

Grażyna CHODOROWSKA

**Badania nad zachowaniem się włókien sprężystych skóry w przebiegu akroskleroderмии przed i po leczeniu heparyną**

Исследования поведения эластических волокон и кожи в течении акросклеродермии до и после лечения гепарином

Studies of the Behaviour of the Dermal Elastic Fibres in the Course of Acroscleroderma before and after the Heparin Treatment

Rola włókien sprężystych w patologii twardziny nie jest dotychczas wyjaśniona. Wyniki badań różnych autorów są kontrowersyjne i dlatego pozostają nadal przedmiotem dyskusji. Możliwość oddziaływania heparyny na tkankę łączną jest rozważana dopiero od niedawna. Zdolność heparyny do wiązania się z białkami, a szczególnie zdolność zmieniania aktywności wielu enzymów sugeruje możliwy wpływ heparyny na białka tkanki łącznej (10). Nieliczne doniesienia na ten temat zachęcają do podjęcia badań.

Celem niniejszej pracy jest histopatologiczna ocena zachowania się włókien sprężystych skóry w przebiegu twardziny układowej — akroskleroderмии przed i po leczeniu heparyną.

MATERIAŁ I METODYKA

Badaniami objęto 20 pacjentek w wieku 24—70 lat, leczonych w Klinice Dermatologicznej AM w Lublinie z powodu akroskleroderмии. Chore, po uprzedniej dokładnej ocenie stanu ogólnego i wykluczeniu przeciwwskazań, otrzymywały domięśniowo preparat *Heparinum* — Polfa w dawce 10 000 j dziennie przez okres 12 mies. Badane parametry układu krzepnięcia (czas krzepnięcia, czas rekalcynacji, czas krwawienia, wskaźnik protrombinowy, ilość płytek krwi/mm<sup>3</sup>) pozostawały przez cały okres leczenia w granicach normy.

Przedmiotem badań histopatologicznych były wycinki o wymiarach 0,5×0,5 cm, obejmujące skórę i tkankę podskórną, pobierane po stronie grzbietowej palca IV

lub III dłoni lewej na wysokości paliczka bliższego przed i po leczeniu heparyną. Grupę kontrolną stanowiły: 1) wycinki ze skóry 12 pacjentek z akrosklerodermią, leczonych lekami innymi niż heparyna (penicylina prokainowa, piaskledyna, leki naczyniowe), 2) wycinki ze skóry zwłok 20 osób nie chorujących na choroby skórne, pobrane do 24 godz. po zgonie. Wycinki skóry obu grup kontrolnych pochodziły z tych samych miejsc co w grupie badanej leczonej heparyną. Wycinki oznaczono w grupach w następujący sposób:

grupa A — kontrolna: wycinki ze skóry zwłok;

grupa B — kontrolna: wycinki pobrane od chorych z akrosklerodermią, leczonych lekami innymi niż heparyna;

grupa C — wycinki pochodzące od 20 pacjentek z akrosklerodermią, pobrane dwukrotnie: przed leczeniem heparyną (grupa C1) oraz po 12-miesięcznym leczeniu heparyną (grupa C2).

Pobrane wycinki utrwalano natychmiast w formalinie zbuforowanej, a z zatopionych bloczków parafinowych krojono skrawki grubości 6  $\mu\text{m}$  na mikrotomie firmy Leitz, a następnie wykonywano:

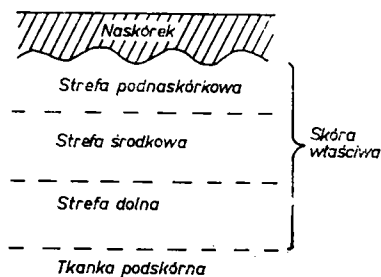
1) barwienie przeglądowe: hematoksyliną i eozyną;

2) barwienie włókien sprężystych: hematoksyliną żelazistą Verhoeffa, orceiną Unny-Tanzera oraz rezorcyno-fuksyną według Weigerta;

