | – | – | – |
| Приобретенный буллезный эпидермолиз | 2 | 2 | – | 0,9 | 2 | – | – | – | 2 | – | – | – | – |
| Итого | 212 | 95 | 117 | 100 | 72 | 14,0 | 16 | 9 | 10 | 43 | 64 | 45 | 16 |

Под собственным наблюдением за период 1998-2008 гг. находилось 114 больных буллезными дерматозами, из них больных акантолитической пузырьчаткой было 71 (62,3 %), герпетиформным дерматозом Дюринга – 43 (37,7 %). В последние годы некоторые авторы описывают новые формы акантолитической пузырьчатки (герпетиформную, паранеопластическую, IgA – зависимую).

Среди 71 больного акантолитической пузырьчаткой были зарегистрированы следующие клинические формы – вульгарная у 46 (40,4 %) больных, себорейная – у 9 (7,9 %), герпетиформная – у 8 (7,0 %), паранеопластическая – у 6 (5,3 %), IgA-зависимая – у 2 (1,7 %).

В соответствии с клиническими формами больные распределялись следующим образом (табл. 3).

Распределение обследованных больных буллезными дерматозами по полу и возрасту

| Клиническая форма | Всего больных | Удельный вес (%) | Пол | | Возраст (лет) | | | | | |
|---------------------------------|---------------|------------------|---------|---------|---------------|---------|---------|---------|---------|------|
| | | | Мужчины | Женщины | 21 – 30 | 31 – 40 | 41 – 50 | 51 – 60 | 61 – 70 | ≥ 70 |
| Вульгарная | 46 | 40,4 | 14 | 32 | 2 | 9 | 6 | 12 | 12 | 5 |
| Себорейная | 9 | 7,9 | 3 | 6 | – | 1 | 3 | 2 | 3 | – |
| Герпетиформная | 8 | 7,0 | 4 | 4 | – | 2 | 2 | 4 | – | – |
| Паранеопластическая | 6 | 5,3 | 2 | 4 | – | – | – | 2 | 2 | 2 |
| IgA–зависимая | 2 | 1,7 | 1 | 1 | – | – | 1 | 1 | – | – |
| Герпетиформный дерматоз Дюринга | 43 | 37,7 | 20 | 23 | 5 | 9 | 12 | 9 | 4 | 4 |
| Итого | 114 | 100,0 | 44 | 70 | 7 | 21 | 24 | 30 | 21 | 11 |

Количество больных, наблюдавшихся в начальной стадии и стадии генерализации, – 58 из 71 больного (81,6 %). Таким образом, больные акантолитической пузырьчаткой составили 63,3 %, больных герпетиформным дерматозом Дюринга было 37,7 % всех буллезных дерматозов, зарегистрированных за последние 10 лет (1998-2008 гг.). Возраст обследованных больных буллезными дерматозами колебался от 26 до 76 лет. Более половины больных были в возрасте 31 – 60 лет (74,6 %) (табл.3).

У больных герпетиформной пузырьчаткой выявлены более редкие поражения слизистой рта, герпетиформность высыпаний на коже, появление их на эритематозном фоне, зуд кожи.

При паранеопластической пузырьчатке дебютные пузырьные высыпания появлялись на коже головы, лица, слизистой рта, при этом во рту возникли упорные эрозивно-язвенные высыпания, аналогичные локализовались в пищеводе, в назо-фарингеальной и аногенитальной областях. При IgA-зависимой пузырьчатке кроме типичных буллезных элементов встречались поверхностные пустулы, часто кольцевидно расположенные.

При герпетиформном дерматозе Дюринга у 9 (20,9 %) из 43 больных были выявлены злокачественные новообразования, у них отмечалось тяжелое течение кожного процесса, торпидность к проводимой терапии, отсутствие ремиссий. У больных ГДД старше 50 лет выявлена тенденция к мономорфизму высыпаний на коже.

Результаты гистопатологического и иммунолюминесцентного методов исследования биоптатов кожи при акантолитической пузырьчатке и герпетиформном дерматозе Дюринга. При гистопатологическом исследовании биоптатов кожи при акантолитической пузырьчатке выявились внутриэпидермальные пузыри, акантолиз, при ГДД – субэпидермальные пузыри, эозинофильная инфильтрация сосочкового слоя дермы. Эозинофильный спонгиоз шиповатого слоя эпидермиса отмечен при герпетиформной пузырьчатке, при этом у обследованных 8 больных выявилось формирование интраэпидермальных пузырей с очагами акантолиза. У 6 больных паранеопластической пузырьчаткой имелись некробиоз и вакуолизация кератиноцитов в базальном и шиповидном слоях и одновременно очаги акантолиза в шиповидном слое.

Среди обследованных больных применение иммунолюминесцентного метода позволило по наличию межклеточных депозитов IgG дифференцировать акантолитическую пузырьчатку, т. к. при герпетиформном дерматозе Дюринга были видны отложения IgA или в виде линейных депозитов в области базальной мембраны, или в виде гранул в сосочковом слое дермы. Применение данного метода позволило выявить 2 случая IgA-зависимой пузырьчатки, при которой отмечались унилокулярные пустулы в эпидермисе, содержащие нейтрофилы и эозинофилы, при этом в дерме обнаруживалась периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация, а в верхних слоях эпидермиса – депозиты IgA.

Иммуногистохимическое исследование клеток Лангерганса в коже больных акантолитической пузырьчаткой. Иммуногистохимическое исследование клеток Лангерганса при акантолитической пузырьчатке выявило увеличение числа CD1a+ положительных клеток в эпидермисе с 2,1 % ± 0,8 %

(контрольная группа) до $7,9 \% \pm 0,8 \%$. При этом КЛ имели тенденцию к миграции (локализация возле базальной мембраны), отмечались CD1a+ положительные клетки и в дерме больных АП. У больных АП в эпидермисе число Crr3+ положительных клеток было увеличено с $3,4 \% \pm 1,7 \%$ (контрольная группа) до $11,2 \% \pm 2,1 \%$. При этом отмечалась четкая зависимость: увеличение числа CD1a+ положительных клеток и Crr3+ положительных клеток в очагах акантолиза.

