

Імуногістохімічні особливості патогенезу акне та динаміка змін шкіри при застосуванні системних ретиноїдів у пацієнтів з тяжкими формами дерматозу

Г.І. Губіна-Вакулік¹, Я.Ф. Кутасевич², Р.В. Сидоренко¹, І.М. Бронова²

¹ Харківський національний медичний університет

² ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України»

Резюме

В статті висвітлено дослідження процесів проліферації та апоптозу епітеліоцитів із застосуванням первинних моноклональних антитіл до Ki-67 і поліклональних антитіл до caspase-3. Наведена динаміка змін цих показників у шкірі хворих на тяжкі форми акне під час лікування системними ретиноїдами.

Ключові слова: акне, системні ретиноїди, імуногістохімія, Ki-67, caspase-3.

Вступ

Акне є широко поширеним хронічним захворюванням шкіри зі складним патогенезом, що потребує тривалої комбінованої терапії. Більшість вітчизняних і закордонних авторів розглядають акне як порушення функціонування всього організму [4]. Клінічні вияви акне являють проблему для пацієнтів і лікарів через велику поширеність, тривалий перебіг і можливі післявугрові зміни шкіри [1, 6, 7].

На сучасному етапі простежується тенденція до зростання рівня захворюваності на акне, що вказує на важливе медичне та медико-соціальне значення проблеми [6, 7, 9]. Незважаючи на те, що акне здебільшого незначно погіршує фізичний стан хворого, воно є постійним стресовим чинником, що призводить до психоемоційних реакцій та обмежень у всіх сферах життєдіяльності [5]. Навіть за умови адекватного лікування частота

рецидивів упродовж 5 років після закінчення терапії становить від 20 до 48% [9].

Європейське керівництво з лікування акне 2012 р. рекомендує застосовувати при акне II–III ступеня системні ретиноїди як препарати першої лінії терапії [10]. Активним діючим компонентом цих препаратів є ізотретиноїн – стереоізомер трансретиноевої кислоти (третиноїну) [2]. Встановлена висока ефективність лікування з досягненням повної клінічної ремісії у всіх хворих на середньотяжкі й тяжкі форми акне, відзначено відсутність серйозних небажаних ефектів та ускладнень під час проведення лікування [7, 8].

Незначна висвітленість у науковій літературі питань патогістології акне ставить перед нами нові питання щодо патогенезу акне, імуногістохімічних зрушень і клітинних змін на субклітинному рівні. Особливо важливим ми вважаємо вивчення динаміки

гістологічної картини у хворих на акне при застосуванні системних ретиноїдів.

Мета дослідження: вивчити динаміку імуногістохімічних змін шкіри у хворих на тяжкі форми акне, які отримували системні ретиноїди.

Матеріали та методи дослідження

В групу дослідження увійшли пацієнти з тяжкими формами акне, які були попередньо обстежені, після виключення протипоказань їм було призначено патогенетичну терапію у вигляді системних ретиноїдів у дозі 0,4 мг/кг маси тіла на добу протягом 4–6 міс. Імуногістохімічне дослідження біоптатів з уражених ділянок шкіри тулуба у пацієнтів з тяжким ступенем акне проводилося тричі: до, в процесі і після проведеної терапії. Забір матеріалу проводився принципово зі шкіри тулуба, щоб рубці після загоєння не залишалися на відкритих ділянках шкіри (шкіра обличчя).

Метод біопсії був інцизійним з попередньою анестезією і наступною обробкою і перев'язками згідно з хірургічними вимогами. Біоптати були зафіксовані в 10% розчині нейтрального формаліну, після проводки в спиртах зростаючої міцності залиті в парафін. Виготовлені мікрорізи (товщиною 5–6 мкм) пофарбовані гематоксиліном-еозином. Світлове мікроскопування здійснювали на мікроскопі AxioStar-plus (Zeiss, ФРН), мікрофотографії отримані із застосуванням цифрової фотокамери Progress-C10.