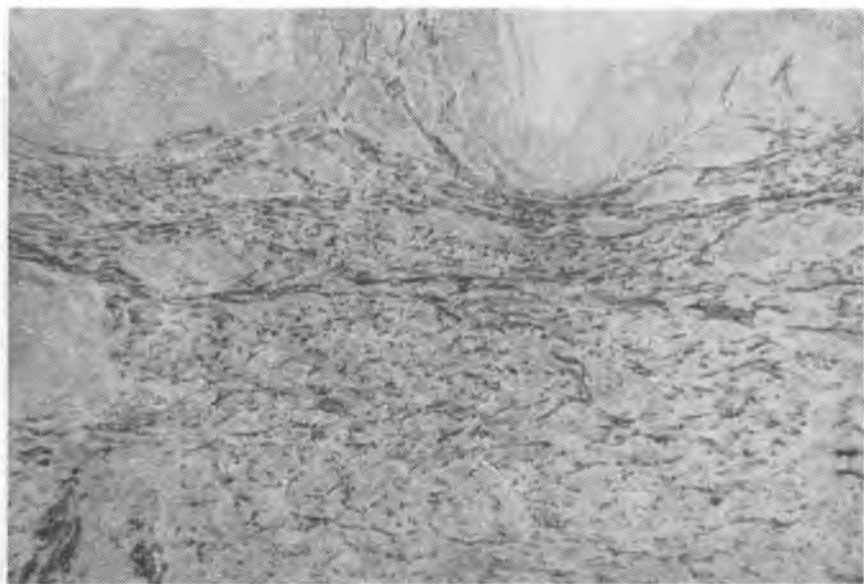
3) barwienie kolagenu metodą PTAH według Mallory'ego.

Preparaty histologiczne oceniano w mikroskopie świetlnym. Dokumentację mikrofotograficzną przeprowadzono na filmie negatywowym Fotopan FF 135 aparatem Practika przy użyciu mikroskopu NEPK (Zeiss, Jena), wyposażonego w kondensator jasnego pola (N.A. 1,35) i obiektywy planchromatyczne oraz okulary M.F. Projektiv K.

Obserwowane pola wycinków ze skóry wszystkich grup podzielono umownie na trzy strefy: 1) podnaskórkową, 2) środkową skóry właściwej, 3) dolną skóry właściwej (schemat 1).



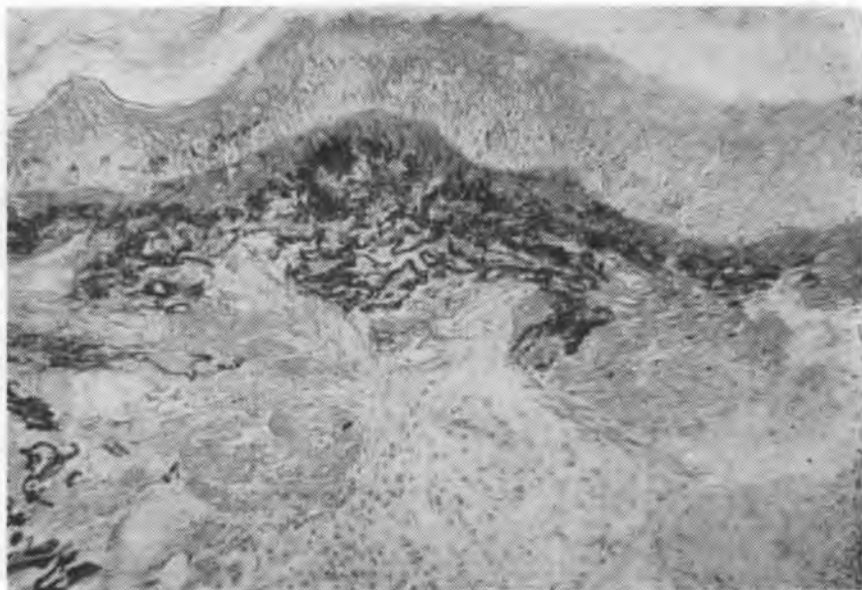
Schemat 1. Umowny podział skóry właściwej  
Conventional division of the dermis



