

Ультраструктурні зміни акантолітичних клітин на різних етапах розвитку вульгарного пемфігуса

Я.Ф. Кутасевич¹, І.О. Олійник¹, О.П. Лукашова², М.В. Рєпін³, А.Е.-С.Е.-С. Абдалла¹

¹ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України»

²ДУ «Інститут медичної радіології імені Григор'єва НАМН України»

³ДУ «Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України»

Резюме

Мета. Вивчити ультраструктурні зміни вмісту інтраепідермальних пузирів та їх покришок для вдосконалення діагностично-лікувальних підходів при вульгарному пемфігусі (ВП).

Матеріали та методи дослідження. Методом електронної мікроскопії дослідити ультраструктуру вмісту інтраепідермальних пузирів, в тому числі акантолітичних клітин (АК), і покришок у 8 хворих на ВП.

Результати. Електронно-мікроскопічне дослідження матеріалу хворих на ВП виявило структурні особливості АК на різних етапах розвитку ВП.

Висновки. Ультраструктурні особливості АК залежали від етапу розвитку ВП та наявних ускладнень. Відзначено дистрофічні зміни АК та різні види їх загибелі, зокрема, аутоімунну, темноклітинну, автофагічну та апоптозну. Виявлено ознаки цитотоксичної дії лімфоцитів і нейтрофільних лейкоцитів на АК та некротичні процеси при піодермії.

Ключові слова: вульгарний пемфігус, акантолітичні клітини, ультраструктура, вміст інтраепідермальних пузирів.

DOI: 10.33743/2308-10667-2024-4-10-14

Вступ

Етіологічний чинник вульгарного пемфігуса (ВП) досі невідомий, але головною патогенетичною ланкою є утворення патогенних аутоантитіл проти десмоглінів, які є молекулами клітинної адгезії і містяться в десмосомах, характерних для клітин базального і шипуватого шару епідермісу [1, 4, 5]. Результатом порушення цілісності десмосом є акантоліз і утворення бул та ерозій на шкірі та/або слизових оболонках [6, 8]. При ВП у процесі акантолізу формуються АК, які мають певні ультраструктурні та морфологічні зміни [2].

У деяких випадках діагностика ВП за обов'язковими критеріями (імунологічні, імунофлюоресцентні, гістологічні) ускладнена, тому дослідження ультраструктури клітин інтраепідермальних бульозних елементів є доцільним, дозволяє вдосконалити методи діагностики ВП.

Мета дослідження: Вивчити ультраструктурні зміни вмісту інтраепідермальних пузирів, в тому числі акантолітичних клітин (АК), а також покришок пузирів, для вдосконалення діагностично-лікувальних підходів при вульгарному пемфігусі (ВП).

Матеріали та методи дослідження

для електронно-мікроскопічних досліджень були взяті інтраепідермальні пузири і покришки у 8 хворих на ВП [3]. Одержані зразки фіксували в 3% розчині глутарового альдегіду на фосфатному буфері за Карновським,

та в 1% розчині чотирьохокису осмію за Паладе. Після дегідратації матеріалу в етанолі зростаючої концентрації зразки заливали у суміші епоксидних смол (епон-аралдит) та полімеризували 36 годин при температурі 56 С. Напівтонкі зрізи товщиною 1 мкм виготовляли на ультрамікромомі УМТП-4 (ВО «Електрон», м. Суми) фарбували в 1% розчині метиленового синього на 1% тетрабораті натрію. Ультратонкі зрізи контрастували уранілацетатом і цитратом свинцю. Ультраструктуру клітин досліджували за допомогою електронного мікроскопу ЕМ-125 (ВО «Електрон» м. Суми).

Результати та їх обговорення

Початковим етапом утворення інтраепітеліальних пузирів при вульгарному пемфігусі є реакція аутоімунних антитіл з десмоглінами, які знаходяться у десмосомах кератиноцитів. При цьому першими руйнуються напівдесмосоми базальних клітин епідермісу, що надає поштовх до розриву міжклітинних зв'язків. Серозна рідина, яка починає надходити з дерми та її судин, відтискує розташовані вище клітини епідермісу, утворюючи пупир. На рисунку 1 представлено сформований інтраепідермальний пупир у хворої на ВП. Він складається з базальних та остистих кератиноцитів, між якими виявляються досить широкі проміжки, обумовлені аутоімунним ураженням десмосом.

