

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА ПУТЕМ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ИНФИЛЬТРАТА

Л.А. Пашкевич¹, М.Т. Мохаммади¹,
М.А. Герасименко², С.Н. Мартынюк¹

¹ ГУ «РНПЦ травматологии и ортопедии,
Республика Беларусь

² УО «Белорусский государственный
медицинский университет»,
Минск, Беларусь

Введение. Морфологическое исследование суставных структур является одним из наиболее надежных и объективных методов диагностики суставного заболевания. При исследовании образцов синовиальной оболочки перед морфологом стоят следующие задачи: уточнение патогенеза и классификации болезней; установление активности патологического процесса, фазы его развития и инволюции; выявление критериев прогноза; определение показаний к назначению определенных видов терапии и контроля ее эффективности и достаточности. Искусство и умение врача-морфолога заключается в объективном решении поставленных задач. В синовиальных оболочках различают два слоя: внутренний (интима) и наружный (адвентиция). Оболочка, в свою очередь, вы-

стлана сплошным или местами прерывистым слоем синовиоцитов, расположенных в 1-3 ряда клеток, без базальной мембраны. Внутренний слой по сравнению с наружным богаче клетками, содержит более нежные коллагеновые волокна [1, 2]. Покровные клетки являются соединительнотканными элементами, модифицированными, морфологически и функционально соответствуют специальным функциям: функции пограничной ткани и функции сецернирования определенных веществ (в основном муцина) в межклеточное вещество и в синовиальную жидкость. Синовиоциты представляют собой клетки соединительной ткани: А-клетки и В-клетки. А-клетки являются макрофагами и осуществляют фагоцитоз различных частиц, в том числе разрушающихся клеток внутри-

суставной синовиальной жидкости; другой их функцией является синтез цитокинов. В-клетки, принадлежащие к клеткам фибробластического ряда, осуществляют синтез и секрецию гиалуроновой кислоты, протеогликанов и белков синовиальной жидкости [2, 3]. В толще интимального слоя располагаются клетки типа фибробластов и гистиоцитов, недифференцированные мезенхимальные клеточные элементы и немногочисленные тучные клетки [4].

Изучение синовиальной оболочки с использованием иммуногистохимических методов важно для понимания патогенеза воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, спондилоартропатии и др. Использование иммуногистохимических методов исследования позволяют специфически определить фенотип воспалительного инфильтрата, экспрессию адгезивных молекул, цитокинов и металлопротеиназ в биопсийном материале больных ревматоидным артритом. Недавние зарубежные исследования показывают возможность использования этих методов исследования для дифференциальной диагностики ревматоидного артрита на ранних этапах заболевания, предотвращая агрессивное разрастание паннуса и синтез протеазы с последующим разрушением хряща. Ряд зарубежных авторов, используя иммуногистохимические методы, изучали ткань синовиальной оболочки больных ревматоидным артритом для выяснения фенотипа клеточного инфильтрата. Образцы синовиальной оболочки были окрашены с использованием набора моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD22 (В-клетки), CD138 (плазмациты), CD68 (макрофаги) и CD55 (фибробласто-подобные синовиоциты), используемые большинством лабораторий. Статистический анализ полученных результатов показал высокий уровень экспрессии CD38+ плазмацитов, CD68+ макрофагов, CD22+ В-клеток, в образцах синовиальной оболочки данных пациентов, по сравнению с контрольной группой [4, 5].

Аналогичные результаты были представлены другой группой исследователей, которые оценивали иммунофенотип клеток воспали-

тельного инфильтрата синовиальной оболочки больных остеоартрозом, ревматоидным артритом и артропатиями с использованием моноклональных антител к CD68, CD3, CD38 и CD20. Было выявлено, что при ревматоидном артрите наблюдается высокий уровень экспрессии данных маркеров воспаления, в 2,5 раза больше, чем в контрольной группе. Выявлена положительная корреляция между продолжительностью заболевания и плотностью клеточного инфильтрата. Отрицательная корреляция установлена между продолжительностью заболевания и числом CD68+клеток [5]. Как указывает ряд зарубежных авторов, количество и распределение клеток воспалительного инфильтрата зависит от стадии ревматоидного артрита. В начале острой фазы ревматоидного артрита преобладают моноциты, гранулоциты, в подострой фазе ревматоидного артрита присутствуют Т-клетки, а также плазмациты. Большинство хронических синовитов характеризуются присутствием большого числа Т-клеток и плазмацитов в синовиальной оболочке [5].