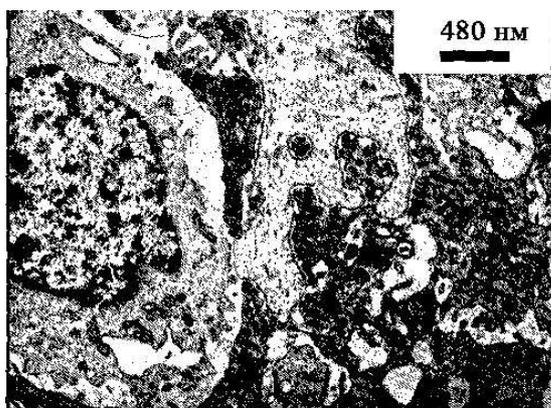
Результаты исследования кожи больных акантолитической пузырьчаткой методом электронной трансмиссионной микроскопии. Как свидетельствуют электронно-микроскопические исследования, изменения в коже при акантолитической пузырьчатке (АП) складывались из следующих главных компонентов: отек и расширение межклеточных пространств, лизис тонофиламентов и десмосом, регрессия эухроматина и фибриллярной трансформации ядрышек кератиноцитов. Разрушения контактов между эпидермоцитами имело очаговый характер. Относительный объем подобных очагов колебался в пределах $10 \% \pm 4,6 \%$ от объема эпидермиса. Но их топография и морфологические особенности в значительной мере определялись формой и стадией клинической манифестации пузырьчатки. Так у впервые заболевших очаги акантолиза располагались преимущественно в надбазальных участках, где формировался характерный феномен «разведения шестерен» [Braun-Falko O., Wolf H. H., 1975]. На контрлатеральной стороне кератиноциты сохраняли межклеточные контакты, но существенно изменялись их морфометрические параметры. Прежде всего, снижался показатель относительного объема анатомически сохранившихся тонофиламентов, который не превышает $40,2 \% \pm 6,4 \%$. Одновременно, до $540 \text{ нм} \pm 32 \text{ нм}$ уменьшается среднее расстояние между кератиноцитами. Указанные изменения морфометрических показателей свидетельствовали об ослаблении аппарата тонофиламентов.

Клетки Лангерганса в коже контрольной группы имели эксцентрично расположенное лапчатое ядро с множественными глубокими инвагинатами и

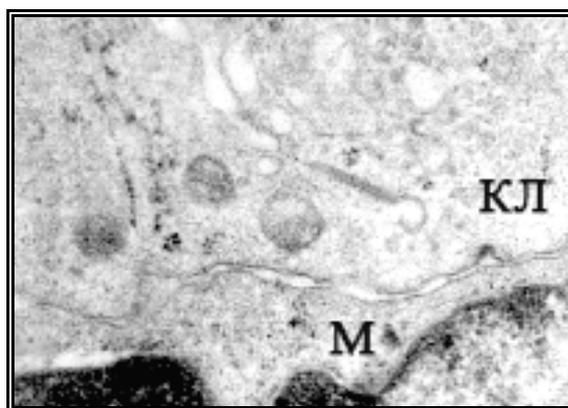
хорошо диспергированным эухроматином, в цитоплазме 1-2 лизосомы, содержащие электронплотное вещество, от крупного тела отходили широкие и довольно длинные отростки. Специфической структурной особенностью клеток Лангерганса является присутствие гранул Бирбека и характерных маргинальных цитоплазматических выростов. В норме гранулы Бирбека представлены преимущественно так называемыми «барабанными палочками» и единичными «теннисными ракетками». Барабанные палочки представляли собой вытянутые структуры размером от 25 до 50 нм с аксиально расположенной тубулой, от которой частокол отходили поперечно расположенные стерженьки. Окончания «палочек» слегка расширены. Количество этих структур колебалось в пределах 2-3 на одну клетку в стандартизированном ультратонком срезе толщиной 65 – 70 нм. При акантолитической пузырьчатке количество гранул увеличивалось до 5 – 7, они приобретали чаще вид теннисных ракеток, и пропорциональная численность которых доминировала над другими формами. В норме размеры ракеток не превышали 75 нм, и они располагаются преимущественно одиночно в периферических участках цитоплазмы. При акантолитической пузырьчатке «ракетки» подвергались выраженной гипертрофии, достигая в своих размерах 150 – 200 нм.

При акантолитической пузырьчатке клетки Лангерганса составили $7,9\% \pm 0,8\%$ от общего числа кератиноцитов (в коже здоровых людей – $2,5\% \pm 0,7\%$, ($p < 0,05$)). При трансмиссионной электронной микроскопии кожи при АП дендрические клетки пребывали в состоянии повышенной функциональной активности. Морфологически это проявлялось, прежде всего, гиперплазией отростков, что чаще наблюдалось в местах начального акантолиза. Здесь на фоне сохранившихся структур аппарата межклеточных контактов располагались ветвящиеся цитоплазматические выросты дендроцитов. Электронно-микроскопически они представлены фрагментами цитоплазмы, практически лишенных органелл. Тонкая структура гиалоплазмы в этих отростках идентична таковой в цитоплазме клеток Лангерганса.

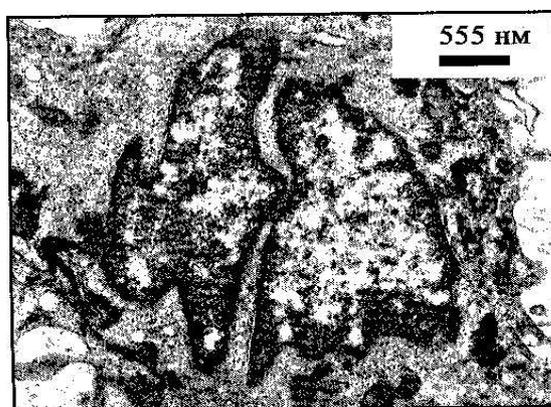
Межщелевые цитоплазматические выросты не вступали в плотные контакты с кератиноцитами, а как бы свободно залегали между тонофибриллами в межклеточном пространстве. Проникновение цитоплазматических отростков в межклеточные щели сопровождалось формированием очагов акантолиза. Многие кератиноциты были окружены подобным тандемом, состоящим из цитоплазматических выростов дендритных клеток (рис. 1. А). Клетки Лангерганса контактировали не только с кератиноцитами, но и моноцитами (рис. 1. Б). В клетках Лангерганса отмечались признаки активации – удвоение ядер (рис. 1. В), выраженная гиперплазия или удвоение гранул Бирбека (рис. 1. Г и Д). Гранулы располагались не только в ядродержащих участках цитоплазмы, но и в их многочисленных выростах (рис. 1. Г). При этом клетки Лангерганса залегали как бы в собственном интерстициальном ложе, в пределах которого цитоплазматические выросты формировали простые, слегка интердигитирующие контакты с кератиноцитами.



