



Е.А. Захарьян

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДИСПЛАЗИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ С ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, г. Симферополь

**Ключевые слова:** дисплазия соединительной ткани, фенотипические и морфологические маркеры, варикозная болезнь вен нижних конечностей.

При гистологическом и иммуногистохимическом исследовании больных с недифференцированной дисплазией соединительной ткани обнаружены особенности структуры вены и кожных покровов в сравнении с группой с минимальным количеством стигм: гипотрофия гладкомышечных волокон вен нижних конечностей, участки гипертрофии эндотелиального и подэндотелиального слоя вены, деформация и склероз стенки вены, усиление экспрессии коллагена I типа или снижение III типа, дистрофия эпидермиса кожи, деформация коллагена в дерме на фоне гипертрофии участков зернистого слоя, нарушение сосудистой проницаемости, периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация в дерме. Подтверждено, что выделенные фенотипические признаки выраженной соединительнотканной дисплазии по частоте встречаемости и особенностям совпадают с морфологическими и иммуногистохимическими стигмами дисплазии соединительной ткани, характеризующими тяжесть заболевания, резистентность к терапии трофических язв, частоту рецидивов заболевания вен. Это может иметь прогностическое значение и определять интенсивность терапии и в целом лечебную тактику.

О.А. Захар'ян

## Морфологічні і фенотипічні маркери дисплазії сполучної тканини у хворих на варикозну хворобу вен нижніх кінцівок

**Ключові слова:** дисплазія сполучної тканини, фенотипічні й морфологічні маркери, варикозна хвороба вен нижніх кінцівок.

При гістологічному та імуногістохімічному дослідженні хворих з недиференційованою дисплазією виявлено особливості структури вени й шкірних покривів у порівнянні з групою з мінімальною кількістю стигм: гіпотрофія гладком'язових волокон вен нижніх кінцівок, ділянки гіпертрофії ендотеліального й підендотеліального шару вени, деформація й склероз стінки вени, посилення експресії колагену I типу або зниження III типу, дистрофія епідермісу шкіри, деформація колагену в дермі на гіпотрофії ділянок зернистого шару, порушення судинної проникності, периваскулярна лимфоцитарна інфільтрація в дермі. Підтверджено, що виділені фенотипічні ознаки вираженої сполучнотканинної дисплазії за частотою виявлення та особливостям збігаються з морфологічними й імуногістохімічними стигмами дисплазії сполучної тканини, що характеризують важкість захворювання, резистентність до терапії трофічних виразок, частоту рецидивів захворювання вен. Це може мати прогностичне значення й визначати інтенсивність терапії й лікувальну тактику загалом.

Е.А. Zaharyan

## Morphological and phenotypic markers of connective tissue dysplasia in patients with varicose disease of lower limbs veins

**Key words:** connective tissue dysplasia; phenotypical and morphological features; varicose disease of lower extremities veins.

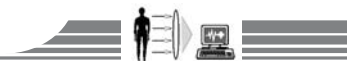
The peculiarities of vein structure and integument are found in the patients with undifferentiated dysplasia with the help of histological and immunohistochemical study in comparison with the group with minimum number of stigma: hypotrophy of smooth-muscle fibers of the lower extremities veins; areas of a hypertrophy of the endothelial and subendothelial layers of the vein; deformation and sclerosis of vein wall; intensifying of expression of I type collagen or reduction of III type; dystrophia of skin epidermis; deformation of collagen in derma against the background of a hypertrophy of granular layer areas; disturbance of vascular permeability; perivascular lymphocytic infiltration in derma. It is confirmed, that singled out phenotypical features of severe connective tissue dysplasia coincide on frequency of occurrence and peculiarities with morphological and immunohistochemical stigma of connective tissue dysplasia, which describe severity of the disease, resistance to therapy of trophic ulcers, frequency of veins diseases recurrence. It can have prognostic value and determine the intensity of therapy and whole therapeutic approach.

