

ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШКІРИ ПАЦІЄНТОК З АНДРОГЕНЕТИЧНОЮ АЛОПЕЦІЄЮ

О. А. САЛЕНКОВА¹, доц. С. В. ДАНИЛЮК², проф. Ю. С. ОВЧАРЕНКО¹

¹ Харківський національний університет імені В. М. Каразіна,

² Харківська медична академія післядипломної освіти, Україна

Досліджено біоптати шкіри пацієнток з андрогенетичною алопецією за допомогою імуногістохімічного методу. Виявлено, що для жінок є характерною низка імуноморфологічних проявів: наявність у запальному інфільтраті імунокомпетентних Т-лімфоцитів CD3+, CD4+ та CD8+, макрофагів (CD68+); порушення балансу ростових поліпептидів VEGF, TGF- β 1, EGFR; накопичення ферментів оксидативного стресу eNOS та iNOS; накопичення патологічної фракції Collagen IV. Отримані дані не тільки дають змогу доповнити уявлення про морфогенез андрогенетичної алопеції, а й спробувати вдосконалити стандарти лікування захворювання з урахуванням результатів сучасних методів діагностики.

Ключові слова: андрогенетична алопеція, імуногістохімія, цитокіни, фактори росту, ферменти оксидативного стресу.

Волосся — важлива частина нашого зовнішнього вигляду та соціального спілкування. Втрата його може спричиняти значну психологічну травму у пацієнтів як жіночої, так і чоловічої статі. Ця проблема ще більше посилюється обмеженими доступними варіантами лікування, які дають лише тимчасові результати з багатьма шансами на побічні ефекти [1–3]. Одним з основних напрямків досліджень у трихології є вивчення різних аспектів андрогенетичної алопеції (АГА).

На теперішній час агресивний вплив андрогенів на волосяний фолікул в андрогензалежних зонах волосистої частини голови за умов генетичної схильності розглядається як основний етіопатогенетичний механізм АГА [4, 5]. Однак результати останніх досліджень показують, що як неандрогенні кофактори її розвитку можна розглядати оксидативний стрес, мікрозапалення, передчасний апоптоз та фіброз [6].

Припущення про роль запалення в патогенезі АГА висловлено ще у 1990-х рр. [7]. Пізніше було опубліковано ряд досліджень, у яких проаналізовано горизонтальні зрізи біопсій скальпа з ділянок облісіння у жінок і чоловіків і виявлено запальний інфільтрат активованих Т-клітин і макрофагів, помірний перифолікулярний фіброз, що складався з концентричних шарів колагену. Було запропоновано термін «мікрозапалення», тому що процес був помірний і відрізнявся від деструктивного характеру класичного запалення [8].

Серед причин, які можуть ініціювати і брати участь у подальшому прогресуванні АГА, розглядається оксидативний стрес. Ряд незалежних досліджень продемонстрували вплив оксидативного стресу на індукцію апоптозу клітин волосяного фолікула (ВФ), який призводить до раннього переходу у фазу катагену [9, 10]. Катаген з імуноло-

гічної точки зору є наслідком зниження експресії факторів, відповідальних за підтримку анагену, чинників зростання IGF-1, bFGF, VEGF. У цьому процесі як індуктори апоптозу задіяні також цитокіни (в тому числі підвищення експресії TGF β , IL-1 α і TNF α). Було відзначено, що зниження проліферативної активності клітин дермального сосочка асоційоване зі змінами клітинної морфології, зокрема з експресією маркерів оксидативного стресу і ураженням ДНК [11].

Але дотепер вплив оксидативного стресу, запального компонента і фіброзу, що формується, не було ретельно розглянуто. Не досліджено молекулярні елементи управління зумовленої імунною системою патологічної дегенерації ВФ шляхом апоптозопосередкованої загибелі органу.

Метою дослідження стало вивчення імуногістохімічних (ІГХ) особливостей шкіри у жінок з АГА.