Імуногістохімічне дослідження процесів проліферації та апоптозу епітеліоцитів здійснено із застосуванням первинних моноклональних антитіл до Ki-67 та поліклональних антитіл до caspase-3 (TermoScientific, США). Титр антитіл підбирався згідно з рекомендаціями виробника з використанням як розчинника спеціального розчину Antibody Diluent (TermoScientific, США). Для ідентифікації реакції використовували систему візуалізації Quanto (TermoScientific, США) з нанесенням хромогену – 3-діамінобензидин тетрахлориду (DAB; TermoScientific, США). Для відокремлення незабарвлених структур зрізи додатково обробляли гематоксиліном Майєра.

Результати та їх обговорення

При вивченні біоптатів шкіри хворих на акне, що отримували системні ретиноїди, було відзначено, що перед початком лікування не тільки епітелій піхви волосяного фолікула, а й поверхневий епітелій (епідерміс), а також залозистий епітелій потових залоз мали ознаки гіпрепроліферації, а саме спостерігалось потовщення епітеліального покриву і його багатоклітинність. В динаміці лікування (4–5 міс) відбулося різке зменшення товщини епідермісу.

Використовуючи антитіла Ki-67, є можливість простежити зміну кількості мічених епітеліальних клітин, тобто тих, що вступають у мітоз, як до початку лікування в порівнянні зі здоровою шкірою, так

і в динаміці лікування. Виявляється, в зразку здорової шкіри мічені клітини зустрічаються в базальному шарі і зрідка – в нижньому шипуватому шарі, загалом близько 20% цих епідермоцитів мають мічене ядро (рис. 1). У хворого на акне перед початком лікування кількість епітеліальних клітин з міченим ядром дуже велика, вони розташовані не лише

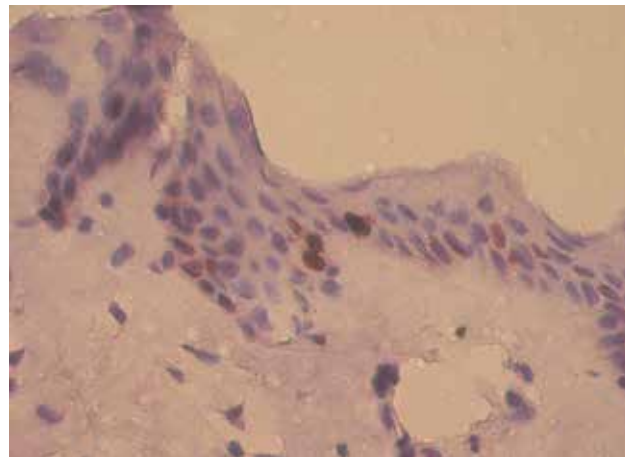


Рис. 1. Шкіра міжлопаткової ділянки здорового чоловіка 30 років. Наявність невеликих ділянок акантозу. Поодинокі клітини базального шару мічені антитілами Ki-67. Судинний шар дерми малоклітинний. Імуногістохімічна реакція на Ki-67 із забарвленням ядер гематоксиліном Майєра; x400