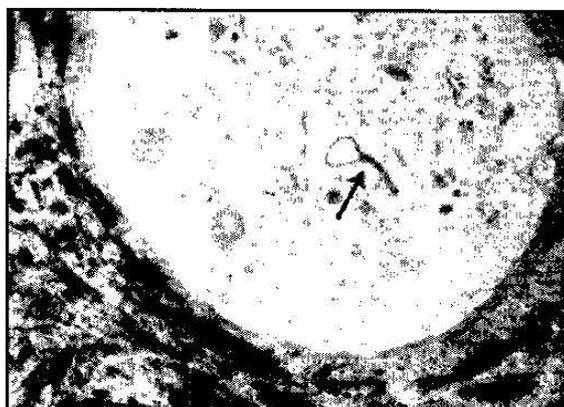
А



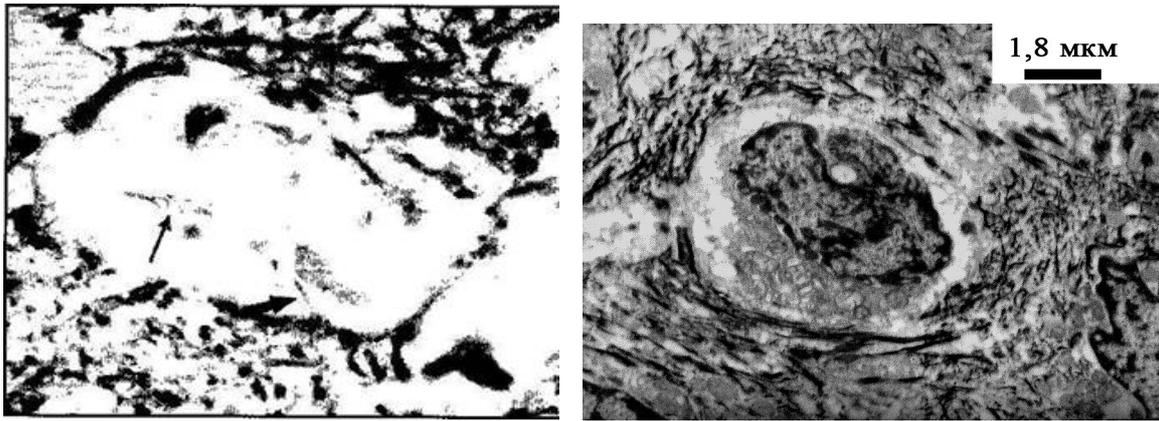
Б



В



Г



Д

Е

Примечания. А. Непосредственный контакт КЛ с базальным кератиноцитом. Ув.х 21000;
 Б. Взаимодействие КЛ с моноцитом. Ув. х 28000;
 В. Двухъядерная КЛ. Ув. х 18000;
 Г. Гипертрофия гранул Бирбека в («теннисные ракетки») отростке КЛ. Ув. х 20000;
 Д. Гипертрофия гранул Бирбека в КЛ, феномен удвоения гранул Бирбека. Ув. х 25000;
 Е. акантолитическая клетка. Ув. х 5600

Рис.1. Трансмиссионная электронная микроскопия кожи при акантолитической пузырьчатке

При ультраструктурном исследовании кожи больных АП постоянно наблюдали акантолитические клетки в различных стадиях их формирования. На некоторых из этих этапов (дезинтеграция десмосом) наблюдали характерные для апоптоза изменения (рис. 1. Е). Вместе с тем в акантолитических клетках, полностью потерявших связь с окружающими клетками, не наблюдали апоптотических изменений, хотя в очагах акантолиза при АП наблюдалось увеличение Cpr3^+ клеток.

Результаты изучения коллаген-протеогликанового комплекса кожи больных акантолитической пузырьчаткой методом атомно-силовой микроскопии и ИК-спектроскопии. В коже контрольной группы хорошо визуализировались при атомно-силовой микроскопии неизменные коллагеновые волокна с четко просматриваемой Д-периодичностью. Размер периодов колебался в пределах 65-64 нм. Аморфное вещество дермы было гомогенным, нанопоры определялись в виде трубчатых дефектов матрикса, их величина варьировала от 25 до 100,150 нм, у них отсутствовала вязкая стенка, а диаметр составил $168,8 \text{ нм} \pm 10,9 \text{ нм}$. При акантолитической пузырьчатке в

дерме выявлена структурная организация межучного вещества – оно не было однородным, в нем определялись нанопоры, наноканалы и агломераты (рис. 2).