Матеріалом для дослідження (основна група) були біоптати шкіри волосистої частини голови жінок з АГА (30 пацієнток віком від 22 до 40 років, середній вік 32,1 року), які перебували під спостереженням у період від 2017 до 2020 р. на клінічній базі кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології медичного факультету ХНУ ім. В. Н. Каразіна — «Інституту трихології». У групі контролю розглядалися 20 зразків шкіри жінок у віці 25–40 років (середній вік 34,7 року), які зазнали аутопсії в патологоанатомічному відділенні Клінічної міської лікарні № 17 м. Харкова. Тканинні фрагменти були проведені за стандартною гістологічною методикою, пофарбовані гематоксиліном і еозином.

ІГХ дослідження проводилося на базі лабораторії кафедри патологічної анатомії Харківської медичної академії післядипломної освіти з використанням антитіл і системи візуалізації фірми

Thermo scientific (Німеччина). Якісний склад запального інфільтрату вивчався за допомогою моноклональних антитіл (МКАТ) до CD3, CD4 Clone 4B12, CD8 (SP16) (різні фракції Т-лімфоцитів, Ready-to-Use), CD68 KP1 (маркер макрофагів, Ready-to-Use). Для виявлення оксидативних порушень досліджували експресію маркерів обміну оксиду азоту: ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS, Nitric Oxide Synthase, endothelial (eNOS), Rabbit Polyclonal Antibody в розведенні 1 : 50) і індуцибельної синтази оксиду азоту (iNOS, Nitric Oxide Synthase, inducible (iNOS), Rabbit Polyclonal Antibody в розведенні 1 : 100). Характер ангиогенезу оцінювали за експресією фактору росту ендотелію судин (VEGF (VG1)), Ready-to-Use. Експресію епідермального фактора росту визначали з використанням поліклональних антитіл (ПКАТ) EGFR Polyclonal Antibody (титр 1 : 100). Як фактор індукції запального процесу вивчали трансформуючий фактор росту (ПКАТ до TGF- β 1 (V) Antibody, Ready-to-Use). Bcl 2(124), Ready-to-Use використовувався як маркер апоптозу. Collagen IV (CIV22) з титром 1 : 50 виявляли у зонах ураження волосся.

Демаскуючу термічну обробку було виконано за методом кип'ятіння зрізів в цитратному буфері (рН 6,0–7,0). Для візуалізації первинних антитіл використовувалася система детекції UltraVision Quanto Detection Systems HRP Polymer (Thermo scientific, Німеччина). Як хромоген використовувався DAB (діамінобензидин).

Результати підраховували за допомогою окулярної сітки Автанділова [12] в 10 довільно вибраних полях зору при збільшенні $\times 400$. Оцінку ІГХ-мітки проводили за двома параметрами: ступенем поширення та інтенсивністю забарвлення, враховуючи вираженість реакції і її локалізацію.

Ступінь поширення мітки визначали за процентним вмістом позитивно забарвлених у коричневий колір органел клітин від загальної кількості клітин у полі зору. Для оцінки ступеня інтенсивності забарвлення використовували напівкількісну шкалу: негативною (0) вважалася реакція при відсутності фарбування специфічних структур клітини, слабкою позитивною (1+) вважалася реакція при слабкому або вогнищевому фарбуванні від 0 до 30 % клітин, помірною позитивною (2+) – при достатньому або вогнищевому фарбуванні 30–60 % клітин, вираженою або дифузною (3+) – реакція при фарбуванні 60–90 % клітин.

Комплекс морфологічних досліджень проводився на мікроскопі Primo Star (Carl Zeiss) з використанням програми AxioCam (ERc 5s).

Гістопатологічні зміни шкіри частини голови в основній групі дослідження були досить характерними, що дало змогу морфологічно підтвердити клінічний діагноз. В усіх випадках дерма була потоншеною, з дифузною втратою волосся. Звертала на себе увагу наявність волосся різного діаметру та велусного волосся, що зростало з мініатюризованих фолікулів. Кореневі волоссяні цибулинки волоссяних фолікулів у зоні порідіння, порівняно

з групою контролю розташовувалися переважно у сітчастому шарі дерми зі значним їх зменшенням у гіподермі. Поміж збережених ВФ у зоні спустілих волоссяних сумок у верхній частині ВФ виявлялися ділянки осередкового фіброзування дерми, вони склалися з концентрично розташованих пучків сполучнотканинних волокон. Кількість сальних залоз було збільшено порівняно зі шкірою здорових жінок. У 28 випадках із 30 периваскулярно, перифолікулярно та між ацинусами сальних залоз ми спостерігали лімфогістіоцитарний інфільтрат різного ступеню вираженості.