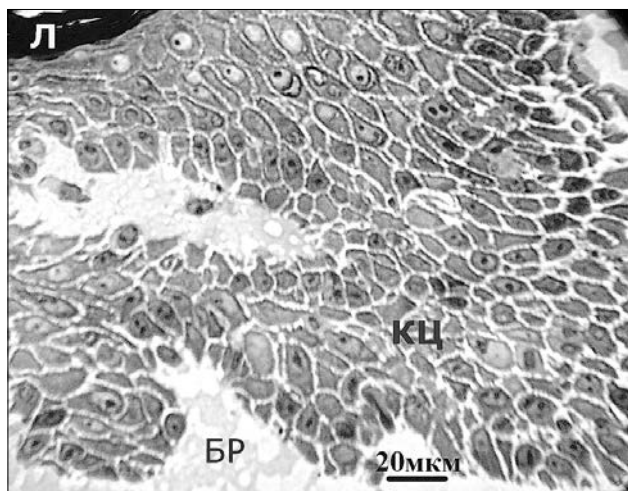


Рис. 1. Інтраепідермальний пупир хворої на ВП.
(БР – бульозна рідина; КЦ – кератиноцити; Л – лусочки.)

Встановлено, що при вульгарному пемфігусі ультраструктура кератиноцитів, що формують покривку пупира, перетерплює значних змін (рис. 2, а). При цьому загублюються як десмосомальні зв'язки між сусідніми клітинами, так і контакти десмосом з тонофібрилами, внаслідок чого різко розширюються міжклітинні про- світки. У цитоплазмі зменшується кількість тонофібрил та виникають великі вакуолі.

Подовження аутоімунної реакції з одного боку призводить до процесу акантолізу з відшаруванням від епідермісу кератиноцитів, а з другого – до бульозної рідини проникають сегментоядерні лейкоцити та лімфоцити. Тобто в інтраепідермальних бульозних пупирах хворих на ВП основним компонентом стають акантолітичні клітини, розташовані пластами, групами та поодинокі, а також виявляються та безструктурний матеріал (рис. 3). Пласти та групи акантолітичних клітин представлені кератиноцитами епідермального походження з великим світлим ядром, чітким ядерцем, наявністю вільних рибосом та одиничних тонофібрил у цитоплазмі (рис. 2, б).

Від кератиноцитів остистого шару покривки їх відрізняє відсутність десмосом характерного вигляду, що, очевидно, є впливом аутоімунних анти- тіл. Спостерігається також проникнення нейтро- фільних лейкоцитів до базальних кератиноцитів,

де вони утворюють точкові контакти з мембраною КЦ (рис. 4, а).

Поодинокі АК в цей час стають мішенню для лімфо- цитів та нейтрофільних лейкоцитів, які тісно взаємо- діють з клітинною мембраною акантолітичних клітин (рис. 4, б). При цьому, якщо функцією лімфоцитів є цитотоксичний вплив на акантолітичні клітини, то для нейтрофільних лейкоцитів, які є мікрофагами, подібне явище є нехарактерним. Можливо, НФ мають на своїй плазматичній мембрані антитіла до акантолітичних клі- тин, що примушує їх реагувати, як цитотоксичні клі- тини. Подібне спостереження свідчить про необхідність приділити особливу увагу процесам, які відбуваються при розвитку вульгарної пупирчатки, зокрема вивченню ролі нейтрофільних лейкоцитів, тим паче, що в останні часи у науковій літературі з'являються дані про значення нейтрофільних лейкоцитів при різних аутоімун- них захворюваннях [7], де підкреслюється, що їх роль значно складніша, ніж це вважалось раніш. Автори вва- жають, що поглиблення знань про функції нейтрофіль- них лейкоцитів при аутоімунних захворюваннях, зокрема при ВП, може сприяти розробці нових терапевтичних підходів. По мірі вичерпання імунних антитіл описана реакція згасає, і змінюється на процеси деградації акан- толітичних клітин, які знаходяться у бульозній рідині.

