

**VILNIUS UNIVERSITY
VILNIUS UNIVERSITY INSTITUTE OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL
MEDICINE**

Arvydas Rimkevičius

**The Damage in Dermal Blood Vessels and Connective Tissue during Systemic
Sclerosis**

(Histopathological and immunohistochemical biopsy analysis)

Summary of doctoral thesis
Biomedical sciences, medicine (07 B)
Skeleton, muscle, rheumatology, locomotor system (B 580)
Vilnius, 2010

The dissertation was prepared at the Institute of Experimental and Clinical Medicine of Vilnius University

The dissertation will be defended according to the protocol for external doctorates.

Scientific Supervisor:

Prof. Dr. Habil. Zygmunt Mackiewicz, Prof. UO (Institute of Experimental and Clinical Medicine of Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 07 B, skeleton, muscle, rheumatology, locomotor system - B 580)

Scientific Consultant:

Prof. Dr. Habil. Algirdas Venalis (Institute of Experimental and Clinical Medicine of Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 07B, skeleton, muscle, rheumatology, locomotor system - B 580)

The thesis will be defended at Medical Research Council of Vilnius University:

Chairman:

Ass. Prof. Dr. Vidmantas Alekna (Vilnius University, Biomedical sciences, medicine – 07B, skeleton, muscle, rheumatology, locomotor system - B 580)

Members:

Prof. Dr. Habil. Elena Stalioraitytė (Kaunas University of Medicine, Biomedical sciences, medicine – 07B, skeleton, muscle, rheumatology, locomotor system - B 580),

Dr. Danutė Kazlauskaitė (Kaunas University of Medicine, Biomedical sciences, biology – 01B).

Dr. Marija Tamulaitienė (Vilnius University, Biomedical sciences, medicine – 07B, skeleton, muscle, rheumatology, locomotor system - B 580).

Dr. Sigutė Stropuvienė (Institute of Experimental and Clinical Medicine of Vilnius University, Biomedical sciences, medicine – 07B, skeleton, muscle, rheumatology, locomotor system - B 580).

Opponents:

Prof. Dr. Habil. Dalia Pangonytė (Kaunas University of Medicine, Biomedical sciences, medicine – 07B, skeleton, muscle, rheumatology, locomotor system - B 580),

Prof. Dr. Irena Butrimienė (Vilnius University, Biomedical sciences, medicine – 07B, skeleton, muscle, rheumatology, locomotor system - B 580)

The thesis will be defended at the open session of the Medical Research Council on January 15, 2010, at 14 o'clock in the Conference Hall of the Institute of Experimental and Clinical Medicine of Vilnius University.

Address: Žygimantų g. 9, LT-01102, Vilnius, Lithuania

The summary of the doctoral thesis was sent on December 14, 2009.

The thesis in full text is available in the Library of Vilnius University and in the Library of Experimental and Clinical Medicine of Vilnius University.

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
VILNIAUS UNIVERSITETO EKSPERIMENTINĖS IR KLINIKINĖS
MEDICINOS INSTITUTAS**

Arvydas Rimkevičius

**Odos kraujagyslių ir jungiamojo audinio pažeidimai sergant sistetine skleroze
(Histopatologiniai ir imunohistocheminiai biopstatų tyrimai)**

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, medicina (07 B),
skeletas, raumenų sistema, reumatologija, judėjimas (B 580)
Vilnius, 2010

Disertacija rengta 2002-2009 metais Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institute
Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis vadovas:

Prof. habil. dr. Zygmunt Mackiewicz, (Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, skeletas, raumenų sistema, reumatologija, judėjimas - B 580)

Konsultantas:

Prof. habil. dr. Algirdas Venalis (Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, skeletas, raumenų sistema, reumatologija, judėjimas - B 580)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

doc. dr. Vidmantas Alekna (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, skeletas, raumenų sistema, reumatologija, judėjimas - B 580)

Nariai:

prof.habil.dr. Elena Stalioraitytė (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, skeletas, raumenų sistema, reumatologija, judėjimas - B 580),

dr. Danutė Kazlauskaitė (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B),

dr. Marija Tamulaitienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, skeletas, raumenų sistema, reumatologija, judėjimas - B 580)

dr. Sigutė Stropuvienė (Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, skeletas, raumenų sistema, reumatologija, judėjimas - B 580)

Oponentai:

prof.habil.dr. Dalia Pangonytė (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, skeletas, raumenų sistema, reumatologija, judėjimas - B 580),

prof. dr. Irena Butrimienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, skeletas, raumenų sistema, reumatologija, judėjimas - B 580)

Disertacija bus ginama viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2010 m. sausio mėn. 15d. 14val. Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institute, konferencijų salėje.

Adresas: Žygimantų g. 9, LT-01102, Vilnius

Disertacijos santrauka išsiųsta 2009m. gruodžio d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus Universiteto ir Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos instituto bibliotekose.

A list of the abbreviations used in the text

α -SMA – smooth muscle actin alpha
CD34 – cluster of differentiation 34
CD68 – cluster of differentiation 68
CTGF – connective tissue growth factor
DR3 – serotypic representation of a HLA
DR5 – serotypic representation of a HLA
eNOS – endothelial nitric oxide synthase
ET-1 – endothelin-1
HLA – histocompatibility antigen
HSP47 – heat shock protein 47
IL-13 – interleukin 13
MMP – matrix metalloproteinase enzymes
PBS – phosphate buffered saline
PDGF – platelet-derived growth factor
RP – Raynaud's phenomenon
SLE – systemic lupus erythematosus
SSc – systemic sclerosis
TGF- β – transforming growth factor beta
TIMP – tissue inhibitor of metalloproteinases
VEGF – vascular endothelial growth factor
VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor
vWF – von Willebrand factor

Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is primary idiopathic fibrosis of the skin and internal organs that is connected with the abnormal activity of the fibroblasts and small blood vessels. Immunity disorders are found together with various degrees of fibrosis and vascular damage in every SSc patient. The degree of the aforementioned damage is frequently not uniform. It is not completely known which of this damage was initiated by the disease, and which occurs as a consequence of it. Vascular changes and endothelial damage are usually already visible in the early stage of SSc. Two clinical processes predominate in SSc: 1 – an abnormal increase in the connective tissue accompanied by the atrophy of the organ parenchyma; and 2 – ischemia due to vascular sclerosis and their later atresia. It is almost impossible to diagnose the preclinical stage of SSc, but early treatment could be more effective compared to the current results. No complete cure for SSc is so far possible. A deeper understanding of the biological processes of this disease could open up new treatment possibilities.

About 20 million people around the world come down with SSc every year (Karassa, Ioannidis 2008), and tens of individuals in Lithuania. The disease is instigated by many factors: a cold, unfavourable environmental conditions, vibration, and work in the plastics industry, especially with polyvinyl alcohol. Genetic factors are also significant: familial morbidity and an established connection with class II HLA are encountered (DR3, DR5).

Various organs are damaged during SSc and therefore this disease is of interest to physicians in several specialities. The confusing aetiology of SSc, the complicated pathogenesis, and the poor prognosis make SSc an important research object.

Relevancy of the dissertation

Systemic connective tissue inflammatory diseases belong to the rheumatic disease group. These are diseases, which are characterised by systemic damage of the connective tissue and musculoskeletal system. They are distinguished by various symptoms, aetiologies, and pathogeneses. Systemic sclerosis (SSc) and systemic lupus erythematosus (SLE) are systemic connective tissue diseases. A histological study of biopsy material is also used to diagnose this disease. The determination of the histopathological signs of vascular damage plays an important role in this analysis.

In order to prescribe proper treatment on time, it is very important to distinguish SSc from RP and SRV in the early stages of the disease. It is also very important to know the development sequence in the pathological processes. This study also attempts to illuminate this sequence.

Compared to other connective tissue diseases, SSc is relatively rare: the prevalence rate is about 105–290 per million inhabitants, the incidence rate 2.6–28/million/per annum (Silman 1997; Maricq et al. 1989; Medsger et al. 1971; Altman et al. 1991; Silman et al. 1988; Hausteina, Albrecht 1993; Mayes et al. 2003). Annual mortality from SSc is 0.8–3.8 deaths per million inhabitants (Medsger 1985). 5- and 10-year survival is about 86% and 69% respectively (Hesselstrand et al. 1998). The majority of the patients die from cardiopulmonary and renal complications. Due to the poor prognosis and insufficiently effective treatments for SSc, new study for this disease remain very important.

Dissertation aim and objectives

The aim of this dissertation is to determine the sequence in the development of vascular damage and fibrosis by studying vascular changes in the skin and connective tissue of SSc patients with atresia characteristic of this pathology and by comparing it with other conditions, where there is no vascular atresia (SLE), and with conditions, which are characterised by vascular function instability (Raynaud's phenomenon).

Objectives:

1. To determine the predominant histopathological changes and the sequence of their development in the skin of SSc patients compared to the changes in SLE and RP patients.
2. To determine the histological, ultrastructural, histochemical, and immunohistochemical signs that best reflect the early and late stages of SSc and to compare the expression of these signs in the skin with their expression in the skin biopsies of patients with SLE.
3. To compare the cellular composition of the inflammatory infiltrate of the vascular walls and perivascular tissue in the early and late stages of SSc and SLE.
4. To compare the late stage of the SSc and SRV diseases, which is accompanied by fibrosis and/or the expression of vascular atresia in order to determine the differences in the course of the pathogenesis of these diseases.

Novelty of the dissertation:

1. An analysis of the eNOS, VEGF, VEGFR, and vWF immunohistochemical endothelial signs helps to determine the early clear damage of the vascular endothelium and the significantly increased vascular permeability in the skin of SSc patients and to differentiate them from SLE and RP.
2. An analysis of the eNOS, VEGF, VEGFR, and vWF immunohistochemical endothelial signs helps to differentiate SSc from SRV and RP in the early stage of the disease.
3. We established that endothelial damage of the small blood vessels predominates in the skin in the pathogenesis of the early stage of SSc while signs of histological and ultrastructural fibroblast damage begin to become distinct after endothelial damage appears in the blood vessels.

Defended statements:

1. During the development of SSc, damage to the small blood vessels first appears in the skin biopsies while tissue fibrosation appears later and shows that the disease is very advanced.
2. The efforts of the systems, which ensure an organism's homeostasis, to restore the blood vessels damaged in the course of SSc are significant, but due to so far undetermined reasons the vascular system does not recover and the fibrosis of the tissues continues to progress.
3. By using immunohistochemical signs of vascular damage in skin biopsies, it is possible to determine the early vascular damage characteristic of SSc, SLE, and RP.

Research material and methods

Skin biopsies were studied from 60 patients with SSc, SLE, and Raynaud's phenomenon, 20 with each disease. The biopsies were taken during 1995–2004 at the Rheumatology Clinic of the Vilnius University Faculty of Medicine (Table 1). Skin samples taken from a corresponding location in 20 individuals of a corresponding age and not suffering from systemic diseases were also analysed as a control. All of the SSc, SLE, and Raynaud's phenomenon diagnoses were confirmed by clinical and laboratory, immunological and molecular diagnostic test data. The onset of the disease was calculated from the time when the patient was diagnosed with the disease in question based on the classification criteria used. All of the SSc patients met the ARC classification criteria (Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23:581-90) and later criteria (LeRoy et al. 1988). The diagnosis of systemic lupus erythematosus was established on the basis of the SLE classification criteria revised in 1982 by the American College of Rheumatology (ACR) (Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7). Raynaud's phenomenon was diagnosed using the 1992 RP classification criteria of the American College of Rheumatology (ACR) (Leroy EC, Medsger TA Jr. Raynaud's phenomenon: A proposal for classification. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10:485-8.)

The early stage of the disease was defined as the period from the establishment of the diagnosis until the third year. The SSc, SLE, and RP groups were formed so that each patient group contained 10 patients in the early stage and 10 in the late stage.

All of the patient biopsies were taken by the physicians of the Rheumatology Clinic of the Vilnius University Faculty of Medicine for diagnostic purposes due to a clinical necessity. The control skin samples were taken by the author from autopsy material from Vilnius City University Hospital Surgery Department patients, who had not been diagnosed with any systemic disease. The autopsies were performed in accordance with medical law and clinical indications. The skin biopsies were processed at the Pathology Laboratory of the Institute of Experimental and Clinical Medicine at Vilnius University; the paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin using histochemical and immunohistochemical methods. The author performed the evaluation of the micropreparations and the interpretation of the data. Three SSc early stage skin biopsies were examined using an electron microscope at the Pathology Laboratory of the Institute of Experimental and Clinical Medicine at Vilnius University and the author performed the evaluation of the electron microscope photographs and the interpretation of the data.

Table 1. Distribution of the studied patients by age and sex.

Disease	Number of patients	Average age
SSc	20 (1 man, 19 women)	46.55 ± 10.87
SRV	20 (2 men, 18 women)	39.18 ± 11.55
RP	20 (3 men, 17 women)	37.02 ± 13.03
Healthy individuals (control)	20 (3 men, 17 women)	47.26 ± 14.05

The biopsy material was fixed in a 10% buffer formalin solution and embedded in paraffin. The studied samples were stained using a standard routine histological staining method with hematoxylin and eosin. The visual analysis and photography were made using an Olympus BX51 light microscope.

The studied preparations were stained using the following standard histochemical methods:

a mixture of picric acid and sirius red (picrosirius) for the connective tissue fibre components and for analysis in a dark polarising microscope field.

Toluidine blue, pH 2.0 for the analysis of the protein-proteoglycans in the mast cell and connective tissue matrix.

During the immunohistochemical analysis the following primary antibodies were used:

1) rabbit IgG anti-human vWF (2 µg/ml, Dakopats A/S, Glostrup, Denmark); 2) mouse IgG anti-human CD34 (2 µg/ml, Cymbus Biotechnology Ltd, Charles Ford, United Kingdom); 3) rabbit IgG anti-human VEGF (2 µg/ml); 4) 2.9 µg/ml rabbit IgG anti-human VEGFR-1 (FLT-1); 5) 4 µg/ml rabbit IgG anti-human VEGFR-2 (FLK-1); 6) 1 µg/ml rabbit IgG anti-human VEGFR-3 (FLT-4) (Fitzgerald Industries International, Concord, MA, USA); 7) mouse IgG anti-human CD68 (1.3 µg/ml, DAKO); 8) rabbit IgG anti-human eNOS(III) (2 µg/ml, Abcam, United Kingdom); 9) rabbit IgG anti-human HSP47 (2 µg/ml, ProSci, Inc, CA, USA).

A corresponding quantity of normal IgG or PBS of the same animal species, the same class, and the same concentration were used for negative stain control in place of the antibody under study.

The En Vision kit (DAKO) was used for the immunohistochemical stain.

During the electron microscope examination, the visual analysis and photography were performed with a JEM 100-B electron microscope.

The histopathological images from the light and electron microscopy were evaluated using the qualitative analysis method.

For the semi-quantitative analysis, the immunohistochemical signs were evaluated using a four point system: 0 – no signs, 1 – isolated signs, 2 – plentiful signs, 3 – very plentiful signs. The quantitative analysis was made using ANALYSIS software. The preparations were photographed using an Olympus BX51 light and polarisation microscope and a Nikon DXM 2000 video camera.

The statistical data analysis was performed using SPSS statistics software for Windows (version 12.0). The averages (A) of the normal parameter values were calculated with standard deviations (SD). The statistical significance of the difference in

the nominal data was determined on the basis of the Chi-square (χ^2) criteria, the difference in the normal quantitative data averages for two independent samples was determined using Student's t-criteria, and the difference in the normal quantitative data averages for three independent samples was determined on the basis of an ANOVA single factor analysis of variance. The statistical significance of the difference in the rank data when there are two independent samples was determined using Mann-Whitney-Wilcoxon criteria.

A significance level of $p < 0.05$, in which the results were deemed statistically reliable, was selected.