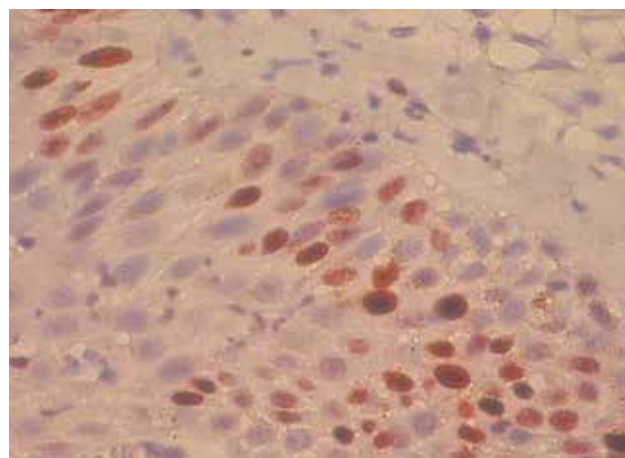


Рис. 2. Біоптат шкіри хворого на акне перед початком лікування. Велика кількість епідермоцитів, мічених Ki-67, як в базальному, так і в нижньому шипуватому шарах епідермісу. Імуногістохімічна реакція на Ki-67 із забарвленням ядер гематоксиліном Майєра; x400

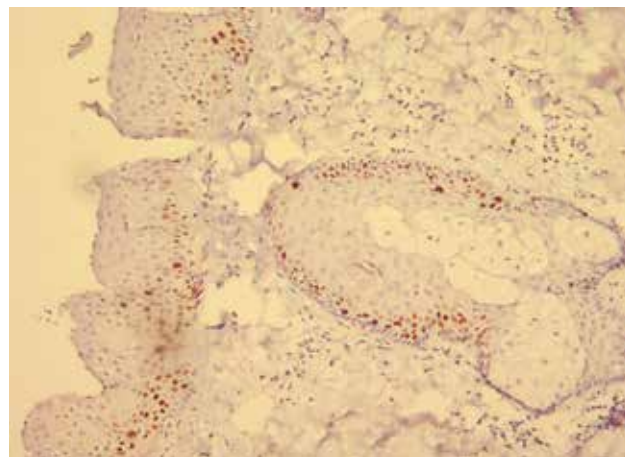


Рис. 3. Потовщення епідермісу і епітеліального вистилання піхви волосяного фолікула, велика кількість епітеліоцитів, мічених Ki-67. Імуногістохімічна реакція на Ki-67 із забарвленням ядер гематоксиліном Майєра; x100

в базальному шарі, а й в сильно потовщеному шипуватому шарі (рис. 2).

Відносна кількість мічених Ki-67 епітеліоцитів у базальному й шипуватому шарах епідермісу місцями сягає 50%. Там, де в зріз потрапив волосяний фолікул, видно, що епітелій його піхви також має різко збільшену кількість мічених Ki-67 епітеліоцитів (рис. 3).

В процесі лікування (через 1,5 міс від початку прийому системних ретиноїдів) ми спостерігали виразне зменшення кількості мічених Ki-67 епітеліоцитів шкіри (рис. 4–6). Причому через 4–6 міс після початку лікування можна було виявити ділянки, де кількість епітеліоцитів, що вступили в мітоз, виявляється меншою, ніж в епідермісі здорової шкіри, аж до 5%.

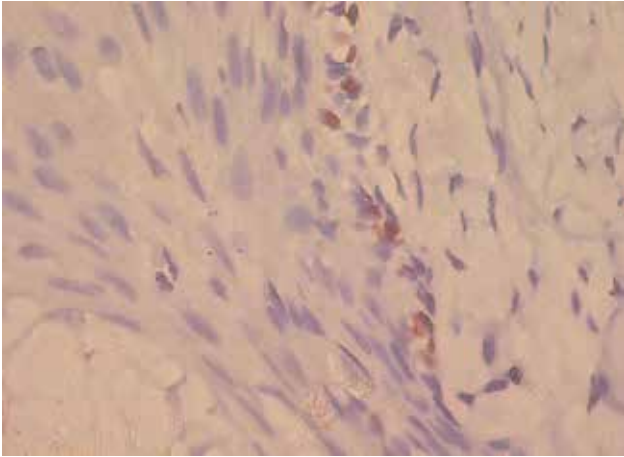


Рис. 4. Ділянка епідермісу з різким зменшенням кількості мічених Ki-67 епідермоцитів у біоптаті шкіри хворого на акне через 4 тиж після початку лікування. Імуногістохімічна реакція на Ki-67 із забарвленням ядер гематоксилином Майєра; x400