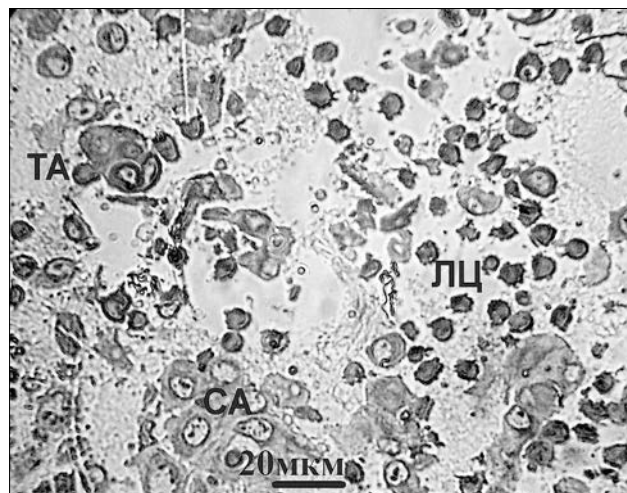
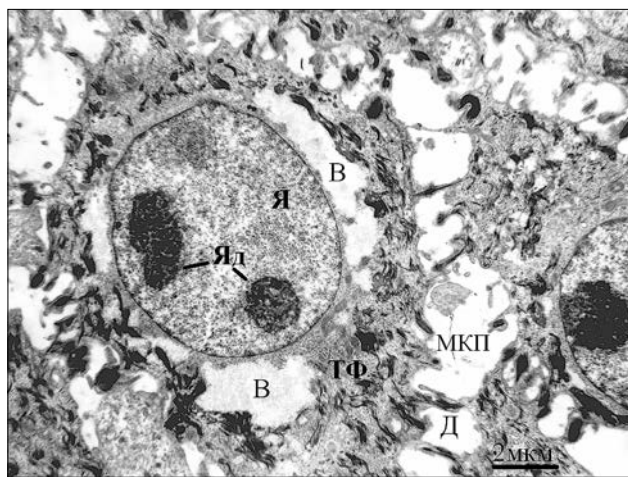
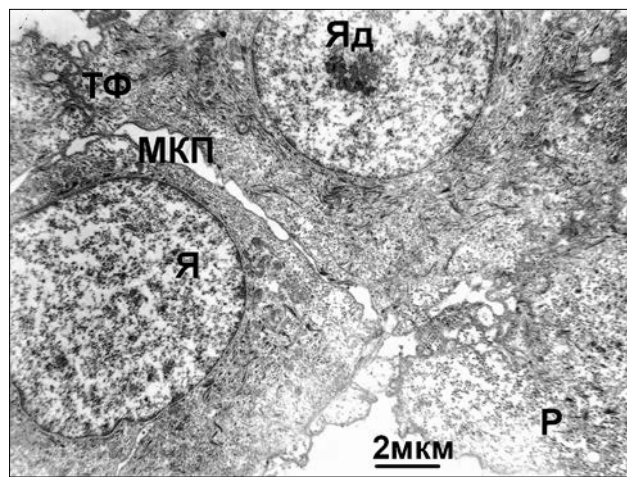


Рис. 3. Вміст бульозного пупира хворої на ВП.
(СА – світлі акантоцити; ТА – темні акантоцити; ЛЦ – лейкоцити;)



