

**О.Г.Харитонова**

Дніпропетровська державна  
косметологічна лікарня

**Ключові слова:** розацеа, еритематозно-папульозна форма, імуногістохімічні дослідження.

Надійшла: 23.10.2011

Прийнята: 21.11.2011

УДК: 616.5/022.9:593

## **ЕРИТЕМАТОЗНО-ПАПУЛЬОЗНА 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 автором використано біопсійний матеріал 12 діагностованих випадків еритематозно-папульозної форми розацеа у чоловіків віком від 32 до 64 років. Використання імуногістохімічних методів дослідження дозволило виявити нові ланки в патогенезі розацеа та встановити внесок окремих клітинних популяцій шкіри та клітин імунної системи в прогресування захворювання. Окрім того, при використанні нової схеми лікування спостерігалася значно більш виразна динаміка імуногістохімічних показників при еритематозно-папульозній формі. Вплив лікування на імунну ланку був підтверджений істотним, відносно контролю, зменшенням кількості CD4+ клітин, а також змінами в чисельності CD1a+, CD138+ та CD68+ клітин. Більшого результату запропонована схема дає в напрямку пригнічення фіброзних змін у дермі та міофібробластної трансформації дендроцитів. Суттєво покращується метаболізм позаклітинного матриксу. Вплив лікування на судинний компонент підтверджений зменшенням щільності судин паралельно з зниженням експресії VEGF.

**Морфологія.** – 2011. – Т. V, № 4. – С. 60-66.

© О.Г.Харитонова, 2011

**Haritonova E.G. Eritema-papulosis form rosacea – results of immunohistochemical research of the condition of the lesions.**

**Summary.** Studying and the analysis of links pathogenesis of eritema-papulosis 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 a material of 12 diagnosed cases eritema-papulosis forms of rosacea at men at the age from 32 till 64 years. Use of immunohistochemical methods of research has allowed to reveal new links in pathogenesis rosacea and to establish a role of some cellular populations of a skin and cages of immune system in disease progressing. Besides, at use of the offered scheme of treatment dynamics of immunohistochemical indicators was observed considerably more expressed at eritema-papulosis forms. Treatment influence on an immune link was has been confirmed essential, concerning control, reduction of quantity CD4 + cages, and also changes in quantity CD1a +, CD138 + that CD68 + cages. Essential result the offered scheme gives in a direction of suppression of fibrous changes in derma and myofibroblastic transformations dendrocytes. Considerably the metabolism extracellular of matrix improves. Influence of treatment on a vascular component proves to be true reduction of density of vessels in parallel with decrease in expression VEGF.

**Keywords:** rosacea, the eritema-papulosis form, immunohistochemical researches.

### **Вступ**

Розацеа – хронічний дерматоз із нез'ясованою етіологією та досить різноманітними клінічними формами, що відображають стадійність розвитку захворювання, є предметом активних досліджень з використанням найсучасніших методів. Основними патогенетичними порушеннями при розацеа вважають запальні прояви та відхилення в стані судин.

При еритематозно-телеангіектатичній формі спостерігається розширення поверхневих судин дерми та периваскулярні інфільтрати, кількість плазматичних клітин в них незначна, що є важливою диференційною ознакою (Pasmatzi E., 2009). Аномальний стан судинного русла при розацеа підтримується надмірною продукцією рецепторів до фактору росту судинного ендотелію (VEGF) в ендотеліальних клітинах мікросу-

дин та мононуклеарних клітинах запального інфільтрату (Pasmatzis E., 2009). VEGF також активно експресується лімфоцитами, плазматичними клітинами та макрофагами. При імуногістохімічному (ІГХ) дослідженні наявність рецепторів до цього фактору росту визначалась частіше, ніж експресія самого фактору (Helm K.F. et al., 2010). У дермі уражених ділянок шкіри експресія VEGF була вищою порівняно до інтактних (88.9% та 55.6%, відповідно) (Mentzel T. et al., 2008). Маркер ендотелію кровеносних судин CD31 та маркер ендотелію лімфатичних судин D2-40 також більш активно експресувалися в ділянках, уражених на розацеа. Не виявлено статистично значущої різниці в експресії цих факторів між папуло-пустульозною та еритемо-телеангіектатичною формами розацеа, а також залежності між рівнем експресії цих маркерів та тривалістю захворювання (Mentzel T. et al., 2008).

