

УДК 616.517-092:577.121

## ЗНАЧЕННЯ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ (ТОЛЛ-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ 2, 4, 9) В ПАТОГЕНЕЗІ ПСОРИАЗУ

*Степаненко Р.Л.**Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, м. Київ, Україна*

*В статті представлені результати дослідження встановлених змін імуногістохімічної експресії TLR2, TLR4 та TLR9 в шкірі у хворих на псоріаз в динаміці проведення лікування, що вказує на певне значення відповідного рецептора в розвитку імунного запалення в шкірі при псоріазі, а також може слугувати додатковим діагностично-прогностичним маркером характеру клінічного перебігу цього дерматозу. Крім цього, встановлені зміни експресії TLR2, TLR4 та TLR9 в ділянках шкірної псоріатичної висипки розширюють уявлення з патогенезу псоріазу*

**Ключові слова:** псоріаз, Толл-подібні рецептори, системна імуносупресивна терапія, імуногістохімічні зміни в шкірі.

**Вступ.** Загально визнаним вважається те, що виникнення запалення в шкірі у хворих на псоріаз починається з активації клітин шкіри. Роль активованих клітин шкіри заключається не тільки в ініціації «до імунного» запального процесу у відповідь на проникнення невідомого антигену, а і в залученні клітин імунної системи. Імунна система залучається в розвиток запального процесу набагато пізніше, після проникнення через шкіру невідомого патогену. За цей час патогени не «мандрують» вільно по організму, так як їх розпізнають як «чуже» структури кератиноцитів. В середині 90-х років ХХ століття ряд авторів визначили це «чуже» як патоген-асоційовані молекулярні структури (pathogen associated molecular patterns (PAMPs)), що відсутні в багатоклітинних організмах [10, 13].

Розпізнавання PAMPs відбувається за допомогою так званих толл-подібних рецепторів (Toll-like receptors (TLRs)) [14]. TLRs представляють собою трансмембранні білкові структури, в склад яких входять мембранний і цитоплазматичні ділянки. На теперішній час відомо 13 різновидів толл-подібних рецепторів, з яких 11 являються найбільш вивченими [9, 11, 12].

Перший рецептор toll сімейства був виявлений у плодової мушки *Drosophila melanogaster* в 1992 році [1] як компонент, що приймає участь в ембріональному розвитку дрозофіл. Пізніше було встановлено, що toll-рецептор приймає участь в імунній відповіді у дорослих мух [2]. Дрозофіли, мутантні по toll-гену, були схильні до грибкових інфекцій. Подальші дослідження показали наявність гомологів toll-рецептора дрозофіл у ссавців, які отримали назву toll-like рецептори [3, 4, 5]. В організмі людини

більшість TLRs експресуються макрофагами, моноцитами, нейтрофілами, також існують дані про наявність їх на епітеліоцитах кишківника, ендотелію судин і кератиноцитах шкіри [6]. Стимуляція TLRs сприяє утворенню тимчасової сигнальної багатокомпонентної структури, спонукаючи геном клітини до вироблення цитокінів, молекул адгезії і костимулюючих молекул, регулюючих активацію адаптивного імунітету.

В тому випадку коли активовані клітини шкіри не можуть самостійно знищити патоген і забезпечити переривання «доімунного» запалення, в процес включаються клітини імунної системи.

Вивчення ролі та функції TLRs в шкірі людини проводяться порівняно недавно. Ряд авторів вважають, що TLRs активованих кератиноцитів здатні моделювати адаптивну імунну відповідь [7]. В деяких дослідженнях встановлено, що TLR-стимульовані кератиноцити супернатанта здатні викликати дозрівання дендритних клітин [8]. Активація TLRs була виявлена при деяких захворюваннях шкіри інфекційної етіології.

Таким чином, дослідження експресії TLRs клітинами шкіри має важливе значення для поглибленого розуміння механізму розвитку імунного запалення в шкірі хворих на псоріаз.

**Мета роботи** - дослідити зміни імуногістохімічної експресії Толл-подібного рецептора 2, 4 та 9 (TLR2, TLR4, TLR9) в шкірі хворих на псоріаз до та після проведення системної імуносупресивної терапії.

**Матеріали і методи дослідження.** Під нашим спостереженням у шкірно-венерологічному відділенні Олександрівської клінічної лікарні м. Києва було 62 хворих на

псоріаз вульгарний з прогресуючою стадією, середньотяжким або тяжким ступенем тяжкості клінічного перебігу дерматозу. У хворих на псоріаз проводили двократне біопсійне дослідження, зокрема з ділянок шкіри ураженої псоріатичною висипкою та з ділянок інтактною шкіри до лікування та після проведення системної імуносупресивної терапії препаратом етанарцепт протягом 3-х місяців. Біопсійний матеріал забирався у одних і тих же хворих з аналогічних ділянок. Крім того, для порівняння результатів імуногістохімічного дослідження проведено вивчення біопсійного матеріалу шкіри передньої черевної стінки у практично здорових осіб відповідного віку (5 пацієнтів), взятого після оперативного втручання, зокрема герніопластики. Фрагменти біопсійного матеріалу шкіри фіксували в 10% нейтральному формаліні. В подальшому біопсійний матеріал проводився по спиртах і заливався в парафінові блоки, з яких готувались гістологічні зрізи товщиною 4–6 мкм.

При постановці імуногістохімічних реакцій з метою демаскування антигенів була проведена теплова обробка зрізів та блокування неспецифічного зв'язування білків протеїновим блоком «ДАКО» і ендогенної пероксидазної активності пероксидазним блоком «ДАКО», після цього наносились первинні антитіла. За допомогою детекції «DAKO EnVision +» проводили візуалізацію первинних антитіл. Гістологічні структури для проведення візуалізації імуногістохімічні препарати дофарбовували гематоксилином Майєра, покривали канадським бальзамом та покривали покривними скельцями. Після цього за кількістю клітин, які мали чітку позитивну реакцію з урахуванням інтенсивності забарвлення, робили облік позитивних реакцій. Клітини з позитивною експресією вивчали у 4-6 випадкових полях зору мікроскопа. Результати імуногістохімічних реакцій оцінювали шляхом підрахунку клітин з позитивним забарвленням у 10 випадково обраних полях зору мікроскопу при збільшенні 400. Оцінювали ступінь інтенсивності забарвлення: 0 – відсутність забарвлення, 1 (+) – слабе забарвлення світло-коричневого кольору, 2 (++) – помірне забарвлення коричневого кольору, 3 (+++) – виражене забарвлення темно-коричневого кольору. Результати імуногістохімічної реакції оцінювали напівкількісним методом в балах від 0 до 6 по загальноприйнятій методиці з урахуванням забарвлених клітин. 0 балів визначали при відсутності зафарбовування, 1 бал – до 10%, 2 бали – до 20%, 3 бали – до 30%, 4 бали – до 40%, 5 балів – до 50%, 6 балів – більше 50% забарвлених клітин.