Ryc. 1



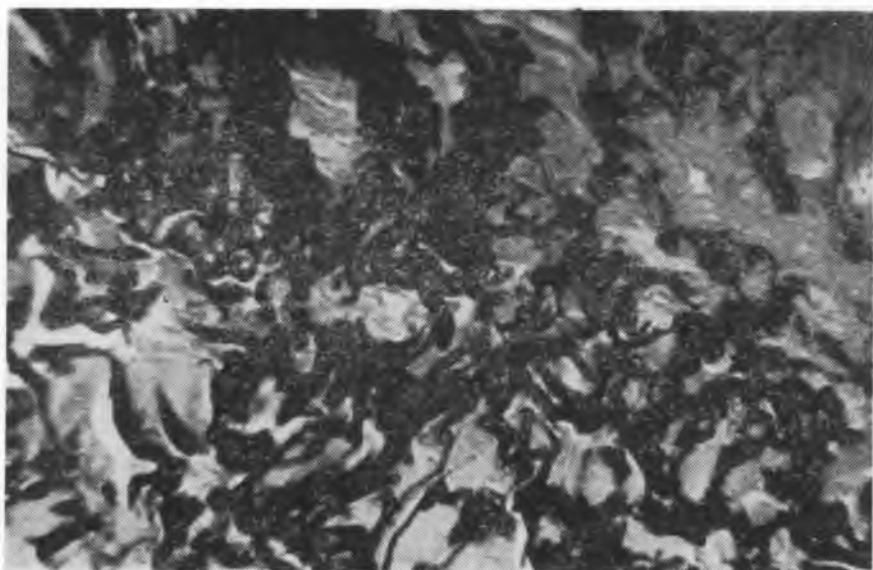
Ryc. 2



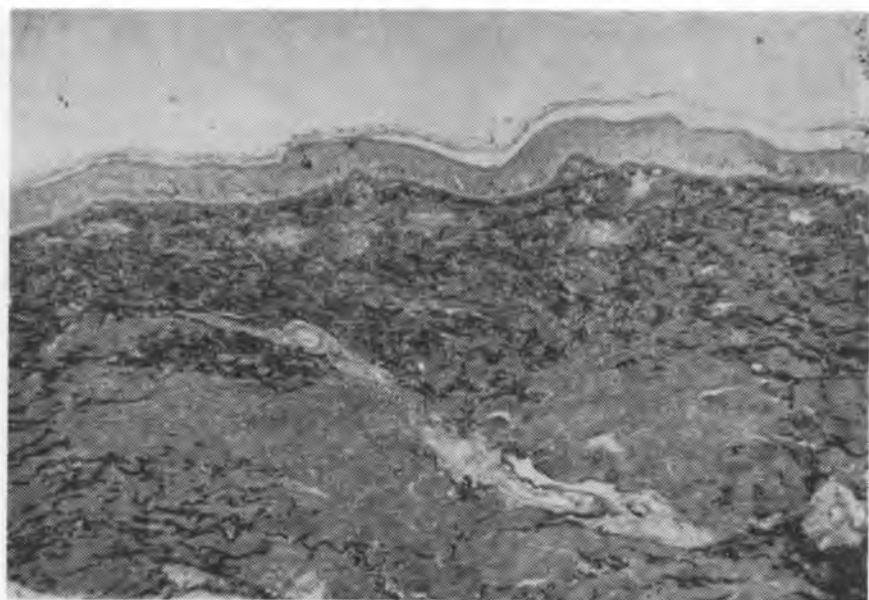
Ryc. 3



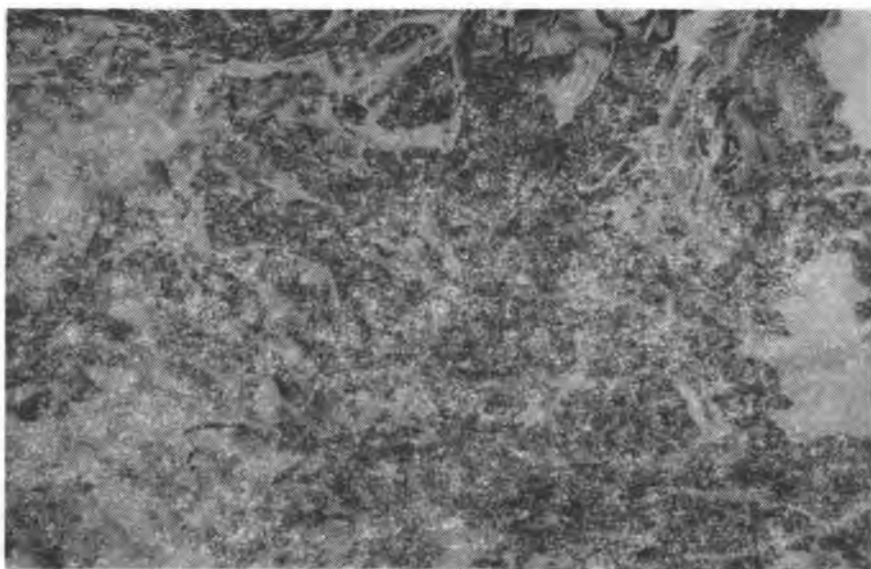
Ryc. 4



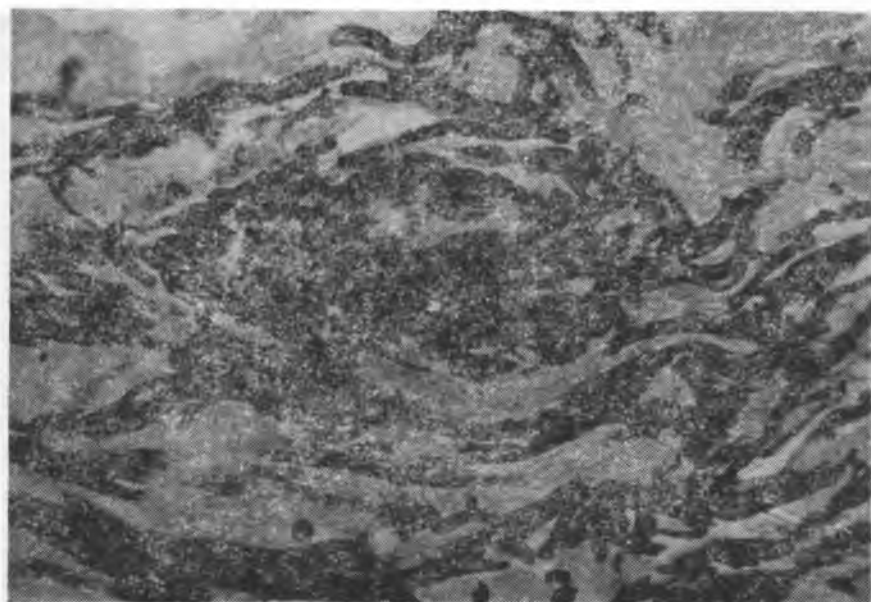
Ryc. 5



Ryc. 6



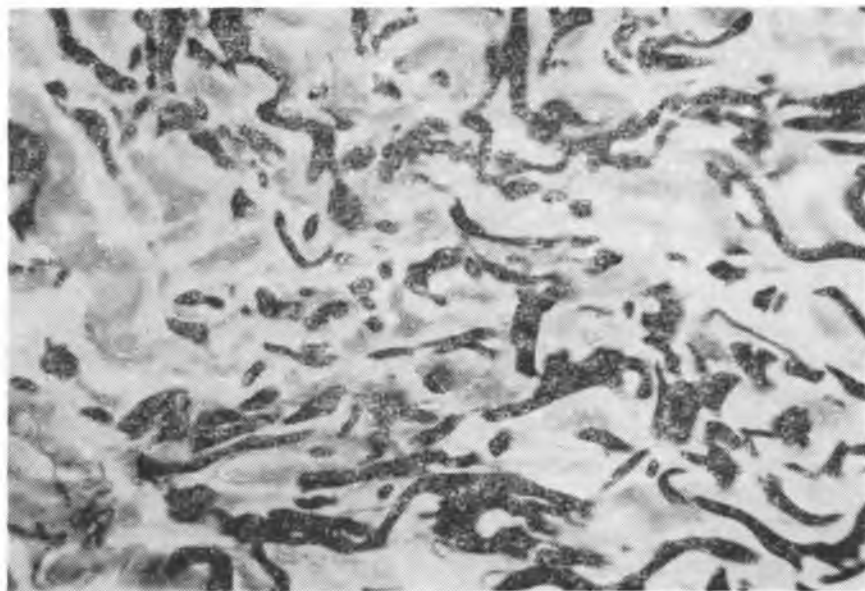
Ryc. 7



Ryc. 8



Ryc. 9



Ryc. 10





## WYNIKI BADAŃ

## Grupa A

Zespolony układ barwień specjalnych na włókna sprężyste wykazał we wszystkich wycinkach obecność delikatnych włókien sprężystych, przeważnie o podłużnym przebiegu w strefie podnaskórkowej i środkowej oraz w strefie dolnej (ryc. 1). Często przebieg włókien sprężystych towarzyszył wyraźnie splotom włókien kolagenowych. We wszystkich przypadkach kontrolnych tej grupy włókna sprężyste barwiły się jednolicie i nigdzie nie wykazywały cech rozpadu i rzeczywistej fragmentacji.

## Grupa B

Układ włókien sprężystych wykazywał dość znaczne różnice, spowodowane zapewne różnym okresem trwania schorzenia, obserwowanym w poszczególnych wycinkach skóry. W tych wycinkach, które zakwalifikowano do okresu pierwszego (obrzękowego) włókna sprężyste były cienkie, w większości zachowane i tylko w strefie środkowej skóry właściwej ogniskowo wykazywały cechy pofragmentowania. Grubość i ilość włókien oraz ich jednorodność barwliwa były zachowane. W wycinkach skóry z okresu późniejszego choroby (stwardnieniowego) skóra właściwa wykazywała dość znaczne pomnożenie ilości włókien sprężystych wraz z ich pogrubieniem i splątaniem w gęstą i bezładnie rozwiniętą siatkę, głównie w strefie podnaskórkowej. Ogniskowo przy całkowitym wybitnym szkliwieniu homogennej tkanki łącznej skóry właściwej stwierdzono całkowity brak włókien sprężystych (ryc. 2 i 3).