При розацеа страждає обмін позаклітинного матриксу, що контролюється матриксними металопротеазами (ММП). При хронічному запаленні, що супроводжує окремі форми захворювання, ММП є необхідними для залучення клітин запального інфільтрату та перебудови тканини (Neumann E. et al., 2008).

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 був застосований широкий спектр ІГХ маркерів при окремих формах розацеа.

**Метою** дослідження було вивчення та аналіз ланок патогенезу еритематозно-папульозної форми розацеа за допомогою широкого спектру ІГХ маркерів.

#### **Матеріал та методи**

Для вирішення поставлених задач у нашому дослідженні використано біопсійний матеріал 12 діагностованих випадків *еритематозно-папульозної форми розацеа* у чоловіків віком від 32 до 64 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,  $\alpha$ -SMA, CD105, CD138, MMP-1, MMP-9, VEGF, Ki-67, антиапоптотичний маркер Bcl-2. Важливими умовами специфічних та якісних імуногі-

стохімічних 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 протягом 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 еритематозно-папульозної форми захворювання ми спостерігали незначні інфільтрати мононуклеарних клітин навколо мікросудин та судин середнього калібру, що містили поодинокі CD4+ клітини. Також при посиленні клінічних ознак цієї форми захворювання в більшому ступені збільшуються інфільтрати навколо саме сальних залоз (перехід в іншу форму) (рис. 1). При прогресуванні захворювання CD4+ клітини формували периваскулярні та парафолікулярні скупчення (рис. 2).

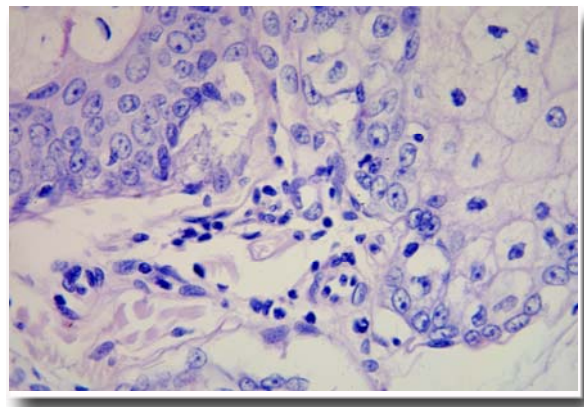


Рис. 1. Гіперплазія сальних залоз, периваскулярна лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, глибокий розпад колагену сосочкового шару дерми у хворого з еритематозно-папульозною формою розацеа. Забарвлення гематоксиліном-еозином.  $\times 1000$ .

CD68+ мононуклеарні клітини рідко зустрічались в інфільтратах при еритематозно-папульозній формі, але були постійно присутні в поверхневих шарах дерми. Скупчень вони не формували, були поодинокими в ділянках, що менш страждали на фіброзні зміни (рис. 3). CD138+ плазматичні клітини були також поодинокими навколо сальних та потових залоз (рис. 4). Окремі клітини зустрічались в дермі, а саме, в субепідермальних ділянках.

CD1a+ клітини (клітини Лангерганса) в незначній кількості визначалися в епідермальному шарі уражених ділянок шкіри без істотних відмінностей.