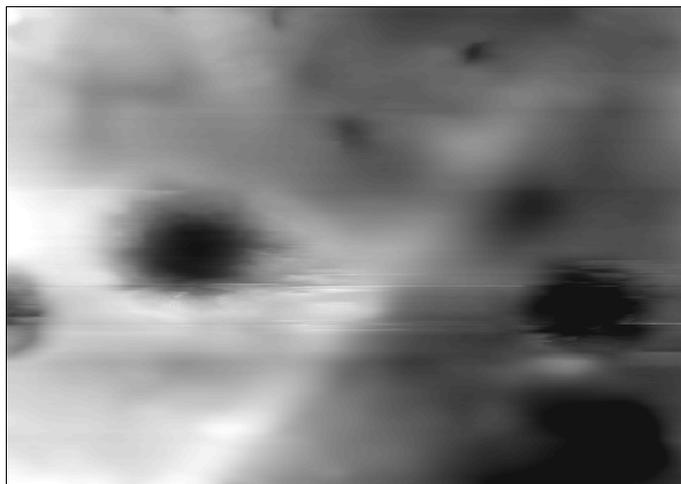


Рис. 2. Атомно-силовая микроскопия кожи при АП.
Хорошо структурированные стенки наноканалов в слое протеогликанов.
Размер скана 1500 нм

При этом количество нанопор межучного вещества на 10 мкм^2 составило $64,3 \pm 8,0$ (в контрольной группе – $23,0 \pm 3,0$, $p < 0,05$) (табл. 4). При акантолитической пузырчатке в межучном веществе были выявлены наноканалы, отличающиеся от нанопор наличием вязкой степени, не рассекаемой кантилевером (рис. 3). Диаметр нанопор при акантолитической пузырчатке составил $168,8 \text{ мкм} \pm 10,9 \text{ мкм}$.



Рис. 3. Атомно-силовая микроскопия кожи при АП.
Плотные не рассекаемые кантилевером стенки наноканала в слое протеогликанов. Размер скана 1500 нм

В межуточном веществе в припузырной области у больных акантолитической пузырчаткой были отмечены агломераты, размером $34,2 \text{ нм} \pm 4,8 \text{ нм}$, число их составило $5,5 \pm 1,2$ на 10 мкм^2 (табл. 4).

Таблица 4

Изменение коллаген-протеогликанового комплекса по данным атомно-силовой микроскопии

| Структурные образования | Показатели атомно-силовой микроскопии | Здоровые лица (n = 15) | Акантолитическая пузырчатка (n = 25) | Герпетиформный дерматит Дюринга (n = 16) |
|---------------------------------|--|------------------------|--------------------------------------|--|
| Межуточное вещество | Адгезионные силы в наноньютонах | $15,3 \pm 2,3$ | $46,8 \pm 4,8^*$ | $2,5 \pm 0,5^*$ |
| | Агломераты, количество на 10 мкм^2 | – | $5,5 \pm 1,2$ | $10,5 \pm 2,6^*$ |
| | Агломераты, размеры в нм | – | $34,2 \pm 4,8$ | $41,5 \pm 3,7$ |
| Коллагеновые волокна наноньютон | Адгезионные силы на поверхности в наноньютонах | $26,3 \pm 1,2$ | $5,6 \pm 1,8^*$ | $5,9 \pm 1,9^*$ |
| Нанопоры | Число на 10 мкм^2 | $23,0 \pm 3,0$ | $64,3 \pm 8,0^*$ | $11,7 \pm 2,7^*$ |
| | Диаметр в нм | $175,2 \pm 10,3$ | $166,4 \pm 1,8$ | $164,8 \pm 12,7$ |
| Наноканалы | Число на 10 мкм^2 | – | $7,4 \pm 3,2$ | – |
| | Диаметр в нм | – | $168,8 \pm 10,9$ | – |

Примечание. * $p < 0,05$

Исследование адгезионных сил, проводимое методом атомно-силовой микроскопии, показало резкое снижение показателей их на коллагеновых волокнах дермы ($5,6 \text{ нН} \pm 1,8 \text{ нН}$ (наноньютонов), в контрольной группе – $26,3 \text{ нН} \pm 1,2 \text{ нН}$).

Адгезионные силы аморфного вещества при акантолитической пузырчатке были резко увеличены ($46,8 \text{ нН} \pm 4,8 \text{ нН}$, в контрольной группе – $25,3 \text{ нН} \pm 2,3 \text{ нН}$, $p < 0,05$). При атомно-силовой микроскопии выявлена деструкция коллагеновых волокон в виде дезинтиграции их доменов.

Таким образом, при акантолитической пузырчатке отмечались гипергидратация межклеточного вещества дермы, появление в нем

агломератов, увеличение количества нанопор и появление наноканалов. Кроме этого, выявлено снижение адгезионных сил на коллагеновых волокнах и их увеличение в аморфном веществе дермы (табл. 4).

Данные ИК-спектроскопии образцов кожи при акантолитической пузырьчатке в воздушной кювете показали, что гипердратация межклеточного вещества дермы обусловлена секвестром (сбросом) воды с коллагеновых волокон за счет снижения их гидрофильности и закрытием нанопор на волокнах.

Результаты исследования иммуногистохимических и ультраструктурных изменений кожи при герпетиформном дерматозе Дюринга. При ГДД количество клеток, имеющих фенотипы СД 1a+ положительных клеток не превышало $0,8 \% \pm 0,3 \%$, интенсивность экспрессии Ki67 кератиноцитами в зоне акантоза была выраженной, активность каспаз вблизи и за пределами пузыря была слабо выраженной.

При трансмиссионной электронной микроскопии биоптатов кожи при ГДД в кератиноцитах, при сохранности тонофиламентов, выявлены признаки вакуольной (гидропической) дистрофии с исходом в колликвационный некроз (рис. 4).

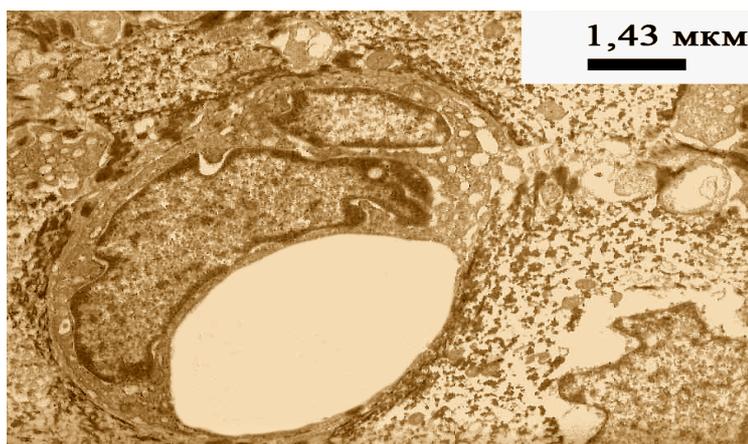


Рис. 4. Трансмиссионная электронная микроскопия кожи при герпетиформном дерматозе Дюринга. Вакуольная (гидропическая) дистрофия с исходом в колликвационный некроз. Ув.×7.000

Эти изменения развивались на фоне изменений в структурной организации ядерного аппарата кератиноцитов.