У результаті ІГХ дослідження біоптатів шкіри встановлено таке: 76,6 % клітин запального інфільтрату в основній групі було представлено CD3+ Т-лімфоцитами; 40 % з них припадало на CD4+ Т-лімфоцити, причому спостерігалися вони переважно у перифолікулярній зоні між ацинусами сальних та потових залоз (рис. 1). CD8+ Т-лімфоцити становили третину від усіх Т-лімфоцитів і виявлялись у сполучнотканинних прошарках та периваскулярно у дермі (28 випадків) та гіподермі (2 випадки).

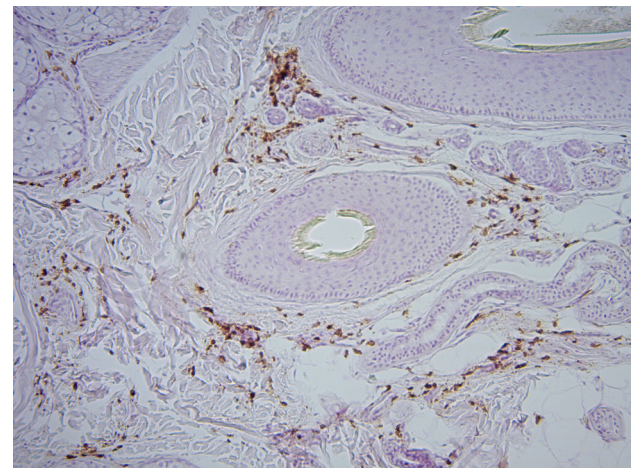


Рис. 1. CD4+ Т-лімфоцити у складі запального інфільтрату біоптатів шкіри основної групи дослідження. Реакція з моноклональними антитілами до CD4 Clone 4B12, $\times 100$

На CD68+ макрофаги припадало 11 % клітин запального інфільтрату, вони розташовувалися переважно у полях фіброзування та у верхніх відділах дерми (рис. 2).

Експресія eNOS у шкірі здорових жінок виявлялась лише у поодиноких макрофагах, фібробластах та ендотеліоцитах судин, тоді як в основній групі спостерігалась і в чисельних макрофагах, фібробластах, ендотеліальній устліці та м'язовому шарі судин та у кератиноцитах зовнішньої кореневої піхви (рис. 3, а).

Індуцибельна синтаза оксиду азоту iNOS у групі контролю не визначалася, у біоптатах з АГА експресувалась у макрофагах, ендотеліоцитах судин, поодиноких епітеліоцитах фолікулів і сальних залоз та у фібробластах зони перифолікулярного фіброзу (рис. 3, б).

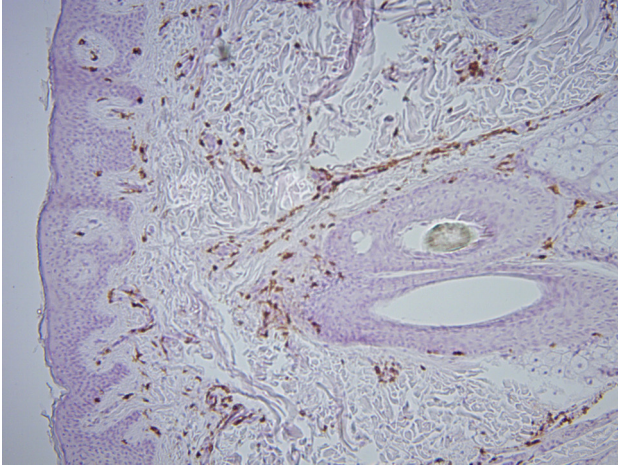
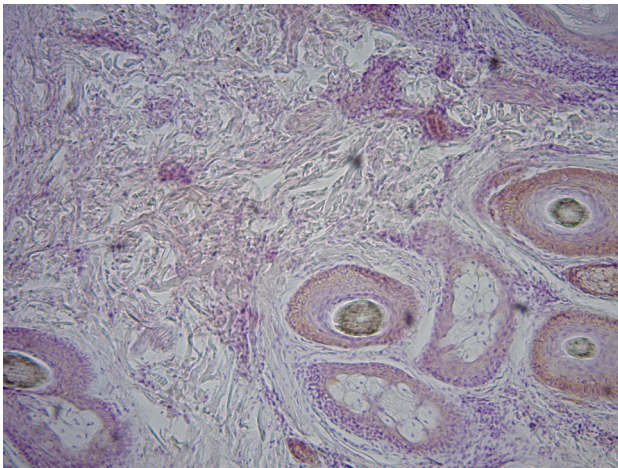
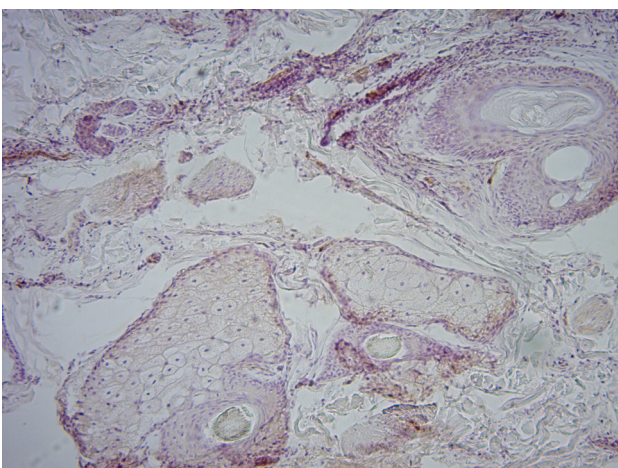