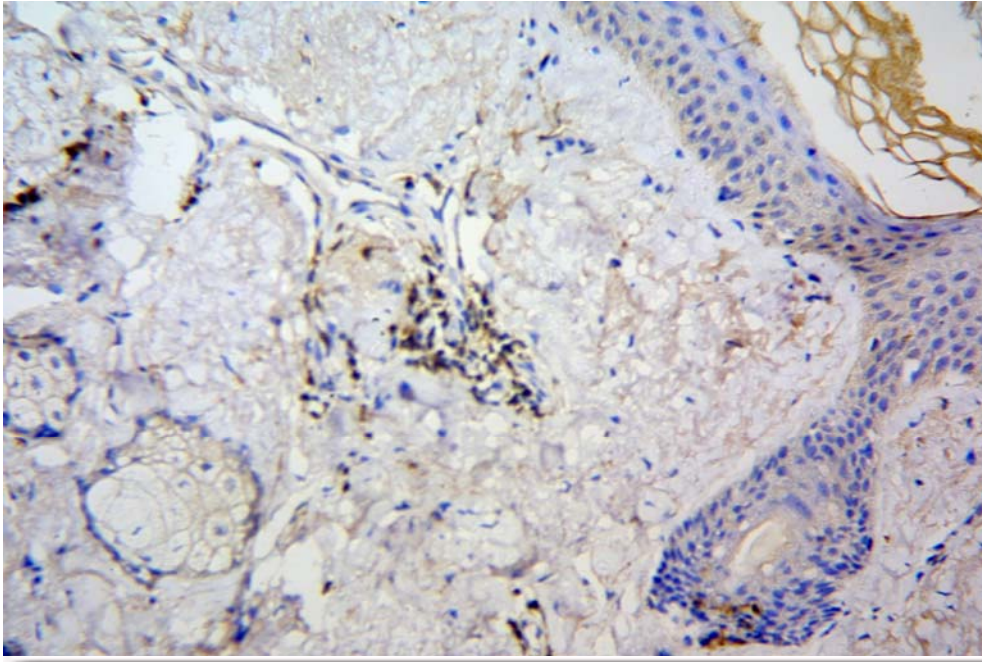


Рис. 2. Позитивна цитоплазматична та мембранна реакція з CD4 довкола судин та волосяного фолікулу у хворого при прогресуванні розацеа. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.  $\times 400$ .

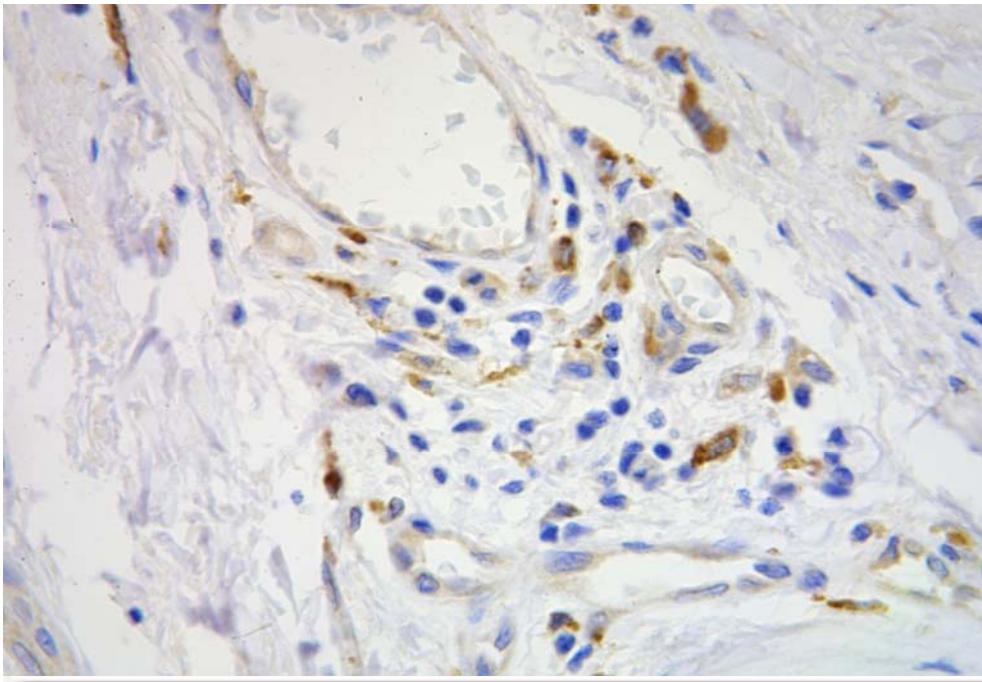


Рис. 3. Позитивна цитоплазматична та мембранна реакція в мононуклеарах з CD68 у збережених ділянках сітчастого шару дерми у хворого з розацеа. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.  $\times 1000$ .

Маркер CD34, як зазвичай, визначався в ендотелії судин, багато позитивних на маркер клітин було розташованими парафолікулярно та навколо потових залоз (рис. 6). CD34+ клітинами, також можуть дендроцити дерми, особливо при розвитку фіброзних змін. Зазвичай, в повер-

хневих та середніх прошарках дерми ми знаходили поодинокі позитивні на цей маркер клітини.