На преимущественно некротическую деструкцию кератиноцитов при ГДД косвенно указывает и низкая активность каспазы в эпидермоцитах, расположенных в непосредственной близости от пузыря и на участках эпидермиса далеко за пределами пузырных высыпаний. Пролиферативная активность кератиноцитов оставались достаточно высокой – клетки интенсивно экспрессировали Ki67 и формировали морфологически четко оформленные эпидермальные диффероны. По данным электронно-микроскопического исследования, основные изменения в базальной мембране проявлялись в виде очаговых расслоений, неравномерной концентрации полудесмосом и отложений депозитов. В мембранном матриксе имелись дефекты, представленные простыми, как правило, сквозными отверстиями диаметром до 300 нм и заполненные полиморфным детритом, включая миелиноподобные слоистые частицы. Характерен отек в подмембранной зоне, сопровождающийся разрушением фиксирующих коллагеновых нитей, приходящихся на якорные волокна. В ранних стадиях формирования пузырей изменения более выражены в базальном слое, в более старых – в патологический процесс вовлекались и lamina lucida, а позже – и lamina densa базальной мембраны. Процесс этот явно протекает синхронно с развитием клеточной инфильтрации подбазальных отделов сосочков кожи.

Состояние системы коллаген-протеогликаны в коже больных герпетиформным дерматозом Дюринга. По данным атомно-силовой микроскопии кожи, для ГДД наиболее характерным являлось разрушение коллагеновых фибрилл, прежде всего в области формирования пузыря (рис. 5). При этом в межуточном веществе дермы накапливался детрит, морфологически образованный довольно мелкими частицами, размерами в пределах от 25 до 50 нм.

Более крупные частицы и их агрегаты накапливались ближе ко дну пузыря (рис.6), на отдаленных от пузырей участках коллагеновые волокна не были изменены.

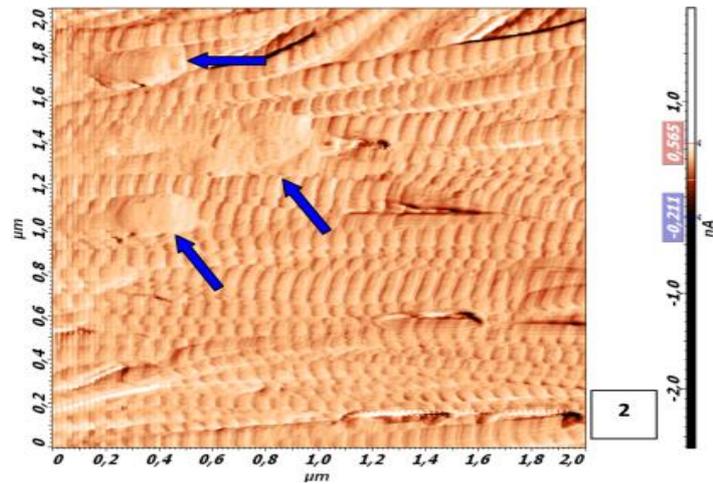


Рис.5. Атомно-силовая микроскопия кожи при герпетиформном дерматозе Дюринга. Демонстрируются дефекты коллагеновых фибрилл в виде очагов гомогенизации структур D-периодичности (указаны стрелками).
Размер сканов 1 000 нм

В целом межучточное вещество дермы в области пузырей при ГДД можно характеризовать как зону грубодисперсного озоления.

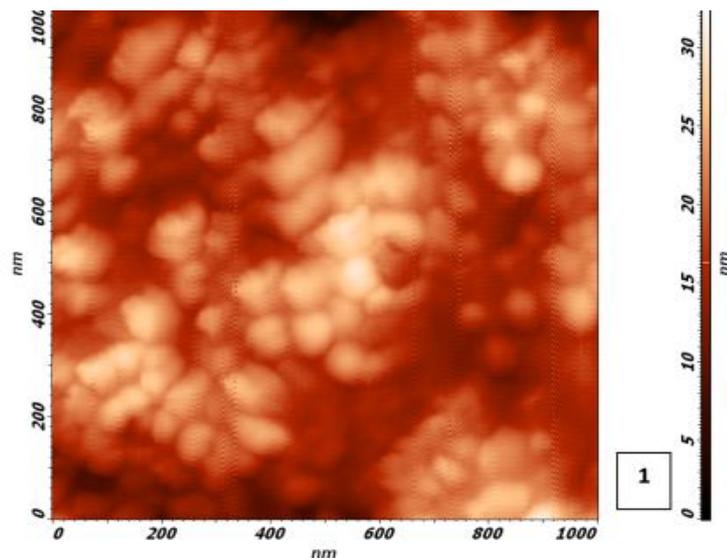


Рис.6. Атомно-силовая микроскопия кожи при герпетиформном дерматозе Дюринга. Агломераты в межучточном веществе. Размер сканов 1 000 нм

Агломераты имели размер $41,5 \text{ нм} \pm 3,7 \text{ нм}$, их число составило $10,5 \pm 2,6$ на 10 мкм^2 (табл. 4). Результаты локальной адгезиометрии свидетельствовали о том, что межучточное вещество в области пузырей являлось достаточно вязкой средой и характеризовалось гипергидратацией. Показатель составил $2,5 \pm 0,5$, в контрольной группе – $15,3 \pm 2,3$ ($p < 0,05$). За пределами пузырей в коллагеновых волокнах сохраняется характерная D-периодичность. Однако

сами фибриллы истончались. Показатель адгезионных сил на коллагеновых волокнах был значительно ниже, чем в коже здоровых субъектов. Падение значения показателя адгезионных сил коллагеновых волокон за пределами пузыря ($5,9 \text{ нН} \pm 1,9 \text{ нН}$, контрольная группа – $26,3 \text{ нН} \pm 1,2 \text{ нН}$) свидетельствовало об их дегидратации, уменьшении смачиваемости и снижении способности коллагеновых белков к удержанию воды (снижение гидрофильности). Принципиально дифференциально-морфологическим критерием при ГДД является снижение пористости межучного вещества (число нанопор составило $11,7 \pm 2,7$ на 10 мкм^2 , в контрольной группе – $23,0 \pm 3,0$, $p < 0,05$), в котором структурированных каналов не было найдено. Тем не менее, инстерстиций дермы находился в состоянии резко выраженного отека. По данным локальной адгезиометрии, в структурах коллаген-протеогликанового комплекса за пределами пузыря регистрировалось снижение показателей адгезионных сил до $2 - 5 \text{ нН}$, что свидетельствовало об уплотнении (полимеризации) межучного вещества дермы.