Research results

In the early stage of SSc, neutrophils, lymphocytes, monocytes, histiocytes, and isolated plasmocyte infiltrates were visible near the blood vessels and ecrinal sweat gland ducts. In places, similar infiltrates were visible in the interstitial and subcutaneous fatty tissue.

As the disease progresses, the density of the dermal vascular network and the total quantity of all of the cells decreases, but the quantity of connective tissue extracellular matrix, especially fibrous collagen, increases. The fibroblasts were hyperfunctional and oedematous. The elastic fibres were fragmented. The collagen fibres were oedematous and had uneven diameters. There was oedema between the collagen fibres.

In the later stages of SSc the inflammatory infiltrates decreased or almost completely disappeared. A sharp reduction in the skin's papillary layer was observed. The blood vessel walls thickened, hyalinosis and necrosis appeared, the lumens narrowed, and devascularisation gradually developed.

The collagen fibres gradually thickened and became denser. In the later stages of SSc, the number of fibroblasts declined. The ecrinal sweat glands became atrophic due to the surrounding fibrosis and were found in only the upper layer of the dermis. The expressed accumulation of collagen and other extracellular matrix proteins were primarily seen on the boundary of the reticular dermis and subcutaneous tissue. In the early stage of SSc, thin, newly synthesised 10–30 nm collagen fibrils were visible with an electron microscope. Later larger diameter fibrils predominated. This showed the maturation of the collagen. An ultrastructural analysis of the blood vessels showed endothelial cell damage, vacuolisation, hyalinisation, and necrosis as well as the activation of the pericyte and fibroblast endoplasmic network. Fairly abundant infiltration that contained mast cells in close contact with fibroblasts, damaged blood vessels, and damaged lymph vessels was visible in the early stage of SSc.

In the cases of SLE, the vascular walls and perivasculars had various degrees of tissue oedema and inflammatory cell infiltration. In the cases of Raynaud's phenomenon we found signs of arterial shrinkage, but there were no signs of vasculitis or they were slight. The signs of vasculitis were expressed to a greater degree in the SSc cases, and especially in the early stage of the disease (Table 2).

Table 2. Distribution of the Vasculitis activity in the skin (according to the histopathological signs) in the early and late stages of SSc and in the cases of SLE and RP.

Disease	Vasculitis activity			
	0	1	2	3
SSc N=20	0/0	1/1	3/8	6/1
SLE N=20	0/0	3/1	2/4	5/5
RP N=20	5/2	5/8	0/0	0/0
Control N=20	20	0	0	0

Comparison	P
SSc – SLE	0.789
SSc – RP	<0.0001
SSc – Control	<0.0001
SLE – RP	<0.0001
SLE – Control	<0.0001
RP – Control	<0.0001

Explanation: 0 = no signs of vasculitis; 1 = endothelial oedema, isolated neutrophils along the blood vessel; 2 = endothelial oedema, sparse infiltration by neutrophils, macrophages, and lymphocytes along the blood vessel; 3 = endothelial damage, abundant infiltration by inflammatory cells along the blood vessel; / = early/late stage of the disease.

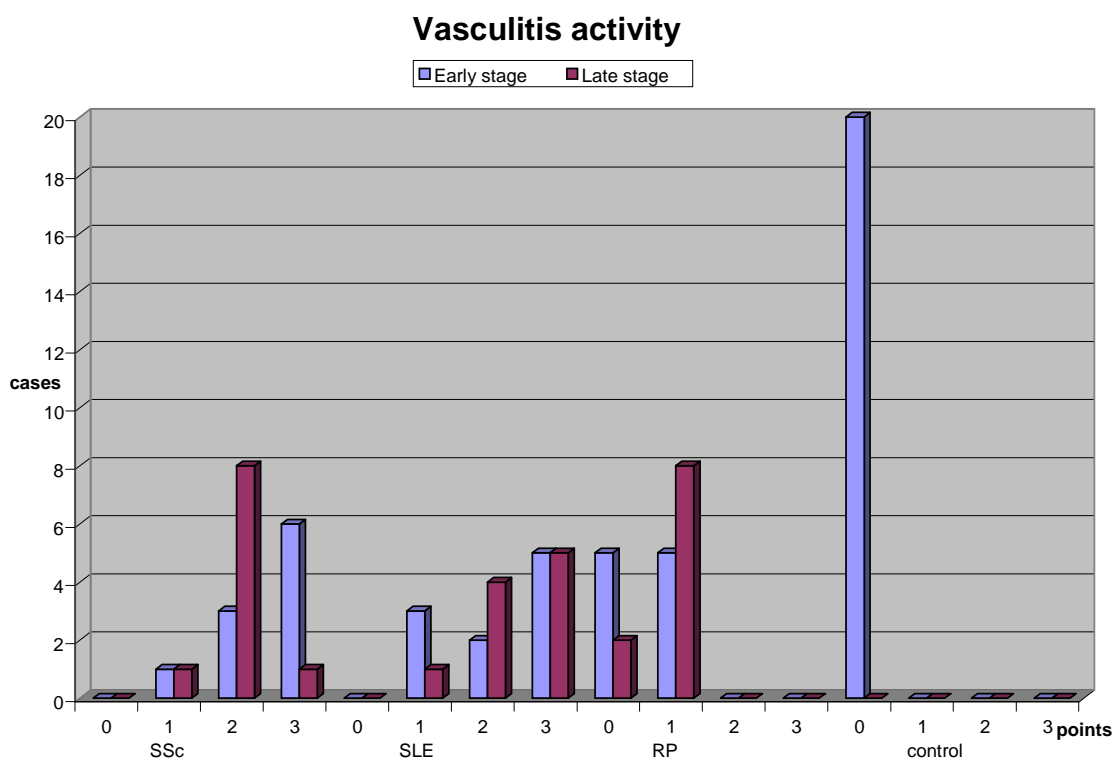


Fig. 1. Distribution of the vasculitis activity in the skin (according to the histopathological signs) in the early and late stages in the cases of SSc, SLE, and RP.

The secondary vasculitis activity directly correlated to vWF leakage into the tissues, which was reliably greater for SSc patients (Table 5).

We see from the data comparison that in the early stage of the disease the vasculitis activity did not differ in SSc and SLE patients, while in the late stage vasculitis activity remained high in the skin of SLE patients, but decreased in that of SSc patients.

In the picosirius stained histological preparations analysed in polarised light, thin, recently synthesised collagen fibres glowed green, while thick, mature collagen fibres glowed red. In the early stage of SSc we found many green glowing collagen fibres, but in the later stages red fibres predominated.

In the cases of SLE and Raynaud's phenomenon, the glowing did not differ from the control cases. But in the cases of Raynaud's phenomenon there were clearly shrunken arteries.

Vascular fibrosation accompanied by atresia was usually encountered in the later stages of SSc, while in the case of SLE and Raynaud's phenomenon no distinct fibrosis was encountered (Table 3).

Table 3. Skin tissue fibrosation in SSc, SLE, and RP patients compared to the control

Disease	Degree of fibrosation			
	0	1	2	3
SSc N=20	5/0	4/0	1/1	0/9
SLE N=20	7/2	3/8	0/0	0/0
RP N=20	6/2	4/8	0/0	0/0
Control N=20	20	0	0	0

Comparison	p
SSc – SLE	0.004
SSc – RP	0.006
SSc – Control	<0.0001
SLE – RP	0.752
SLE – Control	<0.0001
RP – Control	<0.0001

Explanation: 0 = no signs of fibrosation; 1 = a slight increase in thin, picosirius stained fibres that glow green in polarised light; 2 = an increase in picosirius stained fibres that glow green and red in polarised light; 3 = an abundance of thick, picosirius stained collagen fibres that glow red; / = early/late stage of the disease.

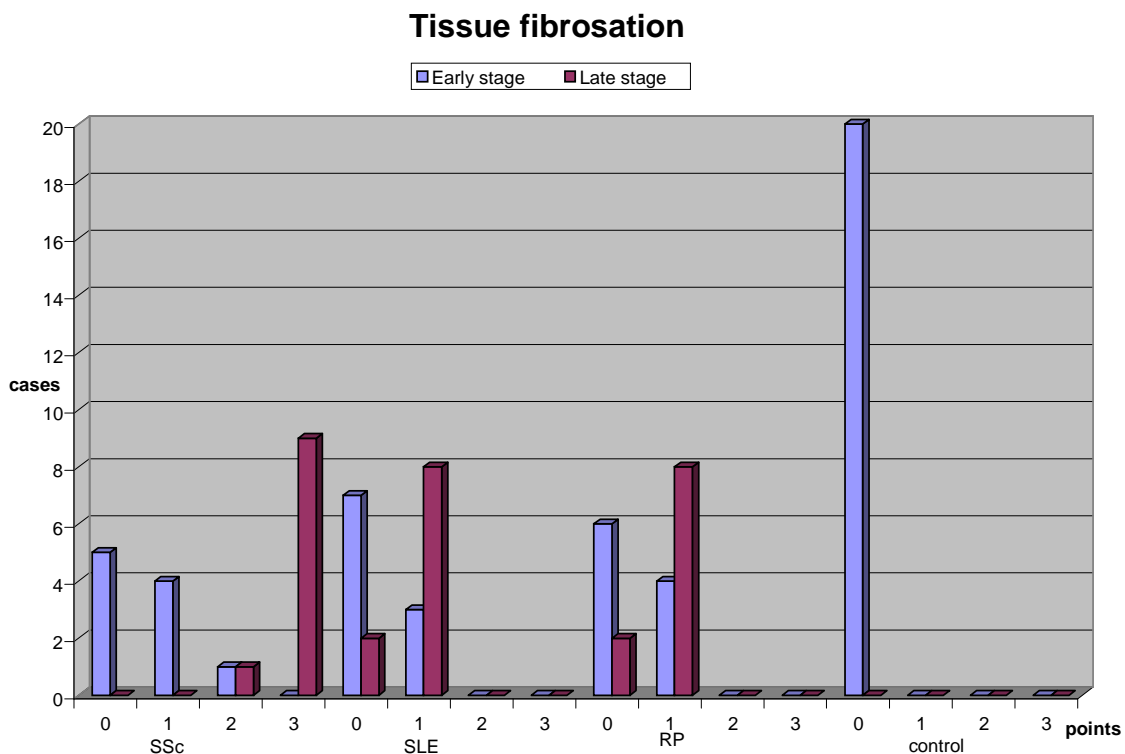


Fig. 2. Skin tissue fibrosation in SSc, SLE, and RP patients compared to the control

From the comparison of the data we see that in the early stage of the disease the degree of tissue fibrosation does not differ in either SSc or SLE patients (either no fibrosation existed or it was slight), but in the late stage massive fibrosis developed in the SSc patients,

Toluidine blue stain highlighted the mast cells, which were distinguished by a violet colour. Compared to the control, there was a greater abundance of mast cells and they more intensively degranulated in the early stage of SSc, but they significantly decreased in the fibrosis stage (Table 4).

Table 4. The abundance and degranulation of the dermal mast cell infiltration of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

Disease	Mast cell infiltration			
	0	1	2	3
SSc N=20	0/0	1/8	2/2	7/0
SLE N=20	0/0	2/3	3/3	5/4
RP N=20	0/0	8/9	2/1	0/0
Control N=20	0	20	0	0

Comparison	p
SSc – SLE	0.285
SSc – RP	0.004
SSc – Control	<0.0001
SLE – RP	<0.0001
SLE – Control	<0.0001
RP – Control	0.075

Explanation: 0 = no specifically stained profiles; 1 = isolated specifically stained profiles; 2 = frequent specifically stained profiles; 3 = abundant specifically stained profiles; / = early/late stage of the disease.

The abundance and degranulation of the dermal mast cell infiltration

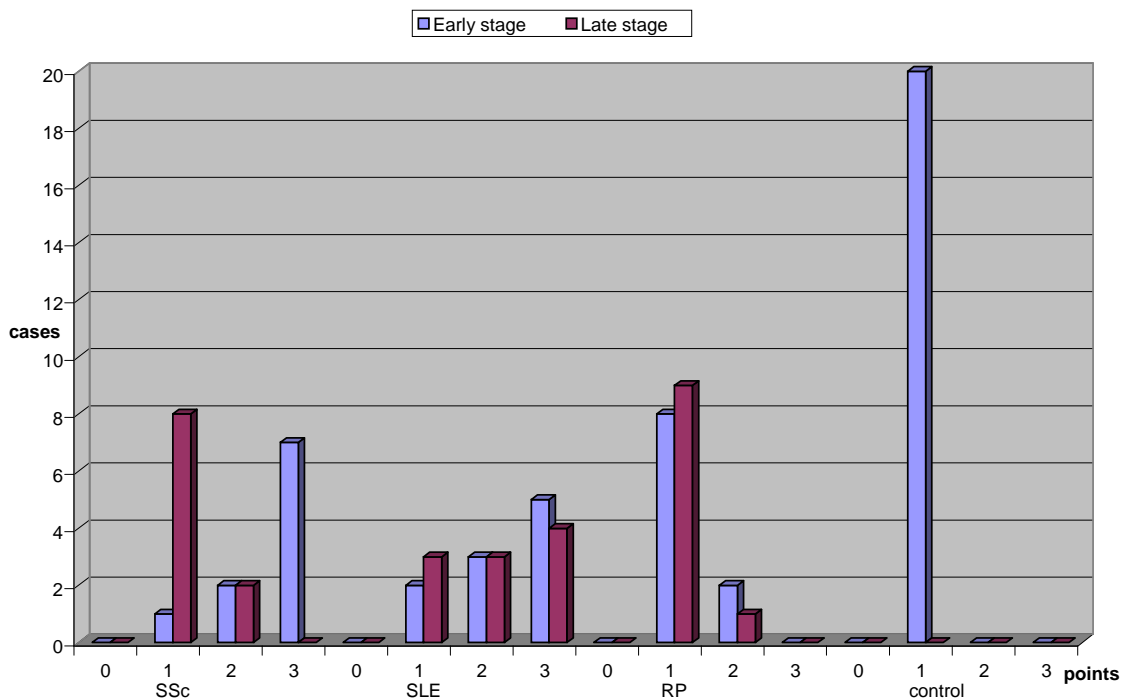


Fig. 3. The abundance and degranulation of the dermal mast cell infiltration of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

From the comparison of the data we see that in the early stage of the disease the mast cell infiltration and degranulation did not differ in SSc and SLE patients (being abundant.), but in the late stage, mast cell infiltration and degranulation remained abundant in SLE patients, but decreased in SSc patients.

In the cases of the analysis of healthy skin biopsies, this factor was visible only on the edges of the blood vessel lumen and in the blood vessel walls, essentially on the inside. In the skin biopsies of the studied groups, the vWF penetrated into the other layers of the blood vessel walls and even got into the extravascular space (Table 5). It is possible to decide about the structural changes in the blood vessels on the basis of the location of the vWF.

Table 5. vWF leakage from the blood vessel lumen into the adjacent tissues in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control

Disease	vWF leakage			
	0	1	2	3
SSc N=20	0/2	4/9	3/1	3/0
SLE N=20	2/4	7/5	1/1	0/0
RP N=20	10/10	0/0	0/0	0/0
Control N=20	20	0	0	0

Comparison	p
SSc – SLE	0.25
SSc – RP	<0.0001
SSc – Control	<0.0001
SLE – RP	<0.0001
SLE – Control	<0.0001
RP – Control	1.0

Explanation: 0 = no vWF leakage; 1 = slight vWF leakage near the blood vessel walls; 2 = slight vWF leakage over tens of micrometers from the blood vessel walls; 3 = abundant vWF leakage; / = early/late stage of the disease.

