

І.С.Шпонька¹
Т.В.Святенко¹
І.Я.Возняк²
О.В.Пославська¹

¹ ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»,

² Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Ключові слова: псоріаз, імуногістохімія, васкуляризація, проліферація, p16, MMP-9.

Надійшла: 22.09.2013

Прийнята: 19.10.2013

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2013.3.117-126>

УДК: 616.517-03-007.61-091.8/-097-076.5/-079.4

АНАЛІЗ ПОКАЗНИКІВ ЕКСПРЕСІЇ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ ПРОЛІФЕРАЦІЇ, ВАСКУЛЯРИЗАЦІЇ, АПОПТОЗУ, CD3⁺ І CD68⁺ МОНОНУКЛЕАРНОЇ ІНФІЛЬТРАЦІЇ ТА КЛІТИН ЛАНГЕРГАНСА В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ФОРМИ ТА ВАЖКОСТІ ПЕРЕБІГУ ПСОРИАЗУ

Реферат. Мета – дослідження рівнів експресії імуногістохімічних маркерів клітинної проліферації, васкуляризації, апоптозу, запалення в залежності від форми псоріазу та важкості перебігу патологічних процесів. В дослідження було включено 18 обстежених пацієнтів (9 чоловіків та 7 жінок) віком від 24 до 58 років з діагнозом псоріазу звичайного (загальна група) двох форм – бляшкова та краплевидна. Для визначення зв'язку між ангиогенезом, запальною інфільтрацією і порушенням дозрівання кератиноцитів проводилися морфологічні та імуногістохімічні дослідження, де в якості первинних використовувалися антитіла до CD3, CD68, Ki-67, VEGF, CD34, p63, S100 і MMP-9. Отримані результати дозволяють з'ясувати форму, стадію та важкість перебігу псоріазу звичайного на момент звернення пацієнта та отримання біоптату псоріатично ураженої шкіри. Активність запалення при псоріазі звичайному можливо з'ясувати за станом нейтрофілів, макрофагів та проліферативної активності базального шару. Персистенцію подальшого патологічного процесу можна визначити за наявністю базальноклітинної гіперплазії в регресуючу стадію, надекспресії маркерів MMP-9, VEGF та дилатації судин з Т-лімфоцитарними інфільтратами. Виключно морфологічні критерії не можуть слугувати вірогідними показниками одужання пацієнтів з бляшкоподібною та краплеподібною формами псоріазу і потребують додаткового проведення імуногістохімічних досліджень.

Morphologia. – 2013. – Т. VII, № 3. – С. 117-126.

© І.С.Шпонька, Т.В.Святенко, І.Я.Возняк, О.В.Пославська, 2013

✉ veter-1@mail.ru

Shpon'ka I.S., Svyatenko T.V., Wozniak I.Y., Poslavs'ka O.V. Analysis of expression of immunohistochemical markers of cell proliferation, vascularization, basal hyperplasia, stromal degradation, CD3+ and CD68+ mononuclear infiltration and Langerhans cells depending on the form and course of psoriasis vulgaris.

ABSTRACT. Background. In recent years, the efforts of dermatologists and patomorphologists directed to identifying additional prognostically significant criteria that will allow determining the psoriasis course and effectiveness of the treatment.

Objective. To study the expression levels of immunohistochemical markers of cell proliferation, vascularization, apoptosis, inflammation, depending on the form of psoriasis and severity of pathological processes. **Methods.** The study included 18 patients (9 men and 7 women) aged from 24 up to 58 years with a diagnosis of psoriasis (general group) in two forms - plaque and guttate. To identify the relationship between angiogenesis, inflammatory infiltration and violations of keratinocytes maturation morphological and immunohistochemical studies were performed; primary antibody to CD3, CD68, Ki-67, VEGF, CD34, P63, S100, and MMP-9 were used. **Results.** The obtained results allow determining the form, stage and severity of psoriasis usual at the time of patient appeal and biopsies of psoriatic skin lesions obtaining. The activity of inflammation in psoriasis could be determined by neutrophils, macrophages and proliferative activity of the basal layer. Subsequent persistence of the pathological process - by the presence of basal cell hyperplasia in the regressing stage, overexpression of markers MMP-9, VEGF and dilation of blood vessels with T-lymphocyte infiltrates. **Conclusion.** Exclusively morphological criteria can not be used as reliable indicators of patient's recovery with plaque and guttate forms of psoriasis and require additional immunohistochemical investigations. These additional prognostic markers also will help to develop effective schemes for patient treatment.

Keywords: psoriasis, immunohistochemistry, vascularization, proliferation, p16, MMP-9.

Citation:

Shpon'ka IS, Svyatenko TV, Wozniak IY, Poslavs'ka OV. [Analysis of expression of immunohistochemical markers of cell proliferation, vascularization, basal hyperplasia, stromal degradation, CD3⁺ and CD68⁺ mononuclear infiltration and Langerhans cells depending on the form and course of psoriasis vulgaris]. Morphologia. 2013; 7(3):117-26. Ukrainian.

Вступ

Псоріаз звичайний (ПЗ), як хронічне циклічне захворювання, характеризується вираженою динамікою місцевих змін, що морфологічно можна розділити на три стадії: ранні місцеві зміни, стадія папули (бляшки) та стадія загоювання (розршення бляшки), що можуть варіювати в межах важкості перебігу місцевих уражень [1; 2; 3]. Ці зміни не зовсім співпадають з класичними клінічними стадіями ПЗ: прогресуючою, стаціонарною та регресуючою, і для з'ясування взаємозв'язку послідовних змін неангіогенезу, запальної інфільтрації та порушення дозрівання кератиноцитів потрібно проводити не тільки морфологічні, а і додаткові імуногістохімічні (ІГХ) дослідження.

Різке збільшення проліферації епідермальних клітин, яке відбувається при ПЗ, змусило дослідників зосередитись на можливих змінах у самих кератиноцитах епідермісу [4; 5], але ефективність імуносупресивних препаратів (метотрексат, псорален, фотохіміотерапія, кортикостероїди, циклоспорин та ін.) в терапії ПЗ довела порушення в першу чергу імунної системи, а знаходження двох категорій Т-клітин, CD4+ і CD8+ лімфоцитів в уражених псоріазом ділянках дало змогу багатьом авторам припустити, що ПЗ – захворювання, що опосередковане Т-лімфоцитами [2; 6; 7].