Таким образом, данные зарубежных исследований показывают возможность использования иммуногистохимических маркеров воспаления в синовиальной оболочке для дифференциальной диагностики иммунных и иных артритов. Использование специфических моноклональных антител в ранней диагностике артритов выявляет увеличение числа макрофагов и фибробластоподобных синовиоцитов, и инфильтрацию синовиального слоя Т-клетками, В-клетками, плазмацитами и макрофагами. Специфичным является то, что маркеры воспалительной инфильтрации синовиальной оболочки – плазмациты, В-клетки и макрофаги, статистически значительно отличаются между ревматоидным артритом и др. формами артритов.

Методы и материалы исследования. Материалом исследования послужили ткани биоптатов синовиальной оболочки, полученные при артроскопии коленного сустава у пациентов в молодом возрасте. Патоморфологически обработаны и изучены биопсийные ткани синовиальной оболочки коленного сустава, полученные у 50 паци-

ентов. Средний возраст которых на момент биопсии коленного сустава составил 19,38 ± 2,13 года (от 10 до 30 лет).

Патоморфологическое исследование материала осуществлялось по общепринятой гистологической методике изучения мягких тканей. Из парафиновых блоков изготавливали серийные срезы и окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону и альциановым синим на слизь. С целью выявления специфики клеточного состава воспалительного инфильтрата, при-

Для иммунного окрашивания использовали стрептавидин-биотиновый пероксидазный метод (Dako, LSAB+Kit, HRP), в качестве хромогенного субстрата применяли Liquid DAB+. Для фонового окрашивания применяли гематоксилин. Контроль отрицательного окрашивания проводился путем исключения первичного антитела.

Препараты были изучены под световым микроскопом.

Результаты исследования. В изучаемую группу входили 50 больных с повреждением

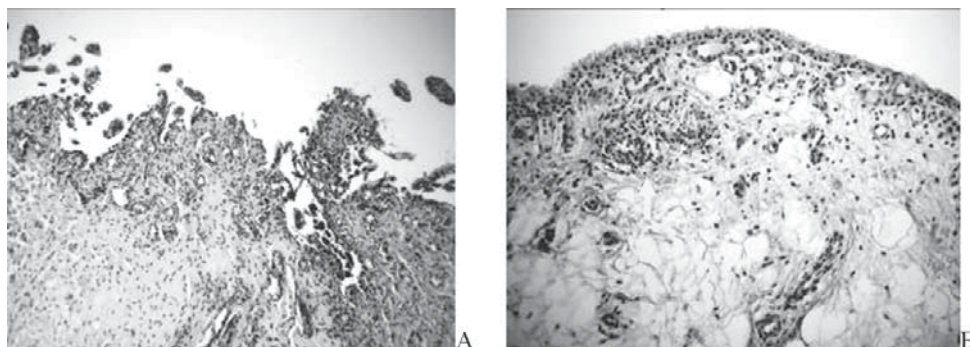


Рис. 1. Посттравматический синовит

Примечание:

1 А Умеренно выраженная гиперплазия ворсин и склероз стромы субинтимального слоя сино-виальной оболочки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х50.

2 Б Слабо выраженный периваскулярный круглоклеточный воспалительный инфильтрат с тенденцией к формированию фолликулярной гиперплазии (стрелка). Выраженный липоматоз и мик-соматоз стромы субинтимального слоя. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х100.

менялись иммуногистохимические методы исследования. Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах толщиной 4 мкм. Срезы депарафинировались в ксилоле, а затем регидратировались в батарее спиртов нисходящей концентрации, после чего промывались в дистиллированной воде. Демаскировку антигена проводили в микроволновой печи в Target Retrieval Solution, PH 6,0. Эндogenous пероксидазу ингибировали в 3% растворе перекиси водорода в течение 20 мин при 4°C. Срезы инкубировались с первичными антителами к CD20, CD45, CD68, CD79a и CD138. Инкубацию с первичными антителами проводили 30 мин при комнатной температуре.