В последние годы в отечественной и зарубежной специализированной литературе активно обсуждается вопрос этиологии варикозной болезни вен нижних конечностей [4]. На Мировом конгрессе Международного общества флебологов и Американского флебологического колледжа (2003) профессор М.А. Pistorius представил результаты исследований, согласно которым ранние, тяжело протекающие формы хронической венозной недостаточности связаны с аутосомно-доминантным типом наследования [8]. Наследственный детерминизм развития хронической

венозной недостаточности подтверждают данные, полученные P. Sansilvestri-Morel et al. [9] при сравнительном исследовании коллагена в стенке здоровых и варикозно измененных подкожных вен, а также в биоптатах соединительной ткани. Авторы выдвинули гипотезу, что слабость венозной стенки обусловлена нарастающим дисбалансом между различными типами коллагена.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определение фенотипических, морфологических и иммуногистохимических критериев прогноза варикозной бо-



лезни вен нижних конечностей при недифференцированной дисплазии соединительной ткани.

### ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 20 больных с варикозной болезнью вен нижних конечностей, поступивших в отделение сердечно-сосудистой хирургии Республиканской клинической больницы им. Н.А. Семашко г. Симферополя. Все больные входили в группу из 80 человек (средний возраст –  $44,5 \pm 1,2$  года) с варикозной болезнью вен нижних конечностей, которые обследованы ранее с целью определения признаков соединительнотканной дисплазии [2].

Использована классификация хронической венозной недостаточности Е.Г. Яблокова и соавт. [7], предусматривающая выделение нескольких степеней патологии. К первой степени относили лиц с проходящим отеком нижних конечностей, ко второй степени – стойкий отек, гипер- или гипопигментацию, к третьей – наличие трофических язв. Хроническую венозную недостаточность I степени имели 2 человека (10 %), II степени – 12 человек (60 %), III степени – 6 человек (30 %).

Исследование вен нижних конечностей выполняли методом ультразвукового триплексного флебосканирования на аппаратах «HDI»-1500 (США) и «HDI»-4000 (США) с помощью линейных датчиков с частотой 5,0–12,0 МГц. Исследование проводили в В-режиме реального времени с доплеровским определением показателей кровотока, цветного и энергетического доплеровского картирования. Изучали скорость кровотока (максимальную систолическую, максимальную диастолическую, среднюю), пульсационный и индекс резистентности, состояние клапанного аппарата, проходимость вен, состоятельность коммуникантных и перфорантных вен, наличие рефлюксов.

Для исследования фенотипа применяли разработанную фенотипическую карту, в основу которой легла модифицированная А.И. Мартыновым и соавторами карта M.J. Glesby [5].

Проведенное ранее исследование позволило выделить 24 фенотипических признака дисплазии соединительной ткани (ДСТ), наиболее характерных для варикозной болезни вен нижних конечностей. С увеличением количества маркеров соединительнотканной дисплазии отмечено утяжеление степени хронической венозной недостаточности [2].

Так как, по данным специализированной литературы, для диагностики синдрома дисплазии соединительной ткани формально критическим количеством признаков является наличие 6 и более стигм дисэмбриогенеза [3], больные разделены на 2 группы: с минимальным количеством признаков дисплазии соединительной ткани при легком течении хронической венозной недостаточности (12 человек – 60%) и с явными проявлениями данного синдрома на фоне тяжелых форм указанной патологии (8 человек – 40%).

20 больным с варикозной болезнью вен нижних конечностей и различным набором фенотипических признаков дисплазии соединительной ткани проведено гистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование участка большой подкожной вены и кожи, взятой с медиальной поверхности бедра.