а

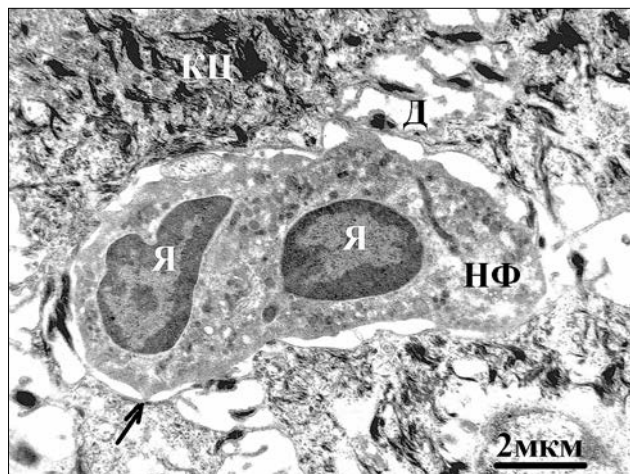


б

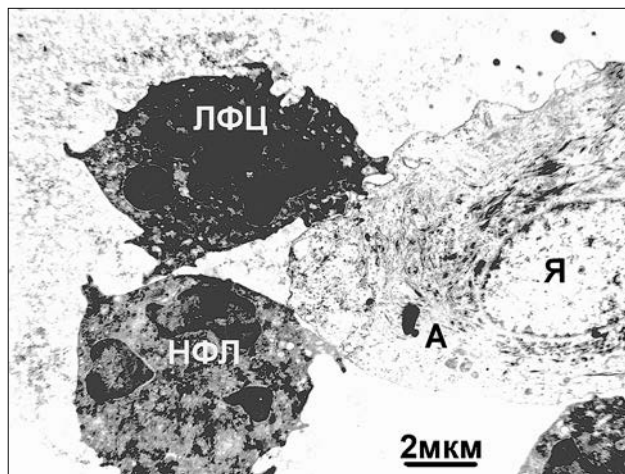
Рис. 2. Кератиноцити остистого шару покривки хворої на ВП з окремими тонофібрилами і великими вакуолями у цитоплазмі та розширеним міжклітинним простором (а); Пласт кератиноцитів епідермального походження в бульозній рідині хворої на ВП (б).
(Я – ядро; Яд – ядерце; ТФ – тонофібрили; Д – десмосоми; Р – рибосоми; МКП – міжклітинний простір)

У порівнянні з кератиноцитами, які є частиною пласта, поодинокі АК відзначаються значно меншими розмірами, часто мають округлу форму, повністю загублюють десмосоми, а на їх поверхні з'являються цитоплазматичні ворсинки (рис. 5, а; 5, б).

У популяції АК реєструються як світлі, так і темні функціонально неактивні їх форми, клітини з наявністю аутофагосом у цитоплазмі, або накопиченням ліпідних краплин, АК у стані апоптозу, для яких характерним є ураження ядра з утворенням темних

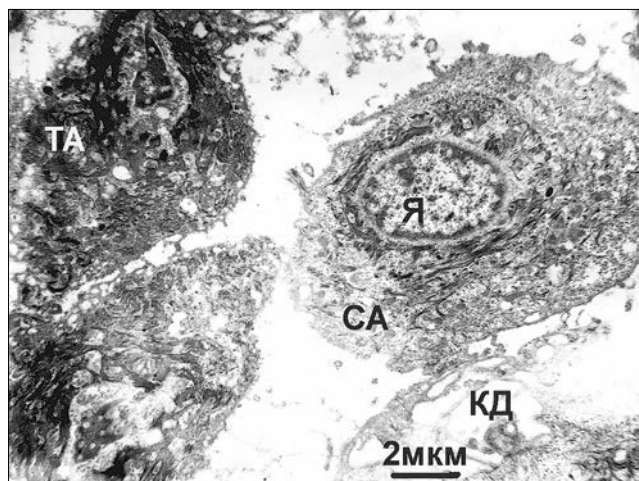


а

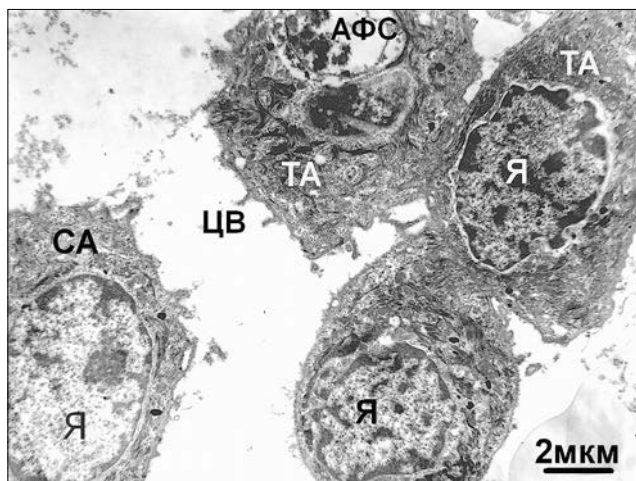


б

Рис. 4. Нейтрофільний лейкоцит серед базальних кератиноцитів покривки хворої на ВП (а); Лімфоцит та нейтрофільний лейкоцит у контакті з клітинною мембраною АК (б). (КЦ – кератиноцит; НФ – нейтрофільний лейкоцит; ЛФЦ – лімфоцит; А – акантолітична клітина; стрілка – контакт нейтрофільного лейкоцита з елементами кератиноцита)

