

Т.В. Святенко, О.А. Старостіна

ДЗ «Дніпропетровська державна медична академія МОЗ України», Дніпро

# Імуногістохімічні дослідження та їхнє значення у діагностиці розацеа у жінок

**Мета роботи** — дослідити взаємозв'язок між рівнем експресії рецепторів андрогенів/естрогенів (AR/ER) і маркера росту ендотелію судин (VEGF) та розробити спосіб прогнозування перебігу розацеа у жінок, що забезпечить можливість заздалегідь передбачити тяжкість перебігу хвороби та вчасно призначити виправдану індивідуалізовану терапію.

**Матеріали та методи.** Для дослідження відібрано 16 біоптатів патологічно зміненої шкіри хворих на розацеа жінок. Проводилось імуногістохімічне дослідження отриманих зразків за допомогою первинних моноклональних антитіл до VEGF, AR і ER.

**Результати та обговорення.** На підставі імуногістохімічного дослідження встановлено суттєве підвищення експресії рецепторів до фактора росту ендотелію судин (VEGF), рецепторів до андрогенів/естрогенів (AR, ER) у біоптатах шкіри хворих на розацеа порівняно зі здоровою шкірою (від  $p < 0,05$  до  $p < 0,001$ ). Маркер росту ендотелію судин VEGF при розацеа інформує про рівень васкулогенезу і запалення в епідермісі та навколо pilosebaceous unit. Підвищення рівня експресії AR в епітелії залоз та фолікулярному епітелії, та рівня васкулогенезу навколо pilosebaceous unit свідчить про перехід розацеа з еритематозно-телеангіектатичної форми у папуло-пустульозну і початок незворотних змін структури і розмірів сальних залоз.

**Висновки.** При аналізі рівня експресії AR та ER-рецепторів та рівня VEGF виявлено вірогідний зв'язок між визначеними змінами та особливістю клінічного перебігу розацеа у хворих. Виявлені кореляції дали змогу розробити алгоритм прогнозування прогресивного перебігу розацеа у жінок для вибору адекватного терапевтичного впливу на всі ланки патогенезу. В комплексі діагностичного обстеження пацієнта вкрай важливо мати діючий спосіб прогнозування індивідуального перебігу розацеа у конкретного хворого для призначення патогенетично обгрунтованої та ефективної терапії. Це ілюструє доцільність подальшого вивчення імунопатогенетичних механізмів розвитку розацеа та патогенетичної ролі експресії рецепторів шкіри та судин у формуванні запального процесу при розацеа.

## Ключові слова

Розацеа, ангиогенез, діагностика, прогноз, VEGF, AR, ER.

Проблема розацеа характеризується відсутністю чіткого уявлення про етіологію та патогенез, значною поширеністю захворювання серед осіб працездатного віку та хронічним персистуючим перебігом із формуванням стійких косметичних дефектів на шкірі обличчя [1, 5, 7]. Ці зміни знижують якість життя пацієнтів та підвищують частоту психологічного дискомфорту, пов'язаного із захворюванням [2, 6, 8].

Актуальність вивчення розацеа зумовлена різноманітністю клінічних виявів захворювання. Для індивідуалізації терапевтичних і реабілітаційних підходів до кожної клінічної форми розацеа важливим є вивчення патогенетичних механізмів розвитку захворювання, мікроскопічних, імуно- та морфофункціональних змін у шкірі при різних клінічних виявах розацеа [4–8].

## Матеріали та методи

Для дослідження було відібрано 16 зразків патологічно зміненої шкіри хворих на розацеа жінок. Фіксовані у формаліні і залиті у парафін зразки розацеа відбирали в процесі попереднього морфологічного дослідження. Парафінові зрізи інформативних блоків наносили на спеціальні адгезивні предметні скельця Super Frost Plus. Після депарафінізації та регідратації зрізів проводили епітопне повернення антигенів та пригнічення ендогенної пероксидази. Інкубацію зрізів з первинними антитілами здійснювали у вологих камерах за температури 23–25 °C протягом 30 хв. Як первинні використовували моноклональні антитіла до маркера росту ендотелію судин (VEGF) та рецепторів андрогенів/естрогенів (AR/ER). Дані щодо

Таблиця. Панель первинних антитіл

Антитіло	Клон	Розведення	Виробник
VEGF	Ab-1	1 : 1000	Thermo scientific
AR	Fremont, CA	1 : 250	Thermo scientific
ER	sp1	1 : 400	Thermo scientific

титру, клонів і виробників антитіл наведено в таблиці.