В останні роки зусилля дерматологів і патоморфологів направлені на виявлення додаткових прогностично значимих ознак, які дозволять у

свою чергу з'ясувати особливості перебігу ПЗ та ефективність проведеної терапії хворих на псоріаз [8; 9; 10]. Результати проведених нами клінічних, морфологічних та ІГХ досліджень дозволяють з'ясувати форму, стадію та важкість перебігу ПЗ на момент звернення пацієнта та отримання біоптату шкіри ураженої псоріазом.

Метою нашої роботи було визначення морфологічних особливостей шкірних уражень хворих на псоріаз звичайний, дослідження рівнів експресії імуногістохімічних маркерів проліферації, васкуляризації, апоптозу, CD3⁺ і CD68⁺ мононуклеарної інфільтрації та клітин Лангерганса в залежності від форми псоріазу та важкості перебігу патологічних процесів.

Матеріали та методи

В дослідження було включено 18 обстежених пацієнтів (9 чоловіків та 7 жінок) віком від 24 до 58 років з діагнозом ПЗ (загальна група) двох форм – бляшкова (БФ) та краплевидна (КФ), що проходили лікування на базі ІV стаціонарного відділення «ЛЮКШВД», м. Львів і 10 осіб – без відповідної патології (практично здорові) для контрольної групи (КГ) (табл. 1). Усім пацієнтам була проведена біопсія шкіри з гістологічною оцінкою біоптатів з встановленням форми та важкості перебігу ПЗ, згідно вимогами морфологічного розділу сучасної класифікації [1; 11; 12] на базі морфологічного відділу лабораторії діагностичного центру медичної академії ТОВ «Аптеки медичної академії» м. Дніпропетровськ.

Таблиця 1

Характеристика клінічних даних пацієнтів

Характеристика клінічних даних пацієнтів	Кількість випадків (n=28)	Відсотки (%)
Загальна група	18	64,3
Стать		
Чоловіки	10	55,55
Жінки	8	44,45
Форми псоріазу		
• Бляшковий псоріаз	15	83,3
• Краплевидний псоріаз	3	16,7
Ступені важкості перебігу псоріазу		
• Легкий	5	27,78
• Середньої важкості	13	72,22
Контрольна група (здорові особи)	10	35,7

Біоптати шкіри з ПЗ фіксувалися у 4% розчині нейтрального формаліну протягом доби і заливалися в парафін. Гістологічні зрізи товщиною 4-6 мкм наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus, після депарафінізації та регідратації зрізів проводили температурне демаскування антигенів та пригнічували активність ендогенної пероксидази 3% розчином перекису водню. Далі проводили інкубацію зрізів з первинними антитілами (табл. 2) у вологих камерах при температурі 23-25⁰С протягом 30 хвилин.

Титр антитіл підбирався індивідуально для кожного маркеру з розчинником Antibody Diluent (DakoCytomation). Візуалізацію проводили системою UltraVision Quanto (LabVision), ідентифікація реакцій виконувалася за допомогою хромогену DAB (LabVision) під контролем мікроскопу від 20 секунд до 3 хвилин з додатковим забарвленням гематоксиліном Майєра. Світлова мікроскопія проводилася з використанням мікроскопу «Leika DLM-E» (USA), об'єктивами ×10, ×20, ×40, ×100.

Панель первинних антитіл

Антитіло	Клон	Розведення	Виробник
VEGF	клон VG1	1:100	DakoCytomation
CD34	клон QBEnd 10	1:100	DakoCytomation
Ki-67	клон SP6	1:200	LabVision
p63	клон 4A4	1:50	DakoCytomation
CD3	клон SP7	1:500	LabVision
S100	клон 4C4.9	1:700	LabVision
CD68	клон PG-M1	1:100	LabVision
MMP-9	поліклон	1:100	LabVision

Розрахунок CD3⁺ Т-лімфоцитів (мембранна реакція), CD68⁺ макрофагів (цитоплазматична), та S100⁺ дендритних клітин (змішана) проводили в 10 полях зору ($\times 400$) і розраховували як середнє арифметичне абсолютних значень. Для оцінки ІГХ реакцій з маркерами MMP-9 та VEGF, інтенсивність цитоплазматичного забарвлення оцінювалася шляхом порівняння з КГ за 5 категоріями: 0 – негативна реакція (жодної забарвленої клітини), 1 – слабка (позитивно забарвлені окремі розкидані клітини, чи розповсюджена, але слабка реакція), 2 – помірна (дорівнює КГ), 3 – сильна (більша кількість інтенсивно забарвлених клітин) і 4 – надмірна (інтенсивно забарвлені практично всі клітини) за рекомендаціями P.J.Aronson (2008) [13]. Для з'ясування щільності мікросудин (ЩМ) шкіри, їх кількість підраховували за мембранною реакцією ендотелію з маркером CD34 у 10 полях зору ($\times 400$), згідно рекомендаціям W.Y.Ma із співавт. (2012) [14]. Всі значення ЩМ були розбиті на 3 категорії за M.M.Amin із співавт. (2012) [15]: слабка васкуляризація (4-10 капілярів), помірна (11-20) і значна (21-28). Індекс проліферації (ІП) та рівень базальноклітинної гіперплазії обчислювалися, як відсоток клітин з ядерної реакцією на 1000 кератиноцитів з маркерами Ki-67 та p63 ($\times 400$), згідно рекомендаціям W.Y.Ma із співавт. (2012) [14].

Статистична обробка даних проводилася в програмі SPSS Statistica 17.0. Для встановлення статистично значущих зв'язків між клініко-морфологічними ознаками та експресією маркерів використовувався непараметричний U-критерій Манна-Уїтні та точний тест Фішера. Значущим вважався зв'язок при $p < 0,05$. В групах з достовірною відмінністю експресії маркеру розраховувався непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмена.

Результати та їх обговорення

Ранні зміни, що на світлооптичному рівні можна зафіксувати впродовж перших 24 годин при обох досліджуваних формах ПЗ, це розширення та звивистість судин сосочків дерми і помірні периваскулярні лімфоцитарні інфільтрати з невеликим набряком навколишньої строми. Маркер CD34, що дає специфічну мембрану реакцію з ендотелієм судин допомагає більш детально оцінити якісні та

кількісні зміни структури судин (рис. 1А). Використовуючи шкалу інтенсивності васкуляризації шкіри за M.M.Amin із співавт. (2012) [15], ми з'ясували, що псоріатично ушкодженні ділянки дерми, в середньому, мали $17,25 \pm 5,34$ мікросудин при збільшенні ($\times 400$) для БФ та $15,18 \pm 5,23$ мікросудин для КФ, що відповідає рівню помірної васкуляризації (11-20 капілярів). Нормальна шкіра КГ мала середній показник $4,32 \pm 2,01$ при ($\times 400$) на рівні слабкої васкуляризації (4-10 капілярів), що статистично вірогідно відрізняється від загальної групи ($p_{БФ} < 0,05$, $p_{КФ} < 0,05$). Аналіз стану судинного русла при різних ступенях важкості перебігу ПЗ, показав, що кількість судин у спостереженнях з середнім ступенем важкості ($22,65 \pm 5,87$) значно більше, ніж при легкому ($10,09 \pm 3,22$) ПЗ, а тим більше, ніж в КГ ($4,32 \pm 2,01$). Статистично вірогідно обидві групи різняться між собою ($p < 0,05$), та з КГ ($p < 0,05$).