CD105+ клітини, або ендоглін-позитивні, наявність яких є показником здатності реагувати на вплив трансформуючого ростового фактору  $\beta$ , в незначній кількості визначалися в складі епіте-

лію сальних та потових залоз. Окремі позитивні клітини були наявні в субепідермальном шарі дерми. Найбільша кількість CD105+ клітин ви-

являлася навколо сальних залоз та в стінці судин (рис. 7).

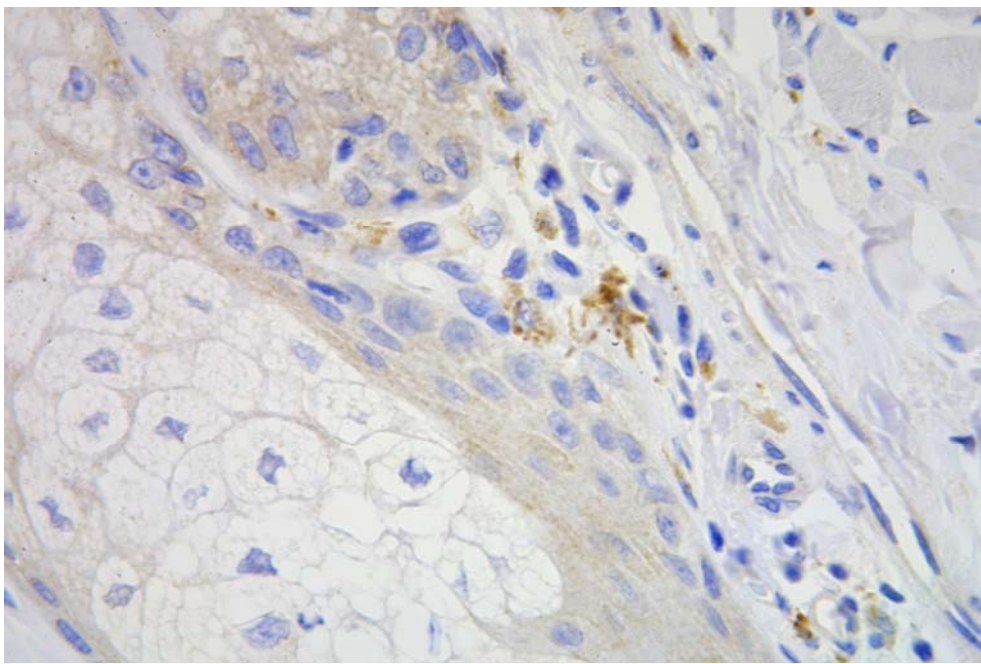


Рис. 4. Позитивна цитоплазматична та мембранна реакція в поодиноких плазматичних клітинах з CD138 довкола сальних залоз. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.  $\times 1000$ .