При ГДД выявлено снижение адгезионных сил на поверхности коллагеновых волокон до $5,9 \text{ нН} \pm 1,9 \text{ нН}$ (здоровая кожа $26,3 \text{ нН} \pm 1,2 \text{ нН}$, $p < 0,05$) (табл. 4). Адгезионные силы аморфного вещества в дерме при ГДД были снижены до $2,5 \text{ нН} \pm 0,5 \text{ нН}$, в нем визуализировались агломераты, их количество составило $10,2 \pm 2,6$ на 10 мкм^2 . Наноканалов при ГДД не наблюдалось, но количество нанопор было снижено до $11,7 \pm 2,7$ (в здоровой коже – $23,0 \pm 3,0$, $p < 0,05$).

Таким образом, изменение матрикса межклеточного вещества при ГДД можно характеризовать повышением вязкости (полимеризацией). Это подтверждается данными ИК-спектроскопии кожи при ГДД, свидетельствующей о закрытии нанопор и снижении гидрофильности коллагеновых волокон дермы.

Контактная биомикроскопия (КБК) и прижизненная микрофлюориметрия кожи (ПМК) при диагностике буллезных дерматозов. При КБК неизменной кожи были видны отдельные роговые чешуйки,

свечение которых гомогенно, ядра не определялись. Аналогичная картина отмечалась при КБК поверхности (покрышки) пузыря. При КБК на месте вскрывшихся буллезных элементов микроскопическая картина зависела от глубины их расположения и характера дна эрозии. При субкорнеальных пузырях дно было представлено клетками зернистого слоя или верхними слоями шиповидного слоя. Клетки были крупные, горизонтально ориентированные, с ядрами разной величины, конфигурации и интенсивности свечения.

При этом в клетках зернистого слоя цитоплазма имела желтоватое свечение, а ядра имели признаки лизиса (деформация, фрагментация).

Когда дно эрозии было представлено нижними слоями шиповидного или клетками базального слоя, в клетках отмечались крупные ядра с интенсивным зеленым свечением, клетки носили признаки дезинтеграции. Акантолитические клетки имели крупное ядро и интенсивно светящуюся красную цитоплазму. При прикосании фронтальной линзы объектива дна эрозии отмечалась дезинтеграция клеток эпидермиса, и пласты его с акантолитическими клетками свободно «плавали» в тканевой жидкости. При использовании контактного объектива х60 с водной иммерсией можно было на дне эрозии дифференцировать клетки инфильтрата.

При разрушении базальной мембраны (субэпидермальное расположение пузыря) дно его было представлено сосочковым слоем дермы, где определялся клеточный инфильтрат, контурировали нефлюоресцирующие темные сосочковые капилляры.

При дебютном проявлении вульгарной пузырчатки интенсивность первичной флюоресценции эпидермиса в режиме НАД·Н составила $4,82 \pm 0,08$, показатель свечения в режиме ФП·О составил $1,02 \pm 0,04$. При этом, показатель E (ФП·О/НАД·Н) составил $0,24 \pm 0,06$.

Изменение показателя E, определяющего отношение интенсивности свечения окисленных форм флавопротеидов (ФП·О) к интенсивности свечения восстановленных форм НАД·Н, может служить показателем прогноза течения

пузырчатки. Нарастание желто-зеленого спектра флюоресценции эрозий (λ , maxim. 530 нм) свидетельствует о выраженных репаративных процессах в эпидермисе. Сдвиг максимума свечения в синюю часть спектра отражал отсутствие восстановительных процессов в коже.

Изучение дерматоскопического изображения в дополнении к макропатологическому протоколу и гистологической картине облегчает и повышает точность патоморфологического диагноза.

Итак, проведенные научные исследования позволили установить особенности морфогенеза при АП и ГДД, выявить роль КЛ в активации акантолиза, описать изменения коллаген-протеогликанового комплекса при буллезных дерматозах, предложить метод прогнозирования течения акантолитической пузырчатки на основании динамики первичной флюоресценции кожи.

ВЫВОДЫ

1. Среди больных буллезными дерматозами, зарегистрированными в Красноярском крае за период 1988 – 2008 гг., основную группу составили больные акантолитической пузырчаткой (52,8 %), реже диагностировались герпетиформный дерматоз Дюринга (33,0 %), врожденный буллезный эпидермолиз (5,7 %). Больные пемфигоидом Левера, доброкачественной пузырчаткой Гужеро-Хейли-Хейли, болезнь Гровера составили 6,6 %.

В последнее десятилетие (1998 – 2008гг.) среди больных акантолитической пузырчаткой диагностировались такие клинические формы, как герпетиформная, паранеопластическая и IgA-зависимая, составившие 22,5 %.

2. В коже больных акантолитической пузырчаткой в локусах выраженного акантолиза и формирования микропузырей выявлено увеличение числа клеток Лангерганса, имеющих морфологические признаки активации (удвоение ядер, увеличение числа гранул Бирбека, их гиперплазия и удвоение). Клетки Лангерганса имели многочисленные контакты дендритических отростков с кератиноцитами и базальной мембраной. Одновременно в этих же локусах отмечались кератиноциты в состоянии апоптоза (анойкис), что

подтверждалось увеличением в эпидермисе количества $CD3+$ положительных клеток.