Ангіогенез завжди супроводжується підвищенням експресії фактору росту ендотелію судин (VEGF) задіяних в патологічний процес тканин. ІГХ дослідження біоптатів шкіри з маркером VEGF навіть на початку розвитку захворювання показало значно підвищену експресію фактору росту ендотелію судин в кератиноцитах епідермісу (окрім зроговілого шару) (рис. 2Г) та в ендотелії судин і навколосудинних інфільтратах дерми псоріатично ушкоджених ділянок. Інтенсивність забарвлення псоріатично змінених ділянок шкіри при БФ та КФ відповідала здебільшого 3 категорії – сильна реакція, тоді як нормальний епідерміс КГ з VEGF завжди давав помірну або слабку реакцію (2, 1 категорії забарвлення) ($p_{БФ} < 0,05$, $p_{КФ} < 0,05$). Експресія VEGF також значно підвищувалась з збільшенням важкості патологічного процесу (табл. 3).

Відповідно точному тесту Фішера розподіл абсолютних значень спостережень за інтенсивністю цитоплазматичного забарвлення маркеру VEGF в усіх групах між собою мав вірогідну різницю ($p < 0,05$). Нами також був виявлений помірний кореляційний зв'язок між збільшенням інтенсивності експресії VEGF і підсиленням важкості перебігу ПЗ ($r = +0,430$), що говорить про важливість процесів неоангіогенезу в патогенезі цього захворювання і можливість застосу-

вання лікувальних заходів з впливом безпосередньо на дану ланку патогенезу. До проліферації ендотеліальних клітин та утворення нових кровоносних судин призводить взаємодія VEGF з його рецепторами. Сьогодні найбільш успішним терапевтичним впливом на VEGF є використання гуманізованих моноклональних антитіл до фактору росту ендотелію судин VEGF, а саме беватумаб, який зв'язується з VEGF і запобігає взаємодії VEGF з його рецепторами (Flt-1 і KDR) на поверхні ендотеліальних клітин. Підсумовуючи дані власних досліджень та даних літератури, можемо припустити можливу доцільність застосування таргетної терапії гуманізованим моноклональним антитілом до фактору росту ендотелію судин VEGF пацієнтів з даним дерматозом.

цизумаб, який зв'язується з VEGF і запобігає взаємодії VEGF з його рецепторами (Flt-1 і KDR) на поверхні ендотеліальних клітин. Підсумовуючи дані власних досліджень та даних літератури, можемо припустити можливу доцільність застосування таргетної терапії гуманізованим моноклональним антитілом до фактору росту ендотелію судин VEGF пацієнтів з даним дерматозом.

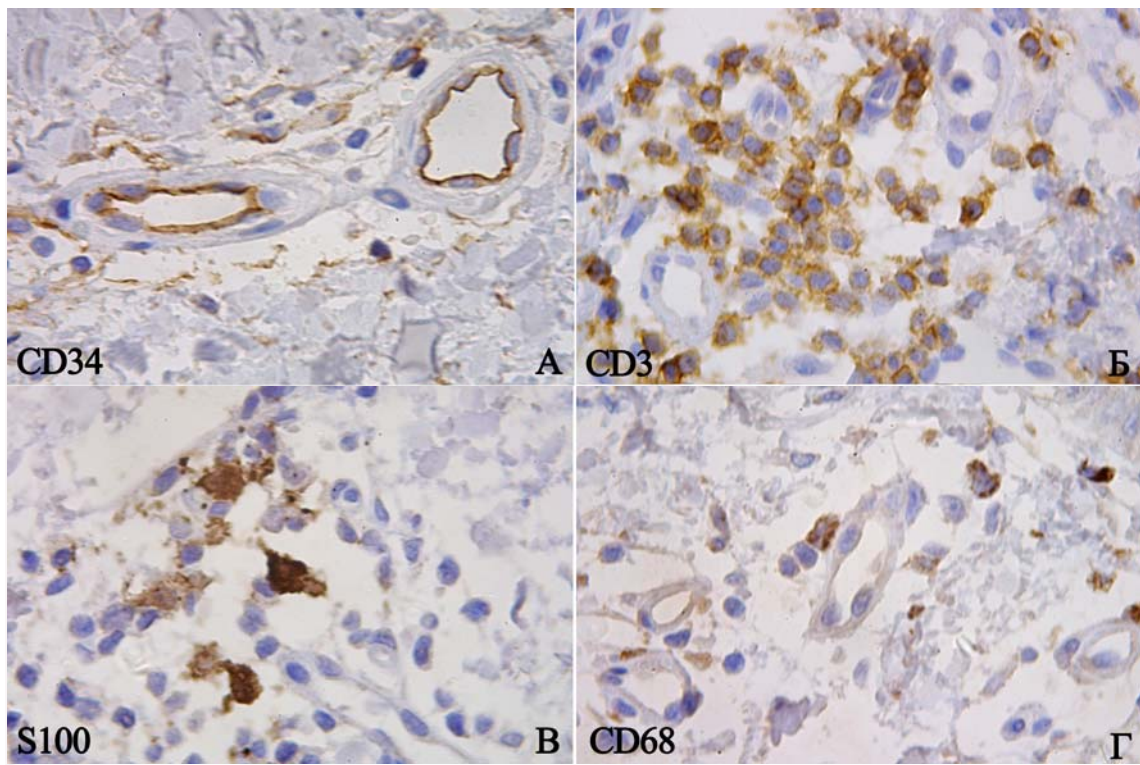


Рис. 1. А. Ранні псоріатичні зміни судин дерми, реакція з CD34 в ендотелії звивистих і ділятованих судин, що вистлані високим призматичним або циліндричним ендотелієм, ІГХ метод ($\times 1000$). Б. Мембранна реакція чисельних Т-лімфоцитів з маркером CD3, ІГХ метод ($\times 1000$). В. Змішана реакція маркера S100 в клітинах Лангерганса (видовжені клітини з розгалуженими відростками), ІГХ метод ($\times 1000$). Г. Цитоплазматична реакція поодиноких CD68⁺ макрофагів, ІГХ метод ($\times 1000$).