Рис. 2. Виражена макрофагальна інфільтрація у концентрично розташованих ділянках фіброзування біоптатів шкіри основної групи дослідження. Реакція з моноклональними антитілами до CD68 (KP1), $\times 100$



a



б

Рис. 3. Експресія eNOS: *a* – у зовнішній кореневій піхві. Реакція з поліклональними антитілами до anti-eNOS; *б* – у ендотеліоцитах і фібробластах. Реакція з поліклональними антитілами до anti-iNOS, $\times 100$

Вміст VEGF, як і колагену 4-го типу, було знижено: реакція із судинним фактором росту в ендотелії судин була слабкою (1+), особливо це помітно у ділянках концентричного фіброзу зі збідненою васкуляризацією. Базальні мембрани епідермісу, залоз, волосяних фолікулів і судин втрачали спеціалізований колаген 4-го типу та, навпаки, його накопичення фіксувалось у нетипових зонах перифолікулярного фіброзування (рис. 4).

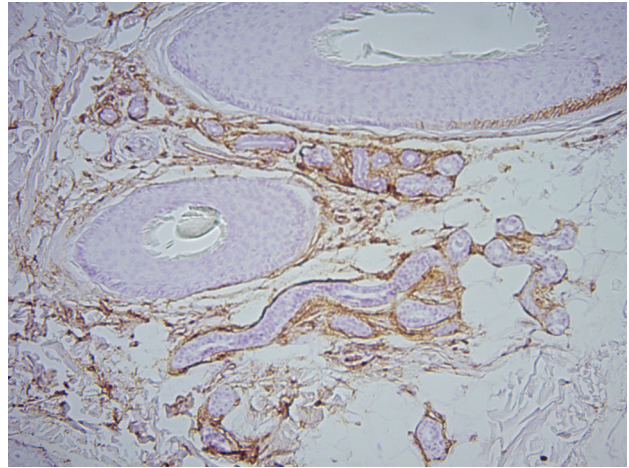


Рис. 4. Слабка та переривчаста експресія колагену 40-го типу у базальних мембранах структур шкіри біоптатів основної групи дослідження. Реакція з моноклональними антитілами до Collagen IV (CIV22), $\times 100$

Підвищеним порівняно з контрольною групою був вміст TGF- β 1 та EGFR. Виражена позитивна реакція (3+) з ПККАТ до трансформуючого фактора росту спостерігалась понад усе в чисельних макрофагах навколо судин та серед сполучнотканинних тяжів фіброзу (рис. 5).