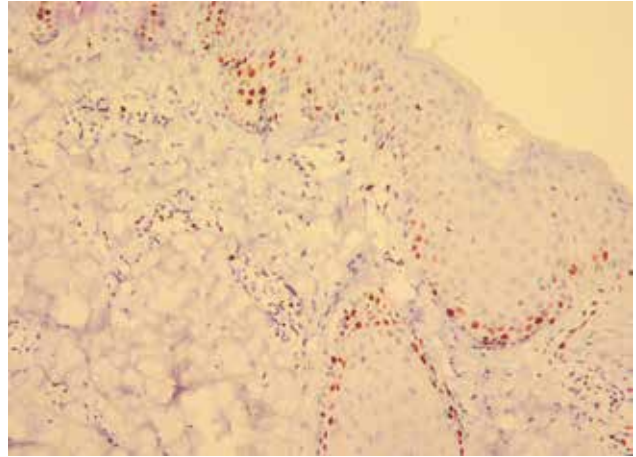


Рис. 5. Зменшення кількості мічених Ki-67 епітеліоцитів у епідермісі та епітеліальному вистиланні піхви волосяного фолікула у хворого на акне в біоптаті шкіри через 6 тиж після початку лікування. Імуногістохімічна реакція на Ki-67 із забарвленням ядер гематоксилином Майєра; x100

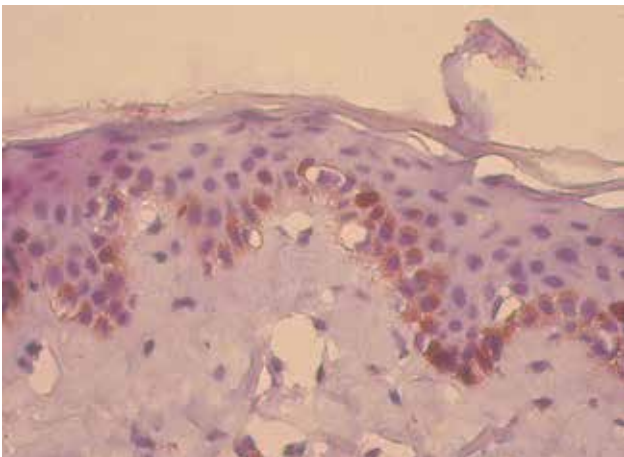


Рис. 6. Нормалізація товщини епідермісу через 6 міс після початку лікування. Поодинокі епідермоцити, мічені Ki-67 (ядро коричневого кольору, тоді як коричнева зернистість у цитоплазмі і ядро синього кольору – це скупчення меланіну в клітині). Імуногістохімічна реакція на Ki-67 із забарвленням ядер гематоксилином Майєра; x400

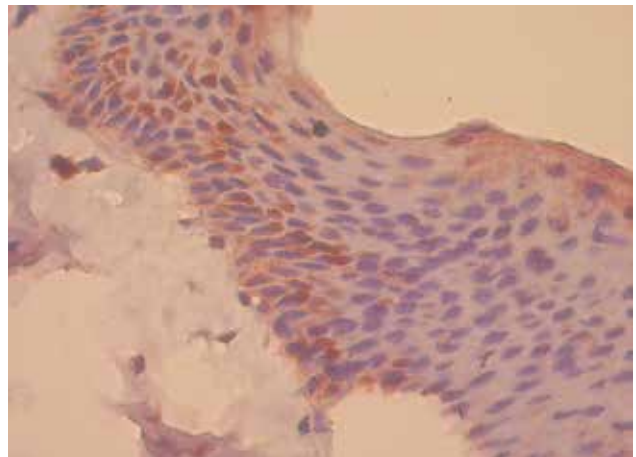


Рис. 7. Апоптоз, епітеліоцити, що гинуть, в епідермісі здорової шкіри. Імуногістохімічна реакція на caspase-3 із забарвленням ядер гематоксилином Майєра; x400