Таблиця 3

Значення експресії VEGF в залежності від важкості ПЗ, n, (%)

Експресія маркеру VEGF	Контрольна група (n=10)	Важкість перебігу псоріазу	
		Легкий ступінь (n=5)	Середній ступінь (n=13)
Негативна (0)	-	-	-
Слабка (1)	8 (80%)	-	-
Помірна (2)	2 (20%)	1 (20%) *	4 (30,78%) ***
Висока (3)	-	4 (80%) *	7 (53,85%) ***
Надмірна (4)	-	-	2 (15,37%) ***

Примітка: * – різниця вірогідна відносно КГ при 5% рівні значущості ($p < 0,05$);

** – різниця вірогідна відносно ПЗ легкого ступеня при 5% рівні значущості ($p < 0,05$).

Видовження акантотичних тяжів за рахунок проліферації кератиноцитів базального шару з зупинкою їхнього подальшого диференціювання призводить до базально-клітинної гіперплазії, яку можна побачити завдяки ІГХ дослідженню з маркером базально-клітинної диференціації p63 (рис.

2В). Індекс експресії маркера p63 загальної групи розрахований на 1000 кератиноцитів в середньому склав $73,25 \pm 8,42\%$ для БФ та $69,18 \pm 8,37\%$ для КФ, що значно перевищує аналогічний показник КГ $12,21 \pm 3,12\%$ ($p_{БФ} < 0,05$, $p_{КФ} < 0,05$). В цей термін спостерігалися збереження рогового шару з

ділянками ортокератозу (нормальне зроговіння) і паракератозу (затримка ядер кератиноцитів) та втрата нижче розташованого зернистого шару (рис. 2 А). Але не дивлячись на те, що підвищення індексу базально-клітинної гіперплазії в псоріатично зміненій шкірі набуває надмірних значень, порівняно з КГ ($p < 0,05$), він не залежить від важкості перебігу (легкий ступінь – $69,0 \pm 8,42\%$, середній

ступінь – $74,38 \pm 8,21\%$), що говорить про універсальність проявів порушення дозрівання кератиноцитів, типовість перебігу ПЗ, що потребує лише ініціації з боку запальних клітин і далі не залежить від обсягу запального інфільтрату. Дані нашого дослідження свідчать про відсутність статистично достовірної різниці в групах з легкою та середньою важкістю перебігу у пацієнтів з ПЗ ($p > 0,05$).

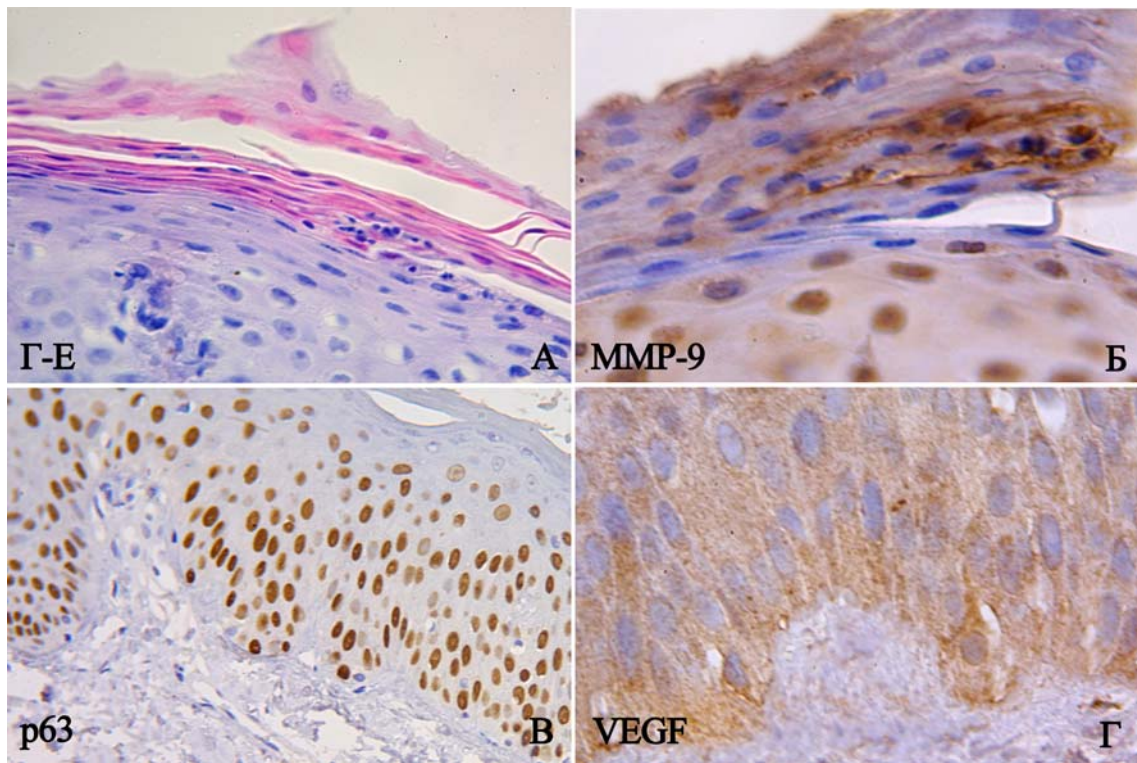


Рис. 2. А. Паракератоз з ектоцитозом нейтрофілів, втрата зернистого шару в шкірі хворих на псоріаз, забарвлення гематоксилином-еозином ($\times 1000$). Б. Надмірна позитивна реакція з маркером MMP-9 навколо інтракорнеального мікробсцесу Munro-Saboungaud, що розташований в самій верхівці паракератозного підвищення рогового шару епідермісу, ІГХ метод ($\times 1000$). В. Псоріатичний акантоз на стадії папули, базально-клітинна гіперплазія, інтрануклеарна реакція з маркером p63, ІГХ метод ($\times 200$). Г. Специфічна цитоплазматична реакція з маркером VEGF високої інтенсивності базально-го шару епідермісу, ІГХ метод ($\times 1000$).