коленного сустава, доля женщин составила 31 (65%) и доля мужчин – 19 (35%). Среди изучаемых больных травматическое поражение коленного сустава занимал первое место (39 наблюдений), на втором месте оказались синовиты ревматоидного генеза (11 человек).

Патоморфологическое исследование синовиальной оболочки

При гистологическом изучении биоптатов синовиальной оболочки учитывались группировки признаков по характеру основных общепатологических процессов: дистрофических, воспалительных, гипертрофических, атрофических, склеротических, и т.д. Степень выраженности общепатологических процессов оценивалась в трех баллах: слабо-; уме-

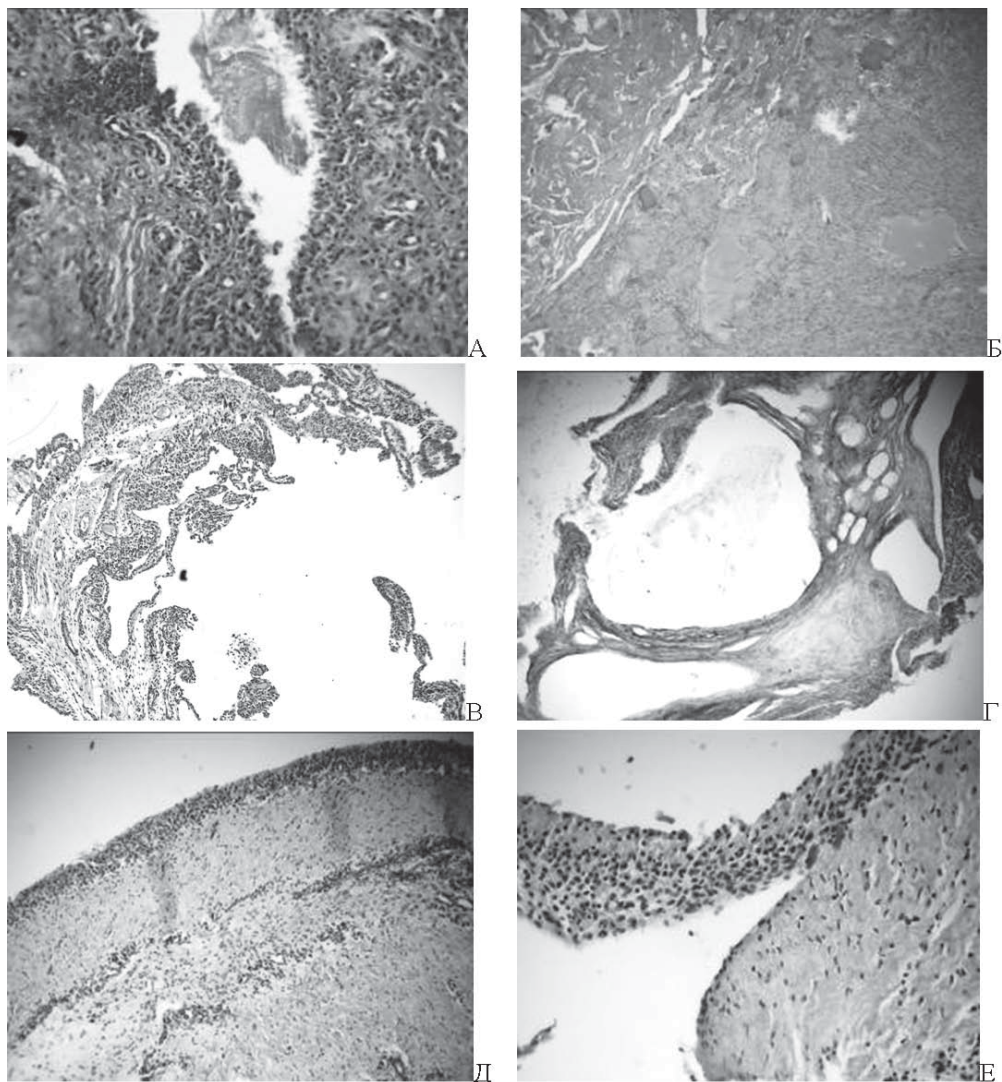


Рис. 2. Ревматоидный синовит

Примечание:

- 1 А Гипертрофия покровного слоя с пролиферацией перпендикулярно расположенных сино-виоцитов и фибриноидным наложением на поверхности. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x400.
- 2 Б Фибриноидный некроз покровного слоя (справа) и склероз стромы субинтимального слоя (слева). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону. Ув. x100.
- 3 В Полипозная гиперплазия синовиальной оболочки с формированием собственной фибро-васкулярной ножки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x50.
- 4 Г Слизистая дистрофия стромы субинтимального слоя с формированием множества слизистых кист. Окраска альциановым синим. Ув. x100.
- 5 Д Полисадообразная пролиферация синовиоцитов в субинтимальном слое. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100.
- 6 Е Десквамация интимального слоя. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x400.

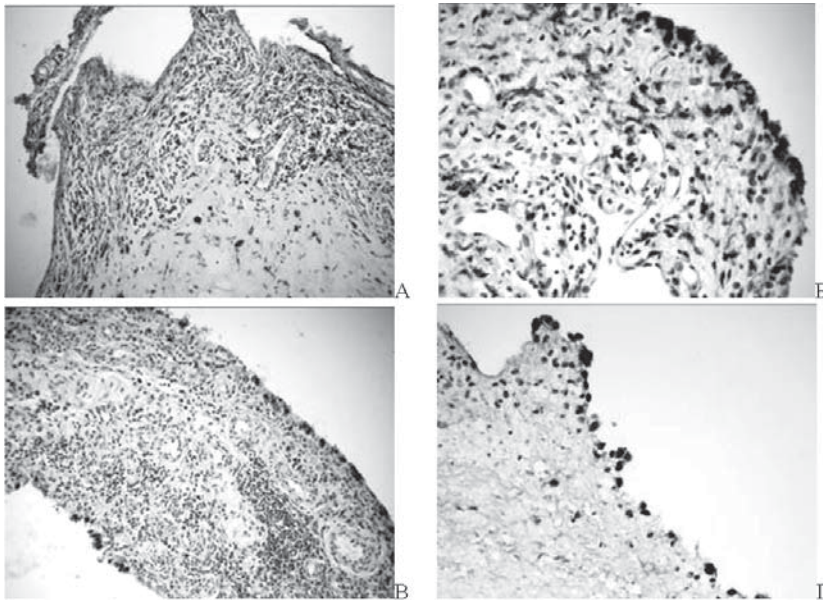


Рис. 3. Иммуногистохимическая окраска синовиальной оболочки с CD68 на выявление макрофагов

Примечание:

- 1 А Ревматоидный синовит. Выраженная экспрессия CD68-позитивных клеток в субинтимальном слое. Ув. x200.
- 2 Б Ревматоидный синовит. Макрофаги выстраиваются в 1-2 ряда на поверхности покровного слоя. Ув. x400.
- 3 В Посттравматический синовит. Слабо выраженная экспрессия CD68-позитивных клеток в субинтимальном слое. Ув. x200.
- 4 Г Посттравматический синовит. Одиночная экспрессия CD68-позитивных клеток в интимальном слое. Ув. x400.

ренно-; сильно выраженная. Также оценивался характер распространения процесса: диффузный; очаговый; и периваскулярный.

По нашим наблюдениям, посттравматический синовит морфологически выразался в гипертрофии оболочки и, в меньшей степени, в пролиферации синовиоцитов, умеренной гиперплазии ворсин, пролиферации фибробластов, склерозе оболочки и очаговой лимфомакрофагальной инфильтрации преимущественно периваскулярно. Нами было отмечено, что в некоторых наблюдениях, особенно в остром периоде после травмы, скопление клеточного воспалительного инфильтрата приводит к формированию структур подобных лимфоидным фолликулам. Однако

они, как правило, периваскулярные, мелкие, одиночные и без зоны роста. В некоторых случаях отмечались отложения фибрина на поверхности. Все эти признаки, как правило, выражены слабо (рис. 1). В большинстве случаев определялось скопление сидерофагов-макрофагов, фагоцитирующих гемосидерин. Данный признак, как утверждают другие исследователи, является важным диагностическим признаком для постановки диагноза посттравматического синовита [1].