Ідентифікацію реакцій проводили відповідно до реакцій з розчином хромогену 3-діамінобензидинтетрахлориду (ДАБ) (Quanto, LabVision) під контролем мікроскопа. Неспецифічні клітинні структури додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра.

Рівень інтенсивності цитоплазматичної експресії маркерів VEGF оцінювали з використанням програми для обробки цифрових зображень Image J. На першому етапі за допомогою плагіну Colour Deconvolution, що має вбудовану схему для аналізу забарвлень «Гематоксилін + ДАБ», зображення ділили на синій та коричневий колір (відокремлювали ДАБ від гематоксиліну). Далі за гістограмою зображення коричневого кольору кількісно оцінювали в діапазоні від 0 (чорне) до 255 (біле) за стандартною шкалою яскравості [1].

Для оцінки інтрануклеарних імуногістохімічних (ІГХ) реакцій з маркерами AR/ER використовували інтегрований плагін ImmunoRatio програми Image J: Plugins > ImmunoRatio для розрахунку середніх значень [1].

Статистичну обробку матеріалів дослідження проводили з використанням ліцензійного пакета програм Statistica v6.1 (Statsoft Inc. США, серійний № AGAR909E415822FA).

Залежно від типу ознак і типу вибірок (зв'язані чи незв'язані) згідно із законом розподілу даних (критерій Шапіро—Уїлка) використовували параметричні і непараметричні критерії порівняння: Ст'юдента (t, T), Манна—Уїтні (U), Вілкоксона (W) та критерій відповідності Пірсона ( $\chi^2$ ). Для оцінки взаємозв'язку ознак проводили кореляційний аналіз з розрахунком коефіцієнтів рангової кореляції Спірмена (r). Критичний рівень статистичної значущості (p) при перевірці статистичних гіпотез приймали як  $\leq 0,05$ .

Нижче наведені клінічні випадки прогнозування перебігу хвороби у пацієнток, які були під нашим спостереженням.

*Хвора К.*, 34 роки. Клінічний діагноз: Розацеа, еритематозно-телеангіектатична форма. Клінічно на щоках і підборідді відзначається еритема рожевого кольору з множинними телеангіектазіями.

11.08.2015 р. у хворої взяли біоптат шкіри методом панч-біопсії, який досліджували за стандартним морфологічним методом з використанням гематоксиліну та еозину і за допомогою імунохімічного методу із застосуванням маркера VEGF, маркерів рецепторів до AR та ER. Імуногістохімічний статус: загальний рівень VEGF 2+, рівень VEGF в епідермісі 168,789 (рис. 1Б), навколо *pilosebaceous unit* – 157,767. Рівень експресії ER в епідермісі 0,2, у залозах – 0,9 (рис. 1А). Рівень експресії AR в епідермісі 2,40, у залозах – 3,5.

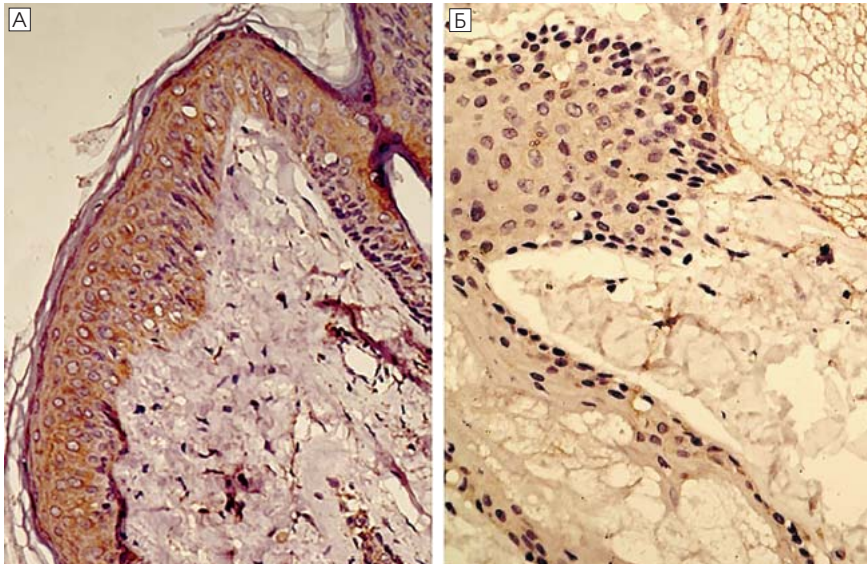
Виявлено помірний рівень васкулогенезу в епідермісі без виразного запалення навколо *pilosebaceous unit*. Вміст AR та ER у шкірі хворої не перевищував більше ніж удвічі такий в шкірі здорової людини. Рівень AR у залозах не перевищував більше ніж у 4 рази такий в епідермісі шкіри хворої.