Для визначення характеру і розповсюдженості місцевих клітинних імунних і запальних реакцій в шкірі застосовували імуногістохімічні методики з визначенням експресії маркера TLR2, TLR4 та TLR9.

Отримані імуногістохімічні препарати вивчали з використанням мікроскопа "Olympus BX 51", цифрової камери "Olympus C 5050 Z" та програмного забезпечення "Olympus DP-Soft". Імуногістохімічні дослідження були проведені в Інституті патології Карл-Тім-Клінікум (академічна школа Шаріте, м. Котбус, Німеччина).

Достовірність відмінностей порівнюваних величин визначалася за допомогою критерію Стьюдента (t). Різниця між середніми значеннями досліджених показників

приймалася достовірною з ймовірністю 95% і вище. Зв'язок між ознаками визначали за допомогою коефіцієнта кореляції. Всі встановлені параметри послужили вихідними даними для статистичного аналізу, який проводився за допомогою пакета прикладних програм "Microsoft Excel - XP". Морфометричний аналіз проведено за допомогою комп'ютерної програми "Olympus DP-Soft". Статистичну обробку результатів дослідження проводили за загальноприйнятими методиками з використанням пакету "STATISTICA 7". Відмінності вважали статистично достовірними при рівні надійності 0,05 і вище.

**Результати дослідження та їх обговорення.** З метою виявлення характеру експресії TLR2 та TLR4 в шкірі, при постановці імуногістохімічних реакцій, в нормі було виявлено фонове дифузне цитоплазматичне і ядерне зафарбування клітин епідермісу, ендотелію судин і поодиноких макрофагальних клітин. Характерні мембранні патерни експресії цих маркерів спостерігаються в дендритних клітинах епідермісу, тучних клітинах, розташованих периваскулярно та в макрофагах (рис. 1). Прослідковується більш інтенсивне зафарбування в епідермісі в напрямку від поверхневих шарів до базального шару.

Експресія TLR9 в епідермісі в нормі найбільш виражена в базальних відділах і в шарі шиповидних клітин (рис.2).

Слід відмітити, що виявляється чітке розмежування клітин з позитивною реакцією і клітин, що мають негативну експресію. В дермі позитивна експресія маркера виявляється в поодиноких запальних клітинах (рис. 2). Слід відмітити, що експресія рецептора  $\epsilon$ , в основному, ядерна; в цитоплазмі епітеліоцитів позитивне зафарбування є мінімальним.

В ділянках інтактною шкіри до лікування, у хворих на псоріаз, при постановці імуногістохімічної реакції на TLR2 визначається позитивна реакція з ядерними патернами експресії в епітеліоцитах та дендритних клітинах базального шару епідерміса (рис. 3). Також відмічається неспецифічне забарвлення в цитоплазмі цих клітин. В поверхневих клітинах епідермісу реакція негативна. В дермі визначається позитивна експресія TLR2 в ендотелії частини кровоносних судин і в поодиноких клітинах легкого запального інфільтрату.

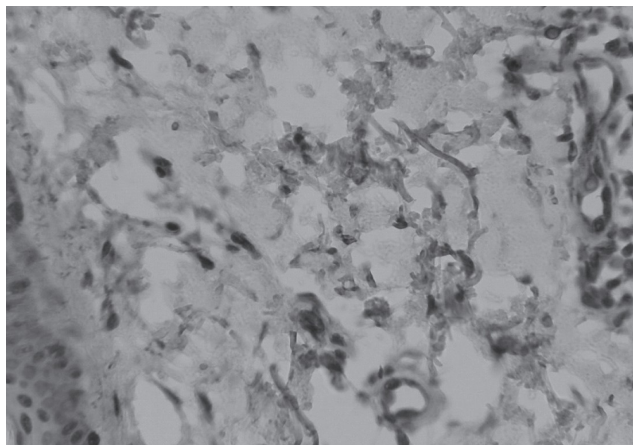


Рис. 1. Шкіра в нормі. Експресія TLR2 в макрофагах, дендритних клітинах епідермісу та ендотелії судин. Х400.

При постановці імуногістохімічної реакції на виявлення експресії TLR4 визначається більш інтенсивне і розповсюджене ядерне і цитоплазматичне забарвлення клітин епідермісу. Більш інтенсивна реакція виражена в базальному шарі епідермісу, однак позитивне забарвлення відмічається і в епітеліоцитах поверхневих шарів. Навіть в субкератиновому шарі відмічається поодинокі епітеліоцити з експресією цього маркера. Слід відмітити позитивну дифузно-вогнищеву реакцію в зроговілому шарі. В дермі також виявляється більша кількість позитивно забарвлених клітин як ендотелію так і запального інфільтрату (Рис. 4). Запальні клітини, що експресують цей маркер локалізуються переважно периваскулярно.

У хворих на псоріаз до проведеного лікування, в інтактній шкірі, в епідермісі вогнищеву визначається більш активна експресія TLR9. Топографічно такі ділянки відповідають збільшеним сосочкам чи сосочкам, які активно формуються. В епідермісі над ними виявляється позитивне зафарбування епітеліоцитів на всю товщу епідермісу.

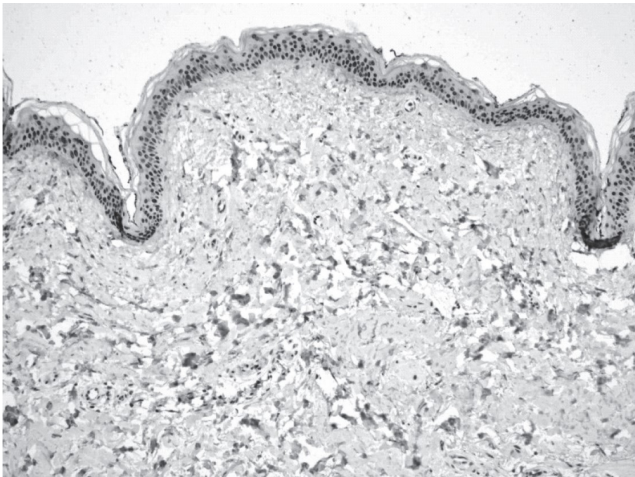


Рис. 2. Шкіра в нормі. Переважна експресія TLR9 в епідермісі в базальних шари і в шарі шиповидних клітин. Імуногістохімічна реакція на TLR9. X40.