Патоморфологические изменения синовиальной оболочки при ревматоидных синовитах характеризовались: резко выраженной сосочковой или, не редко, полипозной гиперплазией ворсин, наложениями фибрина на

поверхности интимального слоя, перпендикулярным расположением синовиоцитов, по отношению к поверхностным фибринозным наложениям, выраженной пролиферацией синовиоцитов покровного слоя до 10 рядов и более, отторжением покровного слоя, пролиферацией синовиоцитов в субинтимальном слое, с формированием полисадообразной структуры, фибриноидным некрозом покровного слоя, с возникновением явления "инверсии слоев" на проекции раннее существующих или вновь образованных полисадообразных структур, очагами мукоидного набухания и фибриноидных изменений, отеком субинтимальной ткани, очаговой или диффузной инфильтрацией субпокровного слоя лимфоцитами, макрофагами, плазматическими, с примесью полиморфноядерных лейкоцитов, формированием лимфоидных фолликулярных узелков, продуктивными или, реже, деструктивно-продуктивными васкулитами, а также миксоматозом, ангиоматозом и склерозом стромы (рис. 2).

Иммуногистохимические исследования синовиальной оболочки

При иммуногистохимическом исследовании, с целью выяснения характера воспалительного инфильтрата синовиальной оболочки при синовитах посттравматического и ревматоидного генеза, нами применены следующие моноклональные антитела: CD45 (маркер общего лейкоцитарного ряда), CD68 (маркер макрофагов), CD138 (маркер плазматических клеток), CD79a (маркер В-клеточной линии, экспрессирующий на всех стадиях дифференцировки В-клеток, что является наиболее специфичным, но менее чувствительным), CD20 (наилучший маркер зрелых В-клеток).

Анализ экспрессии макрофагального маркера CD68 в биопсийном материале синовиальной оболочки показывает более выраженную экспрессию CD68-позитивных клеток в случаях с ревматоидным синовитом, чем с посттравматическим. При окраске на выявление макрофагов при ревматоидных синовитах отмечается их экспрессия, как в покровном слое, так и диффузное распределение в субинтимальном слое. В покровном слое ма-

крофаги образуют сплошную линию из 1-2 и более рядов поверхностных клеток, непосредственно соприкасающихся с суставной жидкостью. Однако, в случаях посттравматических синовитов, количество макрофагов в составе субинтимального инфильтрата встречается меньше, и преимущество носит периваскулярный характер. В интимальном слое также CD68-позитивные клетки в посттравматических синовитах, по сравнению с ревматоидными, наблюдаются реже, и они выстраиваются в прерывистую линию через 1-3 клеток покровных синовиоцитов (рис. 3).

Иммуногистохимическая окраска с CD20 показала некоторые отличия в экспрессии В-лимфоцитов между синовитами ревматоидного и посттравматического генеза. Одним из отличительных признаков ревматоидного синовита является гнездное скопление лимфоцитов с формированием фолликулярных узелков в субинтимае, указывающих на заинтересованность иммунной реакции в процессе. При применении окраски с CD20 нами выявлено, что в случаях ревматоидного синовита данное антитело экспрессирует чаще в центре фолликулярных узелков и, в меньшей степени, периваскулярно, и еще реже, в виде одиночно разбросанных CD20-позитивных клеток в строме субинтимы. В случаях посттравматических синовитов CD20-позитивные клетки встречались намного реже и имели периваскулярную локализацию, или одиночно располагались в субинтимае (рис. 4).