Висновок: Розацеа, еритематозно-телеангіектатична форма. Прогнозовано сприятливий перебіг розацеа з помірним поступовим формуванням телеангіектазій і низькою вірогідністю залучення до патологічного процесу фолікулярного апарату та сальних залоз.

*Хвора Д.*, 34 роки. Клінічний діагноз: Розацеа, папуло-пустульозна форма. Клінічно на щоках і підборідді відзначаються одиничні папули та множинні телеангіектазії на тлі еритеми яскраво-рожевого кольору.

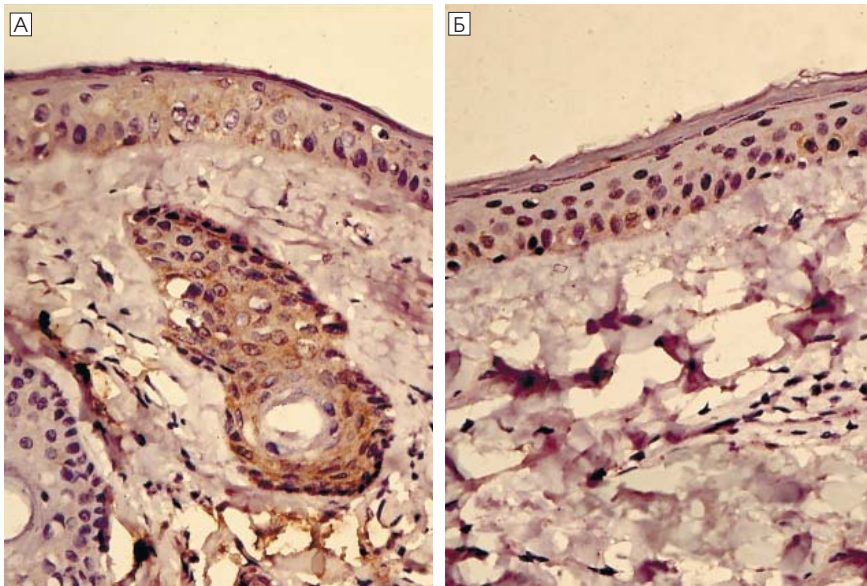
08.09.2015 р. у хворої взяли біоптат шкіри методом панч-біопсії, який досліджували за стандартним морфологічним методом з використанням гематоксиліну та еозину і за допомогою імунохімічного методу із застосуванням маркера VEGF, маркерів рецепторів до AR та ER. Імуногістохімічний статус: загальний рівень VEGF 2+, рівень VEGF в епідермісі 106,492, навколо *pilosebaceous unit* – 129,6624 (рис. 2А). Рівень експресії ER в епідермісі 0,4, у залозах – 1,0. Рівень експресії AR в епідермісі 2,40 (рис. 2Б), у залозах – 5,40.

Виявлено помірний рівень васкулогенезу в епідермісі із залученням до патологічного процесу *pilosebaceous unit*. Вміст AR у шкірі хворої більше ніж удвічі перевищував такий у шкірі здорової людини. Рівень AR у залозах більше ніж у 4 рази не перевищував такий в епідермісі шкіри хворої.