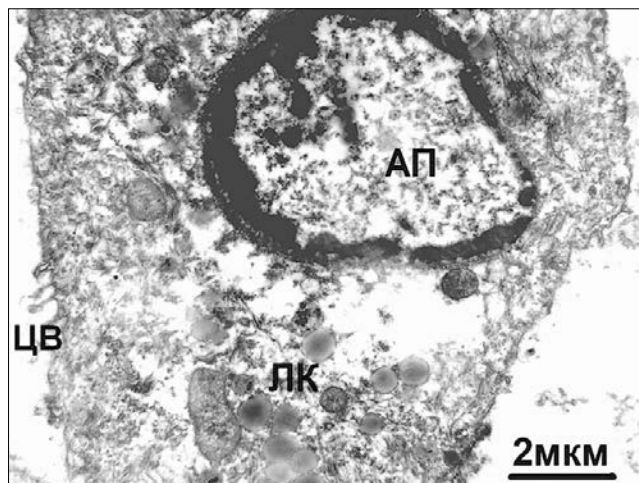


а

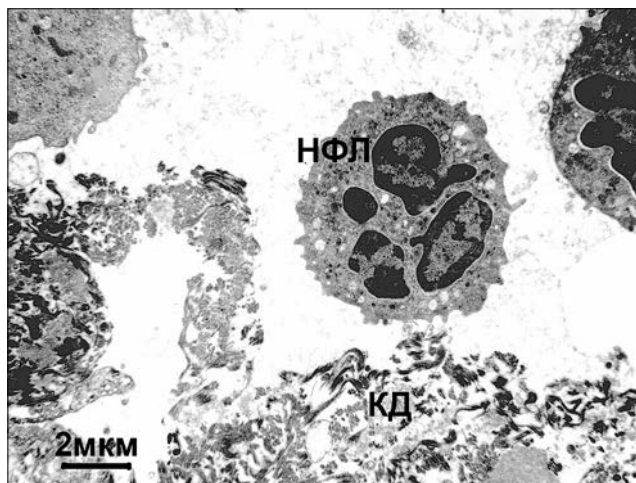


б

Рис. 5. Темна (ТА) та світла (СА) АК у бульозній рідині хворої на ВП (а) та група темних та світлих АК з цитоплазматичними ворсинками одна з яких у цитоплазмі містить велику аутофагосому, у бульозній рідині хворої на ВП (б). (КД – клітинний детрит; ЦВ – цитоплазматичні ворсинки; АФС – аутофагосома.)



а



б

Рис. 6. АК з ядром у стані апоптозу та групами ліпідних краплин у цитоплазмі (а); Нейтрофільний лейкоцит (НФЛ) та клітинний детрит у бульозній рідині хворої на ВП (б). (КД – клітинний детрит; АП – апоптоз; ЛК – ліпідні краплини; ЦВ – цитоплазматичні ворсинки.)