## Grupa C1

We wszystkich badanych wycinkach ze skóry palców stwierdzono zwiększenie ilości włókien sprężystych, jednak niejednakowe we wszystkich wycinkach. W 12 przypadkach zwiększenie ilości włókien sprężystych widoczne było głównie w strefie podnaskórkowej (ryc. 4), a w 4 — w strefie dolnej. W pozostałych 4 przypadkach zwiększenie ilości włókien sprężystych obserwowano we wszystkich trzech strefach. Stwierdzono nie tylko zwiększenie ilości włókien (*proliferatio*), ale także ich przerost (*hypertrophia*). Zmienny był także układ przestrzenny tych włókien. W większości przypadków w wycinkach ze skóry twardzinowej włókna sprężyste w strefie podnaskórkowej rozrastały się chaotycznie, tworząc splątana, bezładnie gęstą, siatkę, niekiedy układy wirowe lub okrężne

(ryc. 5), w przeciwieństwie do skóry prawidłowej, gdzie układ delikatnych włókien sprężystych był równoległy do naskórka. W sześciu przypadkach rozrost i przerost włókien sprężystych w strefie podnaskórkowej był tak duży, iż można już mówić o „masie sprężystej”, a nie o włóknach, ponieważ tworzyły one zbite konglomeraty materiału utkanego z tych włókien. W tych przypadkach naskórek był ścięczały, grubości ok. 15  $\mu\text{m}$ , a granica skórno-naskórkowa — wygładzona. Zaznaczone były również zmiany zarostowe w naczyniach krwionośnych, powodujące zwężenie ich światła. Strefy skóry właściwej, wykazujące dużego stopnia skołagenizowanie podścieliska, charakteryzowała obecność włókien sprężystych krótkich, dość cienkich i pofragmentowanych. Obserwowano także w tych strefach pola, w których włókna sprężyste nie były obecne lub uwidoczniły się tylko nieliczne włókna w stanie rozpadu (ryc. 6 i 7). W strefie dolnej skóry właściwej włókna sprężyste wykazywały znacznie mniejsze zmiany (ryc. 4 i 6), lecz niekiedy zbijały się w „konglomeraty sprężyste” (ryc. 8). W 6 przypadkach obok prawidłowo rozgałęzionej warstwy włókien sprężystych nie zmienionej na granicy skórno-naskórkowej obserwowano cienki pokład strefy bez włókien sprężystych, ciągnący się na długości ok. 2—3 mm (ryc. 6). Pod tym pokładem bezwłóknowym włókna sprężyste wykazywały wzmoczoną fragmentację i rozpad.

### Grupa C2

W wyniku porównania wycinków grupy C1 z wycinkami grupy C2 nie stwierdzono istotnych różnic w obrazie histologicznym, zarówno posługując się barwieniami przeglądowymi, jak i specjalnymi. Układ włókien sprężystych nie wykazywał także istotnych i powtarzalnych różnic w stosunku do grupy C1. W 4 przypadkach w grupie C2 stwierdzono jeszcze nieco większą ilość włókien sprężystych układających się w gęstą siatkę, podobnie jak w grupie C1. Obserwacje te potwierdzono we wszystkich użytych metodach barwienia selektywnego na włókna sprężyste. Nie stwierdzono w żadnym przypadku nasilenia zarostowych zmian naczyniowych. Nie obserwowano także bardziej rozwiniętej kolagenizacji skóry właściwej niż w grupie C1 (ryc. 9 i 10).

### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zmiany we włóknach sprężystych stwierdzono w skórze wszystkich chorych z twardziną w grupach: badanej i kontrolnej. Nasilenie tych zmian w obu grupach różni się, co wynika z pewnych różnic klinicznych

chorych leczonych heparyną i chorych z grupy kontrolnej. Zmiany te polegały na zwiększeniu ilości włókien (*proliferatio*), przeroście (*hypertrophia*), zmienionym układzie przestrzennym, pofragmentowaniu i rozpadzie. Obserwowano także strefy skóry właściwej bez obecności włókien sprężystych. Największe nasilenie zmian histopatologicznych obserwowano w strefie podnaskórkowej. Natomiast zmiany włókien sprężystych były znacznie mniejsze w dolnej strefie skóry właściwej, na granicy z tkanką podskórną.

Podobnie jak wiele innych zagadnień, dotyczących patologii twardziny, tak też zachowanie się włókien sprężystych w skórze nie jest oceniane jednoznacznie. Pinkus i Mehregan (15) podkreślają trudności w ocenie włókien sprężystych skóry. Wynikają one z falistego ich kształtu, trójwymiarowego schematu ich rozmieszczenia w skórze oraz stadium choroby, w którym prowadzone są obserwacje tkanki łącznej skóry. Wydaje się, że czynniki te miały wpływ na rozbieżność wyników badań włókien sprężystych, uzyskanych przez różnych autorów. Wielu autorów uważa, że zmiany włókien sprężystych należą do obrazu zmian chorobowych w twardzinie układowej. Włókna sprężyste są w skórze pacjentów uszkodzone, przy czym w okresie początkowym choroby obserwowano zatarcie struktury włókien, a następnie ich rozpad (1, 3, 6, 11, 12).