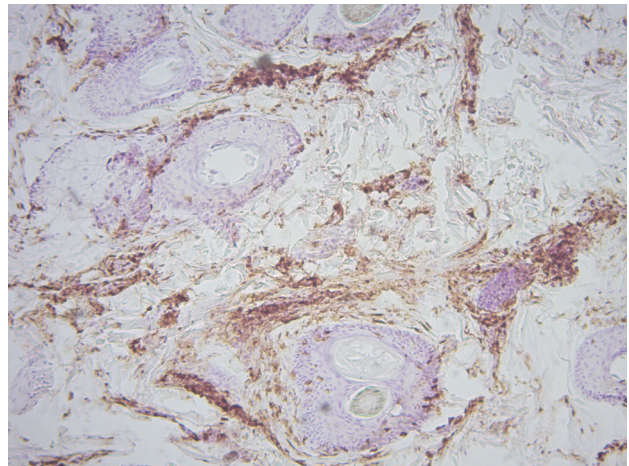


Рис. 5. Виражена експресія TGF- β 1 у макрофагах шкіри біоптатів основної групи дослідження. Реакція з поліклональними антитілами до TGF- β 1 Ab-3, $\times 100$

Епідермальний фактор росту маркував як стоншений епідерміс, так і клітини кореневих піхв (рис. 6).

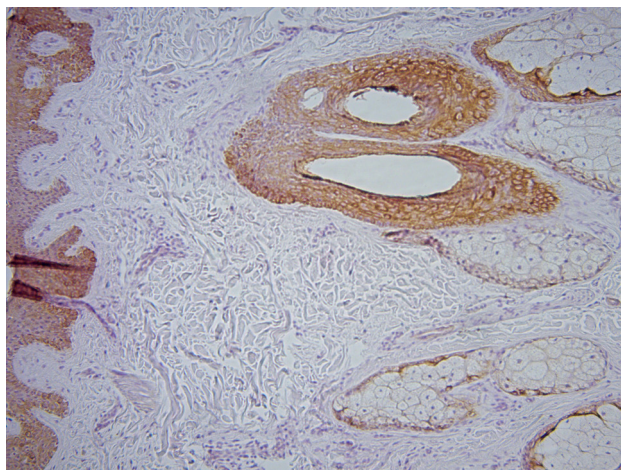


Рис. 6. Виражена експресія EGFR в епітеліальних оболонках волосяного фолікула шкіри біоптатів основної групи дослідження. Реакція з поліклональними антитілами до EGFR Polyclonal Antibody, $\times 100$

Розподіл антиапоптотичного білка Bcl-2 був помірним і частіше слабо вираженим (1+), експресія його виявлялась у клітинах запального інфільтрату та корелювала з підвищенням активності синтаз оксиду азоту, особливо індукцибельної.

Процес АГА неухильно призводить до поступової втрати волосся в скомпрометованих ділянках волосистої частини голови [13, 14]. Діагностична програма при АГА включає оцінку клінічних проявів захворювання, виявлення патології з боку захворювань яєчників і надниркових залоз, гіпофізу, підшлункової залози, щитовидної залози, печінки [15, 16] без детального урахування імуноморфологічного стану саме шкіри пацієнток. Відомо, що основна кількість регуляторних білків і факторів росту, таких як VEGF, TGF- β 1, EGFR, синтезується в ділянці дермального сосочка [17]. Фібробласти, епітеліоцити, ендотеліоцити його капіляра в умовах запального процесу, який виявлено нами

в 93,3 % спостережень основної групи дослідження, як і Т-лімфоцити і макрофаги запального інфільтрату, втрачають здатність до повноцінної продукції цих контролюючих субстанцій [18]. У свою чергу, матрикс ВФ і прилегла дерма починають накопичувати продукти ферментативного розпаду оксиду азоту eNOS та iNOS, що можна розцінювати як прояв оксидативного стресу [19, 20]. У сполучнотканинних волокнах дерми та пучках концентричного перифолікулярного фіброзу спостерігається відкладення колагену 4-го типу. Комплекс імуногістологічних змін, що було визначено у ході дослідження, є ознакою патологічного дисбалансу перифолікулярного середовища і, можливо, індуктором передчасної апоптозопосередкованої загибелі ствольних клітин ВФ, що спостерігалось у всіх пацієнток з АГА. Формується своєрідне «замкнуте коло», розірвати яке можливо, лише впливаючи на кожну ланку морфогенезу.

Імунокоригуючі, протизапальні засоби, антиоксиданти та антифіброзанти наразі не входять до стандартів лікування АГА. Однак виникає припущення: чи не буде їх додаткове застосування чинником, який поліпшує відповідь пацієнток на терапію.

