

О.Г.Харитонова¹
Т.В.Святенко²

¹ Дніпропетровська державна косметологічна лікарня
² ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Ключові слова: розацеа, папуло-пустульозна форма, імуногістохімічні дослідження

Надійшла: 20.01.2012
Прийнята: 05.03.2012

УДК: 616.5/022.9:593

ПАПУЛО-ПУСТУЛЬОЗНА ФОРМА РОЗАЦЕА – РЕЗУЛЬТАТИ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ УРАЖЕНИХ ДІЛЯНОК

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи "Порушення адаптаційних механізмів при дерматозах і інфекціях, що передаються статевим шляхом і методи їх корекції" (номер державної реєстрації 0100U000395).

Резюме. Метою дослідження було вивчення та аналіз ланок патогенезу еритематозно-папульозної форми розацеа за допомогою широкого спектру імуногістохімічних маркерів. Для вирішення поставлених задач авторами використано біопсійний матеріал 11 діагностованих випадків папуло-пустульозної форми розацеа у чоловіків віком від 32 до 59 років. Проведені імуногістохімічні дослідження дозволили виявити нові ланки в патогенезі розацеа та встановити внесок окремих клітинних популяцій шкіри та клітин імунної системи в прогресування захворювання та розвиток саме папуло-пустульозної форми розацеа. Автори дійшли припущення, що можливо, поглиблення патологічних змін при папуло-пустульозній формі розацеа обумовлене наявністю кліщів, які здатні викликати міграцію в шкіру CD68+ клітин, у той час як кількість CD138+ плазмоцитів була незначною та не перевищувала 5-10% в інфільтратах. Ki-67+ клітини у великій кількості нараховувалися в складі сальних залоз, що вказувало на прогресуючі гіперпластичні зміни в цих придатках шкіри. Крім того, кількість клітин, позитивних на цей маркер, корелювала з виразністю ураження сальних залоз в більшому ступеню, ніж зі стадією захворювання.

Морфологія. – 2012. – Т. VI, № 1. – С. 54-58.

© О.Г.Харитонова, Т.В.Святенко, 2012

Haritonova E.G., Sviatenko T.V. Papulo-pustuleznaja form rosacea – results of immunohistochemical research of the condition of the lesions.

Summary. Studying and the analysis of links pathogenesis papulo-pustulosis forms of rosacea by means of a wide spectrum of immunohistochemical markers became a research problem. For the decision of tasks in view by the author it is used biopsy a material of 11 diagnosed cases papulo-pustulosis forms of rosacea at me at the age from 32 till 59 years. Use of immunohistochemical methods of research has allowed to reveal new links in pathogenesis of rosacea and to establish a role of some cellular populations of a skin and cages of immune system in progressing of disease and development papulo-pustulosis forms of rosacea. Authors have come to a conclusion that is possible, strengthening of pathological changes at papulo-pustulosis forms of rosacea is caused by presence of pincers which are capable to cause migration in skin CD68+ cages while quantity CD138+ plasmocytes was insignificant and didn't exceed 5-10 % in infiltrates. Ki-67+ cages in a considerable quantity were as a part of sebaceous glands that specified in progressing hyperplastic changes in these appendages of a skin. Besides, the quantity of cages, positive on this marker, correlated with expressiveness of defeat of sebaceous glands in a greater degree, than with a disease stage.

Keywords: rosacea, papulo-pustulosis form, immunohistochemical researches.

Вступ

Розацеа – хронічний дерматоз із нез'ясованою етіологією. У зв'язку з цим актуалізується питання про розкриття патогенетичних механізмів, які формують різноманіття клінічних проявів розацеа, для індивідуалізації терапевтичних і реабілітаційних підходів щодо кожної клінічної форми захворювання та вивчення мікроскопічних змін у шкірі при різних морфологічних проявах. Європейські дослідники в окремих роботах виділяють 3 послідовних стадії: еритематозно-телеангіектатичну, папуло-пустульозну, пусту-

льозно-вузлувату. Окрім класичних варіантів перебігу захворювання, у літературі також виділяють деякі атипіві, рідкі варіанти перебігу хвороби: стероїдну розацеа, люпоїдну або гранульоматозну, конглобатну, грамнегативну, фульмінантну, розацеа із солідним персистуючим набряком.