W przeprowadzonych badaniach w obrazie histopatologicznym skóry wszystkich chorych leczonych heparyną obserwowano zmiany ilościowe i jakościowe dotyczące włókien sprężystych. Zmiany te były najbardziej nasilone w strefie podnaskórkowej, natomiast znacznie mniejsze — w dolnej strefie skóry właściwej, na granicy z tkanką podskórną. Wyniki te są zgodne z tym, co donieśli O'Leary i wsp. (14) oraz Korting i wsp. (13). Autorzy ci opisywali zwiększenie liczby włókien sprężystych głównie w górnej części skóry właściwej, podczas gdy w dolnych warstwach obserwowali nawet tendencję do zmniejszania się ilości tych włókien. Podobnie Jabłońska (9) uważa, że stan włókien sprężystych skóry zależy od okresu trwania twardziny. W okresie obrzękowym obserwowano dobrze zachowane włókna sprężyste, natomiast w okresie stwardnieniowo-zanikowym ich ilość była zwiększona. Jabłońska uważa, że zwiększenie ilości włókien sprężystych jest pozorne, związane raczej z zanikiem włókien kolagenowych w późnym stadium choroby (9). Rozważając ten pogląd Jabłońskiej, oparto się na wynikach uzyskanych przy pomocy metody PTAH według Mallory'ego. Metodę tę zastosowano w celu jednoczesnego dobrego uwidocznienia zarówno włókien kolagenowych, jak i sprężystych. Nie stwierdzono zmian zanikowych włókien kolagenowych w badanych wycinkach skóry pacjentek, przeciwnie — ich ilość była zwiększona. W badanej skórze chorych obserwowano

no rzeczywiste zwiększenie ilości włókien sprężystych oraz ich przerost. Zmieniony wygląd włókien sprężystych, ich pofragmentowanie i rozpad, które stwierdzono w skórze chorych, było poprzednio obserwowane przez wielu autorów (4, 5, 7, 8).

W wycinkach skóry chorych na twardzinę układową, zarówno leczonych heparyną, jak i w grupie kontrolnej, leczonych innymi lekami, stwierdzono zależność pomiędzy nasileniem zmian włókien sprężystych a okresem trwania choroby. Skóra chorych grupy kontrolnej wykazywała przewagę zmian obrzękowych i stwardnieniowych z rozpoczynającymi się zaledwie zmianami zanikowymi. Natomiast w grupie leczonej heparyną obserwowano zaawansowane zmiany histopatologiczne, odpowiadające okresowi stwardnieniowemu i zanikowemu twardziny. Wyraźne było narastanie zmian włókien sprężystych wraz z rozwojem choroby, zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupie leczonej heparyną. Podobnie Ishikawa i Mori (7) obserwowali zmiany włókien sprężystych w skórze twardzinowej, postępujące wraz z narastającymi objawami choroby. Niektórzy badacze nie opisywali uszkodzenia włókien sprężystych w skórze twardzinowej (2). Dąbrowski i wsp. (2), badając ultrastrukturę skóry twardzinowej, stwierdzili obecność licznych włókien sprężystych zarówno w miejscach aktywnej fibrylogenezy kolagenu, jak i w miejscach skupień dojrzałego kolagenu. Wygląd włókien sprężystych był zupełnie prawidłowy. Nowych danych o udziale włókien sprężystych w patologii twardziny dostarczyły badania Ishikawy i wsp. (8). W początkowym okresie choroby autorzy ci obserwowali pofragmentowanie włókien sprężystych w skórze pacjentów oraz podobne zmiany, lecz znacznie bardziej nasilone w skórze zwierząt w przebiegu doświadczalnej twardziny. W późniejszym okresie twardziny stwierdzili ilościowe zwiększenie tkanki sprężystej w skórze pacjentów. Badania ultrastrukturalne skóry ludzkiej potwierdziły zwiększoną ilość zwyrodniałych włókien sprężystych w późnym okresie twardziny (8).

Wydaje się więc, że zachowanie się włókien sprężystych w skórze twardzinowej jest zróżnicowane i zależy głównie od okresu choroby a także od warstwy skóry. Należy brać pod uwagę stosowanie odmiennych metod badawczych przez różnych autorów, a zwłaszcza metod barwienia zastosowanych przez poszczególnych badaczy, uwidaczniających całą sieć układu sprężystego, lub, być może, tylko dojrzałe włókna sprężyste głębokich warstw skóry. Obserwowane zmiany włókien sprężystych w akrosklerodermii dotyczą ilości włókien, zmiany ich cech morfologicznych, przy czym zdania autorów są rozbieżne (1, 3—14).