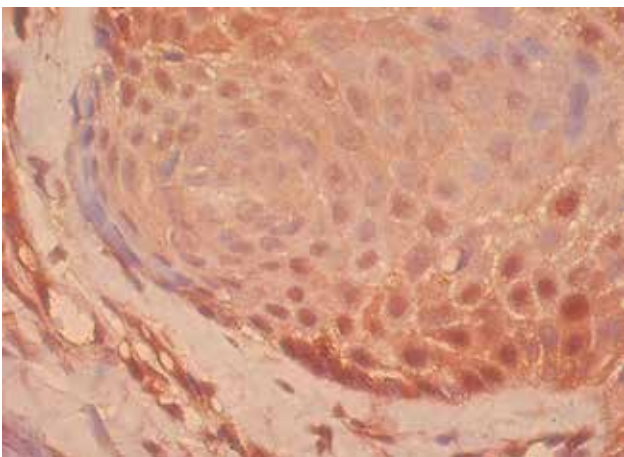


Рис. 8. Виразений апоптоз в епідермісі; можна спостерігати різну ступінь активності caspase-3 в різних епітеліоцитах. Біоптат шкіри узятий до початку лікування. Імуногістохімічна реакція на caspase-3 із забарвленням ядер гематоксилином Майєра; x400

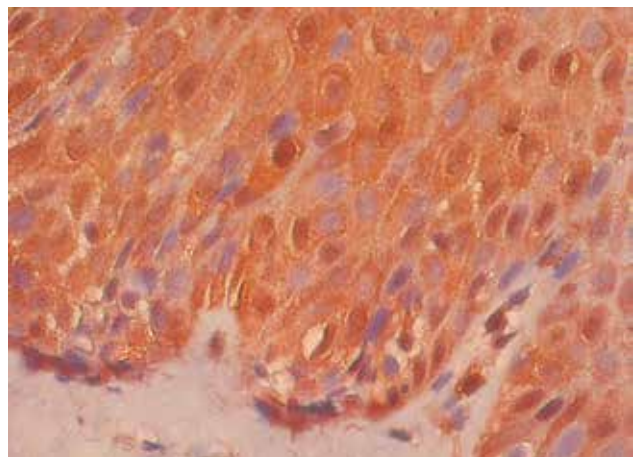


Рис. 9. Наростання апоптозу в епідермісі; біоптат шкіри узятий через 4 тиж після початку лікування. Імуногістохімічна реакція на caspase-3 із забарвленням ядер гематоксилином Майєра; x400

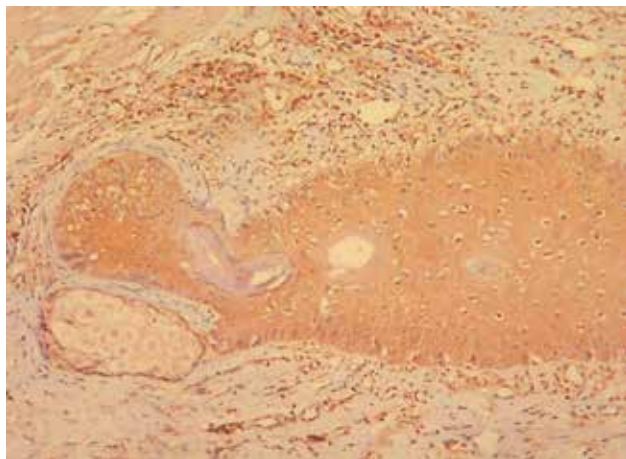


Рис. 10. Виразений апоптоз епітеліоцитів епітеліального вистилання волосяного фолікула хворого на акне в біоптаті шкіри через 4 тиж після початку лікування. Імуногістохімічна реакція на caspase-3 із забарвленням ядер гематоксином Майєра; x100