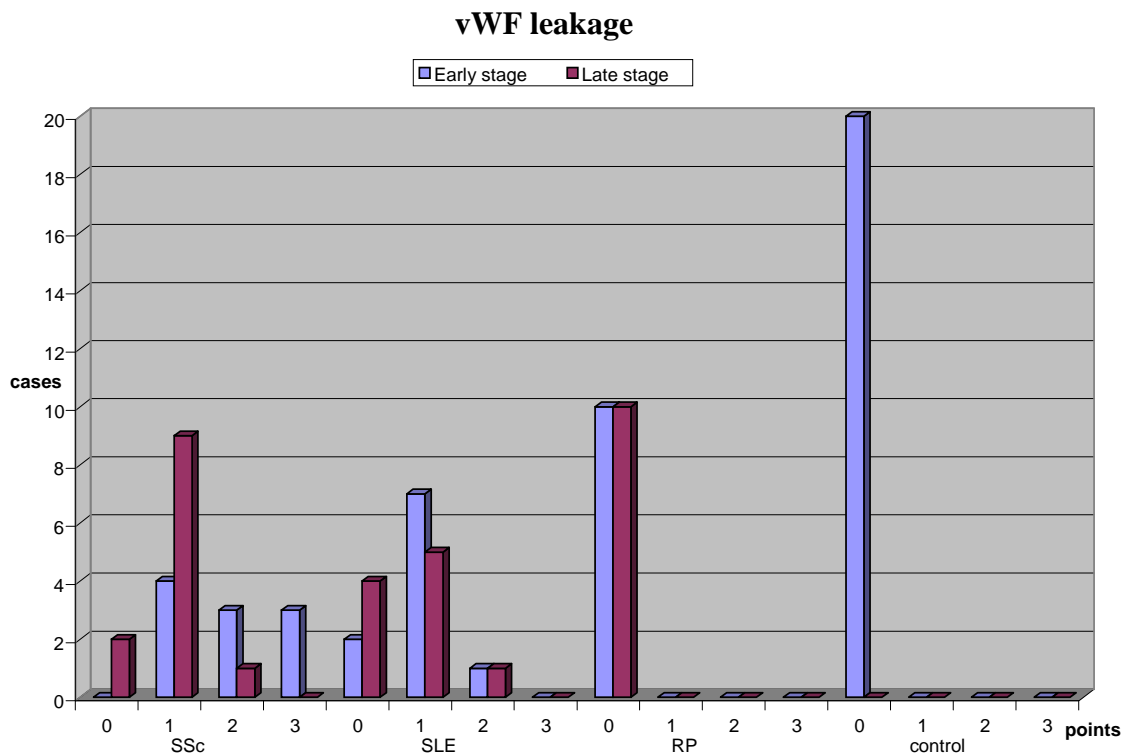


Fig. 4. vWF leakage from the blood vessel lumen into the adjacent tissues in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

From the comparison of the data we see that in the early stage of the disease the vWF leakage into adjacent tissue in SSc patients was more abundant compared to that in SLE patients, and although in the late stage of the disease vWF leakage into adjacent tissue decreased in SSc patients, it remained relatively more abundant than in SLE patients.

Isolated cells with CD68 positive IHC signs were found in the healthy skin biopsies and in the cases of Raynaud's phenomenon. They were located in the interstices as ordinary interstitial macrophages. We found abundant CD68 positive cell infiltrates in the blood vessel walls and alongside the blood vessels in the early stages of SSc and in the cases of SLE (Table 6).

Table 6. Tissue macrophages

Disease	CD68 expression			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	2/6	4/4	4/0
SLE n=20	0/0	2/3	4/5	4/2
RP n=20	0/0	9/9	1/1	0/0
Control n=20	0	20	0	0

Comparison	p
SSc – SLE	0.298
SSc – RP	<0.0001
SSc – Control	<0.0001
SLE – RP	<0.0001
SLE – Control	<0.0001
RP – Control	1.0

Explanation: 0 = no specifically stained profiles; 1 = isolated specifically stained profiles; 2 = frequent specifically stained profiles; 3 = abundant specifically stained profiles; / = early/late stage of the disease.

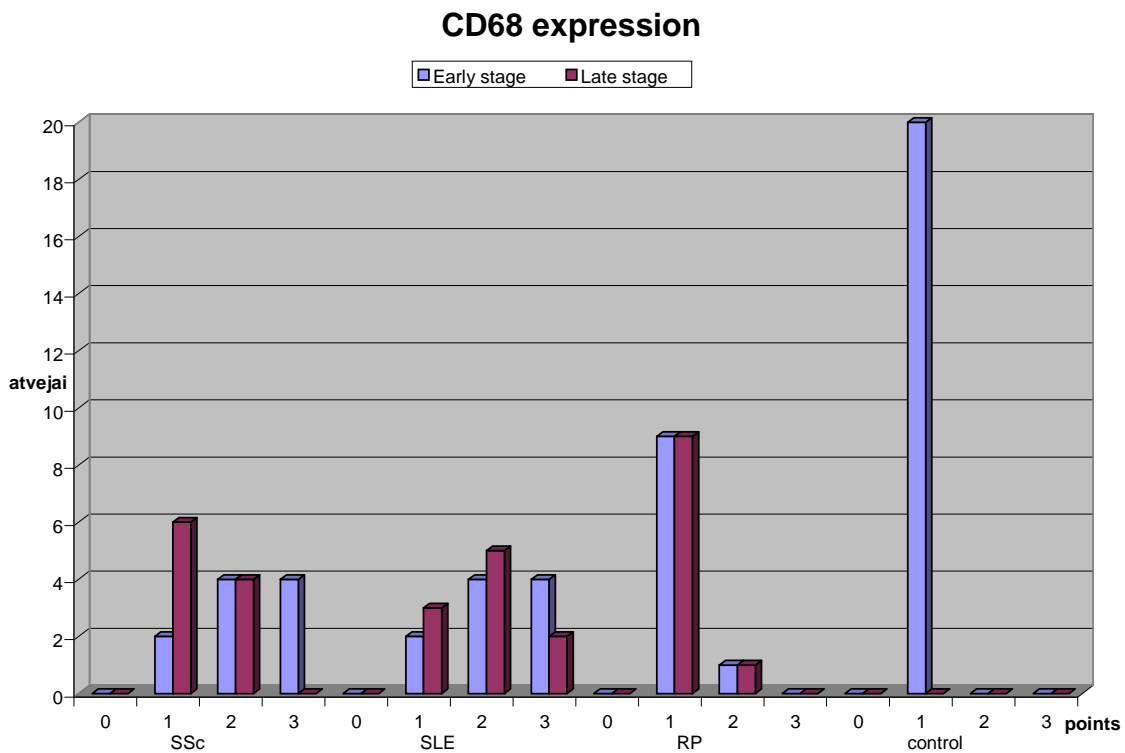


Fig. 5. Tissue macrophages in the skin of SSc, SLE, and RP patients and the control group.

From the comparison of the data we see that in the early stage of the disease the tissue macrophage infiltration did not differ in the SSc and SLE patients (being moderately abundant), but in the late stage of the disease, tissue macrophage infiltration decreased in SSc patients, but in SLE patients it remained similar to the early stage level.

Endothelial nitric oxide synthase was marginally expressed in the skin biopsies of healthy individuals, but its expression was much more distinct in the cases of SSc, especially in the late stage of the disease, and SLE (Table 7).

Table 7. Endothelial nitric oxide synthase expression in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

Disease	Endothelial nitric oxide synthase III (eNOS) expression			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	4/8	6/2	0/0
SRV n=20	0/0	2/3	8/7	0/0
RP n=20	0/0	9/10	1/0	0/0
Control n=20	0	20	0	0

Comparison	P
SSc – SLE	0.27
SSc – RP	0.009
SSc – Control	<0.0001
SLE – RP	<0.0001
SLE – Control	<0.0001
RP – Control	0.317

Explanation: 0 = no specifically stained profiles; 1 = isolated specifically stained profiles; 2 = frequent specifically stained profiles; 3 = abundant specifically stained profiles; / = early/late stage of the disease.

Endothelial nitric oxide synthase III (eNOS) expression

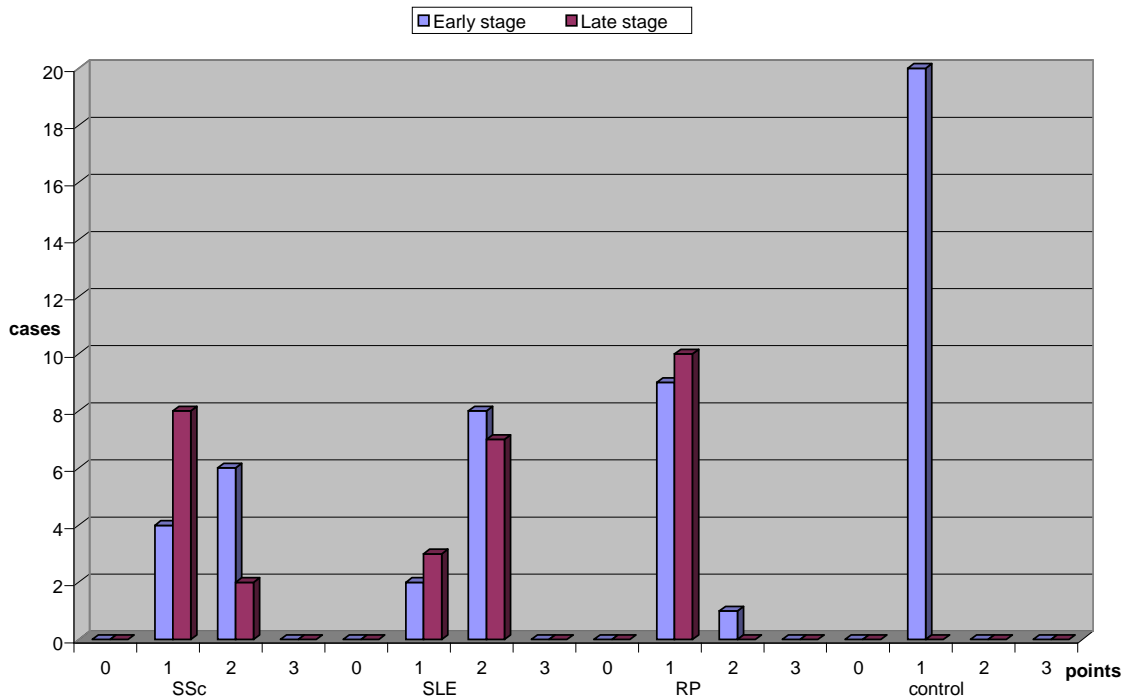


Fig. 6. Endothelial nitric oxide synthase expression in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

From the comparison of the data we see that in the early stage of the disease endothelial nitric oxide synthase expression did not differ in the skin of SSc and SLE patients (being moderately abundant), but in the late stage of the disease endothelial nitric oxide synthase expression declined in the skin of SSc patients, but in SLE patients it remained similar to the early stage level.

A slight expression of heat shock protein (HSP) 47 was established in the skin biopsies of 25% of the healthy individuals. More marked HSP-47 expression was found in the skin in the SLE cases, but HSP-47 was mostly expressed in the course of the SSc, especially in the early stage of the disease (Table 8).

Table 8. Heat shock protein (HSP) 47 expression in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

Disease	Heat shock protein (HSP) 47 expression			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	4/2	6/3	0/5
SLE n=20	0/0	5/4	5/6	0/0
RP n=20	7/8	3/2	0/0	0/0
Control n=20	16	4	0	0

Comparison	p
SSc – SLE	0.086
SSc – RP	<0.0001
SSc – Control	<0.0001
SLE – RP	<0.0001
SLE – Control	<0.0001
RP – Control	0.708

Explanation: 0 = no specifically stained profiles; 1 = isolated specifically stained profiles; 2 = frequent specifically stained profiles; 3 = abundant specifically stained profiles; / = early/late stage of the disease.

Heat shock protein (HSP) 47 expression

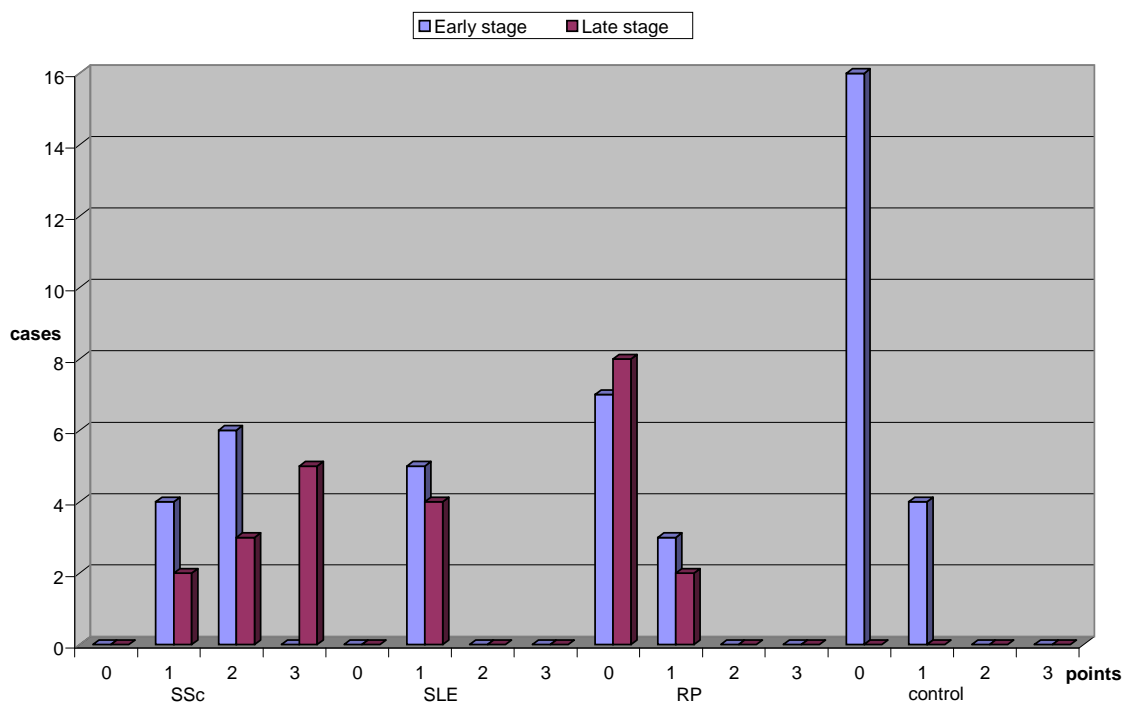


Fig. 7. Heat shock protein (HSP) 47 expression in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

From the comparison of the data we see that in the early stage of the disease heat shock protein (HSP) 47 expression did not differ in SSc and SLE patients (being moderately abundant), but in the late stage, HSP-47 expression in SLE patients remained similar to the early stage level, while it increased in SSc patients. In addition, in SSc patients the location of the heat shock protein (HSP) 47 expression changed: in the early stage it was mainly expressed in the walls of the dermal blood vessels, in the late stage in the fibroblasts.

CD34 was found in the majority of the skin biopsies from the healthy individuals, but its expression was more distinct in the SLE cases. CD 34 was mainly expressed in the early stage of SSc (Table 9).

Table 9. CD34 expression in the skin of patients with SSc, SLE, and RP compared to the control.

Disease	CD34 expression			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/1	4/7	6/3	0/0
SLE n=20	0/0	7/6	3/4	0/0
RP n=20	2/2	8/8	0/0	0/0
Control n=20	3	17	0	0

Comparison	P
SSc – SLE	0.524
SSc – RP	<0.0001
SSc – Control	<0.0001
SLE – RP	0.001
SLE – Control	0.001
RP – Control	0.681

Explanation: 0 = no specifically stained profiles; 1 = isolated specifically stained profiles; 2 = frequent specifically stained profiles; 3 = abundant specifically stained profiles; / = early/late stage of the disease.

