

В.С. Глушок

Тернопільський обласний клінічний шкірно-венерологічний диспансер

# Аналіз процесів васкуляризації та деградації позаклітинного матриксу при актинічному кератозі

**Мета роботи** — проаналізувати кількісний і якісний склад судинного компонента дерми та рівень активності ензимів стромальної деградації різних клініко-морфологічних форм і стадій тяжкості актинічного кератозу порівняно із себорейним кератозом для розробки ефективних диференціально-діагностичних критеріїв.

**Матеріали та методи.** У роботі проведено імуногістохімічне дослідження процесів васкуляризації та стромальної деградації в 24 панч-біоптатах шкіри (15 актинічних кератозів та 9 себорейних кератозів) з маркерами CD34, ММП-9 та ТІМП-1 (Thermo Scientific, США).

**Результати та обговорення.** Виявлено вірогідне збільшення діаметрів та кількості судин у групі актинічних кератозів порівняно із себорейними ( $p < 0,05$ ). Під час оцінювання протеолітичної активності в зразках підгруп порівняння засвідчено відносно сильний кореляційний зв'язок за експресією матриксних протеїназ ММП-9 ( $p < 0,05$ ). Наявність аберантної експресії ММП-9 та ТІМП-1 в обох підгрупах додатково вказує на клітинну атипію і слугує надійним прогностичним показником підвищення проліферативної активності.

**Висновки.** При аналізі васкуляризації груп дослідження виявлено вірогідне збільшення кількості судин у АК порівняно з СК, а також збільшення діаметрів судин у групі АК. Наявність аберантної експресії маркера ММП-9 і ТІМП-1 в обох підгрупах вказує на наявність клітинної атипії і слугує надійним прогностичним показником підвищення проліферативної активності.

## Ключові слова

Актинічний кератоз, себорейний кератоз, діагностика, CD34, ММП-9, ТІМП-1.

Кількість судин новоутворення шкіри характеризують стан трофіки, демонструють напрям подальшого розвитку в зв'язку із можливим метастазуванням. Із підвищенням ступеня атипії клітин кількість судин збільшується [2, 3], тому теоретично актинічний кератоз (АК) як облігатний передрак повинен мати певні переваги перед складним для диференціальної діагностики, але цілком доброякісним себорейним кератозом (СК) щодо кількості судин поверхневої дерми. Імуногістохімічний (ІГХ) маркер загальної ендотеліальної диференціації CD34 дає змогу візуалізувати судинну стінку і оцінити кількість та якість судинного компонента дерми як доброякісних, так і неопластичних тканин.

Патологічну надекспресію маркера стромальної деградації матриксної металопротеїнази 9-го типу (ММП-9) або желатинази В здебільшого описано для злоякісних пухлин як показник порушення колагенового компонента базальної

мембрани з можливою інвазією неоплазії [5]. Актинічний кератоз розглядають як потенційний *cancer in situ*, він потребує ретельної диференціальної діагностики з інвазивною плоскоклітинною карциномою [1, 7]. До того ж порушення базальної мембрани як початковий етап реконструкції стромального компонента новоутворення шкіри та його трансформації в інвазивну форму вірогідно пов'язаний із дисбалансом експресії матриксних металопротеїназ (ММП) та їхніх інгібіторів (ТІМП). Атипові кератиноцити в інвазивних карциномах, що експресують різні ММП з високою інтенсивністю, повністю втрачають їхніх антагоністів ТІМП [6, 7]. Для перевірки порушення/втрати експресії ТІМП-1 у зразках АК (порівняно із СК) належить провести ІГХ-дослідження з урахуванням субклітинної локалізації ММП-9 та ТІМП-1 експресії.

Мета роботи — дослідити стан васкуляризації та стромальної деградації різних клініко-морфо-

логічних форм і стадій актинічного кератозу порівняно із себорейним для розробки ефективних диференціально-діагностичних критеріїв.