Для определения структурных особенностей вен и кожи

нижних конечностей использованы общегистологический, гистохимический и иммуногистохимический методы исследования (по стандартной схеме). В первом случае ткань фиксировали в нейтральном формалине. Материал обрабатывали в парафиновой заливке, срезы окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по ван-Гизону. Гистохимический метод включал исследование гликозаминогликанов (ГАГ) с помощью ШИК (PAS) реакции. Иммуногистохимический анализ осуществляли непрямым стрептавидин-пероксидазным методом определения интенсивности реакции на коллагены I и III типов. Принцип метода базируется на определении интенсивности реакции на коллаген с помощью первичных и вторичных Kit моноклональных антител к антигену коллагена I и III типа. Интенсивность реакции оценивали в баллах [1,6].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ гистологических и иммуногистохимических исследований тканей участка нижних конечностей обнаружил, что стенка вены в группе с минимальным количеством фенотипических признаков дисплазии соединительной ткани и легким течением хронической венозной недостаточности (I группа) имела равномерную толщину и структуру, которая соответствовала венам мышечного типа с развитыми мышечными волокнами.

В ней определяется внутренняя оболочка, которая выстлана эндотелиальными клетками вытянутой или овальной формы. Отмечены небольшие очаги выпячивания эндотелиальных клеток в просвет вены. В средней оболочке – пучки циркулярно расположенных гладких мышечных клеток, которые окружены фуксинофильными коллагеновыми и эластическими волокнами, а также межучточной соединительной тканью, которая дает положительную реакцию на ГАГ. При этом гладкомышечные клетки в основном одинаковой толщины, переплетались либо чередовались с волокнистыми структурами соединительной ткани с наличием единичных фибробластов. В гладкомышечных клетках ядра вытянутой, овальной формы с неравномерным распределением хроматина в виде мелких глыбок.

Иммуногистохимическое исследование обнаружило, что интенсивность реакции на коллаген I типа в I группе составила 0 баллов, а интенсивность реакции на коллаген III типа неравномерна (от 1 балла и более) и локализовалась преимущественно под слоем интимы.

Анализ гистологических и иммуногистохимических исследований вен нижних конечностей группы с дисплазией соединительной ткани при тяжелом течении хронической венозной недостаточности (2 группа) обнаружил изменения, которые можно охарактеризовать как дисхроноз их структур, т.е. определены изменения всех слоев стенки вены, но они были разнонаправлены. Отмечены как дистрофические изменения, так и признаки нарушения кровообращения, а также элементы хронического воспалительного процесса. Обнаруженные изменения приводили иногда к изменениям архитектоники вены.

При гистологическом исследовании в части наблюдений во внутренней оболочке интимы вен отмечена пролифе-



рация эндотелия, а также его многорядность, утолщение, выпячивание в просвет в части наблюдений.

Особенно следует выделить результаты исследования у больных с хронической венозной недостаточностью III степени с ранним началом заболевания. При этом обнаружены очаги выраженного утолщения в стенке вены, которые приводили к резкому сужению ее просвета. Наряду с этим определены участки вен с истончением стенки, гипотрофией эндотелиального слоя (интимы) и резким сужением просвета.

В этих же наблюдениях средняя мышечная оболочка имела уменьшенное количество гладкомышечных клеток с циркулярным расположением и преобладанием волокон соединительной ткани. При этом отмечено уплотнение отдельных волокон с резко положительной реакцией на ГАГ, местами определено разволокнение соединительнотканых структур, неравномерный отек. Волокна соединительной ткани – с участками утолщения и фрагментации, с наличием неравномерно располагающихся фибробластов и единичных лимфоцитов.

Выделен ряд фенотипических признаков, которые чаще отмечали при прогностически тяжелых формах варикозной болезни с быстрой сменой стадий заболевания, образованием трудно поддающихся лечению трофических язв, частым возникновением рецидивов. К ним относят геморрой (100%), плоскостопие (81,8%), хронические тонзиллиты (63,6%), нарушения сердечного ритма и проводимости (59,1%), грыжи (45,5%) и недержание мочи (45,5%).

У основной части больных при II степени ХВН отмечены изменения эндотелия интимы дистрофического характера. Эндотелиальные клетки неравномерно выступали в просвет с явлениями вакуолизации цитоплазмы.

При иммуногистохимическом исследовании коллагена I и III типов во 2 группе обнаружены изменения в стенке вены, которые характеризовались неравномерной экспрессией коллагена I типа, т.е. нарушением его архитектоники в виде отдельных хаотично расположенных структур. Отдельные волокна утолщены, иногда расслоены, местами имели спиралевидно извитые волокна, которые частично окружены отеком.