АГА супроводжується низкою імуноморфологічних змін у шкірі, що можна зафіксувати шляхом проведення ІГХ реакції. Виявлені нами особливості ІГХ реакції в дермі пацієнток з АГА у вигляді підвищення експресії синтаз оксиду азоту eNOS та iNOS свідчать про порушення оксидативних процесів з дисбалансом імунокомпетентних Т-лімфоцитів CD3+, CD4+ та CD8+, макрофагів (CD68+) і ростових поліпептидів VEGF, TGF- β 1, EGFR. Визначення патологічної фракції колагену 4-го типу можна розглядати як маркер оксидативного стресу та хронічного запалення, що може бути предиктором подальшого розвитку перифолікулярного фіброзування та прогресування хвороби. Отримані нами дані дають змогу доповнити уявлення про патогенез і морфогенез АГА.

Список літератури

1. Овчаренко Ю. С., Качук Ю. В. Андрогенетическая алопеция // Les Nouvelles Esthetiques Украина. 2015. № 3 (91). С. 70–78.
2. Трихология / А. Злотогорский и др.; под ред. А. Литуса; пер. с англ. Ю. Овчаренко. 2-е изд., доп. и перераб. К., 2016. 276 с.
3. New Insight Into the Pathophysiology of Hair Loss Trigger a Paradigm Shift in the Treatment Approach / N. S. Sadick, V. D. Callender, L. H. Kircik, S. Kogan // J. Drugs Dermatol. 2017. Vol. 16, Suppl. 11. P. 135–140.
4. Evaluation of the Expression of Genes Associated with Inflammation and Apoptosis in Androgenetic Alopecia by Targeted RNA-Seq / L. Martinez-Jacobo et al. // Skin Appendage Disord. 2018. Vol. 4. P. 268–273. doi: <https://doi.org/10.1159/000484530>
5. Vascular Endothelial Growth Factor Protects CD200-Rich and CD34-Positive Hair Follicle Stem Cells Against Androgen-Induced Apoptosis Through the Phosphoinositide 3-Kinase / Akt Pathway in Patients With Androgenic Alopecia / X. Zhang, D. Zhou, T. Ma, Q. Liu // Dermatol. Surg. 2020. Vol. 46 (3). P. 358–368. doi: <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000002091>
6. Genetic and molecular aspects of androgenetic alopecia / L. Martinez-Jacobo et al. // Indian J. of Dermatology, Venereology and Leprology. 2018. Vol. 84 (3). P. 263–268. doi: <https://doi.org/10.4103/ijdv.ijdv1>
7. Androgenetic Alopecia Treatment in Asian Men / Y. Tanaka et al. // The J. of clinical and aesthetic dermatology. 2018. Vol. 11 (7). P. 32–35.
8. Androgenetic alopecia in males: a histopathological and ultrastructural study / M. El-Domyati, S. Attia, F. Saleh, H. Abdel-Wahab // J. of Cosmetic Dermatology. 2009. Vol. 8. P. 83–91. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2009.00439.x>
9. Trüeb R. M. The impact of oxidative stress on hair //