При иммуногистохимическом исследовании синовиальной оболочки с антителом CD79a в случаях ревматоидного генеза выявлено, что экспрессия CD79a-позитивных клеток по сравнению с CD20-позитивными имеет более диффузный характер распространения в субинтимае. При ревматоидных синовитах, если CD20 экспрессирует в центральной части лимфоидных фолликулярных узелков, то CD79a-позитивные клетки наблюдаются чаще по периферии этих узелков. При посттравматических синовитах количество CD79a-позитивных клеток в субинтимае, по сравнению с синовитами ревматоидного генеза, значительно меньше. Также, в отличие от ревматоидных синовитов, при посттравма-

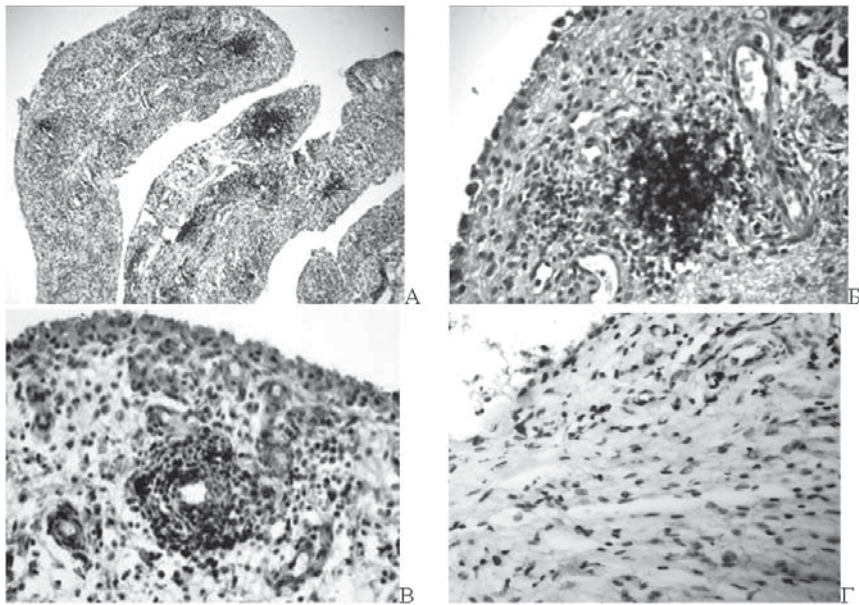


Рис. 4. Иммуногистохимическая окраска синовиальной оболочки с CD20 на выявление зрелых В-лимфоцитов

Примечание:

1 А Ревматоидный синовит. Выраженная villous гиперплазия синовиальной оболочки, с многочисленными фолликулярными узелками в субинтимальном слое. Экспрессия CD20-положительных клеток в центре фолликулярных узелков. Ув. x100.

2 Б Ревматоидный синовит. Выраженная экспрессия CD20-положительных клеток в центре фолликулярных узелков. Ув. x400.

3 В Посттравматический синовит. Периваскулярная экспрессия CD20 в субинтимальном слое. Ув. x400.

4 Г Посттравматический синовит. Одиночная экспрессия CD20-положительных клеток в субинтимальном слое. Ув. x400.

тически наблюдается одиночное, а не групповое скопление CD79a-позитивных клеток, и их распространение чаще носит периваскулярный характер, а не диффузный (рис. 4). В отличие от макрофагального маркера CD68, у которого излюбленное место локализации является поверхностные ряды покровного слоя синовиальной оболочки (фронтальная линия обороны) (рис. 3), CD79a-позитивные клетки локализуются под покровным слоем, т.е. формируют следующую поддерживающую линию защиты (рис. 4 В).

Иммуногистохимическое исследование образцов ткани синовиальной оболочки с CD138 при синовитах ревматоидного и посттравматического характера, с целью выяв-

ления плазматических клеток среди масс клеточного воспалительного инфильтрата, показало значительную количественную разницу в экспрессии между выше указанными группами. При ревматоидных синовитах выявляется огромное количество диффузно распространенных CD138-положительных клеток, вместе с тем, данные клетки отсутствуют в покровном слое и в центральной части лимфоидных фолликулярных узелков. Однако, в посттравматических синовитах плазматические клетки наблюдаются очень редко и, как правило, одиночно разбросаны в субинтимальном слое (рис. 5).