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи кафедри внутрішньої медицини №2 ДВНЗ Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України «Коморбідні стани в клініці внутрішніх хвороб та практиці сімейного лікаря: предиктори розвитку, рання діагностика, профілактика і лікування» (державна реєстрація № 0113U001244, термін виконання 2013–2017 рр.).

### Матеріали та методи

Для дослідження відібрано 24 зразки патологічно зміненої шкіри: 15 актинічних кератозів (АК) та 9 себорейних кератозів (СК). АК було представлено в трьох формах: 3 гіпертрофічних, 2 пігментних та 10 проліферативних зразків. Отримано їх шляхом біопсії в Тернопільському обласному клінічному шкірно-венерологічному диспансері. Імуногістохімічне дослідження проведено в морфологічному відділі Лікувально-діагностичного центру Медичної академії (Дніпро) протягом 2016–2017 рр. Гістологічний діагноз встановлювався на підставі морфологічних критеріїв, зазначених ВООЗ [4]. З огляду на висоту дисплазії епідермісу (1/3, 2/3 або 3/3) всі випадки АК розділено за ступенем тяжкості: АК I, АК II, АК III (рекомендації Rowert-Huber, 2007 та Cockerell, 2000) [4].

ІГХ-дослідження проводили за протоколами компанії Thermo Scientific (США) для маркерів: ендотелію CD34 (клон Ab-1, 1 : 600, Thermo Scientific, США), протеолітичної активності ММП-9 (клон RB9234PO, 1 : 200, Thermo Scientific, США) і тканинного інгібітора протеїнази – 1 TIMP-1 (клон 102D1, 1 : 100, Thermo Scientific, США). У зрізах завтовшки 4 мкм використовували систему візуалізації Ultra Vision Quanto (Thermo Scientific, США) з хромогеном DAB Quanto Chromogen (Thermo Scientific, США). Світлову мікроскопію проводили мікроскопом Zeiss Primo Star-Axiocam ERC5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN2 blue edition. Для кількісної оцінки васкуляризації строми підраховували середню кількість судин у полі зору при збільшенні в 400 із 3 гарячих точок поверхневих відділів дерми під диспластичним епідермісом (для АК)/у дермальних сосочках (для СК). Для якісної оцінки стану судин (спазм або дилатація) розраховували середні діаметри (мкм) з використанням мірної шкали мікроскопа.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програми R version 3.4.1 (2017-06-30) –

Single Candle Copyright<sup>©</sup> 2017. Статистичну значущість різниці результатів у групах перевірено за допомогою точного тесту Фішера, силу зв'язків між показниками оцінювали за коефіцієнтом спряженості Пірсона (C). Різницю в розмірах судин груп СК та АК порівнювали згідно з критерієм Мана–Уїтні. Значення  $p < 0,05$  було прийнято статистично значущим.

### Результати та обговорення

Акантоз, що притаманний всім випадкам СК, формував сосочки дерми з розгалуженою сіткою капілярів та венул, але глибші шари дерми СК мали вигляд без патологічних змін. Таким чином, CD34-позитивна ангіоархітектоніка СК (за збільшення в 400) характеризувалася скупченнями судин від 2 до 8 в п/з (медіана 4, середнє –  $4,22 \pm 1,85$ ), діаметром від 53,537 до 86,368 мкм (медіана 72,729 мкм, середнє –  $(70,743 \pm 12,928)$  мкм).

На відміну від СК, розташування судин у зразках АК мало інші структурні орієнтири: кількість судин із химерними формами збільшувалася безпосередньо під диспластичним базальним шаром епідермісу. Судини перебували в стані дилатації, спазму або навіть формували патологічну капілярну сітку синусоїдного типу, що в деяких випадках унеможливило підрахунок їхньої кількості. Під час аналізу CD34-позитивної васкуляризації в зразках АК виявлено від 4 до 15 судин у п/з (медіана 7, середнє –  $7,33 \pm 2,49$ ) діаметром від 76,225 до 262,481 мкм (медіана 140,415 мкм, середнє –  $(138,98 \pm 47,46)$  мкм). З огляду на значення медіани для АК (7 судин у п/з), всі спостереження розподілено на дві підгрупи: 1-ша – зі щільністю мікросудин (ЩМС)  $< 7$  в п/з: 6 АК та більшість СК (8 із 9); 2-га – ЩМС  $\geq 7$  в п/з, всі АК та 1 СК (табл. 1).