Інтенсивна експресія маркера спостерігається також на ділянках втягнення епідермісу. Закономірним є зростання кількості TLR9-позитивних клітин в поверхневих шарах епідермісу в напрямку до поверхні шкіри. Помірне позитивне зафарбування виявляється також в нечисленних клітинах периваскулярних запальних інфільтратів сосочкового шару дерми (рис. 5).

Як в епітеліоцитах, так і в запальних клітинах патерни експресії маркера є як ядерними, так і цитоплазматичними. При цьому прослідковується дрібно гранулярне зафарбування.

При дослідженні експресії TLR4 в ділянках шкірної псоріатичної висипки також виявляється фонове дифузне цитоплазматичне і ядерне зафарбування клітин епідермісу, ендотелію судин і поодиноких макрофагальних клітин. Кількість клітин епідермісу, що позитивно зафарбовуються складає близько 80%. На великому збільшенні прослідковується експресія маркера дендритними клітинами епідермісу, навколо яких утворюється «корона» із позитивно забарвлених клітин.

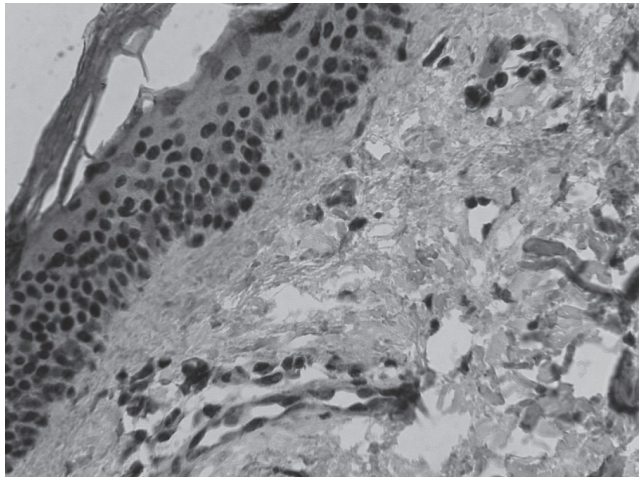


Рис. 4. Інтактна шкіра хворого на псоріаз. Позитивна дифузно-вогнищеву реакція в зроговілому шарі. Реакція на виявлення експресії TLR4. X400

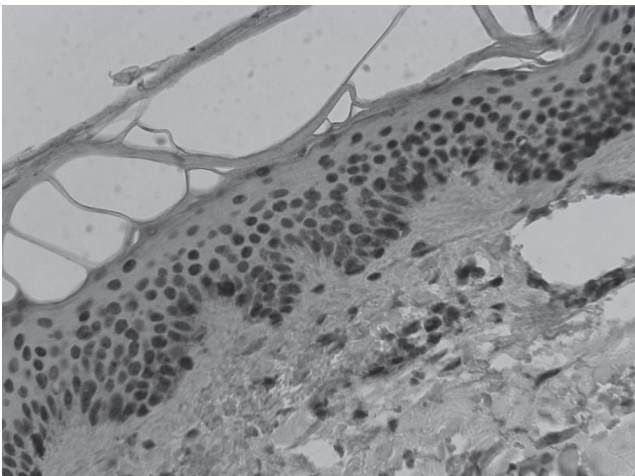


Рис. 3. Інтактна шкіра хворого на псоріаз. TLR2 позитивна реакція з ядерними патернами експресії в епітеліоцитах та дендритних клітинах базального шару епідерміса. X400

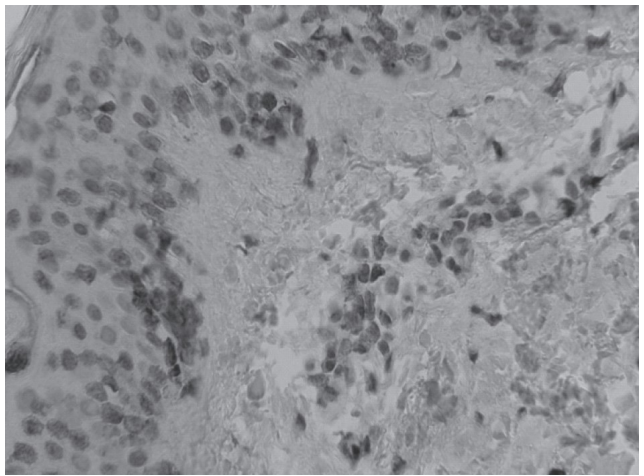


Рис. 5. Інтактна шкіра хворого на псоріаз до лікування. TLR9-позитивні клітини в периваскулярних запальних інфільтратах дерми. Імуногістохімічна реакція на виявлення експресії TLR9. X400.

тивно забарвлених численних міжклітинних з'єднань (містків).

В цих клітинах виявляється слабке забарвлення мембран і гранулярних матеріал в цитоплазмі. Характерне мембранне зафарбування виявляється в макрофагах, розташованих в сосочках при безпосередньому контакті цих клітин з дендритними клітинами епідермісу. Найбільш інтенсивна характерна реакція спостерігається в макрофагах, розташованих в сосочках і периваскулярно в дермі.

При оцінці експресії TLR2 виявляється менш інтенсивне дифузне фонове зафарбування епідермісу, ендотелію судин і частини клітин в запальних інфільтратах дерми. Кількість клітин епідермісу, що виявляють позитивне фонове забарвлення складає близько 80%. Слід відмітити феномен позитивного мембранного зафарбування ядер епітеліоцитів, розташованих безпосередньо під зроговілим шаром епідермісу.

Характерна мембранна експресія виявляється в макрофагах сосочків дерми і макрофагах, що мігрують в епітеліальний пласт. Причому морфологічно виявляється ідентичність локалізації продуктів імуністохімічної реакції в дендритних клітинах епідермісу і в макрофагах сосочків дерми, що безпосередньо контактують з епітеліоцитами. Найбільш виражена позитивна реакція спостерігається в макрофагах, що розташовані в запальних периваскулярних інфільтратах в основі сосочків дерми (Рис. 6).

У хворих на псоріаз, при постановці імуністохімічної реакції з TLR4, в ділянках шкірної псоріатичної висипки характеризуються виразною мембранною експресією TLR4 численними макрофагами сосочків дерми. Макрофаги збільшуються в розмірах і розташовуються групами. Значна кількість позитивних макрофагів виявляється в епідермісі над верхівками сосочків. Характерним являється феномен позитивного ядерного мембранного зафарбування епітеліальних клітин, що межують зі зроговілими масами на поверхні шкіри.