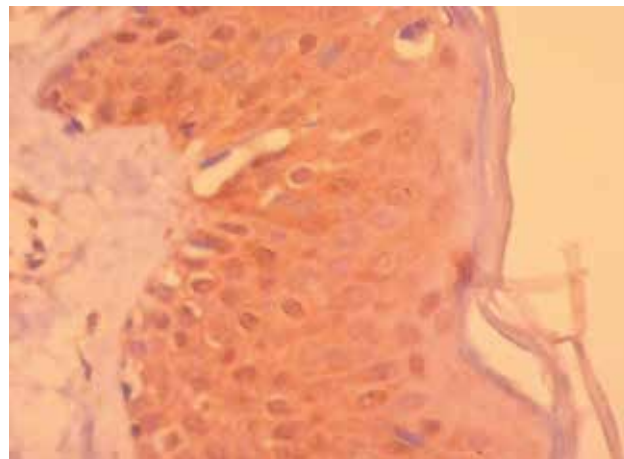


Рис. 11. Біоптат шкіри хворого на акне через 5 міс після початку лікування. Мала кількість епітеліоцитів, що мають мічене ядро, тобто гинуть шляхом апоптозу. Імуногістохімічна реакція на caspase-3 із забарвленням ядер гематоксином Майєра; x400

Отримано прямий доказ гальмування проліферативного процесу епітеліоцитів шкіри, в тому числі волосяних фолікулів, при лікуванні тяжкого акне системними ретиноїдами. Тобто ми маємо морфологічні докази наявності основної патоморфологічної ознаки захворювання – фолікулярний гіперкератоз, що значною мірою гальмується при застосуванні системних ретиноїдів.

Схожа картина спостерігається в епітелії шкіри та її придатків при імуногістохімічному дослідженні апоптозу, а саме з антитілами caspase-3. Виявляється, в здоровій шкірі в межах мікрофотографії (x400) caspase-3 активується лише в декількох епітеліоцитах нижнього шипуватого шару (рис. 7).

У хворих на акне до початку лікування апоптоз епітеліоцитів дуже виражений, у тому числі в епітеліоцитах базального шару (рис. 8). Caspase-3 – це «ключовий» ензим процесу апоптозу, він активується в ядрі, потім виявляється в цитоплазмі, а при розпаді клітини на апоптотичні тіลця – в міжклітинному просторі. Молекула caspase-3 досить міцна і цілком може посилювати процес апоптозу оточуючих клітин.

Через 4–6 тиж після початку лікування системними ретиноїдами апоптотичний процес в епідермісі та епітеліальному піхві волосяного фолікула наростає (рис. 9, 10). Через 4–6 міс інтенсивність експресії апоптотичного ензиму caspase-3 починає зменшуватися (рис. 11).

Можна припустити, що гинуть шляхом апоптозу саме ті епітеліоцити, що з'явилися в результаті патологічного стимулювання їх проліферації при акне. Морфометрично виявлена поліплоїдія ядер

епітеліоцитів обумовлює «неміцність» епітеліоцитів, що з'явилися в результаті гіперпроліферації. Імуногістохімічне дослідження з використанням антитіл caspase-3 підтверджує масивний апоптоз епітеліоцитів шкіри в процесі лікування, що проводиться. Щодо патогістологічних особливостей біоптатів шкіри хворих на акне, треба зазначити, що в дермі були виявлені макрофагально-лімфоцитарні інфільтрати як периваскулярно, так і в близькості до епідермісу та піхви волосяного фолікула – до розвитку в ньому гнійного запалення.