Иммуногистохимическое исследование состава воспалительного клеточного инфильт-

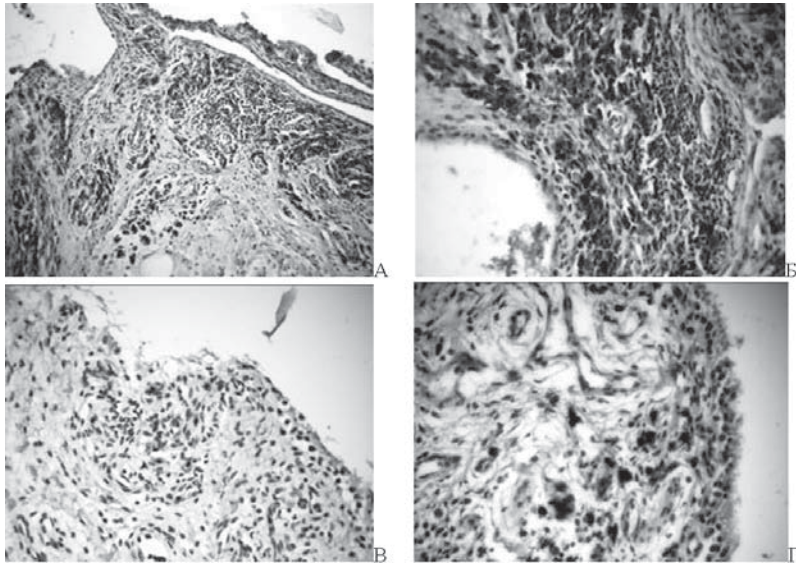


Рис. 5. Иммуногистохимическая окраска синовиальной оболочки с плазмаци-тарным маркером CD138

Примечание:

1 Ревматоидный синовит. Выраженная экспрес-

сия CD138-позитивных клеток. А ув. x200 и Б ув. x400.

2 Б Посттравматический синовит. Единичные CD138-позитивные клетки. А ув. x200 и Б ув. x400.

траты с общим лейкоцитарным маркером CD45 в биопсийном материале синовиальной оболочки коленного сустава выявило, как и описанные предыдущие антитела, количество иммунопозитивных клеток значительно выше в синовитах ревматоидного генеза, по сравнению с посттравматическим. При детальном рассмотрении случаев ревматоидного синовита видно, что в гипертрофированном покровном слое поверхностные ряды клеток, интимно соприкасающиеся с синовиальной жидкостью, состоят из макрофагов и других лимфоцитов, а следующие ряды – из иммунонегативных синовиоцитов. Далее прямо под покровным слоем выявляются сплошные поля лимфоидных клеток (рис.6 А-Б). Вместе с тем, CD45, по сравнению с другими нами примененными антителами (CD68, CD20, CD79a и CD138), показал ожидаемый результат: количество иммунопозитивных клеток при CD45 в образцах ревматоидных и посттравматических синовитов

значительно больше, чем с другими, более специфическими антителами. Данное положение хорошо продемонстрировано в рисунке 6В и 6Г.

Заключение. Данные патоморфологических исследований показывают, что использование иммуногистохимических методов изучения синовиальной оболочки не только позволяет определять фенотип воспалительного инфильтрата, но и применять их с целью дифференциальной диагностики иммунных и неиммунных артритов. Анализ полученных результатов иммуногистохимических исследований показал более высокий уровень экспрессии иммунопозитивных клеток с CD45 (маркер общего лейкоцитарного ряда), CD68 (маркер макрофагов), CD138 (маркер плазматических клеток), CD79a (общий маркер В-клеточной линии), CD20 (маркер зрелых В-клеток) у больных с синовитом ревматоидного генеза, по сравнению с больными с посттравматическим синовитом.