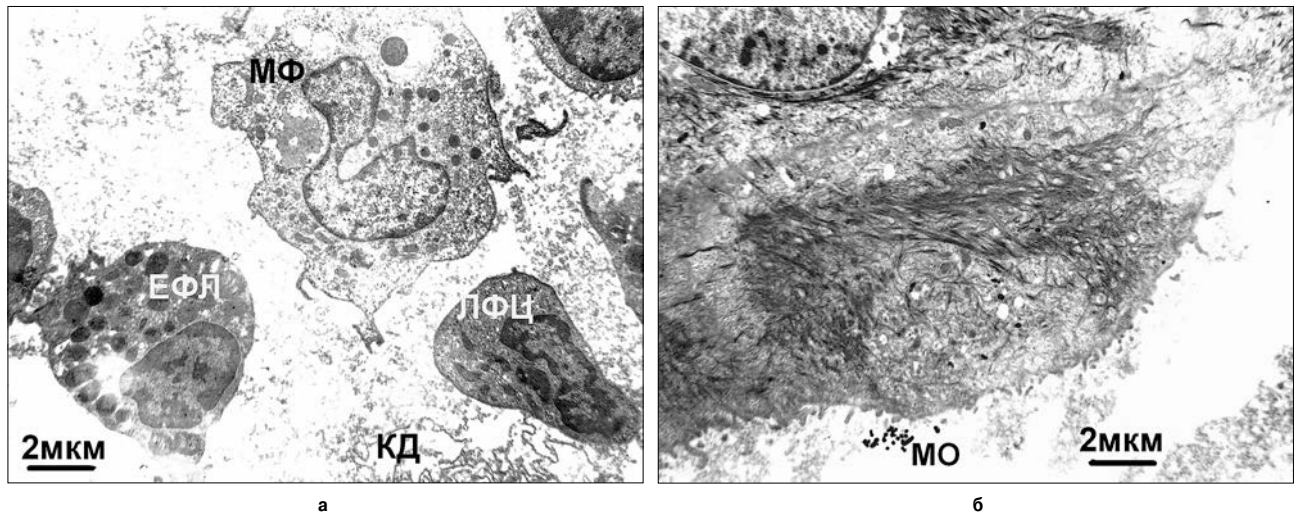


Рис. 7. Макрофаг, еозинофільний лейкоцит та лімфоцит у бульозній рідині хворої на ВП (а); Група мікроорганізмів (МО) біля базального шару покривки (б). (ЕФ - еозинофільний лейкоцит; МФ – макрофаг; ЕФЛ – еозинофільний лейкоцит; МФ – макрофаг; ЛФЦ – лімфоцит.)

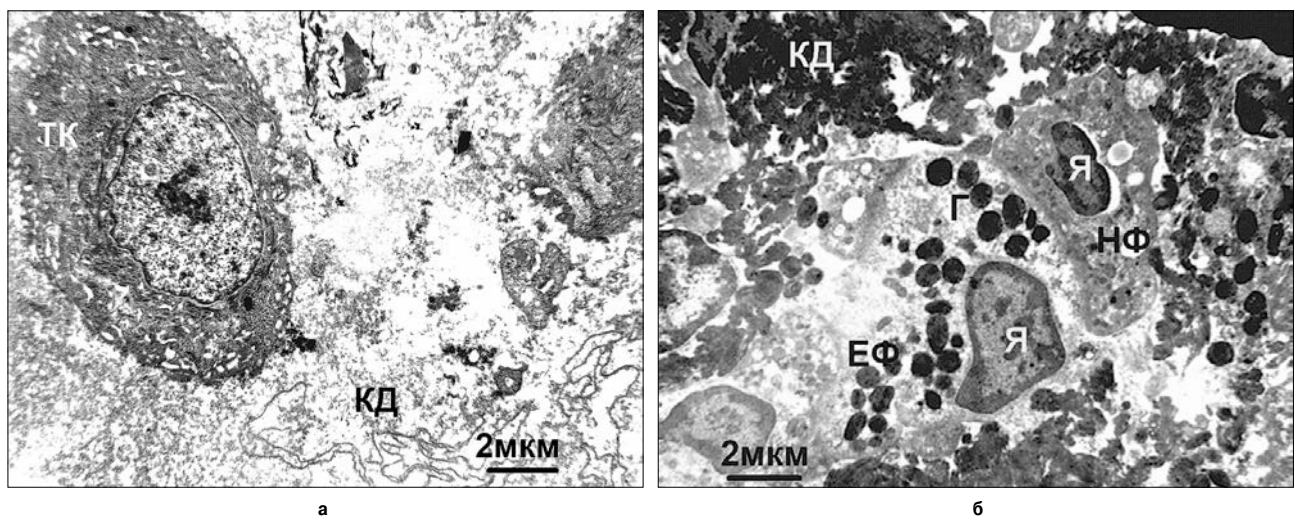


Рис. 8. Темні акантолітичні клітини (ТК) та клітинний детрит (КД) у бульозній рідині хворої на ВП з піодермією (а) та зруйновані нейтрофілі (НФ) й еозинофільні лейкоцити (ЕФ) і клітинний детрит (КД) у бульозній рідині хворої на з ВП з піодермією.