Висновки

Таким чином, при використанні імуногістохімічного методу дослідження біоптатів шкіри хворих на акне до лікування і в динаміці лікування системними ретиноїдами встановлено, що у хворих спостерігається гіперпроліферація епітеліоцитів як піхви волосяного фолікула, так і епідермісу, та завдяки лікуванню гальмується, а наприкінці терміну спостереження кількість епітеліоцитів, мічених Ki-67, виявляється на рівні контролю. Апоптоз епітеліоцитів, що діагностується за експресією ензиму caspase-3, активований і до лікування, максимально виражений через 4–6 тиж після початку лікування. Завдяки зниженню активності проліферації епітеліоцитів і підвищенню активності апоптозу в процесі лікування відбувається нормалізація товщини не лише епідермісу, а й епітеліального покриву піхви волосяного фолікула, що усуває прояви фолікулярного гіперкератозу і має принципове значення для ліквідації умов прогресування порушень біоти.

Список літератури

1. Бочаров В.А., Гладчук В.Є., Бочарова В.В. Роль мікробних асоціацій в розвитку інфекцій з ушкодженням шкіри. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2014. № 1. С. 22–25.
2. Данилюк Н.В., Вірстюк Н.Г. Акне і результати застосування системних ретиноїдів. Журнал дерматології та косметології ім. М.О. Торсуєва. 2013. № 1–2. С. 34–40.
3. Духанин А.С. Современные критерии рациональной фармакотерапии акне у женщин. Взгляд клинического фармаколога. Клиническая дерматология и венерология. 2012. № 2. С. 108–117.
4. Данби Ф.У. Акне: пер. с англ. под ред. В.И. Альбановой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 456 с.

References

1. Bocharov VA, Hladchuk VE, Bocharova VV. Rol mikrobykh asotsiatsiy v rozvytku infektsiy z ushodzhennyam shkiry (The role of microbial associations in the development of skin-damaged infections). Zdobutky klinichnoyi i eksperymentalnoyi medytsyny. 2014;1:22–25.
2. Danylyuk NV, Virstyuk NH. Akne i rezultaty zastosuвання systemnykh retynoyidiv (Acne and the results of systemic retinoids). Zhurnal dermatolohiyi ta kosmetolohiyi im. M.O. Torsuyeva. 2013;1–2:34–40.
3. Dukhanyn AS. Sovremennyye krytery ratsyonal'noy farmakoterapiy akne u zhenshchyn. Vzhlyad klinicheskoho farmakoloha (Modern criteria for rational pharmacotherapy for acne in women. The view of the clinical pharmacologist) Klynycheskaya dermatolohyya u venerolohyya 2012;2:108–117.