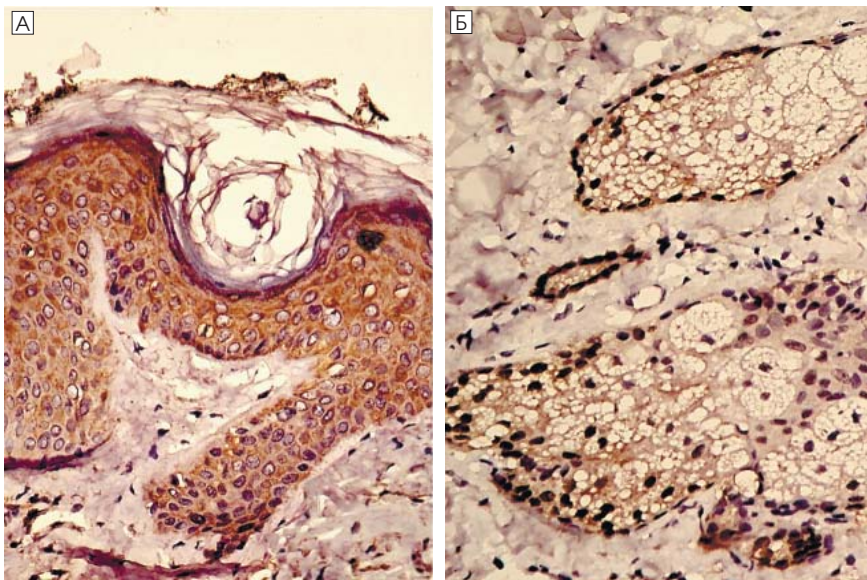
**Рис. 1. Хвора К., 34 роки. Розацеа, еритематозно-телеангієктатична форма**

А — епідерміс та волосяний фолікул, рівномірна цитоплазматична реакція з маркером VEGF, що охоплює всі шари епідермісу, крім зроговілого. ІГХ-метод (× 400); Б — слабка інтрануклеарна експресія ER в епітелії сальних залоз. ІГХ-метод (× 400).



**Рис. 2. Хвора Д., 34 роки. Розацеа, папуло-пустульозна форма**

А — епідерміс та волосяний фолікул, цитоплазматична реакція з маркером VEGF. ІГХ-метод (× 400); Б — інтрануклеарна експресія AR в епідермісі. ІГХ-метод (× 400).



**Рис. 3. Хвора Д., 33 роки. Розацеа, еритематозно-телеангієктатична форма**

А — розтягнута воронка, заповнена пластинчастим кератином, помірна реакція на VEGF в епідермісі. ІГХ-метод (× 400); Б — надмірна інтрануклеарна експресія AR в епітелії сальних залоз. ІГХ-метод (× 400).

Висновок: Розацеа, папуло-пустульозна форма, заострення. Прогнозована тенденція до перебігу розацеа за гіпертрофічним типом з помірним ущільненням шкіри і формуванням папульозних елементів без схильності до формування виразної гіперплазії сальних залоз, фолікулярних кіст та ретенційних елементів.

Хвора Д., 33 роки. Клінічний діагноз: Розацеа, еритематозно-телеангіектатична форма. Клінічно на щоках і підборідді відзначаються множинні телеангіектазії на тлі еритеми яскраво-рожевого кольору.

02.07.2015 р. у хворой взяли біоптат шкіри методом панч-біопсії, який досліджували за стандартним морфологічним методом з використанням гематоксиліну та еозину і за допомогою імунохімічного методу із застосуванням маркера росту VEGF, маркерів рецепторів до AR та ER. Імуногістохімічний статус: загальний рівень VEGF 2+, рівень VEGF в епідермісі 152,013 (рис. 3А), навколо *pilosebaceous unit* – 129,826. Рівень експресії ER в епідермісі 0,2, у залозах – 0,1. Рівень експресії AR в епідермісі 2,30, у залозах – 23,80 (рис. 3Б).

Виявлено виразний васкулогенез в епідермісі без залучення до запального процесу *pilosebaceous unit*. Вміст AR у шкірі хворой більше ніж удвічі перевищував такий у шкірі здорової людини. Рівень AR у залозах більше ніж у 4 рази перевищував такий в епідермісі шкіри хворой.

Висновок: Розацеа, еритематозно-телеангіектатична форма, стадія заострення. Прогнозована тенденція до перебігу розацеа за гіпертрофічним типом зі схильністю до формування виразної гіперплазії сальних залоз, фолікулярних кіст та ретенційних елементів.

## Результати та обговорення

На підставі результатів імуногістохімічного дослідження у біоптатах шкіри хворих на розацеа виявлено суттєве підвищення експресії рецепторів до VEGF, CD34<sup>+</sup> – маркера ендотелію, рецепторів до AR та ER порівняно з показником у пацієнток зі здоровою шкірою (від  $p < 0,05$  до  $p < 0,001$ ), що дало змогу розробити алгоритм прогнозування прогресивного перебігу розацеа у жінок для вибору адекватного терапевтичного впливу на всі ланки патогенезу захворювання.