При папуло-пустульозній стадії отримані цікаві сучасні дані про зміни не тільки з боку кровоносної системи шкіри, а ще й лімфатичної. Такі зміни характеризуються підвищеною проникливістю лімфатичної системи у вогнищах

ураження. Такі дані корелюють з фактом, що більш виразні гістологічні зміни відображалися клінічно в підвищеній пастозності вогнищ (Neumann E. та співавт., 1998). Автори дійшли висновків, що вказані зміни з боку лімфатичної системи, скоріше є наслідком дистрофічних змін з боку дерми. На відміну від першої стадії при папуло-пустульозній формі утворюється поверхневий перифолікуліт та внутрішньофолікулярні абсцеси. Запальна реакція має більш виразний характер. Інфільтрація дерми масивна, вона спотворюється лімфоцитарними структурними елементами та великою кількістю нейтрофільних гранулоцитів. У вогнищах здебільшого скупчення нейтрофільних лейкоцитів утворюються пустули або абсцеси з розплавленням тканини. Також значно частіше у даному випадку зустрічаються дистрофічні зміни колагенових волокон та рогові кісти, які виникають унаслідок атрофічних змін фолікулярного апарату. При папуло-пустульозній формі запальний інфільтрат більш виразний та локалізується периваскулярно й навколо волосяних фолікулів, найбільш поширеними є інфільтрати в поверхневих та середніх шарах дерми. Може спостерігатися незначна кількість нейтрофільних клітин, лімфоцити та плазматичні клітини. Активна фаза супроводжується поверхневим фолікулітом, на пізній стадії наявний грануломатозний перифолікуліт. Паразитарне ураження є частою знахідкою при розацеа. Так, за даними С.Hsu та колег (2009), до 90% випадків папуло-пустульозної форми розацеа має позитивний корелятивний зв'язок з наявністю кліщів *Demodex folliculorum*. Присутність кліщів у зразках шкіри була встановлена більш ніж у 90% хворих на розацеа цього типу та лише у 12% випадків контрольної групи. Встановлено, що підвищення кількості Т-лімфоцитів, макрофагів, клітин Лангерганса, що виявляли за допомогою імуногістохімічних (ІГХ) методів, також корелює з цим чинником. Ранні дослідження вказували на меншу частоту ураження *Demodex folliculorum* (20-50%) при цій формі захворювання (Akilov O., 2004).

Використання ІГХ методів дослідження дозволило виявити нові ланки в патогенезі розацеа та встановити внесок окремих клітинних популяцій шкіри та клітин імунної системи в прогресування захворювання. Проте, нами не виявлено наукових робіт, де застосований широкий спектр ІГХ маркерів при окремих формах розацеа.

Метою дослідження було вивчення та аналіз ланок патогенезу папуло-пустульозної форми розацеа за допомогою широкого спектру ІГХ маркерів.

Матеріал та методи

Для вирішення поставлених задач у нашому дослідженні використано біопсійний матеріал 11 діагностованих випадків *папуло-пустульозної форми розацеа* у чоловіків віком від 32 до 59

років. Для проведення морфологічного дослідження використовували парафінові блоки біопсійного матеріалу. Після проведення ретельного рутинного патогістологічного дослідження зрізи товщиною 4-6 мкм наносили на спеціальні адгезивні предметні стекла SuperFrost Plus, потім депарафінізували відповідно до прийнятих стандартів. Після депарафінізації для епітопного звороту виконувалось нагрівання в цитратному буфері з рН=6,0 в автоклаві (8 хвилин при температурі +1210°C) із симетричним розташуванням стекол у кюветі. З метою ІГХ верифікації діагнозу ми використовували спектр антитіл, який включав маркери CD4, CD1a, CD68, CD34, α -SMA, CD105, CD138, MMP-1, MMP-9, VEGF, Ki-67, S100, антиапоптотичний маркер Bcl-2. Важливими умовами специфічних та якісних імуногістохімічних реакцій є правильно підібраний титр антитіл, а також час і температура інкубації. Ми використовували інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23-25°C на протязі 30 хвилин. Титр антитіл підбирався індивідуально для кожного маркера. Наступний етап імуногістохімічного дослідження проводили з використанням системи візуалізації останнього покоління UltraVision QUANTO (LabVision), ідентифікація реакцій проводилась за допомогою хромогену DAB та додаткового забарвлення гематоксиліном Майєра для відтворення структурної організації тканини.