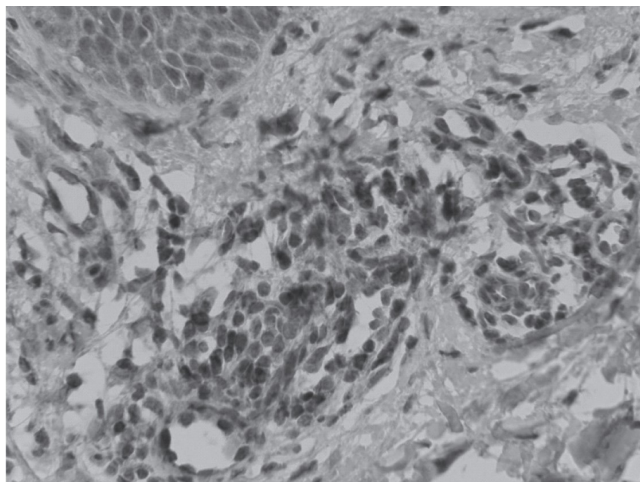


Рис. 6. Ділянка шкірної псоріатичної висипки хворого на псоріаз. Мембранна експресія в макрофагах сосочків дерми і макрофагах, що мігрують в епітеліальний пласт. Реакція на виявлення експресії TLR4. X400.

В сосочковому шарі дерми характерна мембранна експресія TLR4 виявляється як в окремих макрофагах, розташованих периваскулярно, так і особливо в складі периваскулярних запальних інфільтратів.

Слід відмітити локалізацію макрофагів в лімфатичних судинах, що відтікають по напрямку від верхівки сосочків до їх основи, де містяться скупчення судин. Морфологічно спостерігається значне стоншення епідермісу над верхівками сосочків аж до безпосереднього ерозуювання. Епітеліальний пласт, що оточує сосочок, особливо в зонах верхівок, є набряклим з відокремленням клітин між собою за рахунок міжклітинної рідини. Створюється така ситуація, що ліганди мікроорганізмів можуть вільно проникати до сосочкового шару і реагувати з макрофагами. Останні активно мігрують до верхівки сосочків, навіть проникають в епітеліальний пласт.

При цьому макрофаги активуються, збільшуються в розмірах, активно експресують TLR2 та TLR4 рецептори. Очевидно, що макрофаги після активації мігрують до основи сосочків, де включаються в склад запальних інфільтратів, розташованих периваскулярно. В цих ділянках відбуваються основні взаємодії макрофагів та лімфоїдних клітин.

До проведення системної імуносупресивної терапії, в псоріатичних бляшках шкіри у хворих на псоріаз значно потовщується шар епідермісу і в ньому зростає кількість TLR9-позитивних клітин. Прослідковується закономірність: TLR9-позитивні клітини в епідермісі виявляються в ділянках набряку і значно менш представлені в місцях компактного розташування епітеліоцитів.

Макрофаги, що мігрують в судинах сосочків дерми, мають виражену позитивну експресію маркера (рис. 7). Епітеліоцити проявляють легке і помірне ядерне і цитоплазматичне зафарбування.

Слід відмітити, що TLR9-позитивні моноцити і макрофаги виявляються в судинах і периваскулярному просторі сосочкового шару дерми. Найбільша кількість позитивних клітин спостерігається в судинах, котрі знаходяться в сосочках. В фолікулоподібних скупченнях

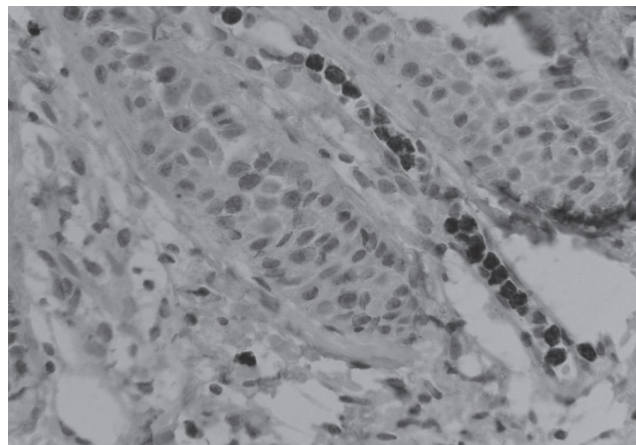


Рис. 7. Ділянка шкірної псоріатичної висипки хворого на псоріаз до проведення курсу системної імуносупресивної терапії. Значна кількість позитивно забарвлених макрофагів і моноцитів в сосочку дерми. Імуністохімічна реакція на виявлення TLR9. X400.

запальних клітин в сосочковому шарі дерми безпосередньо під епідермісом виявляється позитивна експресія TLR9 в крупних макрофагах і слабопозитивна реакція – в частині лімфоїдних клітин.

Частина TLR9-позитивних клітин в епідермісі являє собою запальні клітини, що мігрують із сосочкового шару дерми. До таких клітин слід віднести перш за все макрофаги і активовані лімфоїдні елементи, а також нейтрофільні гранулоцити. Останні проявляють позитивне зафарбування, особливо в ділянках формування під роговим шаром мікроабсцесів Мунро. Слід відмітити, що в разі активності псоріатичного процесу виникає набряк, акантоз і десквамація епітеліоцитів і утворюються ворота, через які заходить бактекріальна мікрофлора. На імуногістохімічних препаратах прослідковується позитивна експресія TLR9 в колоніях мікрорганізмів, внутрішньоклітинно в гранулоцитах і в макрофагах в разі їх фагоцитозу (рис. 8).

В ділянках наявності мікроабсцесів Мунро в прилягаючих сосочках дерми спостерігається максимальна кількість різко TLR9-позитивних макрофагів. Вочевидь відбувається зворотня міграція таких запальних клітин через сосочки в периваскулярні простори дерми. Такий процес може бути ланкою в підтримуванні запального процесу в шкірі і прогресуванні псоріатичного висипу.

Якщо TLR9-позитивну реакцію в макрофагах і гранулоцитах, а також в лімфоїдних елементах можна пояснити фагоцитозом чи рецепцією таких епітопів із тканин, включаючи епідерміс, то в епітеліоцитах, вочевидь, відбувається гуперпродукція та гіперекспресія цього маркера. Слід відмітити ідентичність гранулярного матеріалу, який дає має позитивну реакцію на TLR9 як в ядрах і цитоплазмі епітеліоцитів, так і в запальних клітинах, які контактують з ними, чи знаходяться поблизу в сосочках дерми. В зонах перичелюлярного набряку епітеліального пласта TLR9-позитивні гранули виявляються не тільки в клітинах, але й перичелюлярному просторі.