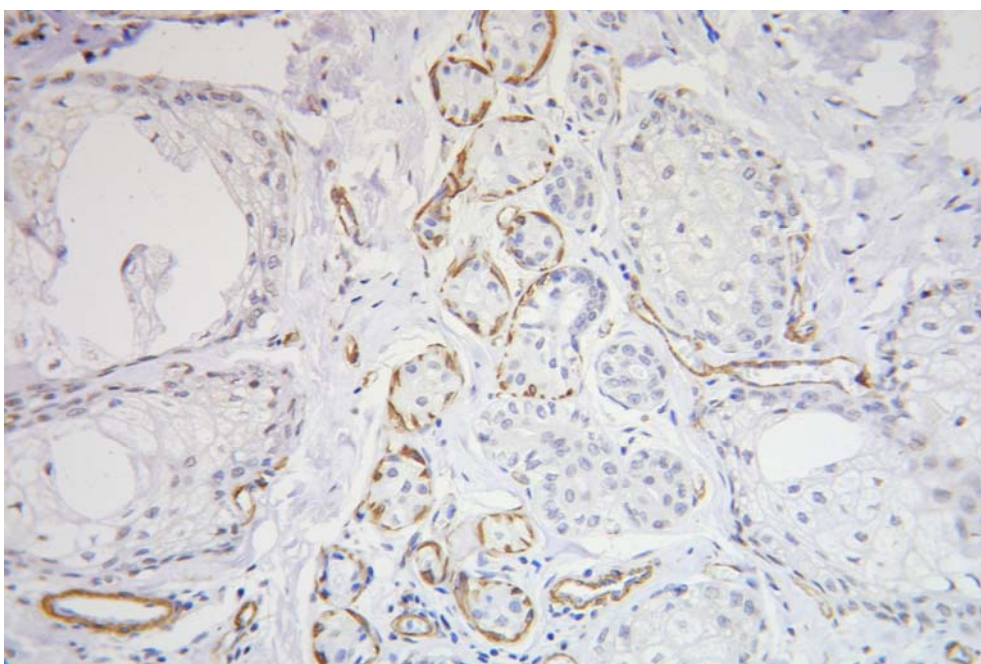


Рис. 5. Позитивна мембранна реакція з маркером  $\alpha$ -SMA у гладком'язових елементах судин та міоепітеліальних клітинах потових залоз. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.  $\times 400$ .

Маркер  $\alpha$ -SMA виявлявся в клітинах міоепітелію потових залоз, гладком'язових клітинах судин (рис. 5). Також даний маркер позначав деякі окремі дендроцити дерми, можливо ті, що

піддалися трансформації в міофіброласти. Кількість їх була невеликою и майже не змінювалась при поглибленні патологічного процесу для цієї форми розацеа.

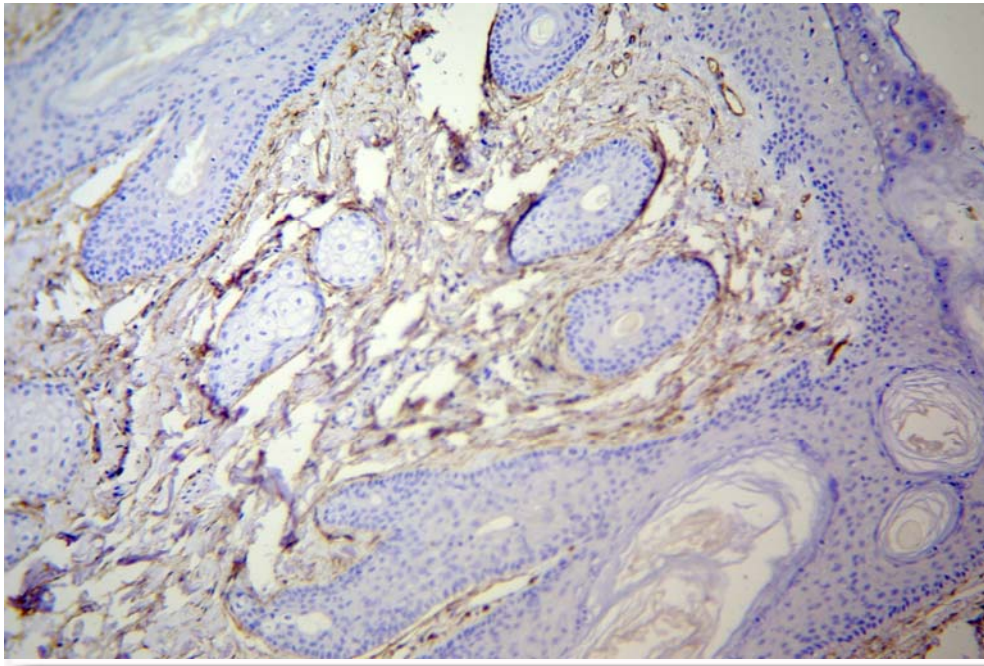


Рис. 6. Позитивна мембранна реакція з CD34 у багатоваскуляризованій дермі. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.  $\times 200$ .