Виявлено відносно сильний кореляційний зв'язок (коефіцієнт спряженості Пірсона 0,433) між збільшенням ЩМС і діагнозом АК порівняно із СК ( $p_3 < 0,05$ ). Але між клінічними варіантами та гістологічними ступенями тяжкості АК різниці не було ( $p_1 > 0,05$ ;  $p_2 > 0,05$  відповідно).

Під час порівняння стану судин при СК і АК зауважено значне збільшення діаметрів у останній групі за рахунок кавернознопоподібних новоутворених судин (табл. 2). Згідно з критерієм Манна–Уїтні, спостерігається статистично вірогідна різниця щодо розмірів судин груп СК та АК ( $p_U < 0,05$ ).

Рівень експресії ферменту ММП-9 в атипичних кератиноцитах можна визначити за одним іменним ІГХ-маркером, який у нормі демонструє лише цитоплазматичну експресію слабкої

Таблиця 1. Щільність мікросудин у зразках АК та СК

Клінічна форма	Гістологічна стадія	n	ЩМС		Вірогідність
			< 7 в п/з	≥ 7 в п/з	
Гіпертрофічна	АК II	3	1	2	$p_1 = 0,7483$ $p_2 = 0,4396$  $p_3 = 0,03334$ $C = 0,433$
Загалом гіпертрофічних АК		3	1	2	
Пігментна	АК II	2	0	2	
Загалом пігментних АК		2	0	2	
Проліферативна	АК I	1	0	1	
Проліферативна	АК II	6	2	4	
Проліферативна	АК III	3	3	0	
Загалом проліферативних АК		10	5	5	
Кількість АК		15	6	9	
Кількість СК		9	8	1	
Кількість випадків		24	14	10	

Примітка. Вірогідним зв'язок вважали при  $p < 0,05$ ;  $p_1$  — різниця між клінічними формами АК;  $p_2$  — різниця між гістологічними стадіями тяжкості АК;  $p_3$  — різниця між групами АК та СК; C — коефіцієнт спряженості Пірсона.

Таблиця 2. Діаметр судин у зразках АК та СК, мкм

Діаметр судин при АК	Діаметр судин при СК	U, p
113,659	82,695	$U$ -критерій Манна—Уїтні дорівнює 6  Критичне значення $U$ -критерію Манна—Уїтні за заданої кількості груп порівняння становить 34  $6 < 34$ , отже, різниця рівня ознаки в групах порівняння статистично значуща ( $p_U < 0,05$ )
148,621	86,368	
182,211	53,534	
262,481	56,06	
91,281	85,615	
142,162	72,729	
181,71	74,812	
149,877	67,863	
133,823	57,017	
76,225		
155,707		
79,964		
140,415		
127,581		
99,054		

Примітка. Вірогідним зв'язок вважали при  $p < 0,05$ ;  $U$  — критерій Манна—Уїтні.

інтенсивності всіх шарів, окрім рогового, і підвищує інтенсивність забарвлення в «гарячих точках» васкуляризації. Подібну тенденцію можна спостерігати в зразках АК зі слабкою дисплазією, але зі збільшенням тяжкості клітинної атипії кератиноцитів (сильніше виявляється аберантна ядерно-цитоплазматична реакція епідермісу). Загалом експресія ММП-9 у АК продемонструвала три варіанти: слабка цитоплазматична (+) без ядер (3 із 15), слабка (+) цитоплазматична з надмірно (+++) забарвленими ядрами (5 із 15) та помірна цитоплазматична (++) із надмірною (+++) реакцією ядер (7 із 15). Більшість із останньої групи стали АК II ступеня тяжкості (табл. 3).