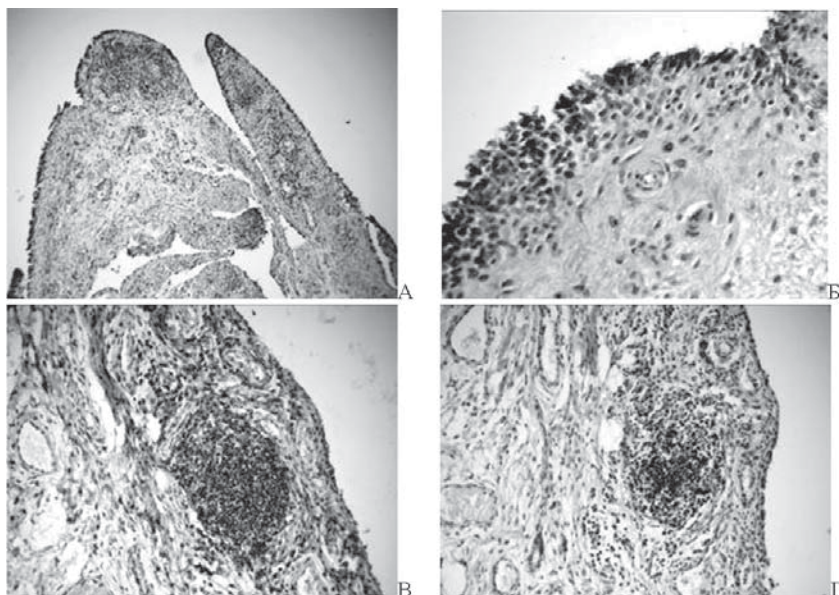


Рис. 6. Иммуногистохимическая окраска синовиальной оболочки

Примечание:

1 Рисунки А и Б ревматоидный синовит.

Виллезная гиперплазия синовиальной оболочки с выраженным воспалительным инфильтратом на поверхности интимального слоя и в строме субинтимального слоя. Окраска CD45. А ув. x100, Б ув. 400.

2 Рисунки В и Г посттравматический синовит, гистологические срезы из одного парафинного блока. В рисунке В видна более выраженная экспрессия иммунопозитивных клеток с маркером CD45, по сравнению с рисунком Б, где видно небольшое количество CD20-позитивных клеток в центральной части скопления воспалительных клеток с тенденцией к формированием лимфоидного узелка. А и Б ув. x200.

Количество CD138-позитивных клеток (плазмочитов) в синовитах ревматоидного генеза, по сравнению с посттравматическим, особенно отличается и может являться ценным дифференциально-диагностическим признаком. Вышеуказанные антитела, идентифицирующие определенные клетки из состава воспалительного инфильтрата, выявили специфику локализации различных клеток. Было показано, что CD45 способно локализоваться по всей поверхности синовиальной оболочки, за исключением глубоких клеточных рядов покровного слоя; CD68 – на поверхностных клеточных рядах покровного слоя и разрознено в строме субинтимального слоя; CD138 – диффузно в строме субинтимального слоя; CD79a – диффузно в строме

субинтимального слоя и по периферии лимфоидных узелков; CD20 – в центральной части лимфоидных узелков.

Данные исследования требуют дальнейшей качественной и количественно-статистической оценки и могут иметь значение не только в диагностике различного генеза синовитов, но и в прогнозировании исходов болезней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артроскопия и морфология синовитов. В.В. Лялина, А.Б. Шехтер. Москва. Наука, 2007. – 108 с.
2. Опухоли суставов, сухожилий, фасций, апоневрозов. Т.П. Виноградова. М. Меди-

ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ КОСОЛАПОСТИ У ДЕТЕЙ С АРТРОГРИПОЗОМ

цина, 1976, 143 с., ил.

3. Kraan C.M. Immunohistological analysis of synovial tissue for differential diagnosis in early arthritis/ C. M. Kraan, J. J. Haringman, W. J. Post // *Rheumatology*. – 1999. – № 38. – P. 1074-1080.
4. Pessler F. The synovitis of «non-inflammatory» orthopaedic arthropathies: a quantitative histological and immunohistochemical analysis / F. Pessler, L. Dai, C. Diaz-Torne // *Annals of the Rheumatic Disease*. – 2008. – №67. – P. 1184-1187.
5. Konttinen Y.T. Cellular immunohistopathology of acute, subacute, and chronic synovitis in rheumatoid arthritis/ Y.T. Konttinen, V. Bergroth, D. Nordstrom // *Annals of the Rheumatic Disease*. – 1985. – № 44 – P. 549-555.
6. Butrimiene I. Tangled immunohistochemical differences between autoimmune and degenerative synovites/ I. Butrimiene. G. Kirdaite, N. Porvaneckas // *Medicinos teorija ir practica*. – 2008. – № 2 – P. 128-134.