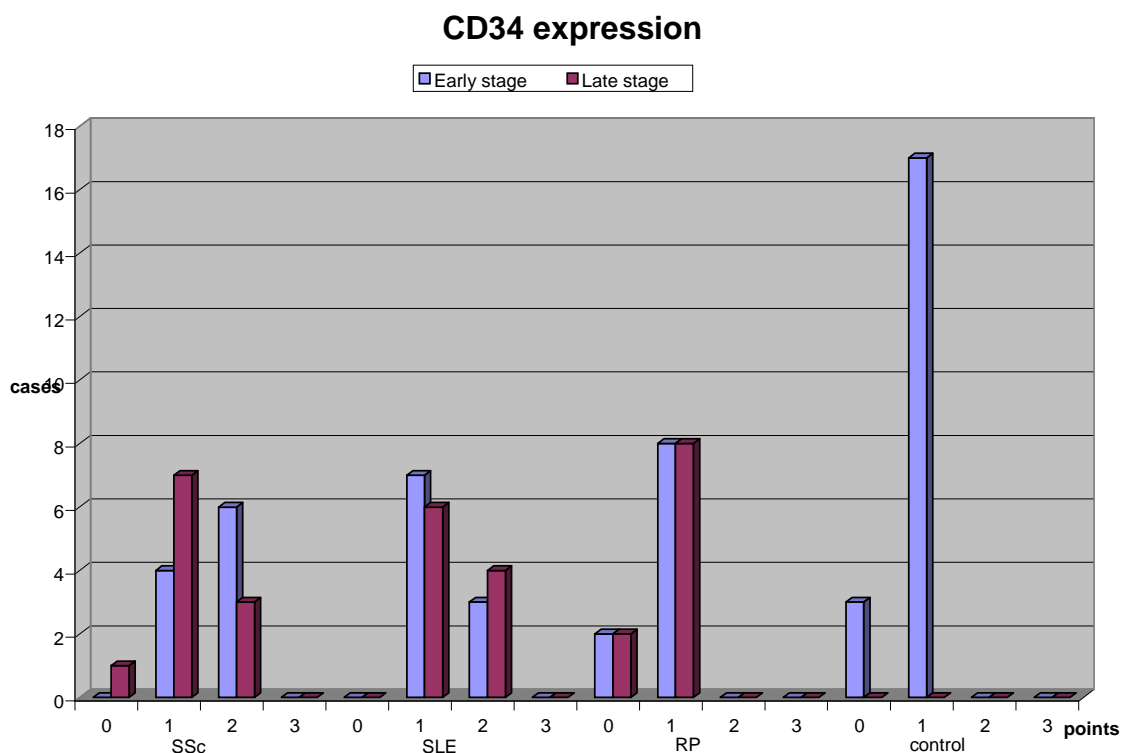


Fig. 8. CD34 expression in the skin of patients with SSc, SLE, and RP compared to the control.

From the comparison of the data we see that in both the early and late stages of the disease, CD34 expression did not differ in SSc and SLE patients, in the early stage it was relatively more abundant, in the later stage, relatively less abundant.

A slight vascular endothelial growth factor expression was encountered in the skin biopsies of some of the healthy individuals. The largest VEGF-A expression occurred in the early stage of SSc (Table 10).

Table 10. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

Disease	Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	3/5	5/5	2/0
SLE n=20	3/3	6/3	1/4	0/0
RP n=20	5/5	5/5	0/0	0/0
Control n=20	13	7	0	0

Comparison	P
SSc – SLE	0.04
SSc – RP	<0.0001
SSc – Control	<0.0001
SLE – RP	0.009
SLE – Control	0.198
RP – Control	0.061

Explanation: 0 = no specifically stained profiles; 1 = isolated specifically stained profiles; 2 = frequent specifically stained profiles; 3 = abundant specifically stained profiles; / = early/late stage of the disease.

Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression

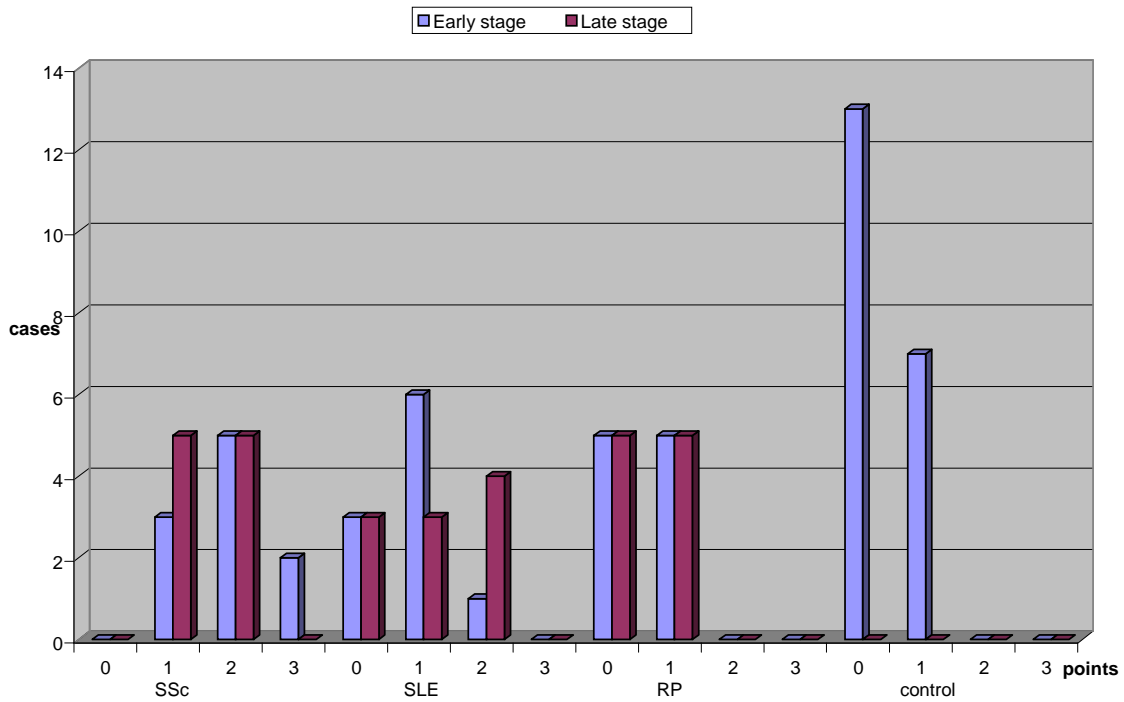


Fig. 9. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression in SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

From the comparison of the data we see that in both the early and late stages of the disease, vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression in SSc patients was more abundant than in SLE patients. In SSc patients vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression was somewhat more abundant in the early stage than in the late stage.

Vascular endothelial growth factor receptor 1 (FLT-1) was marginally expressed in the skin biopsies of healthy individuals. The most distinct expression of this receptor was visible in the skin in the early stage of SSc (Table 11).

Table 11. VEGFR-1 receptor-1 (FLT-1) expression in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

Disease	VEGFR-1 (FLT-1) expression			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	3/6	5/4	2/0
SLE n=20	3/3	6/6	1/1	0/0
RP n=20	5/5	5/5	0/0	0/0
Control n=20	12	8	0	0

Comparison	P
SSc – SLE	<0.0001
SSc – RP	<0.0001
SSc – Control	<0.0001
SLE – RP	0.220
SLE – Control	0.077
RP – Control	0.530

Explanation: 0 = no specifically stained profiles; 1 = isolated specifically stained profiles; 2 = frequent specifically stained profiles; 3 = abundant specifically stained profiles; / = early/late stage of the disease.

VEGFR-1 (FLT-1) expression

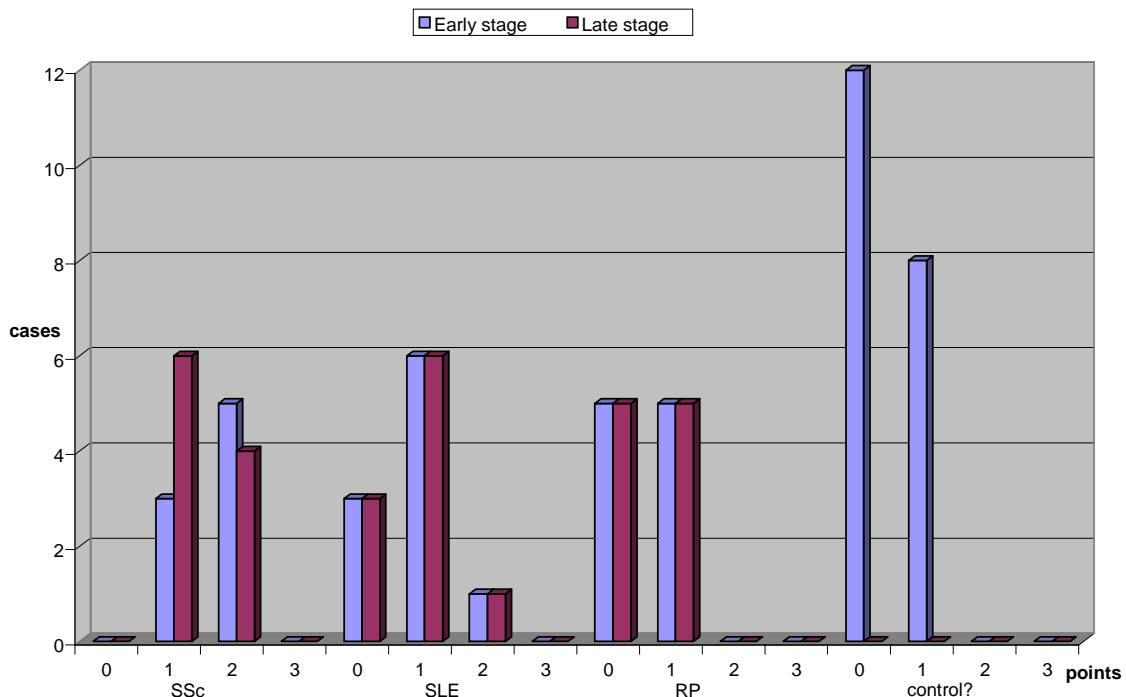


Fig. 10. VEGFR-1 receptor-1 (FLT-1) expression in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

A slight expression of vascular endothelial growth factor receptor 2 (FLK-1) was encountered in the skin biopsies of healthy individuals. The most distinct FLK-1 expression was visible in the early stage of SSc (Table 12).

Table 12. Vascular endothelial growth factor receptor -2 (FLK-1) expression in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control

Disease	VEGFR-2 (FLK-1) expression			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	8/8	2/2	0/0
SLE n=20	3/2	7/8	0/0	0/0
RP n=20	6/5	4/5	0/0	0/0
Control n=20	14	6	0	0

Comparison	P
SSc – SLE	0.005
SSc – RP	<0.0001
SSc – Control	<0.0001
SLE – RP	0.056
SLE – Control	0.005
RP – Control	0.333

Explanation: 0 = no specifically stained profiles; 1 = isolated specifically stained profiles; 2 = frequent specifically stained profiles; 3 = abundant specifically stained profiles; / = early/late stage of the disease.

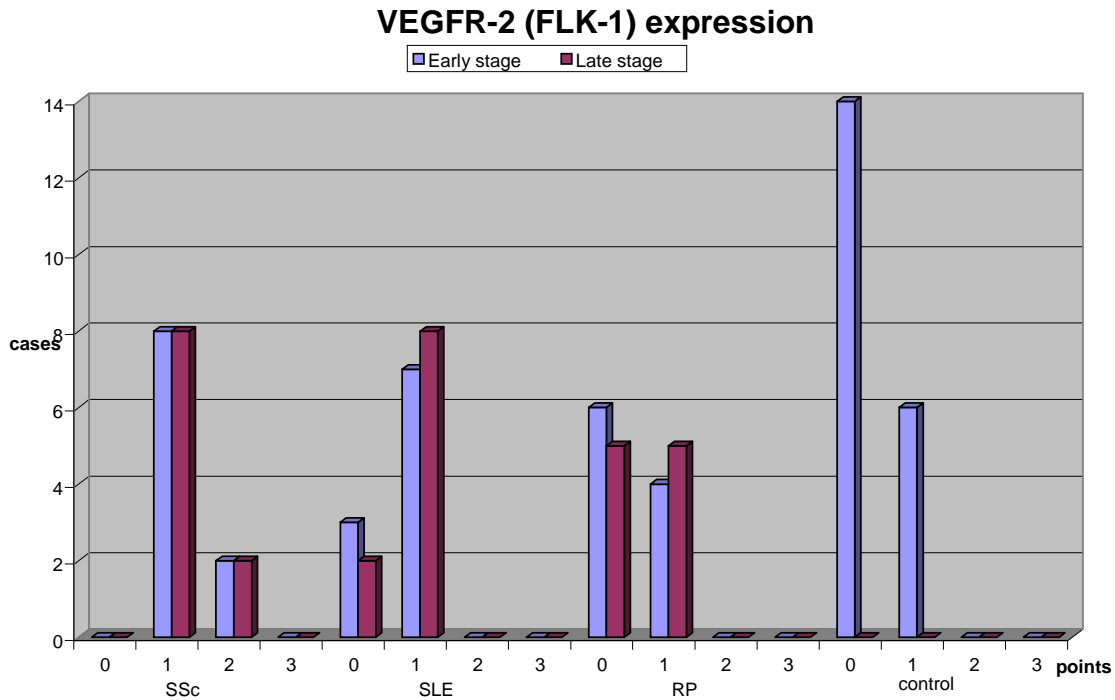


Fig. 11. Vascular endothelial growth factor receptor-2 (FLK-1) expression in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

A slight expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (FLT-4) was discovered in the skin biopsies of some of the healthy individuals. The most distinct expression of this factor was visible in the early stage of SSc (Table 13).

Table 13. The expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (FLT-4) in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

	VEGFR-3 (FLT-4) expression			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	8/6	1/4	1/0
SLE n=20	3/4	7/6	0/0	0/0
RP n=20	7/8	3/2	0/0	0/0
Control n=20	16	4	0	0

Comparison	P
SSc – SLE	<0.0001
SSc – RP	<0.0001
SSc – Control	<0.0001
SLE – RP	0.012
SLE – Control	0.004
RP – Control	0.708

Explanation: 0 = no specifically stained profiles; 1 = isolated specifically stained profiles; 2 = frequent specifically stained profiles; 3 = abundant specifically stained profiles; / = early/late stage of the disease.

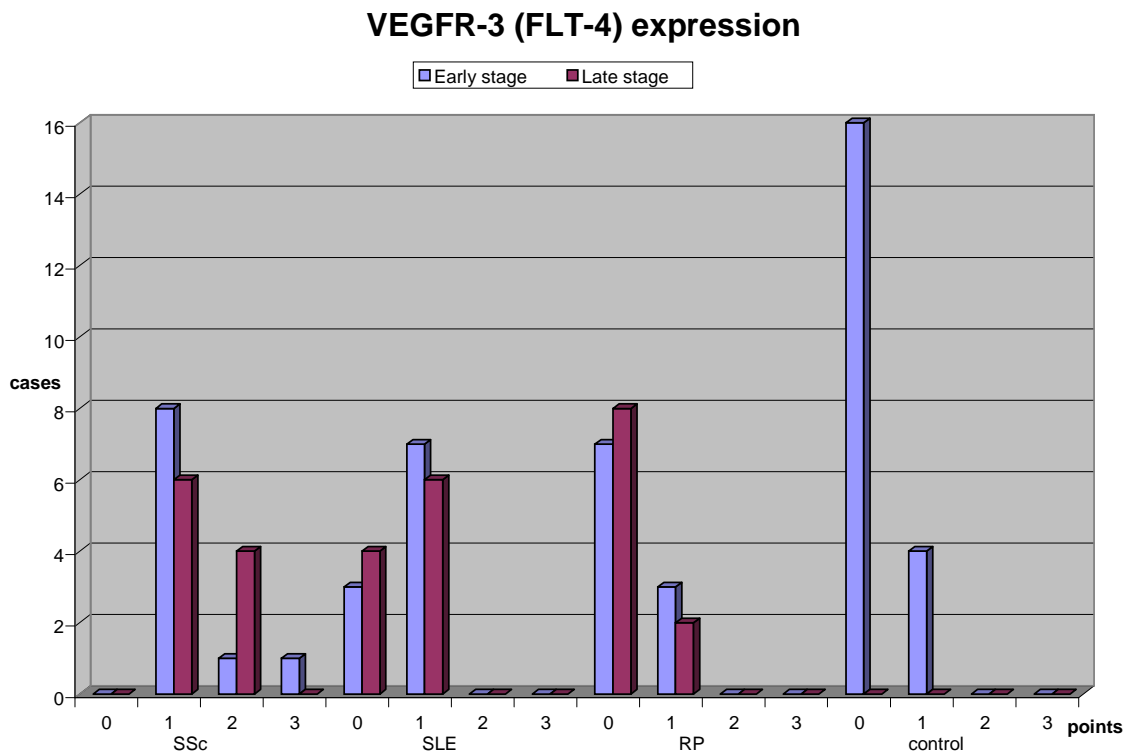


Fig. 12. The expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (FLT-4) in the skin of SSc, SLE, and RP patients compared to the control.