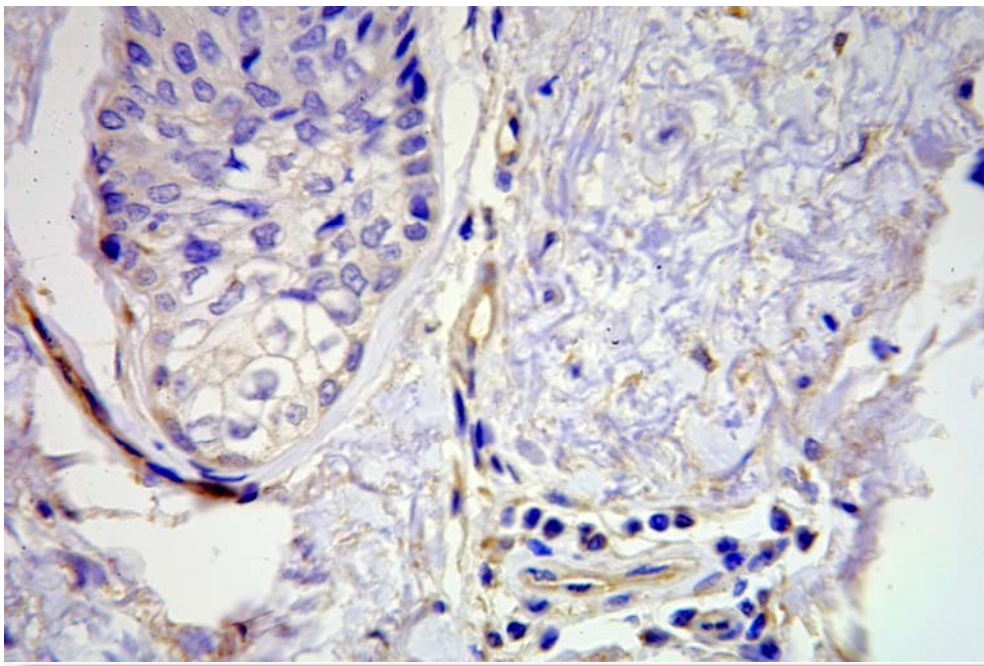


Рис. 7. Позитивна мембранна та цитоплазматична реакція з CD105 у поодиноких клітинах сальної залози та в стінці кровоносних судин. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.  $\times 1000$ .

У дермі зразків шкіри хворих на розацеа еритематозно-папульозної форми кількість MMP-1+ клітин була зовсім незначною, а MMP-9+ клітини, навпроти, визначалися в складі судин, серед фіброblastів дерми, найбільш – під епідермісом (рис. 8). Клітинами, що виробляли VEGF, виявилися епітеліоцити потових та сальних залоз, гладком'язові та ендотеліальні клітини судин, окремі фіброblastи дерми та мононуклеарні клітини.

Клітини, що були позитивні на маркер про-

ліферації Ki-67, визначалися в основному в епідермісі шкіри та в міоепітелоцитах (рис. 9). При другій та третій стадії захворювання в дермі позитивні на цей маркер клітини були поодинокими. Клітини, що експресували антиапоптотичний маркер Bcl-2, були поодинокими та локалізувалися в дермі та навколо сальних залоз.

Клітини, що були позитивними на S-100, в основному, визначалися в базальному та шипчастому шарах епідермісу. В дермі та навколо сальних залоз вони були поодинокими.