Індекс проліферації (ІП) при БФ перебігу склав $37,21 \pm 4,15\%$, при КФ – $29,18 \pm 3,44\%$, порівняно з ІП здорової шкіри КГ $6,27 \pm 1,36\%$, має місце статистично вірогідна різниця проліферативної активності ($p_{БФ} < 0,05$, $p_{КФ} < 0,05$). Також нами було з'ясовано, що ІП кератиноцитів прогресивно збільшувався від показників здорової шкіри КГ, до ПЗ легкого ступеня ($23,09 \pm 3,32\%$, $p < 0,05$) і ПЗ середньої важкості ($41,54 \pm 5,01\%$, $p < 0,05$). Таким чином, мітогена активність всіх клітин базального і значної частини шипуватого шарів епідермісу прямо пропорційно залежить від активності запалення, що корелює з важкістю перебігу псоріазу ($r = +0,451$).

Для визначення співвідношення Т-лімфоцитів, клітин Лангерганса та макрофагів в периваскулярних інфільтратах на стадії папули нами були проведені ІГХ дослідження з маркерами CD3 (Т-лімфоцити), S100 (клітини Лангер-

ганса) та CD68 (макрофаги), що дають специфічну реакцію з відповідними клітинами (рис. 1 Б, В, Г). Таким чином, на 1 клітину Лангерганса приходилося, в середньому, 2-3 CD68⁺ макрофага, 3-4 нейтрофіла та 10-15 CD3⁺ Т-лімфоцита. Згідно результатів нашого дослідження, розподіл CD3⁺ і CD68⁺ мононуклеарів та S100⁺ дендритних клітин в епідермісі та дермі дещо змінювався залежно від ступеня важкості перебігу ПЗ (табл. 4). Приймаючи до уваги значення показників експресії маркеру CD3, вірогідно кількість активних Т-лімфоцитів прогресивно збільшувалась, і в епідермісі, і в дермі досліджених біоптатів, та найбільших значень набула при псоріазі середньої важкості $33,46 \pm 3,59/89,27 \pm 5,28$ (табл. 4), порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$) і групою легкого ступеня важкості перебігу ($p < 0,05$).

Таблиця 4

Розподіл мононуклеарної інфільтрації та дендритних клітин в епідермісі та дермі шкіри залежно від важкості перебігу ПЗ, M±m (n)

Маркер	Контрольна група (n=10)	Важкість перебігу псоріазу	
		Легкий ступінь (n=5)	Середній ступінь (n=13)
CD3 епідерміс/дерма	4,17±0,02 / 8,11±0,08	17,75±2,67 * / 42,43±3,91 *	33,46±3,59 *** / 89,27±5,28 ***
CD68 епідерміс/дерма	1,01±0,01 / 3,35±0,04	1,84±0,02 / 8,74±2,07 *	3,04±0,02 * / 12,58±2,13 ***
S100 епідерміс/дерма	4,24±0,15 / 1,89±0,05	6,14±0,98 / 5,43±0,20 *	7,65±2,01* / 6,97±1,23 *

Примітка * – різниця вірогідна відносно КГ при 5% рівні значущості (p<0,05);

** – різниця вірогідна відносно ПЗ легкого ступеня при 5% рівні значущості (p<0,05).

Статистично вірогідна різниця інтенсивності макрофагальної інфільтрації за маркером CD68 була виявлена тільки для інтрадермального розташування між двома групами дослідження (p<0,05) та порівняно з КГ (p<0,05), і тільки для групи середньої важкості ПЗ для інтраепідермального розташування, порівняно з КГ (p<0,05). Стосовно клітин Лангерганса, статистично вірогідна різниця між групами з легким і середнім ступенем важкості перебігу виявлена не була (p>0,05). Але кількість дендритних клітин збільшилась в дермі при легкому ступені важкості порівняно з КГ (p<0,05), та в епідермісі і в дермі при ПЗ середнього ступеня важкості (p<0,05) (табл. 4).

Нейтрофіли, що розташовані в інтракорнеальних мікроабсцесах Munro-Sabouraud, міжепітеліальних композитах та навколосудинних інфільтратах дермальних сосочків мають протеолітичну активність щодо сусідніх тканин та активують ензими із родини матриксних металопротеїназ. Це підтверджують позитивні ІГХ реакції з антитілом до матричної металопротеїнази 9 (ММР-9) в місцях скупчення нейтрофілів у вигляді ділянок забарвлення інтенсивно коричневого кольору (4 категорія забарвлення) (рис 2Б). До того ж експресія ММР-9 тісно пов'язана з ангіогенезом і виявлялася також в клітинах навколосудинних інфільтратів та ендотелії

судин. Порівняно з нормальною шкірою КГ, що з маркером ММР-9 демонструвала слабку реакцію (1 категорія) в епідермісі та судинах дерми, визначається статистично вірогідне підвищення експресії ММР-9 при БФ та КФ ПЗ (p_{БФ}<0,05, p_{КФ}<0,05).

При дослідженні розподілу значень експресії маркера ММР-9 в залежності від важкості перебігу ПЗ, з'ясувалося значне підвищення експресії цього маркера, порівняно з КГ (табл. 5), особливо при ПЗ середнього ступеня важкості в зонах інтракорнеальних абсцесів Munro-Sabouraud, ділянках пустульозу Когої та навколосудинних інфільтратах дерми, що мали чисельну нейтрофільну інфільтрацію (рис 2Б). Розподілення спостережень за інтенсивністю цитоплазматичного забарвлення клітин маркером ММР-9 в усіх групах між собою показало вірогідну різницю (p<0,05), був виявлений помірний кореляційний зв'язок між збільшенням інтенсивності експресії маркеру ММР-9 і підсиленням важкості перебігу ПЗ (r=+0,532). Для з'ясування можливої ефективності таргетної терапії ми вважаємо за доцільне використання ММР-9 при дослідженні біопатів шкіри пацієнтів на ПЗ, враховуючи існування інгібіторів матриксних металопротеїназ (препаратів «Маристомат», «Батистомат»), які в якості компоненту комбінованої терапії призведуть до покращення стану хворих на ПЗ.

Таблиця 5

Розподіл значень експресії маркеру ММР-9 в залежності від важкості перебігу псоріазу звичайного, n, (%)

Експресія маркеру VEGF	Контрольна група (n=10)	Важкість перебігу псоріазу	
		Легкий ступінь (n=5)	Середній ступінь (n=13)
Негативна (0)	-	-	-
Слабка (1)	10 (100%)	-	-
Помірна (2)	-	2 (40%) *	1 (7,7%) ***
Висока (3)	-	3 (60%) *	8 (66%) ***
Надмірна (4)	-	-	4 (26,3%) ***

Примітка: * – різниця вірогідна відносно КГ при 5% рівні значущості (p<0,05);

** – різниця вірогідна відносно ПЗ легкого ступеня при 5% рівні значущості (p<0,05).

У процесі розрешення бляшок, з часом, в епідермісі верифікувалося «булавоподібне» стовщен-

ня нижніх рівнів сітки акантотичних тяжів (рис. 3А) з зливанням їх в загальне поле і деяким стов-

щенням надсосочкових пластинок (рис. 3 Б). Подальші зміни характеризувалися ортокератозом (нормалізацією процесів зроговіння), відновленням

зернистого шару (рис. 3В) і значно меншим екзоцитозом запальних клітин в епідермісі або повною його відсутністю.