Підгрупа СК переважно мала звичайне рівномірне цитоплазматичне забарвлення ММП-9, окрім одного випадку з підвищеною проліферативною активністю та клітинною атипією (III за Ki-67 в цьому спостереженні становив 19,77 %). 8 інших випадків СК із просто цитоплазматичною реакцією ММП-9 за інтенсивністю розподілили порівну: 4 (+) та 4 (++) (табл. 3).

Таким чином, експресія ММП-9 у СК також мала три варіанти: слабка цитоплазматична (+) без ядер (4 із 9), помірна цитоплазматична (++)

без ядер (4 із 9) і слабка (+) цитоплазматична з помірно (++) забарвленими ядрами (1 із 9).

Різниця щодо варіантів експресії ММП-9 в АК за трьома вказаними клінічними формами не виявлено ( $p_1 = 0,3998$ ), як і за гістологічними стадіями тяжкості ( $p_2 = 0,3846$ ), але визначено відносно сильний кореляційний зв'язок ( $p_3 = 0,002186$ ;  $C = 0,721$ ), що засвідчує незалежну діагностичну вагомість маркера ММП-9 стосовно АК порівняно із СК. Аберантна експресія ММП-9 в ядрах атипичних кератиноцитів додатково вказує на клітинну атипію і служить надійним прогностичним показником підвищення проліферативної активності.

Під час дослідження рівнів експресії тканинного інгібітора металопротеїназ-1 виявили 5 градацій інтенсивності реакцій ТІМП-1 в АК: немає реакції (-), дуже слабка кластерна цитоплазматична експресія окремих клітин (+/-), слабка цитоплазматична (+), помірна цитоплазматична (++) , слабка цитоплазматична (+) із залученням ядер (табл. 4).

У біоптатах СК інтенсивність експресії ТІМП-1 не перевищувала (+) слабка, але в одному випадку з аберантною експресією ММП-9 виявлено також ядерно-цитоплазматичне забарвлення ТІМП-1 (див. табл. 4).

Таблиця 3. Варіанти експресії MMP-9 у зразках АК та СК

Клінічна форма	Гістологічна стадія	n	Варіанти експресії MMP-9				Вірогідність
			Слабка (+) цитоплазматична	Помірна (++) цитоплазматична	Слабка (+) цитоплазматична з забарвленням ядер	Помірна (++) цитоплазматична з забарвленням ядер	
Гіпертрофічна	АК II	3	1			2	p <sub>1</sub> = 0,3998 p <sub>2</sub> = 0,3846
Загалом гіпертрофічних АК		3	1	0	0	2	
Пігментна	АК II	2	1		1		
Загалом пігментних АК		2	1	0	1	0	
Проліферативна	АК I	1	1				
Проліферативна	АК II	6			2	4	
Проліферативна	АК III	3			2	1	
Загалом проліферативних АК		10	1	0	4	5	
Кількість АК		15	3	0	5	7	
Кількість СК		9	4	4	1	0	
Загальна кількість випадків		24	8	4	6	7	

Примітка. Вірогідним зв'язок вважали при  $p < 0,05$ ; p<sub>1</sub> — різниця між клінічними формами АК; p<sub>2</sub> — різниця між гістологічними стадіями тяжкості АК; p<sub>3</sub> — різниця між групами АК та СК; C — коефіцієнт спряженості Пірсона.