Результати та їх обговорення

При ІГХ дослідженні папуло-пустульозної форми розацеа на другій та третій стадії ми виявили виразні периваскулярні інфільтрати, в яких частка CD4+ клітин складала 10-20% при другій стадії, 20-30% – при третій. Навколо сальних залоз інфільтрати завжди були більш істотними, ніж біля судин, в них частка Т-хелперів могла сягати 40-50% при третій стадії захворювання та 20-40% при другій стадії (рис. 1, 2). CD68+ макрофаги також були присутні в інфільтратах навколо судин та залоз шкіри. Ми нарахували до 20% цих клітин в інфільтратах будь-якої локалізації при другій стадії захворювання та до 40% при третій стадії (рис.3).

Можливо, що поглиблення патологічних змін при третій стадії обумовлене наявністю кліщів, які здатні викликати міграцію в шкіру CD68+ клітин. Кількість CD138+ плазмоцитів була незначною та не перевищувала 5% в інфільтратах при другій стадії та 10% – при третій.

Кількість CD1a+ клітин в епідермісі та дермі була дещо підвищеною порівняно до норми та демонструвала різницю при поглибленні патологічних змін в напрямку подальшого збільшення (рис.4).

Маркер α SMA мав таку ж саму локалізацію, як й при еритематозно-папульозній формі (рис. 5). Більше клітин, позитивних на цей маркер,

було в дермі навколо ділянок, що демонстрували рубцеві зміни. Ми не визначили залежності загальної кількості α SMA+ клітин від стадії розвитку захворювання, бо більше значення для їх появи мали місцеві умови, а саме, формування фіброзу.

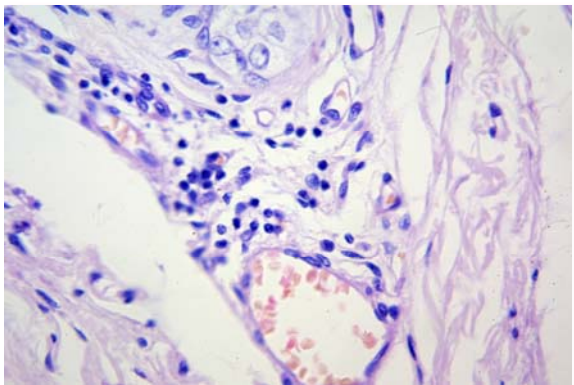


Рис. 1. Периваскулярна лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, фібриноїдне набухання колагену в дермі хворого з папуло-пустульозною формою розацеа. Забарвлення гематоксилином-еозином. $\times 1000$.

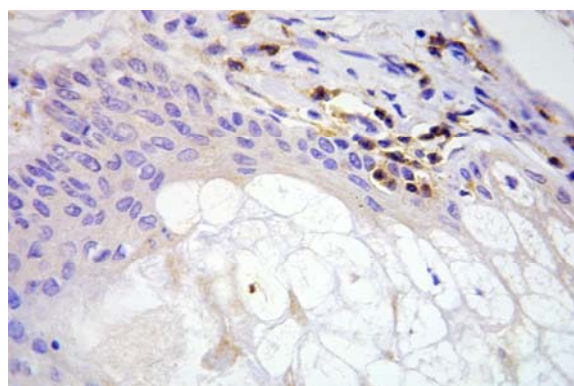


Рис. 2. Позитивна цитоплазматична та мембранна реакція з CD4 довкола сальних залоз та в дермі у хворого з розацеа. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. $\times 1000$.

