

УДК 616.517-092:577.121

ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У ШКІРІ ПРИ ПСОРІАЗІ

СТЕПАНЕНКО Р.Л.

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

Псоріаз є одним з найбільш поширених дерматозів і посідає одне з провідних місць серед актуальних проблем сучасної дерматології. Розповсюдженість псоріазу в різних країнах світу коливається від 0,1 до 3% загальної популяції, а в структурі патології шкіри питома вага цього дерматозу становить 8-15% [1,2,3].

У останні десятиліття спостерігається зростання рівня захворюваності на псоріаз, в тому числі в Україні. Визначилась також тенденція «омолодження» контингенту хворих, які страждають на псоріаз, а також більш тяжкого клінічного перебігу цього дерматозу з резистентністю до ряду загальноприйнятих методів його терапії [4,6].

На сьогодні псоріаз вважається системним захворюванням організму при якому виникають функціональні і органічні зміни в ряді органів і систем, у тому числі, шлунково-кишковому тракті, гепатобіліарній системі, серцево-судинній системі та низці інших [5,6].

Не зважаючи на численні дослідження, етіологія псоріазу залишається нез'ясованою, не вирішеним є також низка питань щодо патогенезу цього дерматозу. На сьогодні можливим є виділення певних провідних чинників і механізмів розвитку псоріазу, зокрема імунологічних та генетичних [8,9].

Основними характеристиками патологічного процесу при псоріазі визнані: імунне запалення, що супроводжується активацією Т-лімфоцитів, надмірною продукцією медіаторів імунної відповіді – цитокінів (інтерферону гамма - ІФН- γ , фактора некрозу пухлин альфа – ФНО- α , ІЛ – 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 17, 18, 19, 20, 23); порушення диференціювання кератиноцитів, а також надлишковий ангиогенез та вазодилатація в дермі [7, 8, 9].

Враховуючи вищезазначене подальше поглиблене вивчення імуногістохімічних особливостей запальних процесів у морфологічних елементах шкірної псоріатичної висипки є важливим в аспекті отримання новітніх даних з патогенезу псоріазу, а також з метою удосконалення комплексної терапії цього дерматозу.

Мета роботи: Дослідити особливості запального процесу в морфологічних елементах шкірної псоріатичної висипки з залученням імуногістохімічних методів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Під нашим спостереженням було 42 хворих на розповсюджений псоріаз, прогресуюча стадія. Вік обстежених хворих коливався від 19 до 75 років.

У якості матеріалу для морфологічного дослідження слугували біоптати шкіри обстежених хворих на псоріаз. Взяття відповідного матеріалу для дослідження проводилось за умови інформованої згоди пацієнтів. Матеріал забирався інцизійним методом з ділянки псоріатичної бляшки і з ділянки інтактної шкіри (однотипно). Біопсії проводились до лікування хворих.

Застосовувались гістологічні, гістохімічні та імуногістохімічні методи дослідження.

Біопсійний матеріал (фрагменти шкіри з ділянок псоріатичних бляшок та фрагменти інтактної шкіри) фіксували в 10% нейтральному формаліні протягом доби. У подальшому матеріал проводився по спиртах і заливався в парафінові блоки, з яких готувались гістологічні зрізи товщиною 5-6 мкм. Отримані препарати зафарбовувались гематоксиліном та еозином. Компоненти сполучної тканини виявляли за допомогою комбінованої методики пікро-Малорі, запальні клітини ідентифікували за допомогою методики Гимзе, стан вуглеводного обміну визначали за допомогою PAS реакції. Для визначення характеру і розповсюдженості місцевих клітинних імунних і запальних реакцій застосовували ряд імуногістохімічних методик для визначення експресії CD4, CD8, CD20, CD56, CD68, CD289 (TLR9) та перфорину.

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 ДАКО En Vizion (+) проводили візуалізацію первинних антитіл. Гістологічні структури для проведення візуалізації імуногістохімічні препарати дофарбовували гематоксиліном 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.