конгломератів хроматину та розташуванням їх близько ядерної мембрани (рис. 6, а). Значний об'єм займає також клітинний детрит, який складається з фрагментів зруйнованих клітин. Присутність перелічених змін ультраструктури АК може свідчити про розвиток таких форм загибелі, як темноклітинна, аутофагічна, апоптична, некротична.

Окрім акантоцитів у вмісті бульозної рідини постійно присутня досить велика кількість сегментоядерних нейтрофілів та еозинофілів лейкоцитів, а також окремі макрофаги (рис. 6, б; 7, а). Функціональна активність цих клітин здебільш пов'язана з їх участю у процесах запалення.

Найбільші зміни ультраструктури акантолітичних клітин відзначаються у випадках приєднання вторинної інфекції (піодермії), яка часто розвивається у хворих на вульгарну пухирчатку. Характерним є наявність мікроорганізмів, зокрема близько від базального відділу покривки (рис 7, б). У бульозній рідині виявляються переважно темні акантоцити, а також поля зруйнованих нейтрофілів та еозинофілів лейкоцитів, серед темних мас клітинного детриту, що свідчить про некротичні процеси (рис. 8, а; 8, б).

Таким чином, проведене дослідження показало, що існує певна відповідність ультраструктурних змін

акантолітичних клітин періодам протікання вульгарної пухирчатки. Електронно-мікроскопічний аналіз вмісту бульозних елементів висипки дозволяє визначити конкретні механізми розвитку ВП на кожному з досліджених етапів та застосувати необхідну терапію.

Висновки

1. Розгортання первинних аутоімунних реакцій супроводжується явищами ураження десмосомних міжклітинних контактів, які призводять до акантолізу (період імунної реакції антиген -антитіло).

2. На наступному етапі реєструються ультраструктурні ознаки цитотоксичної дії активованих лімфоцитів та нейтрофілів лейкоцитів відносно акантолітичних клітин (період цитотоксичних реакцій).

3. Дистрофічні зміни АК та різні види їх загибелі, зокрема, темноклітинна, аутофагічна та апоптозна спостерігаються протягом усіх етапів ВП (період ліквідації дистрофічно змінених акантолітичних клітин).

4. У випадках піодермії, електронно-мікроскопічно виявляється присутність груп мікроорганізмів та великої кількості зруйнованих сегментоядерних лейкоцитів та полів клітинного детриту, що свідчить про переважання некротичних процесів (період вторинного запалення та некрозу).

Список літератури

1. Абдалла А.Е.-С.-С. Сучасні аспекти диференційної діагностики акантолітичного пемфігусу. *Дерматологія та венерологія*. 2020. № 4. С. 17–21.
2. Вульгарний пемфігус. Ультраструктурна характеристика / Я.Ф. Кутасевич, І.О. Олійник, О.П. Лукашова, М.В. Репін, А.Е.-С.-С. Абдалла. *Дерматологія та венерологія*. 2021. № 4. С. 8–10.
3. Electron microscopy in biology: a practical approach / Ed. By J. Robin Harris. New York, US: Oxford University Press; 1991. 308 p.
4. Ingold C.J., Khan M.A.B. Pemphigus Vulgaris. [Updated 2022 Aug 8] / StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
5. Kridin K., Sagi S.Z., Bergman R. Mortality and cause of death in Israeli patients with pemphigus. *Acta Derm Venereol*. 2017. Vol. 97. P. 607–611.
6. Signalling pathways in pemphigus vulgaris / X. Li, N. Ishii, C. Ohata et al. *Exp Dermatol*. 2014. Vol. 23, iss. 3. P. 155–156.
7. The emerging role of neutrophils in autoimmune-associated disorders: effector, predictor, and therapeutic targets / X. Fu, H. Liu, G. Huang, S.-S. Dai. *MedComm*. 2021. N2. P. 402–413.
8. Witte M., Zillikens D., Schmidt E. Diagnosis of autoimmune blistering diseases. *Front Med (Lausanne)*. 2018. Vol. 5. P. 296.