Оцінка реакції на маркер VEGF при розацеа свідчить про рівень васкулогенезу і наявність запалення в епідермісі та навколо *pilosebaceous unit*, адже ангіогенні фактори спричиняють проліферацію ендотелію капілярів та підтримують неоангіогенез та клітинну інфільтрацію. Для прогнозування перебігу захворювання оцінювали інтенсивність реакції епідермісу біоптатів та

окремо фолікулярного епітелію і епітелію залоз біоптатів з використанням уніфікованої шкали забарвлення (слабка +, помірна ++, сильна +++). Згідно з отриманими показниками визначено слабкий, помірний або сильний рівень васкулогенезу в шкірі при розацеа, який відповідав хронічному перебігу захворювання (+) або його заостренню (++, +++). Підвищення рівня васкулогенезу навколо *pilosebaceous unit* свідчить про перехід розацеа з еритематозно-телеангіектатичної форми у папуло-пустульозну і початок незворотних змін структури і розмірів сальних залоз.

Відомо, що шкіра є гормонозалежним органом [1, 6]. Тому визначення співвідношення та можливого підвищення експресії до AR або ER у гормонозалежних структурах шкіри дає змогу виявити схильність до превалювання судинного або гіпертрофічного компонента патогенезу розацеа у кожного пацієнта. Встановлено, що підвищення експресії ER в епідермісі більше ніж удвічі або підвищення експресії AR не більше ніж удвічі порівняно з показником в осіб зі здоровою шкірою свідчить про сприятливий перебіг розацеа з помірним поступовим формуванням телеангіектазій і низькою вірогідністю залучення до патологічного процесу фолікулярного апарату та сальних залоз. Підвищення експресії AR в епідермісі біоптатів більше ніж удвічі та зниження експресії ER в епідермісі біоптатів більше ніж удвічі порівняно з показником в осіб зі здоровою шкірою характеризує тенденцію до перебігу розацеа за гіпертрофічним типом з ущільненням шкіри і формуванням стійкої виразної дилатації судин, раннім залученням до патологічного процесу структур *pilosebaceous unit* і формуванням папульозних елементів. Перевищення показників експресії AR в епітелії залоз та у фолікулярному епітелії більше ніж у 4 рази порівняно з показником в епідермісі шкіри хворого свідчить про несприятливий прогноз розвитку розацеа з формуванням виразної гіпертрофії сполучної тканини та вираженої гіперплазії сальних залоз, формуванням фолікулярних кіст і ретенційних елементів. Такий перебіг клінічно виявляється нерівною, бугристою поверхнею уражених ділянок шкіри, розширенням фолікулярних воронки, формуванням вузлів та кіст. Ці зміни спотворюють шкіру та погано піддаються корекції.

Загальний алгоритм прогнозування перебігу розацеа у жінок: шляхом проведення біопсії шкіри, ураженої розацеа, визначають у біоптаті маркери рецепторів до AR та ER і рівень васкулогенезу в шкірі за маркером VEGF. У разі підвищення експресії ER в епідермісі більше ніж

удвічі або підвищення експресії AR не більше ніж удвічі порівняно з показником в осіб зі здоровою шкірою і за слабого рівня васкулогенезу в шкірі прогноують сприятливий перебіг розацеа з помірним поступовим формуванням телеангієктазій і низькою вірогідністю залучення до патологічного процесу фолікулярного апарату та сальних залоз. За підвищення експресії AR в епідермісі біоптатів більше ніж удвічі та підвищення експресії ER в епідермісі біоптатів не більше ніж удвічі порівняно з показником в осіб зі здоровою шкірою і за помірного рівня васкулогенезу в шкірі прогноують перебіг розацеа за гіпертрофічним типом з ущільненням шкіри і формуванням стійкої виразної дилатації судин, раннім залученням до патологічного процесу структур *pilosebaceous unit* і формуванням папульозних елементів. При перевищенні показників експресії AR в епітелії залоз та у фолікулярному епітелії більше ніж у 4 рази порівняно з показником в епідермісі у шкірі хворих і за високого рівня васкулогенезу в шкірі прогноують несприятливий прогноз розвитку розацеа з формуванням виразної гіпертрофії сполучної тканини, значної гіперплазії сальних залоз, фолікулярних кіст і ретенційних елементів.