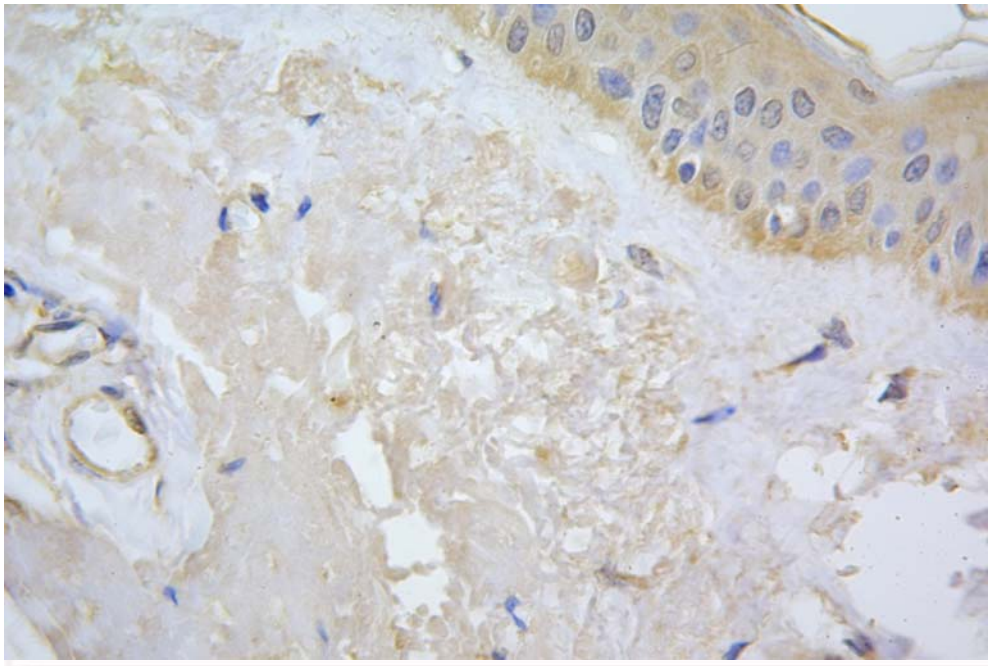


Рис. 8. Позитивна реакція з MMP-9 у дермі та стінках судин. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.  $\times 1000$ .

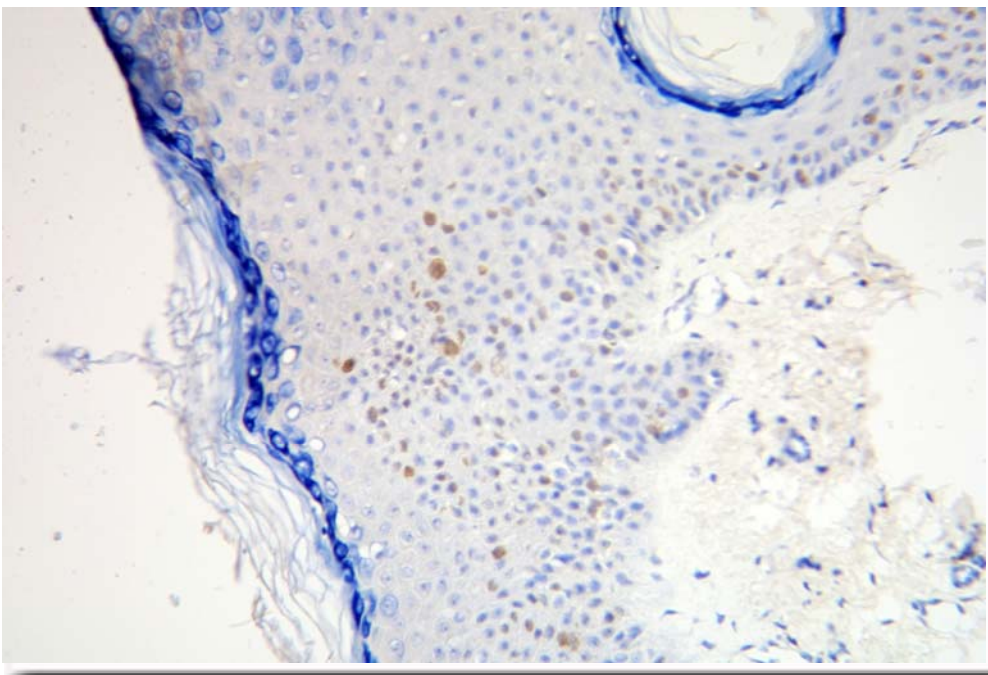


Рис. 9. Позитивна інтрануклеарна реакція з Ki-67 у гіперплазованому базальному шарі епідермісу шкіри (Ki-67=11%). Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.  $\times 400$ .

Після лікування по запропонованій схемі при еритематозно-папульозній формі ми спостерігали значне скорочення чисельності інфільтратів, зменшення кількості CD4+ клітин в них та зменшення кількості Т-хелперів, що були розташовані поодинокі. Суттєво зменшувалась кількість клітин цього типу навколо сальних залоз. Дещо, але в меншому ступеню, змінювалась чи-

сельність CD1a+, CD138+ та CD68+ клітин, хоча це можна пояснити початковим низьким рівнем цих маркерів при еритематозно-папульозній формі захворювання.