5. Захарова Г.И. Вивчення особливостей емоційно-вольової сфери у пацієнтів, які страждають на вугрову хворобу. Архів психіатрії. 2013. № 3. С. 94.
6. Масюкова С.А., Мордовцева В.В., Кахишвили Н.Н. и др. Клинический опыт лечения акне низкими дозами изотретиноина. Український журнал дерматології, венерології, косметології. 2014. № 2. С. 127–134.
7. Кутасевич Я.Ф., Джораева С.К., Брнова И.М. Акне: динамика изменений микробиоценоза в процессе саногенеза у пациентов, получающих системные ретиноиды. Дерматология та венерология. 2016. № 4. С. 43–54.
8. Кутасевич Я.Ф., Маштакова И.А. Опыт лечения тяжелых форм угревой болезни. Український журнал дерматології, венерології, косметології. 2011. № 3. С. 66–72.
9. Масюкова С.А., Мордовцева В.В., Кахишвили Н.Н. и др. Лечение акне низкими дозами изотретиноина. Клиническая дерматология и венерология. 2013. № 6. С. 7–12.
10. Dregno B., Bettoli V., Ochsendorf F. et al. European recommendations on the use of oral antibiotics for acne. Eur. J. Dermatol. 2004. Vol. 14. P. 391–399.
4. Dénby FU. Akne (Acne); per. s anhl. pod red. V.Y. Al'banovoy. M.: H OTAR-Medya. 2018:456.
5. Zakharova Hl. Vyvchennya osoblyvostey emotsiyno-vol'ovoy sfery u patsiyentiv, yaki strazhdayut' na vuhrovu khvorobu (Study of features of emotional-volitional sphere in patients suffering from acne). Arkhiv psykhiatriyi. 2013;3:94.
6. Masyukova SA, Mordovtseva VV, Kakhyshevly NN, et al. Klynychesky opyt lechennya akne nyzkymy dozamy yzotretynoyna (Clinical experience of treating acne with low doses of isotretinoin). Ukrainy's'ky zhurnal dermatolohiyi, venerolohiyi, kosmetolohiyi. 2014;2:127–134.
7. Kutasevych YaF, Dzhoraeva SK, Bronova YM. Akne: dynamyka zymnenenny mykrobyotse-noza v protsesse sanoheneza u patsiyentov, poluchayushchyykh systemnye retynoydy (Acne: dynamics of microbiocenosis changes in the process of sanogenesis in patients receiving systemic retinoids). Dermatolohiya ta venerolohiya. 2016;4:43–54.
8. Kutasevych YaF, Mashtakova YA. Opyt lechennya tyazhelykh form uhreyoy bolezny (Experience in the treatment of severe forms of acne). Ukrainy's'ky zhurnal dermatolohiyi, venerolohiyi, kosmetolohiyi. 2011;3:66–72.
9. Masyukova SA, Mordovtseva VV, Kakhyshevly NN, et al. Lechenye akne nyzkymy dozamy yzotretynoyna (Treatment acne with low doses of isotretinoin). Ukrainy's'ky zhurnal dermatolohiyi, venerolohiyi, kosmetolohiyi. 2013;6:7–12.
10. Dregno B, Bettoli V, Ochsendorf F, et al. European recommendations on the use of oral antibiotics for acne. Eur. J. Dermatol. 2004;14:391–399.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА АКНЕ И ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ КОЖИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СИСТЕМНЫХ РЕТИНОИДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМИ ФОРМАМИ ДЕРМАТОЗА

Г.И. Губина-Вакулик¹, Я.Ф. Кутасевич², Р.В. Сидоренко¹, И.М. Брнова²

¹ Харьковський національний медичинський університет

² ГУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України»

Резюме

В статье освещено исследование процессов пролиферации и апоптоза эпителиоцитов с использованием первичных моноклональных антител к Ki-67, поликлональных антител к caspase-3. Приведена и изучена динамика изменений этих показателей в коже пациентов с тяжелыми формами акне во время лечения системными ретиноидами.

Ключевые слова: акне, системные ретиноиды, иммуногистохимия, Ki-67, caspase-3.

IMMUNOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF PATHOGENESIS ACNE AND DYNAMICS OF SKIN CHANGES IN THE PATIENTS WITH SEVERE FORMS OF DERMATOSIS RECEIVING SYSTEM RETINOLS

G.I. Gubina-Vakulyk¹, Ya.F. Kutasevich², R.V. Sidorenko¹, I.M. Bronova²

¹ Kharkiv National Medical University

² SE «Institute of Dermatology and Venereology of NAMS of Ukraine»

Abstract

The article examines the processes of proliferation and apoptosis of epithelial cells, using primary monoclonal antibodies to Ki-67 and polyclonal antibodies to caspase-3. The dynamics of changes in these parameters in the skin of patients with severe forms of acne during treatment systemic retinoids is presented and studied.

Key words: acne, systemic retinoids, immunohistochemistry, Ki-67, caspase-3.

Відомості про авторів:

Губина-Вакулік Галина Іванівна – д-р мед. наук, професор кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету.

Кутасевич Яніна Францівна – д-р мед. наук, професор, директор ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України».

Сидоренко Руслан Валер'янович – канд. мед. наук, асистент кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету.

Брнова Ірина Михайлівна – лікар поліклініки ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України»; e-mail: bronova-derma@ukr.net