Частина TLR9-позитивного матеріалу переміщується з епітеліального пласта в лімфатичні дренажі, цитоплазму

фагоцитуючих клітин, котрі зворотно мігрують в дерму, де і активують запальні реакції. При активації псоріатичного процесу спостерігається масивна міграція макрофагів в базальні відділи епідермісу і контакти цих клітин з TLR9-позитивними епітеліоцитами. Крім того в периваскулярних просторах сосочкового шару дерми виявляється певна кількість TLR9-позитивного гранулярного матеріалу, котрий розташовується позаклітинно, особливо в ділянках верхівок сосочків (рис. 9).

Можна допустити, що гіперпродукція цього епітопу в епідермісі супроводжується поступанням його в дерму через лімфатичні колектори або в складі фагоцитів.

В інтактній шкірі після проведеного лікування дещо зменшується інтенсивність імуногістохімічної реакції на TLR2. В ядрах епітеліоцитів експресія цього маркера відмічається у вигляді дрібно гранулярного забарвлення частини епітеліоцитів, розташованих переважно в базальних відділах епідермісу. Відмічається також неспецифічне цитоплазматичне дрібногранулярне забарвлення (переважно перинуклеарне) (рис. 10). Кератиновий шар епідермісу не зазнає тинкторіальних змін.

В дермі позитивна експресія аналогічна інтактній шкірі до лікування: забарвлюються ендотеліоцити кровоносних судин і поодинокі клітини легкого запального інфільтрату.

Після проведеного курсу системної імуносупресивної терапії в шкірі значно зменшується інтенсивність і розповсюдженість імуногістохімічної реакції на TLR4. Легка позитивна ядерна експресія спостерігається тільки в поодиноких клітинах епідерміса, в основному, в базальних ділянках (рис. 11). При цьому в ядрі спостерігається не суцільне а дрібногранулярне забарвлення. Позитивно забарвлюється і кератиновий шар епідермісу. Неспецифічне цитоплазматичне (навколоядерне) забарвлення відмічається в більшості епітеліоцитів епідермісу, що локалізуються ближче до базальної мембрани.

В дермі внаслідок зменшення кількості запальних клітин експресія TLR4 спостерігається тільки в поодиноких макрофагах, а також в ендотелії кровоносних судин.

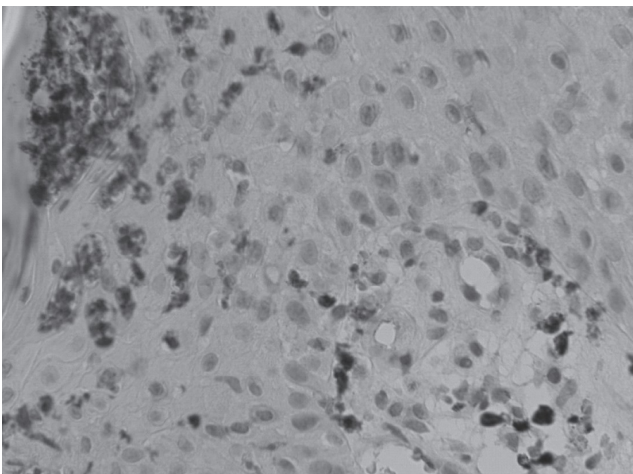


Рис. 8. Ділянка шкірної псоріатичної висипки хворого на псоріаз до проведення курсу системної імуносупресивної терапії. TLR9-позитивні гранулоцити та макрофаги в ділянках наявності мікроабсцесів Мунро. Імуногістохімічна реакція на виявлення TLR9. X400.

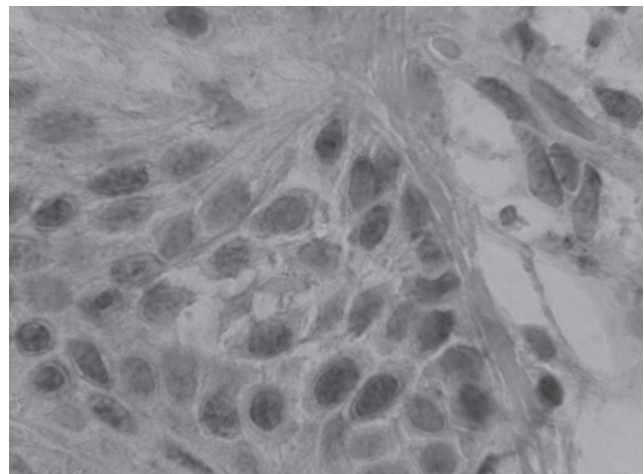


Рис. 9. Ділянка шкірної псоріатичної висипки хворого на псоріаз до проведення курсу системної імуносупресивної терапії. Наявність гранулярного TLR9-позитивного субстрату в міжклітинному просторі епідермісу. Імуногістохімічна реакція на виявлення TLR9. X1000.

Проведені імуногістохімічні реакції на виявлення експресії TLR2 та TLR4, дозволило встановити, що після проведеного лікування в епідермісі значно знижується як кількість позитивно забарвлених клітин, так і інтенсивність реакції. Кількість клітин, що експресують TLR4 в епідермісі складає близько 60%. Найбільш чітко реакція виражена в дендритних клітинах, що мають значні розміри. Після проведеного лікування в епідермісі з'являються ділянки, де практично відсутня експресія TLR4. Очевидно, в цих зонах знаходиться незначна кількість дендритних клітин.

Таким чином, прослідковується значна роль дендритних клітин в адсорбції лігандів мікроорганізмів і активації толл-подібних рецепторів. Гістотопографічно відростки дендритних клітин досягають поверхневих шарів епідермісу, де під зроговілим шаром виявляються гранулярні позитивно забарвлені скупчення, вочевидь мікроорганізмів.

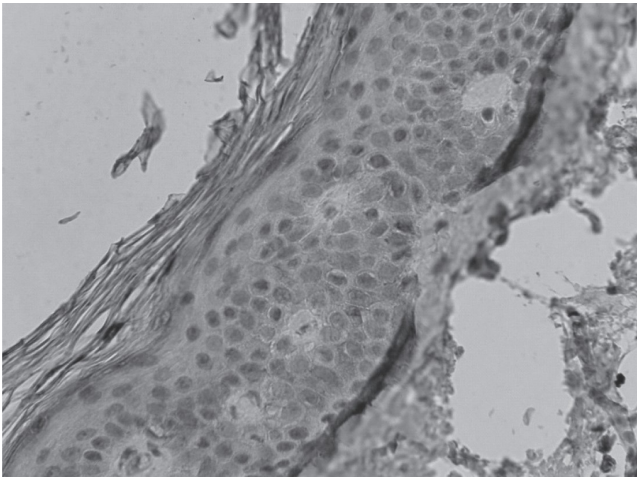
Субепідермально виявляються позитивно забарвлені макрофаги. Аналогічні особливості експресії клітинами

епідермісу TLR2. Кількість позитивно забарвлених епітеліоцитів складає близько 50%. Характерна мембранна експресія виявляється тільки в дендритних клітинах і в макрофагах, що розташовуються безпосередньо під базальним шаром.