## PIŚMIENNICTWO

1. Asboe-Hansen G.: Neue Entwicklungen der Pathologie, Pathophysiologie und Therapie der systemischen Sklerodermie. *Hautarzt* **31**, 584, 1980.
2. Dąbrowski J. i wsp.: Ultrastrukturalne i biochemiczne badania kolagenu w twardzinie. *Przegl. Derm.* **64** (6), 665, 1977.
3. Doerr W. i wsp.: Experimental Mesenchymal Injuries from Lathyres Odoratus. *Langenbecks Arch. Klin. Chir.* **294**, 426, 1960.
4. Fleischmajer R. i wsp.: Scleroderma and the Subcutaneous Tissue, *Science* **171**, 1019, 1971.
5. Fleischmajer R. i wsp.: Alteration of Subcutaneous Tissue in Systemic Scleroderma. *Arch. Derm.* **105**, 59, 1972.
6. Gans O., Steigleder G. K.: *Histologie der Hautkrankheiten*. Ed. Springer, Berlin—Göttingen—Heidelberg 1955.
7. Ishikawa H., Mori S.: Ein Beitrag zum histologischen Unterschied zwischen progressiver und circumscripter Sklerodermie. *Hautarzt* **23** (9), 404, 1972.
8. Ishikawa H. i wsp.: Scleroderma-inducing Glycosaminoglycans in the Urine of Patients with Systemic Scleroderma. *Dermatologica* **1**, 193, 1978.
9. Jabłońska S.: *Histopathology of Scleroderma*. [w:] *Scleroderma and Pseudo-scleroderma*. Ed. S. Jabłońska, Polish Medical Publishers, Warsaw 1975.
10. Jacques L. B.: Heparin and Old Drug with a New Paradigm. *Science* **206**, 528, 1979.
11. Keech K.: The Effect of Mechanical Factors on Connective Tissue *in vitro*. *J. Path. Bacteriol.* **81**, 505, 1961.
12. Kogoj F.: Lichen sclerosus (atrophicus) primitivus. *Arch. f. Derm.* **169**, 456, 1934.
13. Korting G. W. i wsp.: Zur Frage des Elasticaverhaltens bei einigen sklerosierenden und atrophisierenden Hautkrankheiten. *Hautarzt* **20**, 351, 1969.
14. O'Leary P. A. i wsp.: *Dermato-histology of Various Types of Scleroderma*. *Arch. Derm.* **75**, 78, 1957.
15. Pinkus H., Mehregan A. H.: *A Guide to Dermatohistopathology*. 2 ed., Appleton Century, New York 1969.

Otrzymano 23 I 1984.

## OBJAŚNIENIA RYCN

Ryc. 1. Grupa A (kontrolna). Prawidłowy układ włókien sprężystych skóry. Barwienie: rezorcyno-fuksyna według Weigerta. Pow. 120X.

Ryc. 2. Grupa B (kontrolna). Akrosklerodermia w okresie obrzękowym. Nieznaczne zwiększenie ilości włókien sprężystych, zachowujących jednak prawidłowe ułożenie w strefie podnaskórkowej. Barwienie: rezorcyno-fuksyna według Weigerta. Pow. 120X.

Ryc. 3. Grupa B (kontrolna). Akrosklerodermia w okresie zanikowym. Obok znacznego zwiększenia ilości włókien sprężystych w strefie podnaskórkowej widoczne są w strefie środkowej pola pozbawione całkowicie tych włókien. Barwienie: metodą Verhoeffa. Pow. 120X.

Ryc. 4. Grupa C1. Akrosklerodermia w okresie stwardnieniowym. Znaczne zwiększenie ilości włókien sprężystych skóry właściwej, głównie w strefie podnaskórkowej. Barwienie: rezorcyno-fuksyna według Weigerta. Pow. 120X.

Ryc. 5. Grupa C1. Akrosklerodermia w okresie stwardnieniowym. Zwiększona ilość włókien sprężystych układających się w gęste układy okrężne. Barwienie: rezorcyno-fuksyna według Weigerta. Pow. 400X.

Ryc. 6. Grupa C1. Akrosklerodermia w okresie stwardnieniowym. Widoczne pola silnie skołagenizowanego podścieliska w stanie daleko posuniętych zmian szklistych, nie wykazujące obecności włókien sprężystych. Barwienie: orceina Unny-Tanzera. Pow. 120X.

Ryc. 7. Grupa C1. Akrosklerodermia w okresie stwardnieniowym. Widoczne rozszczepienie i rozpad włókien sprężystych obok grubych włókien kolagenowych wykazujących zmiany szkliste. Barwienie: rezorcyno-fuksyna według Weigerta. Pow. 400X.