From the comparison of the data we see that in both the early and late stages of the disease, the expression of vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-1 (FLT-1) was more abundant in the skin of SSc patients than in SLE patients and somewhat more abundant in the early stage than in the late stage.

In the early and late stages of the disease, the expression of vascular endothelial growth factor receptor -2 (FLK-1) was more abundant in the skin of SSc patients than in SLE patients. In SSc patients vascular endothelial growth factor receptor-2 (FLK-1) expression did not differ in the early and late stages.

Vascular endothelial growth factor receptor-3 (FLT-4) expression was more abundant in the skin of SSc patients in both the early and late stages of the disease, and somewhat more abundant in the late stage than the early stage in SLE patients.

Discussion of the results

In the results of our work, it is observed that in the early stage of the disease vasculitis activity did not differ in SSc and SLE patients, but in the late stage vasculitis activity remained high in the skin of SLE patients, but declined in SSc patients. It was characteristic for the infiltrate components that in the early stage of the disease mast cell infiltration and degranulation did not differ in SSc and SLE patients (being abundant), while in the late stage mast cell infiltration and degranulation remained abundant in SLE patients, but declined in SSc patients. Tissue macrophage infiltration did not differ in SSc and SLE patients (being moderately abundant), but in the late stage of the disease,

tissue macrophage infiltration declined in SSc patients, while remaining similar in SLE patients to the early stage level. In studying the development of fibrosis, data was obtained that in the early stage of the disease the degree of tissue fibrosation did not differ in either SSc or SLE patients (either no or slight fibrosation), but in the late stage when massive fibrosis developed in SSc patients, the degree of tissue fibrosation remained almost unchanged in SLE patients. vWF leakage into adjacent tissues was more abundant in SSc patients than in SLE patients. Although in the late stage of the disease vWF leakage into the adjacent tissues declined in SSc patients, it remained relatively more abundant than in SLE patients. In the early stage of the disease endothelial nitric oxide synthase expression did not differ in the skin of SSc and SLE patients (being moderately abundant), but in the late stage of the disease endothelial nitric oxide synthase expression declined in the skin of SSc patients, but remained similar to the early stage level in SLE patients. Meanwhile heat shock protein (HSP) 47 expression in the early stage of the disease did not differ in SSc and SLE patients (being moderately abundant), but in the late stage heat shock protein (HSP) 47 expression in SLE patients remained similar to the early stage level, but increased in SSc patients. In addition, the location of heat shock protein (HSP) 47 expression changed in SSc patients: in the early stage it is mostly expressed in the walls of the dermal blood vessels, in the late stage in the fibroblasts. In the early and late stages of the disease, vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression was more abundant in SSc patients than in SLE patients. In SSc patients vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression was somewhat more abundant in the early stage than in the late stage. In the early and late stages of the disease, vascular endothelial growth factor VEGFR-1 (FLT-1) expression was somewhat more abundant in the skin of SSc patients than in that of SLE patients and somewhat more abundant in the early stage than in the late stage. In the early and late stages of the disease vascular endothelial growth factor receptor-2 (FLK-1) expression was more abundant in the skin of SSc patients than in that of SLE patients. In SSc patients vascular endothelial growth factor receptor-2 (FLK-1) expression did not differ in the early and late stages of the diseases. Vascular endothelial growth factor receptor-3 (FLT-4) expression was more abundant in the skin of SSc patients in the early and late stages of the disease and somewhat more abundant in the late stage than in the early stage in SLE patients.

SSc is a complex multi-system ailment with an incompletely studied pathogenesis. The increased production and accumulation of collagen and other connective tissue extracellular material develops as a consequence of an inflammatory reaction. It is not known precisely why SSc patients have more produced intercellular material components. Besides internal causes such as genetic polymorphism, a series of fibrotic mediators: PDGF, TGF- β , and CTGF participate in SSc pathogenesis.

In many works by foreign authors it has been established that damaged epithelial and/or endothelial cells secrete inflammatory mediators and initiate an antifibrinolytic reaction, which starts a blood coagulation mechanism and a temporary increase in the extracellular material components. The degranulation of the thrombocytes causes vasodilatation and increases vascular permeability. We observed this phenomenon in our research when vWF positive components initially accumulated in the lumens of the small blood vessels, later permeating to the extravascular tissues. The research by other authors shows an increased vascular permeability in the early stage of SSc that decreases in the late stage together with the density of the small blood vessels, which is also seen in our

research material. When there is increased vascular permeability, the myofibroblasts (When activated, fibroblasts abundantly produce α -SMA+ collagen.), epithelial cells, and endothelial cells produce membrane-destroying matrix metalloproteinase enzymes (MMPs), as a consequence of which vascular permeability further increases. The adjacent lymphocytes and other cells begin to produce profibrotic cytokines, such as TGF- β , IL-13, and PDGF, which further activate nearby macrophages and fibroblasts. The cytokines and chemokines produced at the site attract new endothelial cells. When the myofibroblasts produce more collagen than is degraded, the collagen accumulates and fibrosis develops. Under such conditions the collagen at the site of the damage increases and increases. In our research, the skin biopsy sections, stained with histochemical picrosirius and studied using a polarised microscope, repeated an analogous situation: the early stages of the disease were characterised by the accumulation of freshly synthesised collagen. The skin biopsy sections, taken from patients in the late stage of SSc, stained histochemically with picrosirius, and studied using a polarised microscope, demonstrated massive aggregates of thick, nodose, old synthesised collagen fibres. The fibre quantity and diameter depended on the stage of the disease. The epidermis and skin appendages were atrophied. Advanced fibrosis is usually already hypocellular and therefore it is thought that it is irreversible since no cells producing MMPs remain. Although there is a hypothesis about the reversibility of fibrosis, in our SSc research advanced fibrosis was hypocellular and we think that it is irreversible.

The hypothesis about the differentiation of non-fibrotic cell lines into profibrotic mesenchymal cells is finding ever wider recognition in explaining SSc pathogenesis. The latest research is providing a great deal of data about intracellular signalling pathways regulating the fibrotic process and tissue damage during SSc.

According to data from other authors, in the later stages of SSc the number of mast cells decreases in the skin, while in the early stage it is greater than in healthy skin. Our observations confirm that there are more mast cells and they degranulate more intensively in the early stage of SSc. During SSc, mastocyte degranulation causes interstitial oedema, which we also observed in our research. Later, the elastic fibres in the papillary layer of the skin disappear during SSc, there are also no reticular fibres there, and the collagen fibres become heterogeneous. Our electron microscope research showed the heterogeneity of the collagen fibres and that the fibres were thicker in the late stage of SSc.

Our research showed early vascular damage during SSc. Later, during the progression of the fibrosis and the decline in the fibre density, the number of permeable blood vessels declined and the network of small blood vessels thinned out. The significance of the endothelial cells in SSc pathogenesis has so far not been sufficiently clear. On the one hand, the endothelial cells become the target of immune activity during SSc, and they can also act as additional immune stimulators. Vascular damage during SSc leads to hypoxia, ischemia, and vascular occlusion. In our research we observed high eNOS activity in the early stage of SSc that weakened as the fibrosis progressed.

Heat shock protein (HSP) 47 is a collagen-specific molecular chaperone, located in the endoplasmic network and plays an important role in the synthesis of dermal fibroblast collagen. According to data from other authors, during SSc the increase in HSP-47 expression coincides with an increase in collagen synthesis, which is confirmed by the immunohistochemical data we obtained. It is thought that HSP-47 is a reliable

IHC sign of activated fibroblasts when using routine histological sections. HSP-47 causes increased collagen synthesis, secretion, and accumulation in fibroblasts and also increases the free radicals. In our research we established an increase in HSP-47 activity in the fibroblasts in the late stages of SSc. This means that significant fibrosation appears as the disease progresses, but not at the onset of the disease. Meanwhile in the early stages of SSc, HSP47 activity was significantly greater on the endotheliocytes. Keeping in mind that HSP47 is a collagen-specific protein that stimulates fibrosis, the difference in its location on endotheliocytes in the early stage of SSc and on fibroblasts in the late stage of SSc is very significant in our opinion.

Our observations confirm the works of those authors which show that SSc begins in the blood vessels, first of all from changes in the capillaries, and later fibrosis develops through vascular occlusion. In part it is not essential to investigate which causes initiate the chain of damage in the endotheliocytes that is characteristic of SSc. Many authors focus on ET-1, TGF- β , MMPs, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) and inflammatory mediators, interleukin and chemokine, and molecules which were not studied in our research; we used the corresponding data of other authors.

Healthy endothelium functions as a reliable barrier between the circulating blood and the adjacent tissues, ensures the possibility of an exchange of materials and does not allow the blood to coagulate. The endotheliocyte layer in the blood vessels is a semi-permeable barrier located on the boundary between the blood vessel lumen and the perivascular tissues (Bazzoni 2006; Mackiewicz et al. 2002 a). During SSc, vascular pathology is connected with the damaged vascular functions: increased vasospasm, reduced vasodilatation, and increased adhesion of the walls for thrombocytes and lymphocytes. We observed this through the increase in vWF expression in the blood vessel lumens in the early stage of SSc. Von Willebrand factor (vWF) is a large multimer glycoprotein, produced in endothelial Weibel-Palade bodies. Our data confirmed the clear leakage of von Willebrand factor in the external vicinity of the blood vessels and shows an increase in the permeability of the blood vessel walls especially in the skin of SSc patients.

The most distinct SSc damage of the blood vessels is visible in the capillaries and small blood vessels. The capillary damage is described as deformed and abnormal loops. In our research the expression of this process is seen in forming the bushy capillaries in the early stage of SSc.

Conclusions

1. Damage to the vascular endothelium and increased permeability of the vascular walls appears earlier than expressed fibrosis in the skin of SSc patients. Fibrosation of the dermal blood vessels and vascular atresia are encountered in the later stages of SSc, meanwhile these signs are indistinct in SLE and RP patients.
2. The abundant expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and its receptor FLT-1 and especially HSP-47 (heat shock protein, a collagen-specific chaperone that induces fibrosis), and eNOS endothelial nitric oxide synthase are immunohistochemical signs of endothelial injury in the early stage of SSc. CD34 (an endothelial sign) is expressed relatively uniformly in the skin of SSc and SLE patients, but more strongly in the early stages of both diseases.
3. The increased permeability of the dermal vascular walls is shown by the spread of the vWF sign in the perivascular tissues that appears in the early stage of SSc and

only slightly decreases in the late stage, but remains more frequent than for SLE patients.

4. Third degree dermal vasculitis with an abundance of macrophages (CD68) characteristic of inflammatory infiltrate correlated with vWF leakage to the adjacent perivascular tissue, and with the infiltration and degranulation of the mast cells. In the early stages of SSc and SLE the histological signs of vasculitis did not differ, but they significantly decreased in the late stage of SSc, while remaining very expressed in the skin of patients in the late stage of SLE.
5. vWF aggregates in the blood vessel lumens, HSP-47 expression in subcutaneous fibroblasts, and the close contacts of activated fibroblasts with degranulating mast cells are immunohistochemical and ultrastructural signs of fibroblast injury and the late stage of SSc, which confirm the atresia and massive fibrosation of the skin and its blood vessels, which distinguishes SSc from SLE.

Practical recommendations

1. A skin biopsy as an auxiliary diagnostic method is suitable for differentiating between the early stages of SSc, SRV, and RP.
2. In the pathogenesis of the early stage of SSc, damage to the small blood vessels predominates in the skin. It is expedient to consider this when prescribing treatment for SSc based on pathogenesis.

Publications:

1. Mackiewicz Z, Stepaniuk M, Mackevicius Z, Jr, **Rimkevičius A**. Apoptosis and aging. *Gerontologija* 2001; 2(3): 170-5.
2. Mackiewicz Z, Povilenaitė D, Minderis M, Gražienė V, **Rimkevičius A**, Konttinen Y. Angiogenic stimuli in cystic tumoral calcinosis (Teutschländer Disease). *Case Rep Clin Pract Rev* 2002; 3(2): 76-81.
3. Mackiewicz Z, **Rimkevičius A**, Petersen J, Dudek E, Andersen CM, Vytrasova M, Konttinen YT. Macrophages overloaded with tissue debris in Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1229-32. (ISI).
4. Dadonienė J, Kirdaitė G, Mackiewicz Z, **Rimkevičius A**, Venalis A, Haugeberg G. The incidence and clinical manifestations of primary systemic vasculitides in Vilnius: a university hospital population based study. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(2): 335-6. (ISI).
5. **Rimkevičius A**, Mackiewicz Z. Mast cells in the inflammatory connective tissue diseases. *Acta medica Lituanica* 2006;13(2):77-82.

SUMMARY IN LITHUANIAN

Tekste naudojamų trumpinių sąrašas

α -SMA – lygiųjų raumenų alfa aktinas
CD34 – diferenciacijos grupė 34
CD68 – diferenciacijos grupė 68
CTGF – jungiamojo audinio augimo veiksnys
DR3 – serotipinė HLA reprezentacija
DR5 – serotipinė HLA reprezentacija
eNOS – endotelinė azoto oksido sintazė
ET-1 – endotelinas -1
HLA – žmogaus leukocitų antigenas
HSP47 – karščio šoko proteinas 47
IL-13- interleukinas 13
MMP- matrikso metaloproteinazės
PBS – fiziologinis tirpalas su fosfatinu buferiu
PDGF- trombocitų sintezuojamas augimo veiksnys
RP – Reino sindromas
SRV – sisteminė raudonoji vilkligė
SSc – sisteminė sklerozė
TGF- β – transformuojantis augimo veiksnys beta
TIMP – audinių metaloproteinazių inhibitorius
VEGF – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys
VEGFR – kraujagyslių endotelio augimo veiksnio receptoriai
vWF – von Willebrand'o veiksnys

Ižanga

Sisteminė sklerozė (SSc) - tai pirminė idiopatinė odos ir vidaus organų fibrozė, susijusi su sutrikusia fibroblastų bei smulkių kraujagyslių veikla. Kiekvienam SSc ligoniui kartu su įvairaus laipsnio fibroze ir kraujagyslių pažeidimu randami imuniniai sutrikimai. Minėtų pažeidimų laipsnis dažniausiai būna nevienodas. Pilnai nežinoma, kuris iš išvardintų pažeidimų ligą inicijuoja, o kuris atsiranda kaip pasekmė. Kraujagyslių pakitimai ir endotelio pažeidimas paprastai stebimi jau ankstyvoje SSc stadijoje. Sergant SSc vyrauja du klinikiniai procesai: 1 - jungiamojo audinio išvešėjimas, lydymas organų parenchimos atrofijos; 2 - išemija dėl kraujagyslių sklerozės bei vėlesnės jų atrezijos. Iki klinikinės SSc stadijos diagnozuoti beveik neįmanoma, tuo tarpu ankstyvos gydymo priemonės galėtų būti efektyvesnės lyginant su dabartiniais rezultatais. Kol kas visiškai pagydyti nuo SSc dar neįmanoma. Šios ligos biologinio proceso gilesnis pažinimas galėtų atverti naujas gydymo galimybes. Pasaulyje per metus SSc suserga apie 20 milijonų žmonių (Karassa, Ioannidis 2008), Lietuvoje - keliasdešimt žmonių. Ligą provokuoja daugybė veiksnių: peršalimas, nepalankios aplinkos sąlygos, vibracija, darbas plastmasių pramonėje, ypač su poliviniliniiais spiritais. Turi reikšmės ir genetiniai faktoriai: aptinkamas šeiminis sergamumas, nustatytas ryšys su II klasės HLA (DR3, DR5).