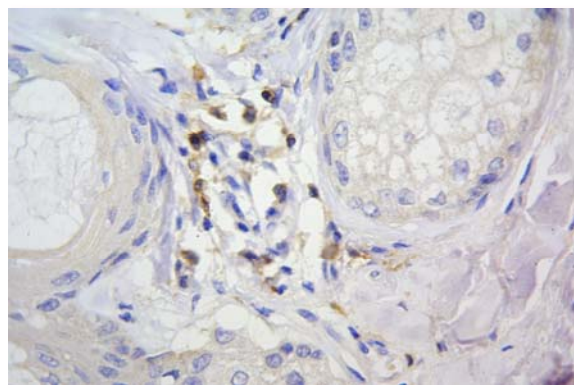


Рис.3. Позитивна цитоплазматична та мембранна реакція з CD68 навколо сальних залоз та судин у дермі у хворого з розацеа. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. $\times 1000$.

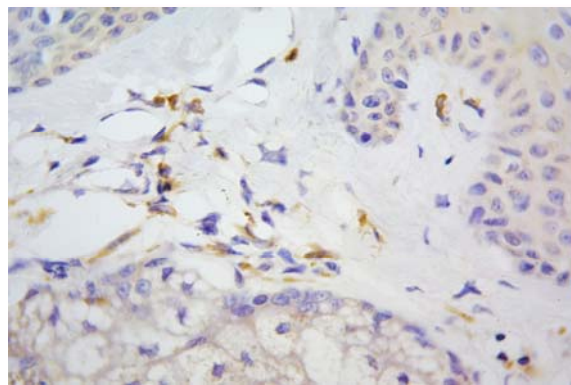


Рис. 4. Позитивна цитоплазматична та мембранна реакція з CD1a в дермі. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. $\times 1000$.

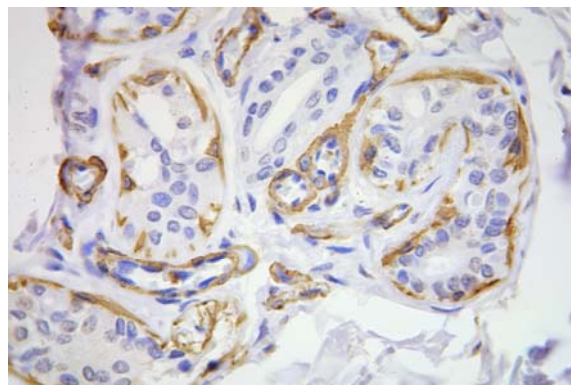


Рис. 5. Позитивна мембранна реакція з маркером α -SMA у гладком'язових елементах судин та міоепітеліальних клітинах потових залоз серед фіброзованої дерми. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. $\times 1000$.

Окрім CD34+ клітин звичайної локалізації, ми виявили позитивні на цей маркер клітини в дермі хворих на папуло-пустульозну форму розацеа другій та третій стадії, що були розташовані в глибині та навколо ділянок, що найбільш постраждали від склеротичних деформацій (рис. 6).

CD105+ клітини були наявні в ендотелії, в складі мононуклеарних інфільтратів. Цими клітинами також були перицити та гладком'язові клітини мікросудин. Окремі позитивні на CD105 клітини виявлялися в дермі та навколо придатків шкіри (рис.7). Клітини, позитивні на MMP-1, були поодинокими в дермі та найчастіше локалізувалися периваскулярно. MMP-9+ клітин було досить багато, в основному, в складі фібробластів або міофібробластів дерми. Клітинами, позитивними на VEGF, були епітеліоцити потових та сальних залоз, ендотеліальні клітини та клітини стінки судин, окремі дермальні дендроцити. VEGF+ клітини, що належали до інфільтратів, були малочисельними, порівняно до еритематозно-папульозної форми, їх кількість майже не

зростала при третій стадії захворювання (рис. 8).