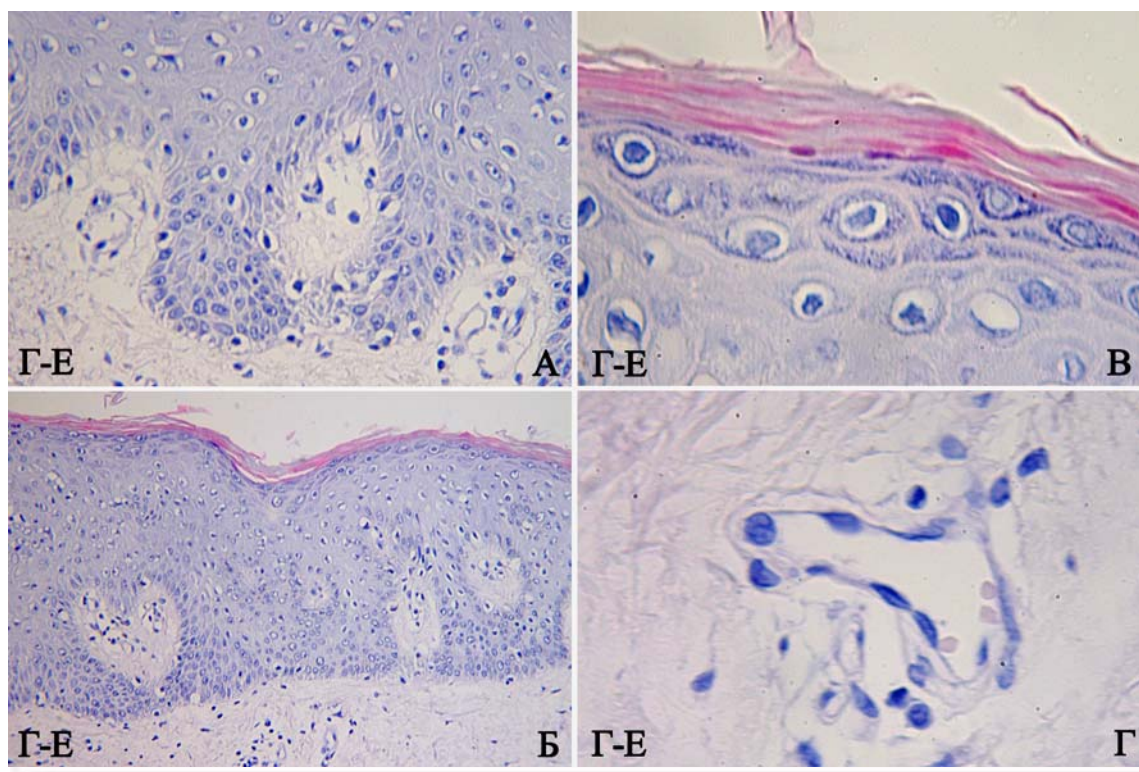


Рис. 3. Псоріаз, на стадії старіння бляшок, забарвлення гематоксилином-еозином. А. Булавоподібне стовщення нижніх рівнів сітки акантотичних тяжів ($\times 400$). Б. Зливання акантотичних тяжів в загальне поле, стовщення супрапапілярних пластинок, ($\times 200$). В. Ортокератоз (нормальне зроговіння), відновлення зернистого шару ($\times 1000$). Г. Помірна дилатація судин дерми із скудним запальним інфільтратом ($\times 1000$).

В дермі псоріатичної бляшки, що вирішувалась (виліковувалась) кількість імуніцитів навколосудинних запальних інфільтратів різко знижувалась, а в епідермісі редукувалась інтенсивність епідермальної гіперплазії та повністю реставрувався зернистий шар. Тільки судини сосочків дерми залишалися розширеними (рис. 3 Г), хоча к цьому часу навколо підвищувалась кількість фібробластів, і в цьому регіоні спостерігався помірний післязапальний фіброз. Але тільки після 10-14 тижнів лікування зовнішній гістологічний вигляд шкіри хворого нормалізувався.

ІГХ характеристика псоріатичних бляшок, що загоювалися (рис. 4А) при БФ та КФ, демонструвала зниження проліферативної активності до рівнів КГ (5-9%), або трохи вищий (11-16%), частіше це мало місце при додатковому подразненні або травмуванні патологічно зміненої ділянки (рис. 4Б), зниження кількості клітин Лангерганса, особливо в дермі (рис. 4В) та повна відсутність нейтрофільної та $CD3^+$ Т-лімфоцитарної інфільтрації епідермісу. Базально-клітинна гіперплазія значного зниження не набувала і у всіх випадках не досягала рівнів значень нормальної шкіри КГ, залишаючись на рівні $35,16 \pm 4,10\%$ для БФ та $30,91 \pm 3,77\%$ для КФ

(рис. 4 Г), що говорить про порушення диференціювання кератиноцитів цієї ділянки і можливість раннього рецидиву.

Таким чином, активність запалення при ПЗ можливо з'ясувати за станом нейтрофілів, макрофагів та проліферативної активності базального шару, а персистенцію подальшого патологічного процесу – за наявністю базально-клітинної гіперплазії в регресуючому стадію, надекспресії маркерів MMP-9, VEGF та дилатації судин з Т-лімфоцитарними інфільтратами. Виключно морфологічні критерії не можуть слугувати вірогідними показниками одужання пацієнтів з бляшкоподібною та краплеподібною формами псоріазу і потребують додаткового проведення ІГХ досліджень.

Підсумок

Для виявлення особливостей перебігу ПЗ БФ та КФ на стадіях ранніх змін, папули (бляшки) та розрешення (старіння бляшки) окрім стандартного морфологічного дослідження доцільно використовувати ІГХ дослідження з використанням маркерів ангиогенезу CD34, VEGF, проліферативної активності Ki-67, базально-клітинної гіперплазії p63, стромальної деградації MMP-9, інфільтрації мононуклеарами CD3, CD68 та клі-

тинами Лангерганса S100, що значно підвищу-

ється порівняно з КГ ($p_{\text{БФ}} < 0,05$, $p_{\text{КФ}} < 0,05$).