Локалізація та кількість клітин, що були позитивні на  $\alpha$ SMA та CD34, мало змінювалися в складі судин та залоз, але кількість їх в дермі дещо зменшувалась, що вказувало на пригнічен-

ня міофібробластної трансформації дендроцитів та позитивний вплив лікування на розвиток фіброзних змін. Так само, що вказує на наявність патогенетичного зв'язку між трансформацією та фіброзом дерми, зменшувалась кількість CD105+ клітин всіх можливих локалізацій (судинна стінка, залози, дерма). Позитивними змінами ми також вважаємо зменшення кількості клітин, що демонстрували активність ферментів MMP-1 та MMP-9. Найбільш помітними були зміни чисельності цих клітин в субепідермальному шарі шкіри – місцю, що найбільш страждало від фібротичних змін. Зменшення діаметру судин дерми, що ми спостерігали після лікування, частково пов'язане зі зменшенням VEGF+ клітин, особливо в складі інфільтратів та дермальних фіброblastів. При застосуванні стандартної схеми лікування кількість імунних клітин іншого типу майже не змінювалась. Значно меншою порівняно до запропонованої схеми лікування була позитивна динаміка кількості клітин, що відображають активність фіброзних процесів, а зменшення кількості клітин, що синтезують металопротеази, було на рівні з досліджувальною групою. Кількість VEGF+, Ki-67+, Vcl-2+ та S-100+ клітин змінювалось не суттєво. Контрольна гру-

па продемонструвала відсутність цього ефекту.

#### **Підсумок**

При використанні нової схеми лікування спостерігається значно більш виразна динаміка ІГХ показників при еритематозно-папулезній формі. Вплив лікування на імунну ланку був підтверджений істотним, відносно контролю, зменшенням кількості CD4+ клітин, а також змінами в чисельності CD1a+, CD138+ та CD68+ клітин. Більшого результату запропонована схема дає в напрямку пригнічення фіброзних змін у дермі та міофібробластної трансформації дендроцитів. Суттєво покращується метаболізм позаклітинного матриксу. Вплив лікування на судинний компонент підтверджений зменшенням щільності судин паралельно зі зниженням експресії VEGF.

#### **Перспективи подальших розробок**

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

### **Літературні джерела**

Helm K. F. A clinical and histopathologic study of granulomatous rosacea / K. F. Helm, J. Menz // J. Am. Acad. Dermatol. – 2010. – Vol. 25, № 1. – P. 1038-1043.

Mentzel T. Cutaneous angiosarcoma of the face: clinicopathologic and immunohistochemical study of a case resembling rosacea clinically / T. Mentzel, H. Kutzner // J. Am. Acad. Dermatol. – 2008. – Vol. 38, № 2. – P. 837-840.

Neumann E. Capillaropathy and capillaroneogenesis in the pathogenesis of rosacea / E. Neumann, A. Frithz // Int. J. Dermatol. - 2008. – Vol. 37, № 4. – P. 263-266.

Pasmatz E. Rosacea-like demodicosis induced by topical pimecrolimus: immunohistochemical evaluation of inflammatory infiltrate / E. Pasmatz, M. Melachrinou // Hospital chronicles. – 2009. – Vol. 4, № 4. – P. 172-174.

#### **Харитоновна Е.Г. Эритематозно-папулезная форма розацеа – результаты иммуногистохимического исследования состояния пораженных участков.**

**Резюме.** Задачей исследования стало изучение и анализ звеньев патогенеза эритематозно-папулезной формы розацеа при помощи широкого спектра иммуногистохимических маркеров. Для решения поставленных задач автором использован биопсийный материал 12 диагностированных случаев эритематозно-папулезной формы розацеа у мужчин в возрасте от 32 до 64 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. Кроме того, при использовании предложенной схемы лечения наблюдалась значительно более выраженная динамика иммуногистохимических показателей при эритематозно-папулезной форме. Воздействие лечения на иммунное звено было подтверждено существенным, относительно контроля, уменьшением количества CD4+ клеток, а также изменениями в количестве CD1a+, CD138+ та CD68+ клеток. Существенный результат предложенная схема дает в направлении подавления фиброзных изменений в дерме и миофибробластной трансформации дендроцитов. Значительно улучшается метаболізм внеклеточного матрикса. Влияние лечения на сосудистый компонент подтверждается уменьшением плотности сосудов параллельно со снижением экспрессии VEGF.

**Ключевые слова:** розацеа, эритематозно-папулезная форма, иммуногистохимические исследования.