- Int. J. Cosmet. Sci. 2015. Vol. 37. P. 25-30. doi: <https://doi.org/10.1111/ics.12286>
10. Oxidative stress in androgenetic alopecia / B. E. Prie et al. // J. Med. Life. 2016. Vol. 9 (1). P. 79–83.
 11. Differential expression between human dermal papilla cells from balding and non-balding scalps reveals new candidate genes for androgenetic alopecia / G. Y. Chew, Elaine et al. // J. of Investigative Dermatology. 2016. Vol. 136 (8). P. 1559–1567. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.03.032>
 12. *Автандилов Г. Г.* Основы количественной патологической анатомии: моногр. М.: Медицина, 2002. 240 с.
 13. Androgenetic alopecia: a review / F.Lolli et al. // Endocrine. 2017. Vol. 57 (1). P. 9–17. doi: <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1280-y>
 14. Adil A., Godwin M. The effectiveness of treatments for androgenetic alopecia: a systematic review and meta-analysis // J. of the American Academy of Dermatology. 2017. Vol. 77 (1). P. 136–141. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.02.054>
 15. S1 guideline for diagnostic evaluation in androgenetic alopecia in men, women and adolescents / P. Blume et al. // Br. J. of Dermatology. 2011. Vol. 164 (1). P. 5–15. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.10011.x>
 16. Galliker N. A., Trieb R. M. Value of trichoscopy versus trichogram for diagnosis of female androgenetic alopecia // Int. J. Trichology. 2012. Vol. 4 (1). P. 19–22. doi: <https://doi.org/10.4103/0974-7753.96080>
 17. Gupta A. K., Carviel J. A mechanistic model of platelet-rich plasma treatment for androgenetic alopecia // Dermatologic Surgery. 2016. Vol. 42 (12). P. 1335–1339. doi: <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000901>
 18. The role of inflammation and immunity in the pathogenesis of androgenetic alopecia / C. M. Magro et al. // J. of drugs in dermatology: JDD. 2011. Vol. 10 (12). P. 1404–1411.
 19. The role of oxidative stress in early-onset androgenetic alopecia / H. K. Erdogan et al. // J. of cosmetic dermatology. 2017. Vol. 16 (4). P. 527–530. doi: <https://doi.org/10.1111/jocd.12300>
 20. Trieb R. M. Oxidative stress in ageing of hair // International J. of trichology. 2009. Vol. 1 (1). P. 6. doi: <https://dx.doi.org/10.4103%2F0974-7753.51923>
 21. Utility of Horizontal Sections of Scalp Biopsies in Differentiating between Androgenetic Alopecia and Alopecia Areata / D. Yadav et al. // Dermatology. 2018. Vol. 234 (3–4). P. 137–147. doi: <https://doi.org/10.1159/000490459>
 22. Comparative effectiveness of low-level laser therapy for adult androgenic alopecia: a system review and meta-analysis of randomized controlled trials / K. H. Liu, D. Liu, Y. T. Chen, S. Y. Chin // Lasers Med. Sci. 2019. Vol. 34 (6). P. 1063–1069. doi: <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02723-6>
 23. A Study of the Histopathological Features of Alopecias on Transverse Sections of Scalp Biopsies / M. Goyal et al. // Indian J. Dermatol. 2019. Vol. 64 (1). P. 47–54. doi: https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_477_17

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОЖИ ПАЦИЕНТОК С АНДРОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АЛОПЕЦИЕЙ

Е. А. САЛЕНКОВА, С. В. ДАНИЛЮК, Ю. С. ОВЧАРЕНКО

Исследованы биоптаты кожи пациенток с андрогенетической алопецией с помощью иммуногистохимического метода. Определено, что для женщин характерен ряд иммуноморфологических проявлений: наличие в воспалительном инфильтрате иммунокомпетентных Т-лимфоцитов CD3+, CD4+ и CD8+, макрофагов (CD68+); нарушение баланса ростовых полипептидов VEGF, TGF-β1, EGFR; накопление ферментов оксидативного стресса eNOS и iNOS; накопление патологической фракции Collagen IV. Полученные данные не только позволяют дополнить представление о морфогенезе андрогенетической алопеции, но и попробовать усовершенствовать стандарты лечения заболевания с учетом результатов современных методов диагностики.

Ключевые слова: андрогенетическая алопеция, иммуногистохимия, цитокины, факторы роста, ферменты оксидативного стресса.

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SKIN OF PATIENTS WITH ANDROGENETIC ALOPECIA

O. A. SALYENKOVA, S. V. DANYLIUK, Yu. S. OVCHARENKO

Skin biopsies of the patients with androgenetic alopecia were immunohistochemically studied. It was found that the women were characterized by a number of immunomorphological manifestations: the presence in inflammatory infiltrate of immune competent T-lymphocytes CD3 +, CD4 + and CD8 +, macrophages (CD68 +); imbalance of growth polypeptides VEGF, TGF-β1, EGFR; accumulation of oxidative stress enzymes eNOS and iNOS; accumulation of pathological fraction of Collagen IV. The findings not only support the idea of the morphogenesis of androgenetic alopecia, but also enable the improving of the standards of the disease treatment taking into account the results of modern diagnostic methods.

Key words: androgenetic alopecia, immunohistochemistry, cytokines, growth factors, oxidative stress enzymes.

Надійшла 17.03.2021