Таблиця 4. Варіанти експресії TIMP-1 у зразках АК та СК

Клінічна форма	Гістологічна стадія АК	n	Варіанти експресії TIMP-1					Вірогідність
			Негативна (-)	Дуже слабка кластерна (+/-)	Слабка (+) цитоплазматична	Помірна (++) цитоплазматична	Слабка (+) цитоплазматична з забарвленням ядер	
Гіпертрофічна	АК II	3	1			1	1	p <sub>1</sub> = 0,6907 p <sub>2</sub> = 0,4923
Загалом гіпертрофічних АК		3	1	0	0	1	1	
Пігментна	АК II	2	1				1	
Загалом пігментних АК		2	1	0	0	0	1	
Проліферативна	АК I	1			1			
Проліферативна	АК II	6	2	2			2	
Проліферативна	АК III	3		1			2	
Загалом проліферативних АК		10	2	3	0	0	4	
Кількість АК		15	4	3	1	1	6	
Кількість СК		9	2	3	3	0	1	
Загальна кількість випадків		24	6	6	4	1	7	

Примітка. Вірогідним зв'язок вважали при  $p < 0,05$ ; p<sub>1</sub> — різниця між клінічними формами АК; p<sub>2</sub> — різниця між гістологічними стадіями АК; p<sub>3</sub> — різниця між групами АК та СК.

Під час аналізу варіантів експресії ТІМП-1 в АК за клінічними формами та гістологічними стадіями різниці розподілу не виявлено ( $p_1 = 0,6907$ ;  $p_2 = 0,4923$  відповідно). У процесі порівняння когорт АК та СК за експресією ТІМП-1 статистично вірогідного кореляційного зв'язку не помічено ( $p_3=0,3049$ ), але виявлено, що наявність аберантної експресії маркера ТІМП-1 часто збігається із подібним явищем при ММП-9.

### Висновки

Під час аналізу васкуляризації груп дослідження, що передбачав розрахунок щільності мікросудин «гарячих точок» та середніх діаметрів за збільшення в 400 разів, було виявлено вірогідне збільшення кількості судин у АК порівняно із

СК ( $p_3 = 0,03334$ ;  $C = 0,433$ ), а також збільшення діаметрів судин у групі АК, пов'язане з формуванням спотворених кавернознопоподібних новоутворених судин навколо ділянок дисплазії епідермісу (за критерієм Манна—Уїтні помічено вірогідну різницю щодо розмірів судин груп АК та СК ( $p_U < 0,05$ )).

У процесі оцінювання протеолітичної активності в зразках АК та СК за експресією ММП-9 та її антагоністі ТІМП-1 визначено тільки відносно сильний кореляційний зв'язок за експресією ММП-9 ( $p_3 = 0,002186$ ;  $C = 0,721$ ), але наявність аберантної експресії маркера ММП-9 та ТІМП-1 в обох підгрупах додатково вказує на присутність клітинної атипії і служить надійним прогностичним показником підвищення проліферативної активності.

### Список літератури

- 1 Butani A.K., Arbesfeld D.M., Schwartz R.A. Premalignant and early squamous cell carcinoma // Clin. Plast. Surg. — 2005. — Vol. 32, N 2. — P. 223–235.
- 2 Florence M.E.B., Massuda J.Y., Bröcker E.-B. et al. Angiogenesis in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study of endothelial markers // Clinics (Sao Paulo). — 2011. — Vol. 66, N 3. — P. 465–468.
- 3 Florence M.E., Massuda J.Y., Soares T.C. et al. P53 immunorexpression in stepwise progression of cutaneous squamous cell carcinoma and correlation with angiogenesis and cellular proliferation // Pathol. Res. Pract. — 2015. — Vol. 211, N 10. — P. 782–788.
- 4 LeBoit P.E., Burg G., Weedon D., Sarasin A. World Health Organization of tumours: pathology and genetics of skin tumours. — Lyon, France: IARC Press, 2006. — 357 p.
- 5 Oliveira Poswar E., Carvalho Fraga C.A., Gomes E.S. et al. Protein expression of MMP-2 and MT1-MMP in actinic keratosis, squamous cell carcinoma of the skin, and basal cell carcinoma // J. Surg. Pathol. — 2015. — Vol. 23, N 1. — P. 20–25.
- 6 Weedon D. Skin Pathology. — China: Churchill Livingstone, 2002. — 1158 p.
- 7 Zalaudek I., Argenziano G. Dermoscopy of actinic keratosis, intraepidermal carcinoma and squamous cell carcinoma // Curr. Probl. Dermatol. — 2015. — Vol. 46. — P. 70–76.