3. В начальной стадии акантолитической пузырчатки система коллаген-протеогликаны характеризовалась гипергидратацией, формированием крупнодисперсных агрегатов вокруг коллагеновых волокон, образованием наноканалов в межклеточном матриксе, с одновременным увеличением числа нанопор. При формировании пузыря отмечалось уменьшение адгезионных сил на коллагеновых волокнах, снижение их гидрофильности, секвестрация воды и миграция ее в эпидермис.

4. При герпетиформном дерматозе Дюринга в повреждении кератиноцитов и, соответственно, в механизмах формирования пузырей ведущее значение имеет гидропическая дистрофия с исходом в колликвационный некроз, при слабой экспрессии каспаз и достаточно высокой пролиферативной активности кератиноцитов. Число клеток Лангерганса не было достоверно изменено, но большинство клеток находились в состоянии дистрофии.

5. В коже больных герпетиформным дерматозом Дюринга межклеточный матрикс дермы характеризуется появлением крупных дисперсных агломератов и уплотнением (полимеризацией), которые обусловлены резким снижением адгезионных свойств аморфного вещества. При этом количество нанопор в межклеточном матриксе дермы было резко снижено. Гидрофильность коллагеновых волокон была уменьшена, и причиной появления свободной воды в локусах формирования пузырей была секвестрация ее коллагеновыми волокнами.

6. Выявленные в коже больных буллезными дерматозами ультраструктурные изменения: феномены активации клеток Лангерганса, гидропической дистрофии кератиноцитов, структуризации межклеточного матрикса (нанопоры, наноканалы), формирования агломератов и полимеризации – можно расценивать как ультраструктурные дифференциально-диагностические критерии при данной группе дерматозов.

7. Контактная биомикроскопия и прижизненная микрофлюориметрия кожи по характеру оптической картины, а также по интенсивности первичной и вторичной флюоресценции позволяют определить характер и уровень формирования пузыря (субкорнеальный, интраэпидермальный, субэпидермальный). Изменения показателя E, определяющего отношение интенсивности свечения окисленных форм флавопротеидов (ФП) к интенсивности свечения восстановленных форм НАД, может служить показателем прогноза течения пузырчатки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При диагностике буллезных дерматозов целесообразно проводить контактную биомикроскопию (КБК) и прижизненную микрофлюориметрию кожи (ПМК) для установления характера пузырных элементов (интраэпидермальный, субэпидермальный), для выявления акантолитических клеток и эозинофилов. Эти морфологические признаки являются важными дифференциально-диагностическими критериями при буллезных дерматозах. Они позволяют уточнить диагноз буллезного дерматоза до получения результатов гистопатологического исследования биоптата, что важно при тяжелом течении дерматоза.

2. Применение цифровых технологий позволяет проводить цифровую видеодерматоскопию. Данный метод фиксирует морфологическую картину изменений в коже, позволяет наблюдать динамику ее изменений в процессе лечения, в неясных диагностических случаях консультировать видеоизображение с другими специалистами.

3. Изменение показателя E, определяющего отношение интенсивности свечения окисленных форм флавопротеидов (ФП·О) и интенсивности свечения восстановленной формы никотинамидаденилдинуклеотида (НАД·Н), определяет прогноз течения пузырчатки. Нарастание желто-зеленого спектра флюоресценции дна эрозий ($\lambda_{\text{max}} \text{im } 530 \text{ nm}$) свидетельствует о хорошей репарации в эпидермисе. Сдвиг максимума свечения в синюю часть спектра отражает отсутствие восстановительных процессов в коже.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Карачева Ю. В.**, Гайдаш А. А., Прохоренков В. И., Сеница Л. Н., Белый В. И., Бабенко О. А., Чигодайкин Г. П., Ившина М. Л. **Буллезные дерматозы (вопросы клинико-морфологической диагностики по данным электронной и атомно-силовой микроскопии) : научная монография** // Красноярск : ООО ИПЦ "КАСС", 2008. 188 с., автора – 2,9 п.л.
2. Прохоренков В. И., Мисенко Д. Н., **Карачева Ю. В.**, Кунгуров С. В., Максименко В. Г., Калиниченко О. Ю., Побилат А. Е., Ившина М. Л. **Контактная биомикроскопия кожи : научная монография** // Красноярск : ООО ИД «КЛАСС», 2011. 151 с., автора – 2,4 п.л.
3. Прохоренков В. И., Мисенко Д. Н., Пономарев А. А., Селиванов С. В., **Карачева Ю. В.** Телевизионная люминесцентная биомикроскопия и микрофлюориметрия кожи: диагностические возможности и перспективы // **Вестник дерматологии и венерологии.** 1998. № 8. С. 4-8, автора – 0,13 п.л.
4. **Карачева Ю. В.**, Прохоренков В. И., Бекетов А. М. О герпетиформной пузырьчатке // **Вестник дерматологии и венерологии.** 2004. № 4. С. 38-39, автора – 0,08 п.л.
5. Прохоренков В. И., **Карачева Ю. В.**, Левкович А. О., Кунгуров С. В., Максименко В. Г., Тепляков Е. Ю., Гринева О. В. Методы прижизненной микроскопии кожи (ПМК): диагностические возможности и перспективы // **Сибирское медицинское обозрение.** 2004. № 2-3. С. 29-35, автора – 0,13 п.л.
6. **Карачева Ю. В.**, Прохоренков В. И., Гайдаш А. А., Гузей Т. Н., Чигодайкин Г. П., Ившина М. В. Буллезные поражения кожи: проблемы нозологии и дифференциальной диагностики // **Сибирское медицинское обозрение.** 2007. № 3. С. 10-14, автора – 0, 10 п.л.
7. Прохоренков В. И., Новиков А. И., **Карачева Ю. В.**, Гайдаш А. А., Чигодайкин Г. П., Гринева О. В. Возможности контактной биомикроскопии при дифференциальной диагностике буллезных поражений кожи // **Российский журнал кожных и венерических болезней.** 2008. №4. С. 32-34, автора – 0,06 п.л.
8. **Карачева Ю. В.**, Прохоренков В. И., Гайдаш А. А., Чигодайкин Г. П., Бабенко О. А. Роль клеток Лангерганса в морфогенезе пузырьчатки // **Вестник дерматологии и венерологии.** 2008. №4. С. 4-8, автора – 0,13 п.л.
9. **Карачева Ю. В.**, Прохоренков В. И., Ившина М. В., Чигодайкин Г. П. Случай везикуло-буллезной формы дискератоза Дарье // **Клиническая дерматология и венерология.** 2008. №1. С. 13-15, автора – 0,09 п.л.
10. Гайдаш А. А., **Карачева Ю. В.**, Прохоренков В. И., Новиков А. И.,