Sergant SSc pažeidžiami įvairūs organai, todėl ši liga domina keletu specialybių gydytojus. Pains SSc etiologija, sudėtinga patogenezė ir bloga prognozė daro SSc aktuali tyrimų objektu.

Darbo aktualumas

Sisteminės uždegiminės jungiamojo audinio ligos priklauso reumatinių ligų grupei. Tai ligos, kurioms būdingas sisteminis jungiamojo audinio ir judamojo aparato pažeidimas. Jos pasižymi įvairialype klinika, etiologija ir patogenezė. Sisteminiams jungiamojo audinio ligoms priklauso sisteminė sklerozė (SSc) bei sisteminė raudonoji vilkligė (SRV, SRV). Šioms ligoms diagnozuoti taikomas ir biopsinės medžiagos histologinis tyrimas. Tokiame tyrime svarbią reikšmę vaidina kraujagyslių pažeidimo histopatologinių požymių nustatymas.

Labai svarbu, siekiant laiku skirti tinkamą gydymą, ankstyvose ligos stadijos atskirti SSc nuo RP ir SRV. Taip pat labai svarbu žinoti patologinių procesų vystymosi eiliškumą, kurį ir bando nušviesti šis tyrimas.

Lyginant su kitomis jungiamojo audinio ligomis, SSc yra reliatyviai retas susirgimas: sergamumas apie 105-290 sergančiųjų milijonui gyventojų, susirgimo dažnis nuo 2,6 iki 28 /milijonui/ per metus (Silman 1997; Maricq et al. 1989; Medsger et al. 1971; Altman et al. 1991; Silman et al. 1988; Hausteina, Albrecht 1993; Mayes et al. 2003). Metinis mirštamumas nuo SSc: 0,8-3,8 mirčių milijonui gyventojų (Medsger 1985).

Išgyvenamumas 5 ir 10 metų atitinkamai yra apie 86% ir 69% (Hesselstrand et al. 1998). Dauguma pacientų miršta nuo kardiopulmoninių ir renalinių komplikacijų. Dėl blogos SSc prognozės ir nepakankamai efektyvaus gydymo, šios ligos nauji tyrimai lieka labai aktualūs.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas – nustatyti kraujagyslių pažeidimo ir fibrozės vystymosi eiliškumą, ištiriant kraujagyslių pakitimus odoje ir jungiamajame audinyje sergantiems SSc, su šiais patologijai būdinga kraujagyslių atrezija, bei palyginant su kitomis būklėmis, kurių metu kraujagyslių atrezijos nėra (SRV), bei su būklėmis, kurioms būdingas kraujagyslių funkcinis nestabilumas (Reino sindromas).

Uždaviniai:

1. Nustatyti vyraujančius histopatologinius pokyčius ir jų vystymosi eiliškumą odoje sergantiems SSc lyginant su pokyčiais sergantiems SRV ir RP.
2. Nustatyti histologinius, ultrastruktūrinius, histocheminius ir imunohistocheminius žymenis, geriausiai atspindinčius ankstyvą ir vėlyvą SSc stadijas ir palyginti šių žymenų ekspresiją odoje su jų ekspresija SRV ligonių odos biopsijose.
3. Palyginti kraujagyslių sienelės ir perivaskulinių audinių uždegiminio infiltrato ląstelinę sudėtį ankstyvoje ir vėlyvoje SSc ir SRV stadijose.
4. Palyginti SSc ir SRV ligų vėlyvą stadiją, lydimą fibrozės, ir/ar kraujagyslių atrezijos išreikštumą, siekiant nustatyti šių ligų patogenezės eigos skirtumus

Darbo naujumas:

1. Imunohistocheminių endotelio žymenų eNOS, VEGF, VEGFR ir vWF analizė padeda nustatyti ankstyvus ryškius kraujagyslių endotelio pažeidimus ir diferencijuoti juos nuo SRV ir RP.
2. Imunohistocheminių endotelio žymenų eNOS, VEGF, VEGFR ir vWF analizė padeda diferencijuoti SSc nuo SRV ir RP ankstyvoje ligos stadijoje.
3. Nustatėme, kad ankstyvosios SSc stadijos patogenezėje odoje vyrauja smulkių kraujagyslių endotelio pažeidimai, o histologiniai ir ultrastruktūriniai fibroblastų pažeidimo požymiai pradeda ryškėti jau po kraujagyslių endotelio pažeidimo.

Ginamieji teiginiai:

1. SSc vystymosi metu smulkių kraujagyslių pažeidimas odos biopsijose atsiranda anksčiausiai, audinių fibrozavimas atsiranda vėliau ir rodo toli pažengusią ligą.
2. Organizmo homeostazę užtikrinančių sistemų pastangos atstatyti pažeistas SSc eigoje kraujagysles yra ženklios, tačiau dėl kol kas nenustatytų priežasčių kraujagyslių tinklas neatsistato, o audinio fibrozė toliau progresuoja.
3. Naudojant imunohistocheminius kraujagyslių pažeidimo žymenis odos biopsiatuose galima nustatyti ankstyvuosius kraujagyslių pažeidimus, būdingus SSc, SRV ir RP.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Ištirta po 20 SSc, SRV ir Reino sindromu sergančių ligonių odos biopsijų, atliktų 1995-2004 metais Vilniaus Universiteto Medicinos Fakulteto Reumatologijos klinikoje (Lentelė 1). 20 atitinkamo amžiaus nesergančių sisteminiams susirgimams žmonių atitinkamos lokalizacijos odos mėginiai buvo analizuojami kaip kontroliniai. Visos SSc, SRV ir Reino sindromo diagnozės buvo patvirtintos kliniškai ir laboratorinių, imunologinių bei molekulinės diagnostikos tyrimų duomenimis. Ligos pradžia buvo skaičiuojama nuo laiko, kai ligoniui buvo diagnozuotos tiriamos ligos pagal naudotus klasifikacinius kriterijus. Visi SSc ligoniai atitiko ARC klasifikacinius kriterijus (Subcommittee for Scleroderma criteria of American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23:581-90) ir vėlesnius kriterijus (LeRoy et al. 1988). Sistemines raudonosios vilkligės diagnozė nustatyta remiantis Amerikos reumatologų kolegijos (ARC) 1982 m. patikslintais SRV klasifikacijos kriterijais (Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7). Reino sindromas diagnozuotas remiantis Amerikos reumatologų kolegijos (ARC) 1992 m. RF klasifikacijos kriterijais (Leroy EC, Medsger TA Jr. Raynaud's phenomenon: A proposal for classification. *Clin Exp Rheumatol* 1992;10:485-8.)

Ankstyva ligos stadija buvo apibrėžiama kaip laikotarpis nuo diagnozės nustatymo iki 3 metų. SSc, SRV ir RP grupės buvo formuojamos taip, kad kiekvienoje ligonių grupėje būtų po 10 ankstyvos ir 10 vėlyvos ligos stadijų ligonių.

Visos ligonių biopsijos buvo paimtos Vilniaus Universiteto Medicinos fakulteto Reumatologijos katedros gydytojų diagnostikos tikslais, esant klinicinei būtinybei. Kontroliniai odos pavyzdžiai buvo paimti autoriaus iš Vilniaus miesto universitetinės ligoninės chirurgijos skyrių ligonių, kuriems nebuvo diagnozuota jokia sisteminė liga, autopsinės medžiagos, atliekant autopsijas pagal klinικές ir medicinos teisės indikacijas. Odos biopsijos buvo apdorotos Vilniaus Universiteto Eksperimentinės ir klininės medicinos instituto Patologijos laboratorijoje, parafininiai pjūviai buvo dažyti hematoksilinu ir eozinu, histocheminiais bei imunohistocheminiais metodais. Autorius atliko mikropreparatų vertinimą ir duomenų interpretavimą. Trys ankstyvos SSc stadijos odos biopsijos buvo ištirtos elektroniniu mikroskopu Vilniaus Universiteto Eksperimentinės ir klininės medicinos instituto Patologijos laboratorijoje, autorius atliko elektroninės mikroskopijos nuotraukų vertinimą ir duomenų interpretavimą. Lentelė 1. Tirtų ligonių pasiskirstymas pagal amžiu ir lytį.

Liga	Ligonių skaičius	Amžiaus vidurkis
SSc	20 (vyrų 1, moterų 19)	46.55 ± 10.87
SRV	20 (vyrų 2, moterų 18)	39.18 ± 11.55
RP	20 (vyrų 3, moterų 17)	37.02 ± 13.03
Sveiki asmenys (kontrolė)	20 (vyrų 3, moterų 17)	47.26 ± 14.05

Tirti mėginiai buvo dažomi standartiniu rutininiu histologiniu dažymo būdu - hematoksilinu ir eozinu. Vaizdo analizė bei fotografavimas atlikti šviesiniu mikroskopu Olympus BX51.

Tirti preparatai buvo nudažyti šiais standartiniais histocheminiais būdais: Pikrino rūgšties ir sirius red mišiniu (pikrosirius) – jungiamojo audinio skaiduliniam komponentams ir analizei tamsiame poliarizuojančio mikroskopo lauke.

Toluidino mėliu, pH 2.0 – putliųjų ląstelių ir jungiamojo audinio matrikso baltymų- proteoglikanų analizei.

Imunohistocheminiam dažymui buvo naudojami En-Vision vizualizacijos rinkiniai (DAKO).

Elektroninio mikroskopinio tyrimo metu vaizdo analizė bei fotografavimas atliktas elektroniniu mikroskopu JEM 100-B.

Histopatologiniai šviesos bei elektroninės mikroskopijos vaizdai buvo vertinami kokybinės analizės būdu.

Pusiau kiekybinei analizei imunohistocheminiai žymenys buvo vertinami keturių taškų (balų) sistema: 0 – nėra žymens, 1 – pavieniai žymenys, 2 – daugiau žymenų, 3 – labai daug žymenų. Kiekybinis vertinimas atliktas naudojant „ANALYSIS“ kompiuterinę programą. Preparatai buvo fotografuoti naudojant šviesos bei poliarizacinį Olympus BX51 mikroskopą ir Nikon DXM 2000 vaizdo kamerą.

Statistinė duomenų analizė atlikti naudojant kompiuterinės statistikos programą SPSS for Windows (versija 12.0). Apskaičiuoti normaliųjų parametrų reikšmių vidurkiai (V) su standartiniais nuokrypiais (SN). Nominaliųjų duomenų skirtumo statistinis reikšmingumas nustatytas pagal Chi kvadratu (χ^2) kriterijų, normaliųjų kiekybinių duomenų vidurkių skirtumas dviems nepriklausomoms imtims – naudojant Stjudento t kriterijų, normaliųjų kiekybinių duomenų vidurkių skirtumas trims nepriklausomoms imtims – vienfaktorinę dispersinę analizę ANOVA. Ranginių duomenų skirtumo statistinis reikšmingumas esant dviems nepriklausomoms imtims nustatytas naudojant Mano – Vitnio - Vilkoksono (Mann-Whitney – Wilcoxon) kriterijų.

Pasirinktas reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$, kuriame rezultatai laikyti statistiškai patikimais.

Tyrimų rezultatai

Ankstyvoje SSc stadijoje buvo stebimi neutrofilų, limfocitų, monocitų, histiocitų ir pavienių plazmocitų infiltratai apie kraujagysles ir ekrininių prakaito liaukų latakus. Vietomis panašūs infiltratai buvo stebimi intersticiume ir poodiniame riebaliniame audinyje.

Ligai progresuojant, mažėjo odos kraujagyslių tinklo tankumas bei visų ląstelių bendras kiekis, tačiau gausėjo jungiamojo audinio ekstraląstelinio matrikso, ypač skaidulinio kolageno. Fibroblastai buvo hiperfunkciški bei edemiški. Elastinės skaidulos buvo fragmentuotos. Kolageno skaidulos buvo edemiškos ir nevienodo skersmens. Tarp kolageninių skaidulų buvo edema.

Vėlesnėse SSc stadijose uždegiminių infiltratų sumažėjo arba jie beveik visiškai išnyko. Buvo stebima ryški speninio odos sluoksnio redukcija. Kraujagyslių sienelės sustorėdavo, atsirasdavo hialinozė bei nekrozė spindžiai siaurėjo, laipsniškai vystėsi devaskuliarizacija.

Kolageno skaidulos palaipsniui storėjo ir tankėjo. Vėlesnėse SSc stadijose sumažėjo fibroblastų. Ekrininės prakaito liaukos tapo atrofiškos dėl supančios fibrozės ir dėstėsi tik viršutiniame dermos sluoksnyje. Išreikštas kolageno ir kitų ekstraląstelinio matricos baltymų kaupimasis pirmiausiai buvo matomas retikulinės dermos ir poodžio ribose. Ankstyvojoje sisteminės sklerozės stadijoje elektroniniu mikroskopu buvo matomos plonos, naujai sintezuotos 10-30 nm kolageno fibrilės. Vėliau vyravo didesnio skersmens fibrilės. Tai rodė kolageno brendimą. Ultrastruktūrinė kraujagyslių analizė parodė endotelio ląstelių pažeidimą, jų vakuolizaciją, hialinizaciją bei nekrozę, o taip pat pericitų ir fibroblastų endoplazminio tinklo aktyvaciją. Ankstyvojoje stadijoje buvo stebima gana gausi infiltracija putliosiomis ląstelėmis, aptinkamomis glaudžiamame kontakte su fibroblastais bei pažeistomis kraujagyslėmis ir limfagyslėmis. SRV atvejais kraujagyslių sienelėse ir perivaskuliariai buvo įvairaus laipsnio audinių edema ir uždegiminių ląstelių infiltracija. Reino sindromo atvejais rasdavome arterijų susitraukimo požymių, tačiau vaskulito požymių nebuvo arba jie buvo nežymūs. Vaskulito požymiai labiau buvo išreikšti SSc atvejais, ir ypač ankstyvoje ligos stadijoje (Lentelė 2).

Lentelė 2. Vaskulito aktyvumo (pagal histopatologinius požymius) pasiskirstymas odoje SSc ankstyvoje ir vėlyvoje stadijose, SRV bei RP atvejais.

Liga	Vaskulito aktyvumas			
	0	1	2	3
SSc N=20	0/0	1/1	3/8	6/1
SRV N=20	0/0	3/1	2/4	5/5
RP N=20	5/2	5/8	0/0	0/0
Kontrolė N=20	20	0	0	0

Lyginimas	P
SSc – SRV	0,789
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV – RP	<0,0001
SRV – Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	<0,0001

Paaiškinimai: „0“ = nėra vaskulito požymių; „1“ = endotelio edema, palei kraujagyslę pavieniai neutrofilai; „2“ = endotelio edema, palei kraujagyslę negausi neutrofilų, makrofagų, limfocitų infiltracija; „3“ = endotelio pažeidimai, palei kraujagyslę gausi infiltracija uždegiminėmis ląstelėmis; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

Antrinio vaskulito aktyvumas tiesiogiai koreliavo su vWF prasisunkimu į audinius, kuris patikimai didesnis SSc sergantiems ligoniams (Lentelė 5).

Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje vaskulito aktyvumas SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė, o vėlyvoje stadijoje SRV ligonių odoje vaskulito aktyvumas išliko aukštas, o SSc – mažėjo.

Pikrosiriusu dažytuose histologiniuose preparatuose, analizuojamuose poliarizuotoje šviesoje, plonos, neseniai sintezuotos kolageninės skaidulos švyti žalia spalva, o storos bei subrendusios kolageninės skaidulos švyti raudonai. Ankstyvojoje SSc stadijoje rasdavome daug žaliai švytinčių kolageninių skaidulų, o vėlesnėse stadijose dominavo raudonos skaidulos.

SRV bei Reino sindromo atvejais švytėjimas nesiskyrė nuo kontrolės atvejų. Tačiau Reino sindromo atvejais būdavo ryškiai susitraukusių arterijų.

Kraujagyslių fibrozavimas lydymas atrezijos dažniausiai buvo aptinkamas SSc vėlesnėse stadijose, tuo tarpu SRV ir Reino sindromo atveju ryški fibrozė nebuvo neaptinkama (Lentelė 3).

Lentelė 3. Odos audinių fibrozavimas sergantiems SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Liga	Fibrozavimo laipsnis			
	0	1	2	3
SSc N=20	5/0	4/0	1/1	0/9
SRV N=20	7/2	3/8	0/0	0/0
RP N=20	6/2	4/8	0/0	0/0
Kontrolė N=20	20	0	0	0

Lyginimas	p
SSc – SRV	0,004
SSc- RP	0,006
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV- RP	0,752
SRV- Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	<0,0001

Paaškinimas: “0” = nėra fibrozavimo požymių; “1” = plonų, pikrosiriusu dažytų, stebint poliarizuotoje šviesoje švytinčių žalia spalva skaidulų nežymus pagausėjimas; “2” = pikrosiriusu dažytų, poliarizuotoje šviesoje švytinčių žalia bei raudona spalva skaidulų pagausėjimas; “3” = gausu storų, raudonai švytinčių kolageninių skaidulų, dažytų pikrosiriusu; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje audinių fibrozavimo laipsnis nei SSc, nei SRV ligoniams nesiskyrė (fibrozavimo arba nebuvo, arba jis buvo nežymus), o vėlyvoje stadijoje tuo metu kai SSc ligoniams vystėsi masyvi fibrozė,

Toluidino mėlio dažymas išryškino putliasias ląsteles, kurios išsiskirdavo violetine spalva. Lyginant su kontrole, putliųjų ląstelių buvo gausiau ir jos intensyviau degranuliuodavo ankstyvoje SSc stadijoje, jų ryškiai sumažėjo fibrozės stadijoje. (Lentelė 4).

Lentelė 4. Odos putliųjų ląstelių infiltracijos gausa ir degranuliacija sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Liga	Putliųjų ląstelių infiltracija			
	0	1	2	3
SSc N=20	0/0	1/8	2/2	7/0
SRV N=20	0/0	2/3	3/3	5/4
RP N=20	0/0	8/9	2/1	0/0
Kontrolė N=20	0	20	0	0

Lyginimas	p
SSc – SRV	0,285
SSc- RP	0,004
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV – RP	<0,0001
SRV – Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	0.075

Paaškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje putliųjų ląstelių infiltracija ir degranuliacija SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo gausi), o vėlyvoje stadijoje SRV ligoniams putliųjų ląstelių infiltracija ir degranuliacija išliko gausi, o SSc ligoniams – mažėjo.

Sveikų odos biopsijų analizės atvejais šis veiksnys buvo stebimas tik kraujagyslių spindžio ribose bei kraujagyslių sienelėse, iš esmės intimoje. Tiriamųjų grupių odos biopsijose vWF skverbėsi į kitus kraujagyslių sienelių sluoksnius ir net išsiliedavo į ekstravaskulinę erdvę (lentelė 5). Pagal vWF lokalizaciją galima buvo spręsti apie kraujagyslių struktūrinius pokyčius.

Lentelė 5. vWF nutekėjimas iš kraujagyslių spindžio į aplinkinius audinius SSc, SRV ir RP ligonių odoje, lyginant su kontrole

Liga	vWF nutekėjimas			
	0	1	2	3
SSc N=20	0/2	4/9	3/1	3/0
SRV N=20	2/4	7/5	1/1	0/0
RP N=20	10/10	0/0	0/0	0/0
Kontrolė N=20	20	0	0	0

Lyginimas	p
SSc – SRV	0,25
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	<0,0001
SRV - Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	1.0

Paaiškinimai: „0“ = nėra vWF nutekėjimo; „1“ = negausus vWF nutekėjimas šalia kraujagyslės sienelės; „2“ = negausus vWF nutekėjimas per keliasdešimt mikrometrų nuo kraujagyslės sienelės; „3“ = gausūs vWF išsiliejimai; “/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje vWF nutekėjimas į aplinkinius audinius SSc ligoniams buvo gausesnis, lyginant su SRV, ir nors vėlyvoje ligos stadijoje SSc ligoniams vWF nutekėjimas į aplinkinius audinius mažėjo, jis išliko santykinai gausesnis, negu SRV ligonių.

Pavienės ląstelės su CD68 teigiamu IHC žymeniu buvo randamos sveikų odos biopsijose ir Reino sindromo atvejais. Jos buvo lokalizuotos intersticiume kaip įprastiniai intersticiniai makrofagai. Gausus CD68 teigiamų ląstelių infiltratus kraujagyslių sienelėse bei palei kraujagyslius SRVs rasdavome ankstyvoje SSc stadijoje ir SRV atvejais (lentelė 6).

Lentelė 6. Audinių makrofagai

Liga	CD68 ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	2/6	4/4	4/0
SRV n=20	0/0	2/3	4/5	4/2
RP n=20	0/0	9/9	1/1	0/0
Kontrolė n=20	0	20	0	0

Lyginimas	p
SSc – SRV	0,298
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	<0,0001
SRV - Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	1.0

Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija.

Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje audinių makrofagų infiltracija SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo vidutiniškai gausi), o vėlyvoje ligos stadijoje SSc ligoniams audinių makrofagų infiltracija mažėjo, o SRV ligoniams išliko panaši kaip ankstyvoje stadijoje.

Endotelinė azoto oksido sintazė buvo nežymiai išreikšta sveikų žmonių odos biopstatuose, tačiau jos ekspresija buvo daug ryškesnė SSc, ypač ligos vėlyvoje stadijoje bei SRV atvejais (lentelė 7).

Lentelė 7. Endotelio azoto oksido sintazės ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Liga	Endotelinės azoto oksido sintazės III (eNOS) ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	4/8	6/2	0/0
SRV n=20	0/0	2/3	8/7	0/0
RP n=20	0/0	9/10	1/0	0/0
Kontrolė n=20	0	20	0	0

Lyginimas	p
SSc – SRV	0,27
SSc- RP	0,009
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	<0,0001
SRV - Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	0.317

Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieni specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje endotelio azoto oksido sintazės ekspresija odoje SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo vidutiniškai gausi), o vėlyvoje ligos stadijoje SSc endotelio azoto oksido sintazės ekspresija odoje mažėjo, o SRV ligoniams išliko panaši kaip ankstyvoje stadijoje.

Nežymi terminio šoko proteino HSP-47 ekspresija buvo nustatyta 25% sveikų žmonių odos biopsijose. Žymesnė HSP-47 ekspresija odoje buvo randama SRV atvejais, tačiau labiausiai HSP-47 pasireiškėdavo SSc eigoje, ypač ankstyvoje ligos stadijoje (lentelė 8).

Lentelė 8. Terminio šoko proteino HSP-47 ekspresija SSc, SRV ir RP ligonių odoje lyginant su kontrole

Liga	Terminio šoko proteino HSP-47 ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	4/2	6/3	0/5
SRV n=20	0/0	5/4	5/6	0/0
RP n=20	7/8	3/2	0/0	0/0
Kontrolė n=20	16	4	0	0

Lyginimas	p
SSc – SRV	0,086
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	<0,0001
SRV - Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	0.708

Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija.

Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje terminio šoko proteino HSP-47 ekspresija SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo vidutinio gausumo), o vėlyvoje stadijoje SRV ligoniams HSP-47 ekspresija išliko panaši kaip ir ankstyvoje, o SSc ligoniams – pagausėjo. Be to, SSc ligoniams keitėsi terminio šoko proteino HSP-47 ekspresijos lokalizacija – ankstyvoje stadijoje labiausiai išreikšta odos kraujagyslių sienelėse, vėlyvoje – fibroblastuose.

CD34 buvo randamas daugumoje sveikų žmonių odų biopsijose, tačiau jo ekspresija buvo ryškesnė SRV atvejais. Labiausiai CD 34 buvo išreikštas SSc metu, ligos ankstyvojoje stadijoje (lentelė 9).

Lentelė 9. CD34 ekspresija odoje sergantiems SSc, SRV ir RP, palyginus su kontrole.

Liga	CD34 ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/1	4/7	6/3	0/0
SRV n=20	0/0	7/6	3/4	0/0
RP n=20	2/2	8/8	0/0	0/0
Kontrolė n=20	3	17	0	0

Lyginimas	P
SSc – SRV	0,524
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	0,001
SRV - Kontrolė	0.001
RP- Kontrolė	0.681

Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija.

Iš duomenų palyginimo matome, kad ir ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje CD34 ekspresija SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė, ankstyvoje stadijoje buvo santykinai gausesnė, vėlyvoje – santykinai mažesnė.

Nežymi kraujagyslių augimo veiksnio ekspresija buvo aptinkama dalies sveikų žmonių odos biopsijose. Didžiausia VEGF-A ekspresija pasireiškė ankstyvoje SSc stadijoje (lentelė 10).

Lentelė 10. Kraujagyslių augimo veiksnio VEGF-A ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Liga	Kraujagyslių augimo veiksnio (VEGF-A) ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	3/5	5/5	2/0
SRV n=20	3/3	6/3	1/4	0/0
RP n=20	5/5	5/5	0/0	0/0
Kontrolė n=20	13	7	0	0

Lyginimas	P
SSc – SRV	0,04
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV – RP	0,009
SRV – Kontrolė	0.198
RP- Kontrolė	0.061

Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

Iš duomenų palyginimo matome, kad ir ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo veiksnio VEGF-A ekspresija SSc ligoniams buvo gausesnė nei SRV ligoniams. SSc ligoniams kraujagyslių augimo veiksnio VEGF-A ekspresija kiek gausesnė ankstyvoje stadijoje, lyginant su vėlyva.

Kraujagyslių augimo veiksnio receptorių 1 (FLT-1) buvo nežymiai išreikštas sveikų žmonių odos biopsijose. Ryškiausia šio receptoriaus ekspresija buvo stebima odoje SSc ankstyvojoje stadijoje (lentelė 11).

Lentelė 11. VEGFR-1 receptoriaus-1 (FLT-1) ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Liga	VEGFR-1 (FLT-1) ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	3/6	5/4	2/0
SRV n=20	3/3	6/6	1/1	0/0
RP n=20	5/5	5/5	0/0	0/0
Kontrolė n=20	12	8	0	0

Lyginimas	P
SSc – SRV	<0,0001
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV – RP	0,220
SRV – Kontrolė	0,077
RP- Kontrolė	0,530

Paaškinimas: „0“ = nėra specifiskai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiskai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiskai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiskai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija.

Kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus 2 (FLK-1) nežymi ekspresija buvo aptinkama sveikų žmonių odos biopatuose. Ryškiausia FLK-1 ekspresija buvo stebima ankstyvojoje vėlyvojoje SSc stadijoje (lentelė 12).

Lentelė 12. Kraujagyslių augimo faktoriaus receptoriaus-2 (FLK-1) ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Liga	VEGFR-2 (FLK-1) ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	8/8	2/2	0/0
SRV n=20	3/2	7/8	0/0	0/0
RP n=20	6/5	4/5	0/0	0/0
Kontrolė n=20	14	6	0	0

Lyginimas	P
SSc – SRV	0,005
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	0,056
SRV - Kontrolė	0,005
RP- Kontrolė	0,333

Paaškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija.

Kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus 3 (FLT-4) nežymi ekspresija buvo aptinkama dalyje sveikų žmonių odos biopsijų. Žymiausia šio veiksnio ekspresija buvo stebima ankstyvojoje vėlyvojoje SSc stadijoje (lentelė 13).

Lentelė 13. Kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-3 (FLT-4) ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole.

	VEGFR-3 (FLT-4) ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	8/6	1/4	1/0
SRV n=20	3/4	7/6	0/0	0/0
RP n=20	7/8	3/2	0/0	0/0
Kontrolė n=20	16	4	0	0

Lyginimas	P
SSc – SRV	<0,0001
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	0,012
SRV - Kontrolė	0.004
RP- Kontrolė	0.708

Paaškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija.

Iš duomenų palyginimo matome, kad ir ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo faktoriaus VEGFR-1 (FLT-1) ekspresija SSc ligonių odoje buvo gausesnė nei sergančių SRV ir kiek gausesnė ankstyvoje stadijoje, lyginant su vėlyva.

Ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo faktoriaus receptoriaus-2 (FLK-1) ekspresija SSc ligonių odoje buvo gausesnė nei sergantiems SRV. SSc ligoniams kraujagyslių augimo faktoriaus receptoriaus-2 (FLK-1) ekspresija ankstyvoje ir vėlyvoje stadijoje nesiskyrė.

Ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-3 (FLT-4) ekspresija SSc ligonių odoje buvo gausesnė ir kiek gausesnė vėlyvoje stadijoje, lyginant su ankstyva nei sergantiems SRV.

Rezultatų aptarimas

Mūsų darbo rezultatuose stebima, kad ankstyvoje ligos stadijoje vaskulito aktyvumas SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė, o vėlyvoje stadijoje SRV ligonių odoje vaskulito aktyvumas išliko aukštas, o SSc – mažėjo. Infiltrato sudėčiai buvo būdinga, kad ankstyvoje ligos stadijoje putliųjų ląstelių infiltracija ir degranuliacija SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo gausi), o vėlyvoje stadijoje SRV ligoniams putliųjų ląstelių

infiltracija ir degranuliacija išliko gausi, o SSc ligoniams – mažėjo. Audinių makrofagų infiltracija SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo vidutiniškai gausi), o vėlyvoje ligos stadijoje SSc ligoniams audinių makrofagų infiltracija mažėjo, o SRV ligoniams išliko panaši kaip ankstyvoje stadijoje. Tiriant fibrozės vystymąsi, gauti duomenys, kad ankstyvoje ligos stadijoje audinių fibrozavimo laipsnis nei SSc, nei SRV ligoniams nesiskyrė (fibrozavimo arba nebuvo, arba jis buvo nežymus), o vėlyvoje stadijoje tuo metu kai SSc ligoniams vystėsi masyvi fibrozė, SRV ligoniams audinių fibrozavimo laipsnis beveik nesikeitė. vWF nutekėjimas į aplinkinius audinius SSc ligoniams buvo gausesnis, lyginant su SRV, ir nors vėlyvoje ligos stadijoje SSc ligoniams vWF nutekėjimas į aplinkinius audinius mažėjo, jis išliko santykinai gausesnis, negu SRV ligonių. Ankstyvoje ligos stadijoje endotelio azoto oksido sintazės ekspresija odoje SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo vidutiniškai gausi), o vėlyvoje ligos stadijoje SSc endotelio azoto oksido sintazės ekspresija odoje mažėjo, o SRV ligoniams išliko panaši kaip ankstyvoje stadijoje. Tuo tarpu terminio šoko proteino HSP-47 ekspresija ankstyvoje ligos stadijoje SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo vidutinio gausumo), o vėlyvoje stadijoje SRV ligoniams putliųjų HSP-47 ekspresija išliko panaši kaip ir ankstyvoje, o SSc ligoniams – pagausėjo. Be to, SSc ligoniams keitėsi terminio šoko proteino HSP-47 ekspresijos lokalizacija – ankstyvoje stadijoje labiausiai išreikšta odos kraujagyslių sienelėse, vėlyvoje – fibroblastuose. Ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo veiksnio VEGF-A ekspresija SSc ligoniams buvo gausesnė nei SRV ligoniams. SSc ligoniams kraujagyslių augimo veiksnio VEGF-A ekspresija kiek gausesnė ankstyvoje stadijoje, lyginant su vėlyva. Ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo faktoriaus VEGFR-1 (FLT-1) ekspresija SSc ligonių odoje buvo gausesnė nei sergančių SRV ir kiek gausesnė ankstyvoje stadijoje, lyginant su vėlyva. Ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo faktoriaus receptoriaus-2 (FLK-1) ekspresija SSc ligonių odoje buvo gausesnė nei sergantiems SRV. SSc ligoniams kraujagyslių augimo faktoriaus receptoriaus-2 (FLK-1) ekspresija ankstyvoje ir vėlyvoje stadijoje nesiskyrė. Ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-3 (FLT-4) ekspresija SSc ligonių odoje buvo gausesnė ir kiek gausesnė vėlyvoje stadijoje, lyginant su ankstyva nei sergantiems SRV.