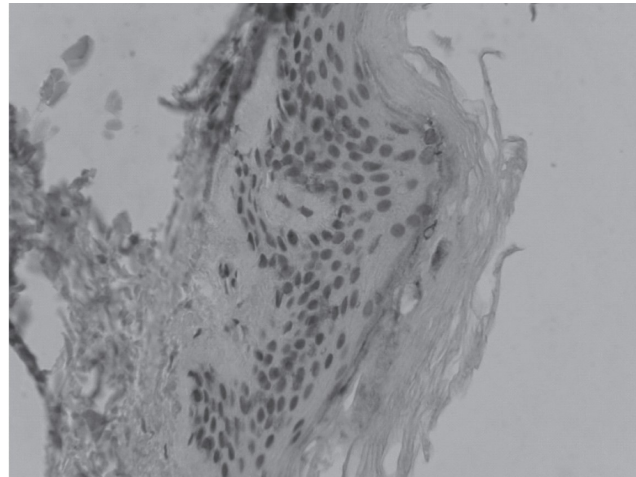
Після проведеного лікування в епідермісі інтактної шкіри значно зменшується кількість TLR9-позитивних клітин. Топографічно спостерігається переважна їх локалізація в базальних відділах.

Поверхневі шари епідермісу, як і у групі порівняння у хворих без псоріазу, містять тільки поодинокі клітини, що мають слабе позитивне забарвлення. Також в шкірі зустрічаються ділянки, в яких відсутні ознаки набряку і де реакція на TLR9 є негативною (рис. 12).

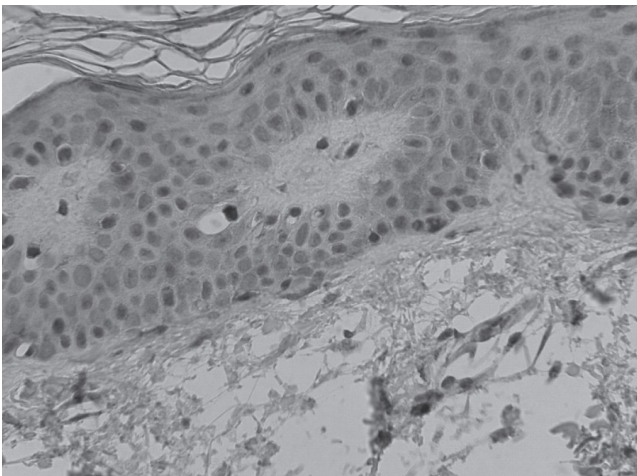
Поодинокі TLR9-позитивні клітини виявляються в дермі в дрібних скупченнях запальних клітин. Знову таки ж субстратом позитивної реакції є дрібні гранули з легким і помірним зафарбуванням як в ядрі, так і в цитоплазмі позитивних клітин.



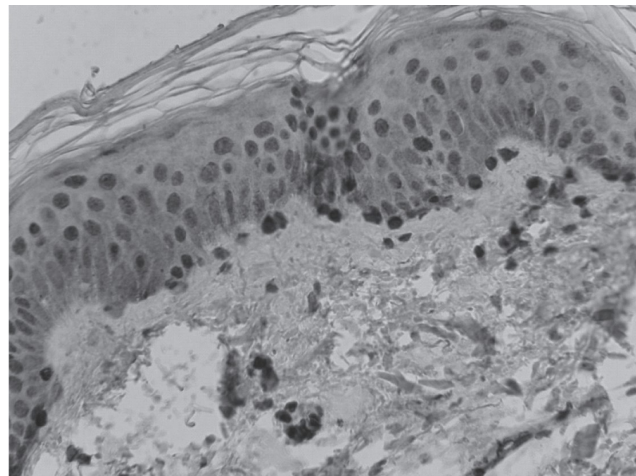
*Рис. 10. Інтактна шкіра хворого на псоріаз після проведення курсу системної імуносупресивної терапії. Експресія TLR2 в ядрах епітеліоцитів відмічається неспецифічне цитоплазматичне дрібногранулярне забарвлення (переважно перинуклеарне). X400*



*Рис. 12. Інтактна шкіра хворого на псоріаз після проведення курсу системної імуносупресивної терапії. Незначна експресія TLR9 в епідермісі, де відсутні ознаки набряку. Імуногістохімічна реакція на виявлення експресії TLR9. X400.*



*Рис. 11. Інтактна шкіра хворого на псоріаз після проведення курсу системної імуносупресивної терапії. Легка позитивна ядерна експресія TLR4 спостерігається тільки в поодиноких клітинах епідерміса, в основному, в базальних ділянках. X400*



*Рис. 13. Шкіра в ділянці шкірної псоріатичної висипки після проведеного лікування. TLR4-позитивні макрофаги в субепітеліальних зонах, а також навколо судин в сосочковому шарі дерми. X400.*

В шкірі хворих на псоріаз після проведеного лікування на відміну від шкіри в нормі відмічається позитивне фонове ядерне зафарбування епітеліоцитів в поверхневих шарах епідермісу.

Після проведеного лікування в дермі відмічається різке зменшення кількості запальних клітин, включаючи TLR2- та TLR4-позитивні макрофаги. Останні спостерігаються в субепітеліальних зонах, а також навколо судин в сосочковому шарі дерми (рис. 13).

Прослідковується тісний контакт TLR2-позитивних макрофагів в субепітеліальних ділянках з позитивно забарвленими дендритними клітинами епідермісу, причому в цих зонах експресія маркера спостерігається в епітеліоцитах на всю товщу шару аж до рогового шару.

Вказані структурні особливості можуть свідчити про активацію макрофагів дендритними клітинами епідермісу, котрі зв'язують і концентрують відповідні ліганди. Аналогічні зміни виявляються і при вивченні експресії TLR4. В епідермісі навіть після проведеного лікування виявляються значна кількість TLR4 – позитивних дендритних клітин, які мають значно збільшені розміри і розповсюджуються своїми відростками аж до рогового шару. Причому прослідковується досить інтенсивне фонове цитоплазматичне забарвлення цих клітин. Слід відмітити, що в рогових лусочках шкіри спостерігаються колонії мікроорганізмів. Лусочки рогової речовини у хворих на псоріаз мають рихлу пошарову структуру, що створює умови для колонізації їх значною кількістю мікроорганізмів, продукти життєдіяльності яких можуть виступати лігандами в активації толл-подібних рецепторів.

В більш глибоких шарах дерми позитивно забарвлені макрофаги визначаються периваскулярно в невеликій кількості.