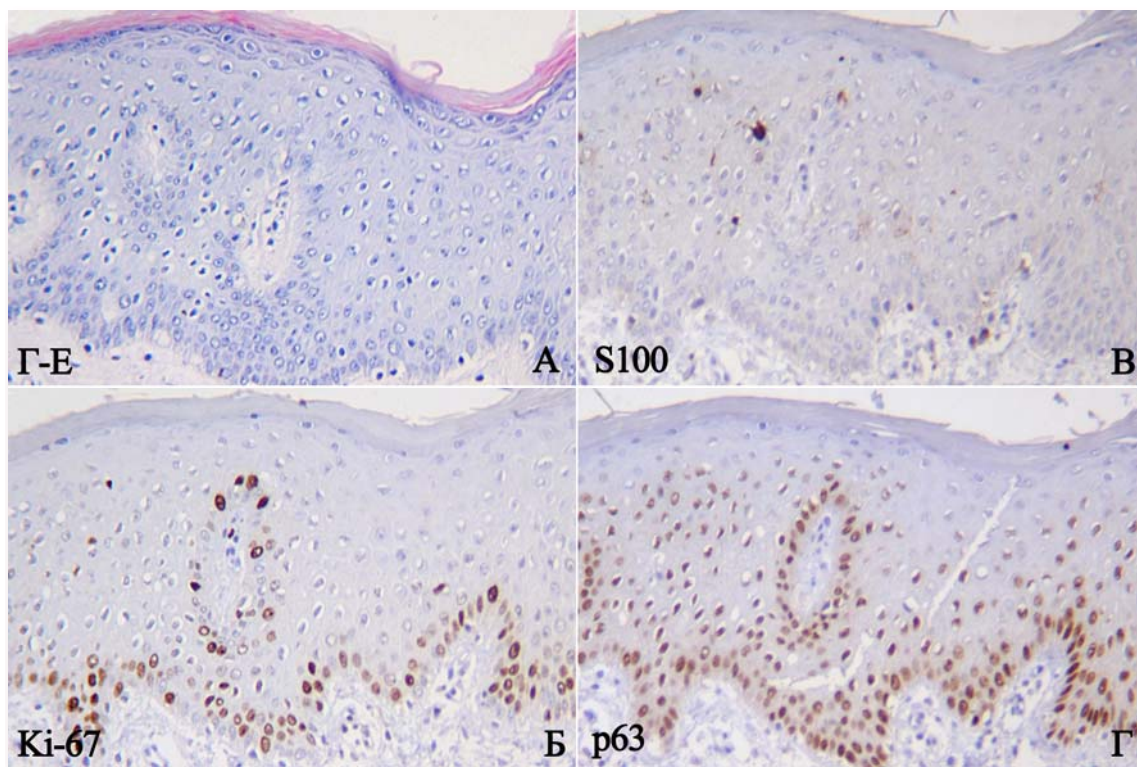


Рис. 4. А. Псоріатична бляшка, що загоюється, КФ, забарвлення гематоксиліном-еозином ($\times 400$). Б. Інтрануклеарна реакція проліферуючих кератиноцитів базального шару епідермісу з маркером Ki-67, індекс проліферації на рівні 8-10%, ІГХ метод ($\times 400$). В. Змішана реакція клітин Лангерганса з маркером S100, ІГХ метод ($\times 400$). Г. Інтрануклеарна реакція маркеру p63 в кератиноцитах з базально-клітинним диференціюванням, ІГХ метод ($\times 400$).

ПЗ середнього ступеня важкості характеризується вірогідно більшою щільністю мікросудин на 1 мкм ($p < 0,05$), інфільтрацією CD3+ Т-лімфоцитами ($p < 0,05$) епідермісу і дерми, інфільтрацією CD68+ макрофагів дерми, активністю VEGF-залежного ангиогенезу ($p < 0,05$), проліферативною активністю ($p < 0,05$), експресією матриксної металопротеїнази MMP-9 ($p < 0,05$), ніж псоріаз легкого ступеня та здорова шкіра КГ.

Підвищення експресії маркерів VEGF та MMP-9 при БФ та КФ ПЗ звертає увагу стосовно можливої ефективності таргетної терапії гуманізованим моноклональним антитілом до фактору

росту ендотелію судин та інгібіторами матриксних металопротеїназ на підставі виявлення кореляційних зв'язків між збільшенням інтенсивності експресії відповідних маркерів і підсиленням важкості перебігу досліджуваних форм ПЗ ($r_{\text{VEGF}} = +0,430$, $r_{\text{MMP-9}} = +0,532$).

Перспективи подальших розробок пов'язані з подальшим дослідженням клініко-морфологічних особливостей перебігу різних форм псоріазу звичайного для глибокого розуміння патогенетичних ланок цього захворювання.

Літературні джерела References

1. Weedon D. Skin pathology, second edition / D. Weedon. – China : Churchill Livingstone, 2002. – 1158 p.
Weedon D. Skin pathology. 2nd ed. China: Churchill Livingstone; 2002. 1158 p.
2. Хайрутдинов В. Р. Генетический паспорт больного псориазом / В. Р. Хайрутдинов // Вестник дерматологии и венерологии. – 2011. – № 4. – С. 14–19.
Khairutdinov VR. [Genetic profile of psoriasis pa-

- tients]. Vestn Dermatol Venerol. 2011; (4): 14-9. Russian.
3. Кашутин С. Л. Экспрессия молекул адгезии, связанных с миграцией лейкоцитов, у больных псориазом / С. Л. Кашутин, С. И. Данилов, Е. Н. Верещагина // Клиническая дерматология и венерология. – 2012. – № 4. – С. 86–89.
Kashutin SL, Danilov SI, Vereshchagina EN. [Expression of adhesion molecules associated with leukocyte migration in patients with psoriasis]. Clinical dermatology and venerology. 2012; 10 (4): 86-9. Russian.

4. Суханова Н. М. Иммуноморфологические маркеры нарушения дифференцировки и пролиферации клеток в коже больных псориазом / Н. М. Суханова // Вестник дерматологии и венерологии. – 2003. – № 3. – С. 29–31.

Sukhanova NM. [Immunomorphological markers of cellular differentiation and proliferation disorders in the skin of psoriasis patients]. Vestn Dermatol Venerol. 2003; (3): 29-31. Russian.

5. Тлиш М. М. Клинико-морфологические особенности каплевидного псориаза / М. М. Тлиш, Н. Л. Сычева, Л. А. Фаустов // Клиническая дерматология и венерология. – 2012. – № 5. – С. 65–70.