References

1. Abdalla A.E.-S.-S. Suchasni aspekty dyferentsiinoi diahnozyky akantolitychnoho pemfihusu [Modern aspects of differential diagnosis of acantholytic pemphigus]. *Dermatolohiia ta venerolohiia*. 2020. № 4. S. 17–21.
2. Kutasevych Ya.F., Oliynyk I.O., Lukashova O.P., Riepin M.V., Abdalla A.E.-S.-S. Vulharnyi pemfihus. Ultrastrukturna kharakterystyka [Pemphigus vulgaris. Ultrastructural characteristics]. *Dermatolohiia ta venerolohiia*. 2021. № 4. S. 8–10.
3. Electron microscopy in biology: a practical approach / Ed. By J. Robin Harris. New York, US: Oxford University Press; 1991. 308 p.
4. Ingold C.J., Khan M.A.B. Pemphigus Vulgaris. [Updated 2022 Aug 8] / StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
5. Kridin K., Sagi S.Z., Bergman R. Mortality and cause of death in Israeli patients with pemphigus. *Acta Derm Venereol*. 2017; 97: 607–611.
6. Li X., Ishii N., Ohata C. et al. Signalling pathways in pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol*. 2014; 23(3):155–156.
7. Fu X., Liu H., Huang G., Dai S.-S. The emerging role of neutrophils in autoimmune-associated disorders: effector, predictor, and therapeutic targets. *MedComm*. 2021;2:402–413.
8. Witte M., Zillikens D., Schmidt E. Diagnosis of autoimmune blistering diseases. *Front Med (Lausanne)*. 2018; 5: 296.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF ACANTHOLYTIC CELLS AT DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT OF PEMPHIGUS VULGARIS

Kutasevych Ya.F.¹, Oliynyk I.O.¹, Lukashova O.P.², Repin M.V.³, Abdalla A.E.-S.E.-S.¹¹SE «Institute of Dermatology and Venereology of NAMS of Ukraine»²SO «Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the NAMS of Ukraine»³Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine

Abstract

Objective: To study ultrastructural changes in the contents of intraepidermal blisters and their covers to improve diagnostic and therapeutic approaches in pemphigus vulgaris (PV).

Materials and methods. To investigate the ultrastructure of the contents of intraepidermal vesicles, including acantholytic cells (AC), and caps in 8 patients with PV using electron microscopy.

Results. Electron microscopic study of the material of patients with PV revealed structural features of AC at different stages of PV development.

Conclusions. Ultrastructural features of AC depended on the stage of development of PV and existing complications. Dystrophic AC and other types of their death were noted, in particular, autoimmune, dark cell, autophagic and apoptotic changes. Signs of cytotoxic action of lymphocytes and neutrophil leukocytes on AC and necrotic processes in pyoderma were revealed.

Keywords: pemphigus vulgaris, acantholytic cells, ultrastructure, contents of intraepidermal blisters.

Відомості про авторів:

Кутасевич Яніна Францівна – доктор мед. наук, професор, в.о. директора ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України», м. Харків

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8706-1487>

Олійник Ірина Олександрівна – доктор мед. наук, ст. наук. співроб., головний наук. співроб. відділу дерматології, інфекційних та паразитарних захворювань шкіри ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України», м. Харків

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6408-830X>

Лукашова Ольга Петрівна – кандидат біол. наук, провідний наук. співроб. лабораторії променевої онкології ДУ «Інститут медичної радіології імені Григор'єва НАМН України», м. Харків;

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4518-5104>

Репін Микола Васильович – доктор біол. наук, завідувач лабораторією кріоморфології, ДУ «Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України», м. Харків;

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8993-4789>

Абдалла Алія Ель-Саед Ель-Седик – аспірант відділу дерматології, інфекційних та паразитарних захворювань шкіри ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України», м. Харків;

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6180-549X>