В шкірі хворих після проведеного лікування визначається слабка TLR9-позитивна реакція переважно в базальному шарі епідермісу і поодинокі позитивні запальні клітини в дермі. Спостерігається більша виразність реакції в ділянках набряку епідермісу і, навпаки, в місцях

компактного розташування епітеліоцитів реакція – негативна.

Про відносність значення бактеріального компоненту в розвитку псоріатичного висипу свідчать факти виявлення значної кількості колоній мікроорганізмів під роговим шаром епідермісу шкіри у хворих після проведеного курсу лікування, в той же час запальна інфільтрація дерми і епідермісу відсутня (рис. 14).

Очевидно, бактеріальний фактор приєднується як ускладнення в разі розвитку пошкоджень епідермісу (набрякання, десквамація) у відповідь на розвиток не бактеріального запалення.

Таким чином, результати проведених імуногістохімічних досліджень біопсійного матеріалу взятого з ділянок шкіри у практично здорових людей, а також з ділянок шкіри ураженою псоріатичною висипкою та інтактній шкірі у обстежених хворих на псоріаз, до та після курсу проведення системної імуносупресивної терапії, вказують на вагоме значення експресії Толл-подібних рецепторів 2 та 4 (TLR2, TLR4) в розвитку імунного запалення в шкірі при цьому дерматозі.

#### Висновки.

1. У хворих на псоріаз встановлено наявність гіперпродукції і гіперсекреції епітеліоцитами шкіри прозапальних біологічних маркерів, зокрема TLR2, 4, 9 – позитивних клітин. При цьому відповідні TLR – позитивні клітини виявляються, як у ділянках шкіри ураженої псоріатичною висипкою, так і в ділянках інтактної шкіри. Разом з тим, кількість відповідних клітин у ділянках шкіри з псоріатичними бляшками була вищою у порівнянні з їх кількістю у ділянках інтактної шкіри.

2. TLR2-, TLR4- TLR9- позитивні макрофаги після їх активації в сосочках дерми мігрують до основи сосочків, де включаються в склад запальних інфільтратів, розташованих периваскулярно. В цих ділянках відбуваються основні взаємодії макрофагів та лімфоїдних клітин.

3. Після проведеного комплексного лікування хворих на псоріаз з залученням системної імуносупресивної терапії в ділянках шкіри ураженою псоріатичною висипкою встановлено суттєве зменшення кількості клітин (як дендритних, так і макрофагів), в яких виявляється експресія TLR2, TLR4 та TLR9. Однак продовжує існувати фонове готовність до сплеску активації толл-подібних рецепторів.

4. Встановлена у епідермісі і дермі хворих на псоріаз експресія TLR – позитивних клітин вказує, що важливою ланкою в патогенезі цього дерматозу є антигенна стимуляція імунокомпетентних клітин яка призводить до розвитку запального процесу у поверхневих шарах шкіри. Встановлені зміни імуногістохімічної експресії TLR2, 4, 9 в ділянках шкірної псоріатичної висипки у хворих на псоріаз в динаміці проведення лікування вказують на певне значення відповідного рецептора в розвитку імунного запалення в шкірі при псоріазі, а також може слугувати додатковим діагностично-прогностичним маркером характеру клінічного перебігу цього дерматозу. Крім цього, встановлені зміни експресії TLR2, 4, 9 в ділянках шкірної псоріатичної висипки розширюють уявлення з патогенезу псоріазу.

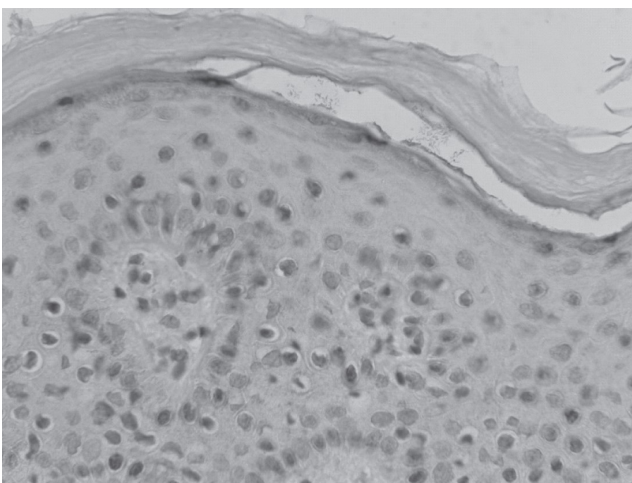


Рис. 14. Шкіра на ділянці шкірної псоріатичної висипки після лікування. Колонії мікроорганізмів під роговим шаром епідермісу при відсутності запальної інфільтрації дерми і епідермісу. Імуногістохімічна реакція для виявлення експресії TLR9. X400.

**Конфлікт інтересів.** Автор заявляє, що не має конфлікту інтересів, який може сприятися таким, що може завдати шкоди неупередженості дослідження.

**Джерела фінансування.** Ця стаття не отримала фінансової підтримки від державної, громадської або комерційної організації.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Medzhitov R. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition / R. Medzhitov, C. Janeway // *Cell*. – 1997. - № 91. – P. 295–298.
2. Hoffman J.A. Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes / J.A. Hoffman, A. Braun, M. Meister // *Proc nat Acad Sci USA*. – 1998. - № 95. – P. 14337–342.
3. Sandor F. Toll-like Receptors. I. Structure, Function and Their Ligands / F. Sandor, M. Buc // *Folia biol (Praha)*. – 2005. - № 51. – P. 148–156.
4. Medzhitov R. // *Nature*. - 1997. - № 388. – P. 394–397.
5. Rock F.L., Hardiman G., Timains J.C., Kastelein R.A., Bazan J.F. // *Proc nat Acad Sci USA*. – 1998. - № 95. – P. 588–93.

6. Zhang D. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria / D. Zhang, G. Zhang, M. S. Hayden et al // *Science*. – 2004/ - P/ 15-22.

7. James E., McInturff R., Modlin J. K. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease / E. James, R. McInturff, J. K. Modlin // *J invest Derm*. – 2005/ - № 1. – P. 1–8.

8. Akira S. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity / S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho // *Nat Immunol*. – 2001. - № 2/ - P. 675–680.

9. Curry J.L. Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin / J.L. Curry, J.Z. Qin, B. Bonish, et al // *Arch Path Lab Med*. – 2003. - № 127/ - P. 178–186.

10. Takeda K. Toll-receptors in innate immunity / K. Takeda, S. Akira // *Int Immunol*. – 2005/ - № 17. – P. 1–14.

11. Trinchieri G. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence / G. Trinchieri, A. Sher // *Nat Rev Immunol*. – 2007. - № 7: 3. – P. 179–190.