Tlish MM, Sycheva NL, Faustov LA. [The clinical and morphological features of guttate psoriasis]. Clinical dermatology and venerology. 2012; 10 (5): 65-71. Russian.

6. Роль Т-регуляторных клеток в патогенезе псориаза / В. Р. Хайрутдинов, А. Ф. Михайличенко, М. С. Мухина [и др.] // Вестник дерматологии и венерологии. – 2011. – № 5. – С. 78–85.

Khairutdinov VR, Michailichenko AF, Mukhina MA, Samtsov AV, Imyanitov EN, Ivanov AM. [The role of T-regulatory cells in the pathogenesis of psoriasis]. Vestn Dermatol Venerol. 2011; (5): 78-85. Russian.

7. Бабанин В. А. Макрофагальная активность в коже больных псориазом при NB-UVB (311 нм) терапии / В. А. Бабанин // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 2. – С. 22–27.

Babanin VA. [Macrophage activity in the skin of psoriasis patients at NB-UVB (311nm) therapy]. Tavricheskiy medico-biologicheskii vestnik. 2012; 15 (2, part 3): 22-7. Russian.

8. Бабанин В. А. Особенности Т-клеточного инфильтрата в коже больных псориазом при NB-UVB (311 нм) терапии / В. А. Бабанин // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 3. – С. 17–21.

Babanin VA. [Features of T-cell infiltration in the skin of psoriasis patients during NB-UVB (311 nm) therapy]. Tavricheskiy medico-biologicheskii vestnik. 2012; 15 (3, part 2): 17-21. Russian.

9. Цогцэцэг А. Сравнительное изучение морфологических показателей хронических дерматозов до и после лечения на курорте «Авагатосон» (Монголия) / А. Цогцэцэг // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 8. – С. 70–73.

Tsogtsetseg A. [Some morphological findings of

chronic dermatoses before and after treatment at health resort «Avara-Toson» (Mongolia)]. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk). 2008; 83 (8): 70-3. Russian.

10. Хлебникова А. Н. Современные подходы к наружной терапии псориаза / А. Н. Хлебникова // Вестник дерматологии и венерологии. – 2012. – № 1. – С. 86–91.

Khlebnikova AN. [Current approaches to the external therapy of psoriasis]. Vestn Dermatol Venerol. 2012; (1): 86-91. Russian.

11. Guilhou J. J. Immunopathogenesis of Psoriasis: news in an old concept / J. J. Guilhou // Dermatology. – 1998. – Vol. 197. – P. 310–312.

Guilhou J. Immunopathogenesis of psoriasis: news in an old concept. Dermatology. 1998;197(4):310-2. Cited in: PubMed; PMID: 9873165.

12. Dermatopathology / W. Kempf, M. Hantschke, H. Kutzner, W. H. C. Burgdorf. – Germany : Steinkopff Verlag, 2008. – 299 p.

Kempf W, Hantschke M, Kutzner H, Burgdorf WHC. Dermatopathology. Germany: Steinkopff Verlag; 2008. 299 p.

13. Aronson P. J. A review of the role of neutrophils in psoriasis and related disorders / P. J. Aronson // Dermatology Online Journal. – 2008. – Vol. 14, № 7. – Режим доступа до журн. : <http://dermatology.cdlib.org>.

Aronson PJ. A review of the role of neutrophils in psoriasis and related disorders. Dermatology Online Journal [Internet]. 2008; 14 (7). Available from : <http://dermatology.cdlib.org>.

14. Inverse correlation between Caveolin-1 expression and clinical severity in Psoriasis Vulgaris / W. Y. Ma, L. Zhuang, D. X. Cai [et al.] // Journal of International Medical Research. – 2012. – Vol. 40. – P. 1745–1751.

Ma WY, Zhuang L, Cai DX, Zhong H, Zhao C, Sun Q. Inverse correlation between caveolin-1 expression and clinical severity in psoriasis vulgaris. J Int Med Res. 2012; 40 (5): 1745-51. Cited in: PubMed; PMID: 23206456.

15. Amin M. M. Immunohistochemical study of osteopontin, Ki-67, and CD34 of psoriasis in Mansoura, Egypt / M. M. Amin, Z. A. Azim // Indian J. Pathol Microbiol. – 2012. – Vol. 55. – P. 56–60.

Amin MM, Azim ZA. Immunohistochemical study of osteopontin, Ki-67, and CD34 of psoriasis in Mansoura, Egypt. Indian J Pathol Microbiol. 2012 Jan-Mar; 55 (1): 56-60. doi: 10.4103/0377-4929.94857. Cited in: PubMed; PMID: 22499302.

Шпонька И.С., Святенко Т.В., Возняк И.Я., Пославская О.В. Анализ показателей экспрессии иммуногистохимических маркеров пролиферации, васкуляризации, базальноклеточный гиперплазии, стромальной деградации, CD3+ и CD68+ мононуклеарной инфильтрации и клеток Лангерганса в зависимости от формы и тяжести течения псориаза вульгарного.

Реферат. Цель – исследование уровней экспрессии иммуногистохимических маркеров клеточной пролиферации, васкуляризации, апоптоза, воспаления в зависимости от формы псориаза и тяжести течения патологических процессов. В исследовании были включены 18 обследованных пациентов (9 мужчин и 7 женщин) в возрасте от 24 до 58 лет с диагнозом псориаза вульгарного (общая группа) двух форм - бляшечковидная и каплевидная. Для определения связи между ангиогенезом, воспалительной инфильтрацией и нарушением созревания кератиноцитов проводились морфологические и иммуногистохимические исследования, где в качестве первичных использовались антитела к CD3, CD68, Ki-67, VEGF, CD34, P63, S100 и MMP-9. Полученные результаты позволяют выяснить форму, стадию и тяжесть течения псо-

риазе вульгарного на момент обращения пациента и получения биоптата псориатически пораженной кожи. Активность воспаления при псориазе вульгарном возможно выяснить по состоянию нейтрофилов, макрофагов и пролиферативной активности базального слоя. Персистенцию дальнейшего патологического процесса можно определить по наличию базально-клеточной гиперплазии в регрессирующую стадию, сверхэкспрессия маркеров MMP-9, VEGF и дилатации сосудов с Т-лимфоцитарными инфильтратами. Исключительно морфологические критерии не могут служить достоверными показателями выздоровления пациентов с бляшковидной и каплевидной формами псориаза и требуют дополнительного проведения иммуногистохимических исследований.

Ключевые слова: псориаз, иммуногистохимия, васкуляризация, пролиферация, p16, MMP-9.