Экспрессия коллагена III типа неравномерно выражена в стенке вены, располагаясь в основном в межмышечных участках в средней оболочке. Отдельные волоконца коллагена отмечены в различных участках вены.

У больных с III степенью хронической венозной недоста-

точности (ХВН) отмечено резкое снижение экспрессии коллагена III типа в стенке вены, который располагался очагово в наружном адвентициальном слое стенки либо мелкими очагами в подэндотелиальном слое. В местах утолщения стенки вены отмечена положительная экспрессия коллагена III типа в участке деструкции стенки вены. В остальных оболочках вены экспрессия коллагена не определялась либо была резко снижена (табл. 1).

Анализ гистологического изучения кожных покровов нижних конечностей показал, что в группе с минимальным количеством признаков дисплазии соединительной ткани и легким течением хронической венозной недостаточности (1 группа) эпидермис кожи неравномерной толщины с очагами некоторого утолщения и истончения. Базальная мембрана росткового слоя толщиной 7–10 микрон, местами несколько разволокнена. Гистохимически ГАГ в основном располагались в структуре базальной мембраны и дерме, имели положительную неравномерную реакцию (от 1 до 3 баллов): эпидермис – 1 балл, базальная мембрана – 2 балла, дерма – 2–3 балла.

При иммуногистохимическом исследовании коллагена I типа отмечена положительная реакция или его экспрессия в эпидермисе (2–3 балла), в дерме (1–2 балла). При этом экспрессия коллагена III типа была 3 и более баллов.

Анализ гистологических исследований кожи в группе с дисплазией соединительной ткани и выраженной хронической венозной недостаточностью (2 группа) обнаружил выраженную неравномерность изменений структур, при которых выявлены либо очаги резкого истончения эпидермиса и сосочкового слоя дермы, либо участки утолщения с пролиферацией поверхностных слоев эпидермиса.

При этом обнаружено, что в участках гипотрофии кожи истончается эпидермис и слои дермы, которая неравномерно отечна с разволокнением коллагена, наличием лимфоцитарной инфильтрации вокруг сосудов.

В участках утолщения кожных покровов в дерме выражен неравномерный отек, особенно располагающийся периваскулярно, хаотично расположенные коллагеновые волокна с очагами фибробластов. Местами определены резко измененные пучки коллагена с уплотнением, дезорганизацией его структур, резким утолщением отдельных волоконца, хаотичным расположением. В участках дермы в глубоких сосудистых пучках обнаружены очаги периваскулярного склероза с резким сужением просвета сосудов и

Таблица 1  
Гистохимические и иммуногистохимические особенности структуры вен нижних конечностей

Группа	Баллы		
	Коллаген I типа	Коллаген III типа	ГАГ (ШИК)
1 (с минимальным количеством признаков ДСТ и легким течением ХВН)	0	1–2	2–3
2 (с явными признаками ДСТ и выраженной ХВН)	0–3	0–4	0

Таблица 2  
Гистохимические и иммуногистохимические особенности структуры кожи нижних конечностей

Группа	Баллы		
	Коллаген I типа в дерме	Коллаген III типа в дерме	ГАГ (ШИК)
1 (с минимальным количеством признаков ДСТ и легким течением ХВН)	1–2	3–4	3, равномерно
2 (с явными признаками ДСТ и выраженной ХВН)	4	2–3	0–3, неравномерно



дистрофическими изменениями. При этом гистохимическое исследование ГАГ обнаружило очаги изменения уровня их реакции с неравномерной структурой с участками выраженной реакции и снижения или ее отсутствия.

Иммуногистохимическое исследование коллагенов I и III типов во 2 группе выявило неравномерность их распределения. Коллаген I типа обнаружен в единичных наблюдениях с выраженной ХВН, экспрессия коллагена – более 3 баллов. В остальных наблюдениях экспрессия коллагена I типа была неравномерной (от 0 до 2 баллов). Экспрессия коллагена III типа была 2–3 балла в слоях дермы, особенно выражена в утолщенных структурах дермы (табл. 2).