12. Medzhitov R. Toll-like receptors in innate immunity / R. Medzhitov // *New Engl J Med*. – 2000. - № 1. – P. 343–344.

13. Janeway C.A. Innate immune recognition / C.A. Janeway, R. Medzhitov // *Annu Rev Immunol*. – 2002. - № 20. – P. 197 – 2016.

14. Kopp E.B. The Toll-receptor family and control of innate immunity / E.B. Kopp, R. Medzhitov // *Curr Opin Immunol*. – 1999. - № 11. – P. 13-28.

## ЗНАЧЕНИЕ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА (ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 2, 4, 9) В ПАТОГЕНЕЗЕ ПСОРИАЗА

Степаненко Р. Л.

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

**Цель работы** – исследовать механизмы развития местного иммунного воспаления с учетом изменений иммуногистохимической экспрессии Толл-подобного рецептора 2, 4, 9 (TLR2, 4, 9) в коже при псориазе после проведенной системной иммуносупрессивной терапии.

**Материалы и методы.** Проведено иммуногистохимическое исследование биопсийного материала взятого из областей кожной псориазической сыпьке и интактной кожи у 62 больных на псориаз в динамике проведенной системной иммуносупрессивной терапии. Кроме того, для сравнения результатов иммуногистохимического исследования проведено исследование биопсийного материала кожи передней брюшной стенки у практически здоровых особ соответствующего возраста (5 пациентов), которым выполнялась операция герниопластики. Для определения характера и распространенности местных клеточных иммунных и воспалительных реакций использовались иммуногистохимические методики для выявления экспрессии маркера TLR2, 4, 9.

### Результаты и обсуждение.

При проведении иммуногистохимического исследования, с целью определения характера экспрессии TLR2, 4, 9 в коже, было определено фоновое диффузное цитоплазматическое и ядерное окрашивание клеток эпидермиса, эндотелия сосудов и единичных макрофагальных клеток. У больных псориазом на участках интактной кожи до лечения при проведении иммуногистохимического исследования на TLR2 определяются позитивная реакция с ядерными паттернами экспрессии в эпителиоцитах и дэндритных клетках базального слоя

## VALUE INNATE IMMUNITY (TOLL-LIKE RECEPTORS 2, 4, 9) IN THE PATHOGENESIS OF PSORIASIS

R. Stepanenko

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

**Purpose of the work** – to investigate the mechanisms of local immune inflammation in psoriasis, taking into account changes immunohistochemical expression of Toll-like receptor 2, 4, 9 (TLR2, 4, 9) in patients with this dermatosis before and after systemic immunosuppressive therapy.

**Materials and Methods.** Immunohistochemical research of biopsy material, taken from areas of skin psoriasis pouring out at 62 patients on psoriasis. In addition, for comparison of results of immunogistochemical research a study of biopsy material of skin of front abdominal wall is undertaken for the persons of corresponding age without psoriasis (5 patients) that was execute the operation of hernioplastick. For find character and prevalence of local cellular immune and inflammatory reactions immunohistochemical methodologies were used for the exposure of expression of marker of TLR2, 4, 9.

**Results.** While setting the immunohistochemical reaction in order to define the character for TLR2, TLR4 and TLR9 expression in the skin in the norm, we found out the diffuse cytoplasmic and nuclear coloration of epidermis cells, vessels endothelium and singular macrophage cells. The positive reaction with nuclear patterns of expression in epithelial cells and dendrite cells of epidermis basal layer was observed at patients with psoriasis in the areas of intact skin before treatment while setting the TLR2 immunohistochemical reaction. More intensive and widespread nuclear and cytoplasmic coloration of epidermis cells is observed while setting the reaction of TLR4 expression. The background diffuse cytoplasmic and nuclear coloration of epidermis cells, vessels endothelium and singular macrophage cells is



эпидермиса. При постановке реакции на определение экспрессии TLR4 определяется более интенсивное и распространённое ядерное и цитоплазматическое окрашивание клеток эпидермиса. При изучении экспрессии TLR4 в участках кожной псориатической сыпи также определяется фоновое диффузное цитоплазматическое и ядерное окрашивание клеток эпидермиса, эндотелия сосудов и единичных макрофагальных клеток. При постановке иммуногистохимической реакции с TLR2 и TLR9 определяется менее интенсивное диффузное фоновое окрашивание эпидермиса, эндотелия сосудов и части клеток в воспалительных инфильтратах дермы. После проведенного лечения в интактной коже значительно уменьшается интенсивность иммуногистохимической реакции на TLR2 и TLR4. В коже больных псориазом после проведенного лечения в отличие от кожи в норме отмечается позитивное фоновое ядерное окрашивание эпителиоцитов в поверхностных слоях эпидермиса.

В более глубоких участках дермы позитивно окрашенные макрофаги определяются периваскулярно в небольшом количестве.

**Выводы.** Выявленные изменения иммуногистохимической экспрессии TLR2, TLR4 и TLR9 в участках кожной псориатической сыпи у больных псориазом в динамике проведения лечения указывают на определённое значение соответствующего рецептора в развитии иммунного воспаления в коже при псориазе, а также может служить дополнительным диагностически-прогностическим маркером характера клинического течения этого дерматоза. Кроме этого, выявленные изменения экспрессии TLR2, TLR4 и TLR9 в участках кожной псориатической сыпи расширяют представление о патогенезе псориаза.

**Ключевые слова.** Псориаз, Толл-подобные рецепторы, системная иммуносупрессивная терапия, иммуногистохимические изменения в коже.

also observed at study of TLR4 expression in the areas of skin psoriaform. Less intensive diffuse background coloration of epidermis, vessels endothelium and some cells in inflammatory skin infiltrates is found while setting TLR2 and TLR9 immunohistochemical reaction. The intensity of TLR2 and TLR4 immunohistochemical reaction is a bit reduced after the treatment, performed in intact skin. The positive background nuclear coloration of epithelial cells in the surface layers of epidermis is observed in the skin of patients with psoriasis after performed treatment unlike the skin in the norm.

Positive painted macrophages are perivascularly found in a small quantity in deeper layers of the skin.

**Conclusions.** The changes revealed immunohistochemical expression of TLR 2, TLR4 and TLR9 plots in psoriatic skin rash in patients with psoriasis in the dynamics of treatment indicate a certain value of the corresponding receptor in the development of immune inflammation in the skin in psoriasis, and may also serve as an additional diagnostic and prognostic marker for the clinical course of the nature of the dermatosis. In addition, expression of TLR2 identified changes in the psoriatic skin rash areas expand understanding of the pathogenesis of psoriasis.

**Key words:** Psoriasis, Toll-like receptors, systemic immunosuppressive therapy, immunohistochemical changes.