Ryc. 8. Grupa C1. Akrosklerodermia w okresie stwardnieniowym. Zbrylanie się włókien sprężystych w większe „konglomeraty sprężyste”. Barwienie: orceina Unny-Tanzera. Pow. 400X.

Ryc. 9. Grupa C2. Akrosklerodermia w okresie stwardnieniowym. Rozrost i przerost włókien sprężystych. Zaznaczony także rozpad i fragmentacja włókien. Barwienie: rezorcyno-fuksyna według Weigerta. Pow. 120X.

Ryc. 10. Grupa C2. Akrosklerodermia w okresie stwardnieniowym. Rozległy rozpad i fragmentacja włókien sprężystych. Barwienie: rezorcyno-fuksyna według Weigerta. Pow. 400X.

#### РЕЗЮМЕ

Поведение эластических волокон в течении системной склеродермии в научной литературе не до конца выяснено. Некоторые авторы считают, что эластические волокна не принимают участия в патологии склеродермии и не подвергаются изменениям. Принимая во внимание факт, что существуют спорные мнения, оценивающие роль эластических волокон в склеремической коже, были сделаны попытки гистопатологической оценки поведения этих волокон в выше-названной болезни. Наблюдалось болезненно измененные эластические волокна в коже 20 больных, леченных гепарином и в контролируемой группе 12 больных, леченных с помощью других лекарств. Было установлено, что в течении акросклеродермии повышается количество эластических волокон прежде всего в подэпидермальной полосе вместе с прогрессированием болезненного процесса. Влияния гепарина на поведение эластических волокон в выше-названной болезни не наблюдалось.

#### SUMMARY

Evaluation of the elastic fibres behaviour in the course of the systemic scleroderma is not clearly defined in literature. Some authors maintain that the elastic fibres do not take part in pathology of scleroderma and remain unchanged. In the presence of different opinions on the role of elastic fibres in sclerodermic dermis an attempt at histopathologic evaluation of behaviour of these fibres in scleroderma has been undertaken. The changed elastic fibres were observed in

the dermis of 20 patients treated with heparin and in the control group of 12 patients treated with other drugs. It was found that in the course of acroscleroderma the number of elastic fibres increases mainly in subepidermal area as the pathological process develops. No influence of heparin on the behaviour of elastic fibres in this disease has been observed.

#### EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Group A (control). Normal arrangement of the elastic fibres in the dermis. Staining: Weigert's resorcin-fuchsin. Magn. 120X.

Fig. 2. Group B (control). Acroscleroderma in the oedemic stage. Slight increase in the number of elastic fibres still preserving their normal arrangement in subepidermal area. Staining: Weigert's resorcin-fuchsin. Magn. 120X.

Fig. 3. Group B (control). Acroscleroderma in the atrophic stage. Apart from a considerable increase in the number of elastic fibres in subepidermal area the sites completely without these fibres are visible in the medial area of the dermis. Staining: Verhoeff's method. Magn. 120X.

Fig. 4. Group C1. Acroscleroderma in the sclerotic stage. Considerable increase in the number of elastic fibres of dermis mainly in subepidermal area. Staining: Weigert's resorcin-fuchsin. Magn. 120X.

Fig. 5. Group C1. Acroscleroderma in the sclerotic stage. Increased number of the elastic fibers arranged in thick circular pattern. Staining: Weigert's resorcin-fuchsin. Magn. 400X.

Fig. 6. Group C1. Acroscleroderma in the sclerotic stage. Areas of intensely collagenic stroma in the stage of highly advanced hyaline changes not showing the presence of the elastic fibers. Staining: Unna-Tanzer's orcein. Magn. 120X.

Fig. 7. Group C1. Acroscleroderma in the sclerotic stage. Splitting and decomposition of elastic fibers next to the thick collagen fibers showing hyaline changes are visible. Staining: Weigert's resorcin-fuchsin. Magn. 400X.

Fig. 8. Group C1. Acroscleroderma in the sclerotic stage. Clumping of the elastic fibers in the bigger "elastic conglomerations". Staining: Unna-Tanzer's orcein. Magn. 400X.

Fig. 9. Group C2. Acroscleroderma in the sclerotic stage. Hyperplasia and hypertrophy of the elastic fibers. Decomposition and fragmentation of the fibers may be noticed. Staining: Weigert's resorcin-fuchsin. Magn. 120X.

Fig. 10. Group C2. Acroscleroderma in the sclerotic stage. Extensive decomposition and fragmentation of the elastic fibers. Staining: Weigert's resorcin-fuchsin. Magn. 400X.