Таким образом, обнаружена связь между проявлениями дисплазии соединительной ткани и тяжестью течения варикозной болезни вен нижних конечностей, а также установлены морфологические и иммуногистохимические особенности в коже и стенке вен у данных больных.

Следовательно, тяжелым формам хронической венозной недостаточности соответствует определенный комплекс морфологических, иммуногистохимических и фенотипических признаков соединительнотканной дисплазии. Подтверждено, что ранее выделенные фенотипические признаки выраженной соединительнотканной дисплазии по частоте встречаемости и особенностям совпадают с морфологическими и иммуногистохимическими стигмами дисплазии соединительной ткани, характеризующими тяжесть заболевания, резистентность к терапии трофических язв, частоту рецидивов заболевания вен. Это может иметь прогностическое значение и определять интенсивность терапии и в целом лечебную тактику.

### ВЫВОДЫ

Выделен ряд фенотипических признаков соединительнотканной дисплазии, которые чаще обнаруживают при прогностически тяжелых формах варикозной болезни вен нижних конечностей (геморрой, плоскостопие, хронические тонзиллиты, нарушения сердечного ритма и проводимости, грыжи и недержание мочи).

У больных с недифференцированной ДСТ при гистоло-

гическом и иммуногистохимическом исследовании обнаружены особенности структур вены и кожных покровов в сравнении с группой с минимальным количеством стигм (гипотрофия гладкомышечных волокон вен нижних конечностей, участки гипертрофии эндотелиального и подэндотелиального слоя вены, деформация и склероз стенки вены, усиление экспрессии коллагена I типа или снижение III типа, дистрофия эпидермиса кожи, деформация коллагена, периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация в дерме).

При тяжелом течении хронической венозной недостаточности обнаружен ряд морфологических и иммуногистохимических изменений в коже и стенке вен, сочетающихся с различными фенотипическими признаками соединительнотканной дисплазии, что свидетельствует о системном характере заболевания.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы / Дж. Полак, С. Ван Норден; Пер. с англ. М.А. Глуховой; Под ред. Н.Г. Хрущова. – М.: Мир, 1987. – 74 с.
2. Захарьян Е.А. Проявления синдрома дисплазии соединительной ткани у больных с варикозным расширением вен нижних конечностей / Захарьян Е.А. // Серце і судини. – 2005. – №3. – С. 88–93.
3. Земцовский Э.В. Соединительнотканые дисплазии сердца / Земцовский Э.В. – СПб.: Политекс, 1998. – 95 с.
4. Лишневская В.Ю. Хроническая венозная недостаточность: вопросы и ответы / Лишневская В.Ю. // Кровообіг та гемостаз. – 2004. – №2–3. – С. 111–117.
5. Мартынов А.И. Новые подходы к лечению больных с идиопатическим пролабированием митрального клапана / Мартынов А.И., Стенупа О.Б., Шехтер А.Б. // Тер. арх. – 2000. – №9. – С. 67–70.
6. Петров С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Петров С.В., Райхлин Н.Т. – Казань: Титул, 2003. – 456 с.
7. Яблоков Е.Г. Хроническая венозная недостаточность / Яблоков Е.Г., Кириенко А.И., Богачев В.Ю. – М.: Берг, 1999. – 126 с.
8. Pistorius M. Chronic Venous Insufficiency: The Genetic Influence / Pistorius M. // Angiology. – 2003. – №54. – P. 5–12.
9. Sansilvestri-Morel P. Chronic Venous Insufficiency: Dysregulation of Collagen Synthesis / Sansilvestri-Morel P., Rupin A., Badier-Commander C., Fabiani J-N., Verbeuren T. // Angiology. – 2003. – №54. – P. 13–18.

### Сведения об авторе:

Захарьян Е.А., к. мед. н., доцент каф. внутренней медицины №1 КГМУ им. С.И. Георгиевского.

Поступила в редакцию 10.12.2012 г.