В.С. Глушок

*Тернопольский областной клинический кожно-венерологический диспансер*

## Анализ процессов васкуляризации и деградации внеклеточного матрикса при актиническом кератозе

**Цель работы** — проанализировать количественное и качественное состояние сосудистого компонента дермы и уровень активности энзимов стромальной деградации различных клинико-морфологических форм и стадий тяжелой актинического кератоза в сравнении с себорейным кератозом для разработки эффективных дифференциально-диагностических критериев.

**Материалы и методы.** В работе проведено иммуногистохимическое исследование процессов васкуляризации и стромальной деградации в 24 панч-биоптатах кожи (15 актинический кератоз и 9 себорейных кератозов) с маркерами CD34, ММП-9 и ТІМП-1 (Thermo Scientific, США).

**Результаты и обсуждение.** Найдено достоверное увеличение диаметров и количества сосудов в группе актинических кератозов по сравнению с себорейными ( $p < 0,05$ ). При оценке протеолитической активности в образцах сравниваемых подгрупп выявлена относительно сильная корреляционная связь по экспрессии ММП-9 ( $p < 0,05$ ). Наличие аберантной экспрессии ММП-9 и ТІМП-1 в обеих подгруппах дополнительно говорит о клеточной атипии и служит надежным прогностическим показателем повышения пролиферативной активности.

**Выводы.** При проведении анализа васкуляризации групп исследования обнаружено вероятное увеличение количества сосудов в АК по сравнению с СК, а также увеличение диаметров сосудов в группе АК. Наличие аберантной экспрессии маркера ММП-9 и ТІМП-1 дополнительно свидетельствует о присутствии клеточной атипии и может быть надежным прогностическим показателем повышения пролиферативной активности.

**Ключевые слова:** актинический кератоз, себорейный кератоз, диагностика, CD34, ММП-9, ТІМП-1.

V.S. Hlushok

*Ternopil Regional Dermatovenerologic Dispensary*

## Analysis of vascularization and extracellular matrix degradation processes in actinic keratosis

**Objective** – to analyze the quantitative and qualitative state of the vascular component of the dermis and the level of enzymes activity of stromal degradation of various clinical and morphological forms and severity stages of actinic keratosis in comparison with seborrheic keratosis, for the development of effective differential diagnostic criteria.

**Materials and methods.** The immune histochemical study of vascularization and stromal degradation processes in 24 skin panchibioplates (15 actinic keratosis and 9 seborrheic keratosis) with markers CD34, MMP-9 and TIMP-1 (Thermo Scientific, USA) was carried out.

**Results and discussion.** A significant increase in the diameter and number of vessels in the actinic keratosis group was found in comparison with seborrheic keratosis ( $p < 0.05$ ). When evaluating the proteolytic activity in the samples of the compared subgroups, a relatively strong correlation was observed for the expression of MMP9 ( $p < 0.05$ ). The presence of aberrant expression of MMP-9 and TIMP-1 in both subgroups additionally indicates the presence of cellular atypia and serves as a reliable predictor of increased proliferative activity.

**Conclusions.** As a result of the vascularization analysis among the research groups, the probable increase of the quantity of vessels in AK in comparison with SK and the increase of the vessels diameter in AK group were found. The presence of aberrant expression of MMP-9 marker and TIMP-1 additionally testifies the presence of the cell atypia and can be a reliable prognostic indicator of the proliferative activity increasing.

**Key words:** actinic keratosis, seborrheic keratosis, diagnosis, CD34, MMP-9, TIMP-1.

---

### Дані про автора:

Глушок Віталій Степанович, лікар-дерматовенеролог Тернопільського обласного клінічного шкірно-венерологічного диспансеру 46006, м. Тернопіль, вул. Князя Острозького, 37  
E-mail: hlushok\_v@ukr.net