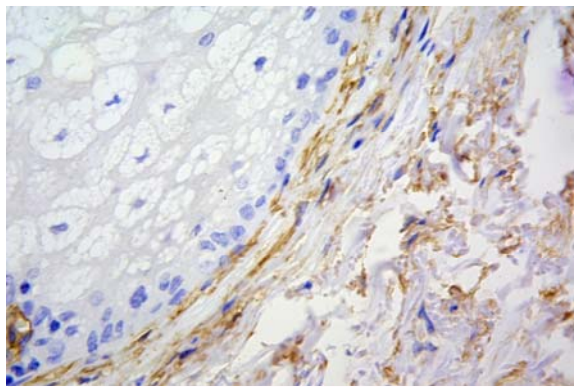


Рис.6. Позитивна цитоплазматична та мембранна реакція з CD34 в судинах дерми. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. $\times 1000$.

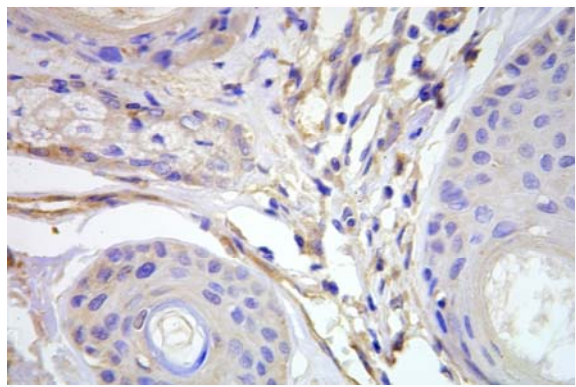


Рис. 7. Позитивна цитоплазматична та мембранна реакція з CD105 з мононуклеарами інфільтратів дерми та гладком'язових судинах. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. $\times 1000$.

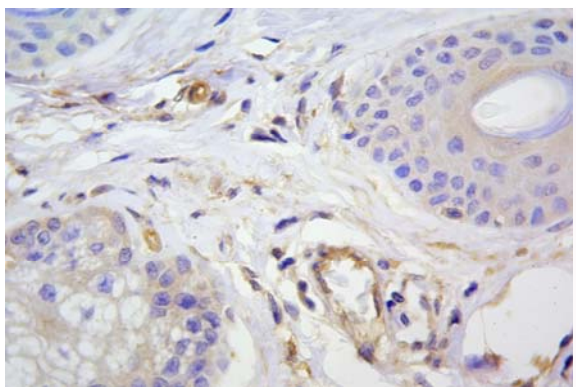


Рис. 8. Позитивна цитоплазматична та мембранна реакція з VEGF у епітеліоцитах сальної залози, ендотелії судин дерми та поодиноких дендроцитів. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. $\times 1000$.

Ki-67+ клітини в великій кількості нараховувалися в складі сальних залоз, що вказувало на прогресуючі гіперпластичні зміни в цих придат-

ках шкіри. Кількість клітин, позитивних на цей маркер, корелювала з виразністю ураження сальних залоз в більшому ступені, ніж з стадією захворювання (рис. 9).

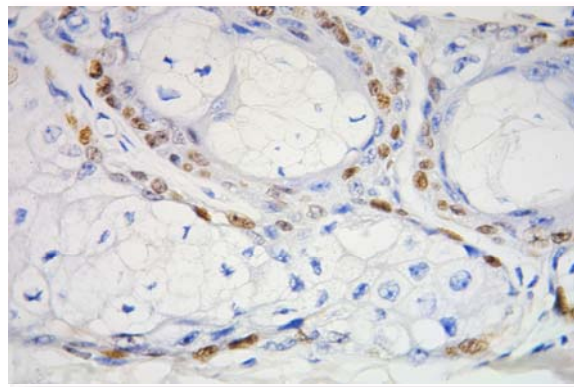


Рис. 9. Позитивна інтрануклеарна реакція з Ki-67 у резервному міоепітеліальному шарі сальних залоз. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. $\times 1000$.

Клітин, позитивних на S-100, було багато в дермі на навколо придатків шкіри. Як і в нормальній шкірі, вони також визначалися в епідермісі. В дермі та навколо сальних залоз вони були поодинокими (рис. 10). При поглибленні стадії захворювання кількість S-100+ клітин була більшою. Vcl-2+ клітини були поодинокими та локалізувалися в дермі та навколо сальних залоз.