## Висновки

Порівняння показників рівня експресії VEGF, ER та AR дає змогу прогнозувати перебіг розацеа у кожного пацієнта. В основу прогнозування покладено виявлення рівня експресії до ER і AR, що має сталий та індивідуальний характер та зумовлює поступове формування різних ланок патогенезу розацеа. Також визначення рівня маркера VEGF у біоптатах шкіри дає змогу виявити більш ранні ознаки прогресування захворювання та початок формування незворотних змін навколо *pilosebaceous unit*. Цей підхід дає можливість скласти індивідуальний для кожного хворого прогноз, який ґрунтується на виявленні прогностичних маркерів у біоптаті шкіри, ураженої розацеа. Інтерпретація отриманих результатів дає змогу забезпечити можливість заздалегідь передбачити тяжкість перебігу хвороби та своєчасно провести адекватну індивідуалізовану медикаментозну терапію з урахуванням клініко-морфологічних особливостей розвитку цієї патології у кожного пацієнта. Це сприяє підвищенню ефективності лікування на 64–70 % (з імовірністю безпомилкового прогнозу на рівні 95 %) та уникненню поліпрагмазії.

## Список літератури

1. Пославська О.В. Методологія використання програмного забезпечення для аналізу цифрових мікрофотографій на базі курсу патоморфології з метою підвищення професійного рівня студентів, аспірантів, здобувачів вищих медичних закладів // Морфологія.— 2015.— Т. 9, № 3.— С. 122–126.
2. Del Rosso J.Q. Advances in understanding and managing rosacea: part 2: the role, evaluation, and medical management of diffuse and persistent facial erythema of rosacea // J. Clin. Aesthet. Dermatol.— 2012.— Vol. 5, N 3.— P. 26–36.
3. Guo D., Murdoch C.E., Xu H. et al. Vascular endothelial growth factor signaling requires glycine to promote angiogenesis // Sci. Rep.— 2017.— Vol. 7.— P. 43–49. doi: 10.1038/s41598-017-15246-3.
4. Margalit A., Kowalczyk M.J., Zaba R. et al. The role of altered cutaneous immune responses in the induction and persistence of rosacea // J. Dermatol. Sci.— 2016.— Vol. 82.— P. 3–8. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.12.006.
5. Steinhoff M., Buddenkotte J., Aubert J. et al. Clinical, cellular, and molecular aspects in the pathophysiology of rosacea // J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.— 2011.— Vol. 15, iss. 1.— P. 2–11. doi: 10.1038/jidsymp.2011.7.
6. Tsiskarishvili N.V., Katsitadze A.G., Tsiskarishvili Ts.I. Improvement of rosacea treatment based on the morphological and functional features of the skin // Georgian Med. News.— 2013.— Vol. 223.— P. 31–35.
7. Two A.M., Wu W., Gallo R.L., Hata T.R. Rosacea: Part I. Introduction, categorization, histology, pathogenesis, and risk factors // J. Am. Acad. Dermatol.— 2015.— Vol. 72, N 5.— P. 749–758.
8. Woo Y.R., Lim J.H., Cho D.H., Park H.J. Rosacea: molecular mechanisms and management of a chronic cutaneous inflammatory condition // Int. J. Mol. Sci.— 2016.— Vol. 17, N 9.— P. E1562. doi: 10.3390/ijms17091562.

Т.В. Святенко, О.А. Старостина

ГУ «Днепропетровская государственная медицинская академия МЗ Украины», Днепр

## Иммуногистохимические исследования и их значение в диагностике розацеа у женщин

**Цель работы** — исследовать взаимосвязь между уровнем экспрессии рецепторов андрогенов/эстрогенов (AR/ER) и маркера роста эндотелия сосудов (VEGF) и разработать способ прогнозирования течения розацеа у женщин, обеспечивающего возможность заранее предусмотреть тяжесть течения болезни и вовремя назначить оправданную индивидуализированную терапию.

**Материалы и методы.** Для исследования отобрано 16 биоптатов патологически измененной кожи больных розацеа женщин. Проводилось иммуногистохимическое исследование полученных образцов с помощью первичных моноклональных антител к VEGF, AR и ER.