SSc - tai sudėtingas daugiasisteminis susirgimas su nepilnai iširta patogenezė. Uždegiminės reakcijos pasekoje vystosi kolageno ir kitos jungiamojo audinio ekstraląstelinės medžiagos padidinta gamyba ir kaupimasis. Nėra tiksliai žinoma, kodėl sergant SSc atsiranda daugiau gaminamų tarpląstelinės medžiagos komponentų. Be vidinių priežasčių, tokių kaip genetinis polimorfizmas, eilė fibrozinių mediatorių: PDGF, TGF- β , CTGF dalyvauja SSc patogenezėje.

Gausiuose užsienio autorių darbuose nustatyta, kad pažeistos epitelio ir/ar endotelio ląstelės išskiria uždegimo mediatorius ir inicijuoja antifibrinolizinę grandinę, kuri paleidžia kraujo krešėjimo mechanizmą bei ekstraląstelinės medžiagos komponentų laikinąjį pagausėjimą. Trombocitų degranuliacija sukelia vazodilataciją ir padidina kraujagyslių pralaidumą. Tokį reiškinį mes stebėjome mūsų tyrimuose, kai vWF teigiami komponentai iš pradžių kaupėsi smulkių kraujagyslių spindžiuose, vėliau prasisunkdavo į ekstravaskulinius audinius. Kitų autorių tyrimai rodo padidintą kraujagyslių pralaidumą SSc ankstyvoje stadijoje, o vėlyvoje pralaidumas mažėja, ir mažėja smulkių kraujagyslių tinklo tankumas, kas taip pat matoma ir mūsų tyrimo medžiagoje. Esant padidintam kraujagyslių pralaidumui, miofibroblastai (aktyvuoti, fibroblastai gausiai gaminantys kolageną α -SMA+) bei epitelio ir endotelio ląstelės gamina membranas ardančias

metaloproteinazes (MMPs), to pasekoje kraujagyslių pralaidumas dar padidėja. Aplinkiniai limfocitai bei kitos ląstelės pradeda gaminti profibrozinius citokinus, tokius kaip TGF- β , IL-13 bei PDGF, kurie toliau aktyvuoja esančius aplinkoje makrofagus bei fibroblastus. Vietoje pagaminti citokinai bei chemokinai pritraukia naujų endotelio ląstelių. Kai miofibroblastai pagamina daugiau kolageno nei jo degraduojama, kolagenas kaupiasi ir vystosi fibrozė. Tokiomis sąlygomis pažeidimo vietoje kolageno vis gausėja. Mūsų tyrime analogišką situaciją atkartoję ligonių odos biopsijų pjūviai dažyti histochemiškai picrosiriusu ir tirti poliarizuotu mikroskopu: ankstyvai ligos stadijai buvo būdingas šviežiai sintezuoto kolageno kaupimasis. Ligonių, sergančių vėlyva SSc stadija, odos biopstatų pjūviai dažyti histochemiškai picrosiriusu ir tirti poliarizuotu mikroskopu demonstravo masyvias storų, mazguotų, senai sintezuotų kolageno skaidulų sankaupas. Skaidulų kiekis bei skersmuo priklausė nuo ligos stadijos. Epidermis ir odos priedai buvo atrofuoti. Pažengusi fibrozė paprastai būna jau hipoląstelinė, todėl manoma, kad ji negrįžtama, nes nebelieka MMPs gaminančių ląstelių. Nors yra hipotezių apie fibrozės grįžtamumą, mūsų SSc tyrimuose pažengusi fibrozė buvo hipoląstelinė, ir, manome, kad negrįžtama.

Hipotezė apie nefibrozinių ląstelių linijų diferenciaciją į profibrozines mezenchimines ląsteles randa vis platesnį pripažinimą aiškinant SSc patogenezę. Naujausieji tyrimai suteikia nemažai duomenų apie intraląstelinės signalizacijos kelius, reguliuojančius fibrozės procesą ir audinių pažeidimą SSc metu.

Kitų autorių duomenimis, vėlesnėse SSc stadijose dermoje mažėja putliųjų ląstelių, kai ankstyvojoje stadijoje jų būna daugiau negu sveikoje odoje. Mūsų stebėjimai patvirtina, kad putliųjų ląstelių yra daugiau ir jos intensyviau degranuliuoja ankstyvojoje SSc stadijoje. SSc metu mastocitų degranuliacija sukelia intersticiumo edemą, ką ir mes stebėjome mūsų tyrimuose. Vėliau, SSc metu išnyksta elastinės skaidulos papiliariniame dermos sluoksnyje, taip pat ten jau nebūna retikulinių skaidulų, kolageninės skaidulos tampa heterogeniškos. Mūsų elektroninės mikroskopijos tyrimai parodė kolageninių skaidulų heterogeniškumą, skaidulos buvo storesnės vėlyvoje SSc stadijoje.

Mūsų tyrimai parodė ankstyvus kraujagyslių pažeidimus sergant SSc. Vėliau, progresuojant fibrozei ir mažėjant ląstelių tankiui, mažėjo pratekamų kraujagyslių kiekis bei retėjo smulkių kraujagyslių tinklas. Endotelinių ląstelių reikšmė SSc patogenezėje iki šiol nepakankamai aiški. Iš vienos pusės – endotelinės ląstelės SSc metu tampa imuninio aktyvumo taikiniu, taip pat jos gali veikti kaip papildomi imuniniai stimulatoriai Kraujagyslių pažeidimas SSc metu veda prie hipoksijos, ischemijos ir kraujagyslių okliuzijos. Mūsų tyrimuose ankstyvojoje SSc stadijoje stebėjome aukštą eNOS aktyvumą, silpnėjantį progresuojant fibrozei.

47-kDa terminio šoko baltymas (HSP-47) - tai specifinis kolagenui molekulinis šaperonas, lokalizuotas endoplazminiame tinkle ir vaidina svarbią rolę odos fibroblastų kolageno sintezėje. Kitų autorių duomenimis, SSc metu HSP-47 ekspresijos padidėjimas sutampa su kolageno sintezės padidėjimu, ką patvirtina mūsų gauti imunohistocheminiai duomenys. Manoma, kad HSP-47 yra patikimas aktyvuotų fibroblastų IHC žymuo naudojant rutininius histologinius pjūvius. HSP-47 fibroblastuose sukelia padidintą kolageno sintezę, sekreciją bei kaupimąsi, taip pat didina laisvųjų radikalų. Mūsų tyrimuose HSP-47 aktyvumo padidėjimą konstatavome fibroblastuose vėlyvose SSc stadijose. Tai reiškia, kad žymus fibrozavimas atsiranda ligai progresuojant, o ne ligos pradžioje. Tuo tarpu ankstyvose SSc stadijose HSP47 aktyvumas buvo žymiai didesnis ant endotelio citų. Turint omenyje, kad HSP47 yra kolagenams specifinis baltymas,

skatinantis fibrozę, jo lokalizacijos skirtumas ant endoteliocitų ankstyvoje SSc ir ant fibroblastų vėlyvoje SSc stadijose mūsų požiūriu yra labai reikšmingas.

Mūsų stebėjimai patvirtina tų autorių darbus kurie rodo, kad SSc prasideda kraujagyslėse visų pirma nuo pakitimų kapiliaruose, per kraujagyslių okliuziją ir vėliau vystosi fibrozė. Iš dalies nebūtina nagrinėti kokios priežastys paleidžia SSc būdingų pažeidimų grandinę endoteliocituose. Daugelio autorių dėmesys nukreiptas į ET-1, TGF-beta, MMPs, metaloproteinazių inhibitorius (TIMPs) bei uždegimo mediatorius, interleukinus ir chemokinus, molekules kurios mūsų tyrimuose nebuvo tirtos, mes rėmėmės kitų autorių atitinkamais duomenimis.

Sveikas endotelis atlieka patikimo barjero tarp cirkuliuojančio kraujo ir aplinkinių audinių funkciją, užtikrina medžiagų apsikeitimo galimybę ir neleidžia kraujui krešėti. Kraujagyslėse endoteliocitų sluoksnis - tai pusiau pralaidus barjeras, lokalizuotas pasienyje tarp kraujagyslės spindžio ir perivaskulinių audinių (Bazzoni 2006; Mackiewicz et al. 2002 a). SSc metu kraujagyslių patologija yra susijusi su pažeistomis kraujagyslių funkcijomis: padidintu vazospazmu, sumažinta vazodiliacija, padidėjusiu sienelių adhezivumu trombocitams ir limfocitams. Mes tai stebėjome per imunohistocheminį vWF ekspresijos padidėjimą kraujagyslių spindžiuose SSc ankstyvoje stadijoje. Von Willebrand'o faktorius (vWF) yra didelis multimerinis glikoproteinas, gaminamas endotelio Weibel – Palade kūneliuose. Mūsų duomenys patvirtino ryškų Von Willrebrando faktoriaus patekimą į išorinę kraujagyslių aplinką ir rodo kraujagyslės sienelės pralaidumo padidėjimą ypač SSc ligonių odoje.

Ryškiausiai SSc kraujagyslių pažeidimai stebimi kapiliaruose ir smulkiose kraujagyslėse. Kapiliarų pažeidimas apibūdinamas deformuotomis ir netaisyklingomis kilpomis. Mūsų tyrime šio proceso išraiška matoma krūminiams kapiliarams susidarant ankstyvoje SSc stadijoje.

Išvados

1. Sergantiems SSc odoje ankščiau, negu išreikšta fibrozė pasireiškia kraujagyslių endotelio pažeidimai ir padidėjęs kraujagyslių sienelės pralaidumas. Odos kraujagyslių fibrozavimas bei kraujagyslių atrezija aptinkamos vėlesnėse SSc stadijose, tuo tarpu sergantiems SRV ir RP šie požymiai neryškūs.
2. Kraujagyslių endotelio augimo veiksnio VEGF-A ir jo receptoriaus FLT-1 ir ypač HSP-47 (terminio šoko baltymo, kolagenams specifinio šaperono skatinančio fibrozę), bei eNOS (endotelio azoto sintazės) gausi ekspresija yra ankstyvos SSc stadijos endotelio pakenkimo imunohistocheminiai žymenys. CD34 (endotelio žymuo) ekspresuojamas santykinai vienodai SSc ir SRV ligonių odoje, bet stipriau ankstyvoje abiejų ligų stadijose.
3. Padidėjusį odos kraujagyslių sienelės pralaidumą rodo vWF žymens išplitimas perivaskuliniuose audiniuose pasireiškiantis jau ankstyvoje SSc stadijoje ir tik nežymiai sumažėjantis vėlyvoje, bet išliekantis gausesnis nei SRV ligoniams.
4. Odos trečio laipsnio vaskulitas su uždegiminiu infiltratu būdinga makrofagų gausa (CD68) koreliavo su vWF nutekėjimu į aplinkinius perivaskulinius audinius, ir su putliųjų ląstelių infiltracija bei degranuliacija. Ankstyvoje SSc ir SRV stadijose histologiniai vaskulito požymiai nesiskyrė, bet jie ryškiai mažėjo SSc vėlyvoje stadijoje, tačiau liko labai išreikšti vėlyvos stadijos SRV ligonių odoje.

5. vWF agregatai kraujagyslių spindžiuose, HSP-47 ekspresija poodžio fibroblastuose ir aktyvuotų fibroblastų artimi kontaktai su degranuliuojančiomis putliosiomis ląstelėmis - tai imunohistocheminiai ir ultrastruktūriniai fibroblastų pakenkimo ir vėlyvos SSc stadijos žymenys patvirtinantys masyvų odos ir jos kraujagyslių fibrozavimą bei atreziją, atskiriančią SSc nuo SRV.

Praktinės rekomendacijos

1. Odos biopsija kaip pagalbinis diagnostinis metodas tinka diferencijuoti tarp ankstyvos SSc, SRV ir RP stadijų.
2. Ankstyvosios SSc stadijos patogenezėje odoje vyrauja smulkių kraujagyslių pažeidimai. Į tą tikslingą atsižvelgti skiriant patogenezę pagrindą SSc gydymą.

ABOUT THE AUTHOR

Arvydas Rimkevičius.

e-mail: arimkevicius@one.lt

Education:

University: 1993–1999 – Vilnius University Faculty of Medicine

Residency: 1999–2001 – LR SAM National Centre of Pathology

Postgraduate studies : 2002-2006 in Rheumatology at the Institute of Experimental and Clinical Medicine of Vilnius University.

Professional experience:

1999–2001 – Vilnius University Faculty of Medicine (VU MF) Department of Anatomy, Histology, and Anthropology – Senior Laboratory Assistant (conducted anatomy practical training for medical students).

1999–2001 – Ministry of Health of the Republic of Lithuania (LR SAM) National Centre of Pathology, General Pathology Department – Physician – Junior Lecturer.

2001–2002 – Institute of Experimental and Clinical Medicine at Vilnius University (VU) – Pathomorphology Laboratory Assistant.

2001–2004 – LR SAM National Centre of Pathology, Cytology Department – Pathologist.

Since 2001 – UAB SK Impeks Medical Diagnostics Centre – Pathologist.

Since 2001 – VšĮ Vilnius City University Hospital, Pathology Department – Pathologist.

Since 2002 – VšĮ Vilnius City University Hospital, Pathology Department – Manager.

2002–2003 – during the licensing of the pathology department, I created the Pathology Department Quality System on the basis of LST EN ISO 9001:2001 and introduced it at the VšĮ Vilnius City University Hospital and UAB SK Impeks Medical Diagnostics Centre Pathology Departments. During accreditation the quality systems and work quality of both departments received a rating of ‘excellent’ from the State Health Care Accreditation Agency expert commission.

Since 2003 – Society of Lithuanian Pathologists – member of the board, curation area: cytopathology.

Since 2003 – VšĮ Vilnius City University Hospital – member of the Board of Enquiry.

Since 2004 – VšĮ Vilnius City University Hospital – member of the audit group.

Since 2006 – VU MF Department of Pathology, Forensic Medicine, and Pharmacology – periodically Resident Manager.

Since 2008 – VU MF Department of Pathology, Forensic Medicine, and Pharmacology – Lecturer (forensic medicine course).

Since 2009 – Lithuanian Forum of the Disabled – public advisor.

Since 2009 – VšĮ Kaunas Red Cross Hospital – advisor to the director.