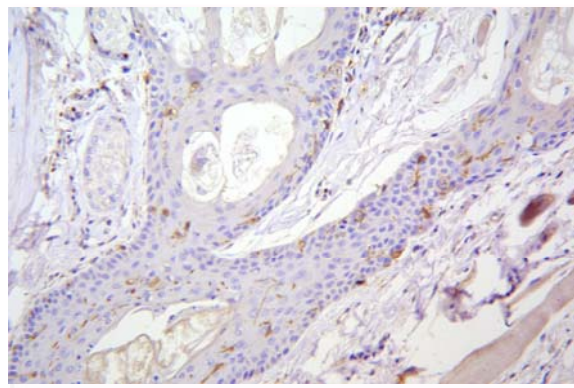


Рис. 10. Позитивна цитоплазматична та мембранна реакція з S100 в меланоцитах епідермісу та довкола придатків шкіри. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. $\times 400$.

Підсумок

Таким чином, проведені ІГХ дослідження дозволили виявити нові ланки в патогенезі розацеа та встановити внесок окремих клітинних популяцій шкіри та клітин імунної системи в прогресування захворювання та розвиток саме папуло-пустульозної форми розацеа. Можливо, що поглиблення патологічних змін обумовлене наявністю кліщів, які здатні викликати міграцію в шкіру CD68+ клітин, у той час як кількість

CD138+ плазмоцитів була незначною та не перевищувала 5-10% в інфільтратах. Ki-67+ клітини в великій кількості нараховувалися в складі сальних залоз, що вказувало на прогресуючі гіперпластичні зміни в цих придатках шкіри. Крім того, кількість клітин, позитивних на цей маркер, корелювала з виразністю ураження сальних залоз в більшому ступеню, ніж з стадією захворювання.

Перспективи подальших розробок

На підставі проведеної роботи нам вважається перспективним вивчення також імуногістохімічних особливостей стану уражених ділянок шкіри при папуло-пустульозній формі розацеа після проведеного лікування та інших формах розацеа з метою порівняння отриманих даних та встановлення чітких кореляційних зв'язків між клінічними та морфологічними особливостями дерматозу.

Літературні джерела

Akilov O. Immune response in demodicosis. / O. Akilov, Y. Mumcuoglu // JEADV. – 2004. – Vol. 56. – P. 440-444.

Hsu C. Demodicosis: a clinicopathological study / C. Hsu, J. Lee // J. Am. Acad. Dermatol. –

2009. – Vol. 42. – P. 453-462.

Neumann E. Capillaropathy and capillaroneogenesis in the pathogenesis of rosacea. / E. Neumann, A. Frithz // Int. J. Dermatol. – 1998. – Vol. 16. – P. 263-266.

Харитонов О.Г., Святенко Т.В. Папуло-пустулезная форма розацеа – результаты иммуногистохимического исследования состояния пораженных участков.

Резюме. Задачей исследования стало изучение и анализ звеньев патогенеза папуло-пустулезной формы розацеа при помощи широкого спектра иммуногистохимических маркеров. Для решения поставленных задач авторами использован биопсийный материал 11 диагностированных случаев папуло-пустулезной формы розацеа у мужчин в возрасте от 32 до 59 лет. Использование иммуногистохимических методов исследования позволило выявить новые звенья в патогенезе розацеа и установить роль некоторых клеточных популяций кожи и клеток иммунной системы в прогрессировании заболевания и развитии именно папуло-пустулезной формы розацеа. Авторы пришли к выводу, что возможно, усиление патологических изменений при папуло-пустулезной форме розацеа обусловлено наличием клещей, которые способны вызвать миграцию в кожу CD68+ клеток, в то время, как количество CD138+ плазмоцитов было незначительным и не превышало 5-10% в инфильтратах. Ki-67+ клетки в большом количестве насчитывались в составе сальных желез, что указывало на прогрессирующие гиперпластические изменения в этих придатках кожи. Кроме этого, количество клеток, положительных на этот маркер, коррелировало с выраженностью поражения сальных желез в большей степени, чем со стадией заболевания.

Ключевые слова: розацеа, папуло-пустулезная форма, иммуногистохимические исследования.