**Результаты и обсуждение.** На основании иммуногистохимического исследования выявлено существенное повышение экспрессии рецепторов к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), рецепторов к андрогенам/эстрогенам (AR/ER) в биоптатах кожи больных розацеа по сравнению со здоровой кожей (от  $p < 0,05$  до  $p < 0,001$ ). Маркер роста эндотелия сосудов VEGF при розацеа информирует об уровне васкулогенеза и воспаления в эпидермисе и вокруг *pilosebaceous unit*. Повышение уровня экспрессии AR в эпителии желез и фолликулярном эпителии и уровня васкулогенеза вокруг *pilosebaceous unit* свидетельствует о переходе розацеа с эритематозно-телеангиэктатической формы в папуло-пустулезную и начале необратимых изменений структуры и размеров сальных желез.

**Выводы.** При анализе уровня экспрессии AR и ER-рецепторов и уровня VEGF выявлено вероятную связь между определенными изменениями и особенностями клинического течения розацеа у больных. Выявленные корреляции позволили разработать алгоритм прогнозирования прогрессивного течения розацеа у женщин для выбора адекватного терапевтического воздействия на все звенья патогенеза. В комплексе диагностического обследования пациента крайне важно иметь действенный способ прогнозирования индивидуального течения розацеа у конкретного больного для назначения патогенетически обоснованной и эффективной терапии. Это иллюстрирует целесообразность дальнейшего изучения иммунопатогенетических механизмов развития розацеа и патогенетической роли экспрессии рецепторов кожи и сосудов в формировании воспалительного процесса при розацеа.

**Ключевые слова:** розацеа, ангиогенез, диагностика, прогноз, VEGF, AR, ER.

T.V. Svyatenko, O.A. Starostina

SI «Dnipropetrovsk State Medical Academy of Ministry of Health of Ukraine», Dnipro

## Immunohistochemical investigations and their significance in diagnosis of rosacea in women

**Objective** – to investigate the relationship between the level of expression of androgen/estrogen receptors (AR/ER) and the vascular endothelial growth factor (VEGF), and to develop a method for predicting the course of rosacea in women, providing an opportunity to predict in advance the severity of the disease and timely assign a personalized individual therapy.

**Materials and methods.** The study selected 16 biopsies of pathologically altered skin of female patients with rosacea. Immunohistochemical study of the obtained samples was performed using primary monoclonal antibodies to VEGF, AR and ER.

**Results and discussion.** Based on immunohistochemical studies, a significant increase in the expression of receptors to vascular endothelial growth factor (VEGF), androgen/estrogen receptors (AR/ER) in the skin biopsy samples of rosacea patients compared with healthy skin (from  $p < 0.05$  to  $p < 0.001$ ) was revealed. VEGF vascular endothelial growth marker for rosacea informs about the level of vasculogenesis and inflammation in the epidermis and around the *pilosebaceous unit*. An increase in the level of AR expression in the epithelium of the glands and follicular epithelium, and the level of vasculogenesis around the *pilosebaceous unit* indicates the transition of rosacea from ETP to SPR and the beginning of irreversible changes in the structure and size of the sebaceous glands.

**Conclusions.** The analysis of the levels of expression of AR and ER receptors and the level of VEGF revealed a probable relationship between certain changes and characteristics of the clinical course of rosacea in patients. The revealed correlations made it possible to develop an algorithm for predicting the progressive course of rosacea in women to choose an adequate therapeutic influence on all links of the pathogenesis. In the complex of a patient's diagnostic examination, it is extremely important to have an effective method for predicting an individual course of rosacea in the particular patient for prescribing pathogenetically substantiated and effective therapy. This illustrates the feasibility of the further studying of the immunopathogenetic mechanisms of rosacea development and the pathogenetic role of expression of skin and vascular receptors in the formation of the inflammatory process in rosacea.

**Key words:** rosacea, angiogenesis, diagnosis, prognosis, VEGF, AR, ER.

### Дані про авторів:

Святенко Тетяна Вікторівна, д. мед. н., проф. кафедри шкірних та венеричних хвороб  
49044, м. Дніпро, вул. Володимира Вернадського, 9  
E-mail: tatsvyatenko@gmail.com

Старостіна Ольга Анатоліївна, к. мед. н., асист. кафедри шкірних та венеричних хвороб