Синица Л. Н., Семенова О.И., Щеглов Д. В., Белый В. И., Новиков Д. А., Чигодайкин Г. П., Денисов А. В., Бабенко О. А., Безвинный М. Ю. Коллаген-протеогликановый комплекс кожи при акантолитической пузырьчатке по данным атомно-силовой микроскопии и ИК-спектроскопии // **Вестник дерматологии и венерологии**. 2009. № 2. С. 4-12, автора – 0,09 п.л.

11. **Карачева Ю. В.**, Гайдаш А. А., Новиков А. И., Прохоренков В. И., Чигодайкин Г. П. Ультраструктурные и иммуногистохимические изменения кожи у больных герпетиформным дерматитом Дюринга // **Российский журнал кожных и венерических болезней**. 2009. №3. С. 62-66, автора – 0,13 п.л.

12. Гайдаш А. А., Прохоренков В. И., Новиков А. И., Синица Л. Н., Белый В. И., **Карачева Ю. В.**, Рябова Н. П., Новиков В. А., Бабенко О. А., Чигодайкин Г. П. Межуточное вещество кожи при герпетиформном дерматите Дюринга по данным зондовой микроскопии и колебательной спектроскопии // **Российский журнал кожных и венерических болезней**. 2010. № 1. С. 37-42, автора – 0,08 п.л.

13. **Карачева Ю. В.**, Прохоренков В. И., Гайдаш А. А., Новиков А. И., Бабенко О. А., Чигодайкин Г. П. Ультраструктурные изменения кожи при буллезных дерматозах (Сообщение I) // **Сибирское медицинское обозрение**. 2010. № 2. С. 40-45, автора – 0,13 п.л.

14. **Карачева Ю. В.**, Прохоренков В. И., Гайдаш А. А., Новиков А. И., Бабенко О. А., Чигодайкин Г. П. Структурные изменения кожи при буллезных дерматозах (Сообщение II) // **Сибирское медицинское обозрение**. 2010. № 3. С. 32-37, автора – 0,13 п.л.

15. Прохоренков В. И., **Карачева Ю. В.**, Гузей Т. Н. Существует ли болезнь Гровера? // **Клиническая дерматология и венерология**. 2011. № 3. С. 78-81, автора – 0,17 п.л.

16. Гайдаш А. А., Чигодайкин Г. П., Прохоренков В. И., **Карачева Ю. В.**, Николаев В. Г., Сиднева Л. В., Бабенко О. Н. Структура межуточного матрикса кожи различных соматотипов человека по данным атомно-силовой микроскопии // **Сибирский медицинский журнал**. 2011. № 5. С. 34-38, автора – 0,09 п.л.

17. Малышев А. С., Прохоренков В. И., Рукша Т. Г., **Карачева Ю. В.** Методы прижизненной микроскопии кожи // **Сибирский журнал дерматологии и венерологии**. 2009. №10 (I). С. 19-24, автора – 0,20 п.л.

18. Гайдаш А. А., **Карачева Ю. В.**, Прохоренков В. И., Новиков А. И., Синица Л. Н., Белый В. И., Рябова Н. П., Новиков В. А., Бабенко О. А., Чигодайкин Г. П. Структурные изменения в дерме при герпетиформном

дерматите Дюринга по данным сканирующей зондовой микроскопии и колебательной спектроскопии // Сибирский журнал дерматологии и венерологии. 2009. № 10 (II). С. 23-27, автора – 0,06 п.л.

19. Prokhorenkov V. I., **Karachova J. V.**, Ponomarev A. A., Grineva O. V. The use of television Luminescent biomicroscopy (BM) and microfluorimetry in diagnostics of dermatoses // The 4th Russia-Japan International Medical Symposium.-Irkutsk, 1996. P. 233, автора – 0,03 п.л.

20. **Карачева Ю. В.**, Прохоренков В. И., Гайдаш А. А., Чигодайкин Г. П. Роль клеток Лангерганса в морфогенезе пузырчатки // II Всероссийский конгресс : тезисы. Санкт-Петербург, 2007. С. 60-61, автора – 0,06 п.л.

21. Прохоренков В. И., **Карачева Ю. В.**, Бекетов А. М. К вопросу о герпетиформной пузырчатке // Актуальные вопросы дерматовенерологии : тезисы научно-практической конференции. Красноярск, 2005. С. 34-37, автора – 0,13 п.л.

22. Прохоренков В. И., **Карачева Ю. В.**, Левкович А. О., Максименко В. Г. Диагностические возможности контактной биомикроскопии // Актуальные вопросы дерматовенерологии : тезисы научно-практической конференции. Красноярск, 2005. С. 113-120, автора – 0,25 п.л.

23. Пат. 2 408 279 С1 Российская Федерация. Способ дифференциальной диагностики буллезных дерматозов / **Карачева Ю. В.**, Ившина М. Л., Прохоренков В. И., Малышев А. С., Побилат А. Е.; Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. № 2408279; заявл. 02.07.2009; опубл. 10.01.2011. Бюл. № 1. 2 с., автора – 0,05 п.л.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|-------|--|
| АП | – истинная акантолитическая пузырчатка |
| ГДД | – герпетиформный дерматоз Дюринга |
| КБК | – контактная биомикроскопия кожи |
| НАД·Н | – никотинамидаденилдинуклеотид восстановленный |
| ПМК | – прижизненная микрофлюориметрия кожи |
| ФП·О | – флавопротеин окисленный |
| ЦИК | – циркулирующие иммунные комплексы |
| Dsg | – десмоглеины |
| Ig | – иммуноглобулин |
| КЛ | – клетки Лангерганса |