У результаті імуногістохімічних реакцій виявляли CD4 - маркер Т-хелперів; CD8 - маркер Т-супресорів; CD20 - маркер В-лімфоцитів; CD56 – маркер NK –клітин; CD68 – маркер макрофагів; перфорин – маркер цитотоксичних Т-лімфоцитів; TLR9 - маркер активованих макрофагів, що містять структурні компоненти бактерій. Інтенсивність реакції 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 за загальноприйнятою методикою 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. Кількість позитивно забарвлених клітин коливалася від 0 – 100%.

Отримані гістологічні препарати вивчали з використанням мікроскопа «Olympus BX 51», цифрової камери «Olympus C 5050 Z» та програмного забезпечення «Olympus DP-Soft».

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 вважаємо статистично достовірними при рівні надійності 0,05 і вище.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Псоріатичні бляшки характеризуються наявністю запальних інфільтратів, котрі локалізуються в сосочковому шарі дерми і на межі сосочкового та сітчастого шарів дерми. В них визначається значна кількість (до 40%) CD4-позитивних клітин, що свідчить, перш за все, за присутність індукованих-Т-хелперів (Рис. 1).

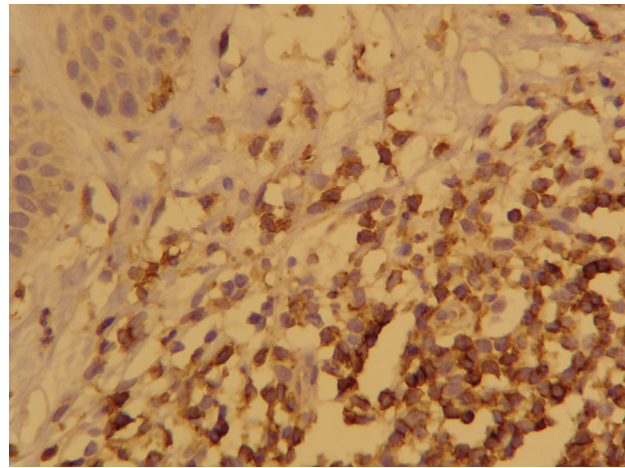


Рис. 1. Псоріатична бляшка. Значна кількість CD4-позитивних клітин в запальному інфільтраті в сосочковому шарі дерми. x400.

CD4-позитивні клітини виявляються також в сосочках, особливо в ділянках верхівок. Спостерігається безпосередня міграція CD4-позитивних клітин по сосочках до епідермісу і у зворотньому напрямку до дерми (рис. 2).

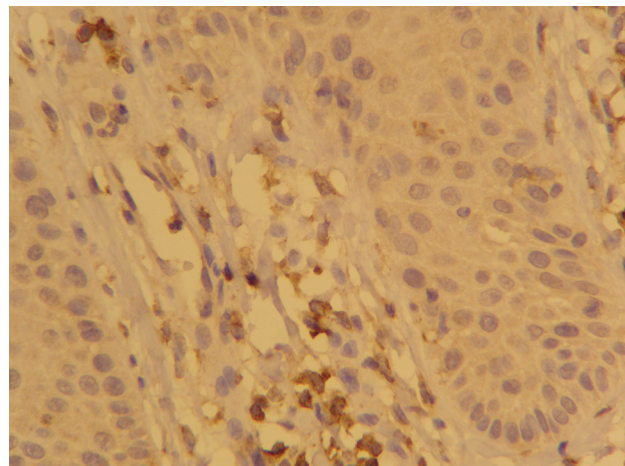


Рис. 2. Псоріатична бляшка. Міграція CD4-позитивних клітин по сосочках до епідермісу і у зворотньому напрямку до дерми. X400.

Частина CD4-позитивних клітин інфільтрує епітеліальний шар, досягаючи зроговілого шару епідермісу, де такі клітини виявляються в поодинокій кількості. В запальних інфільтратах дерми спостерігаються тісні контакти між CD4-позитивними клітинами. Основна маса CD4-позитивних клітин в цих ділянках виявляється в периваскулярних інфільтратах в основі сосочків, де вони складають до 40 % від усього пулу запальних клітин.

Основна маса CD8-позитивних клітин спостерігалась в запальних інфільтратах в основі сосочків дерми. Частка CD8-позитивних клітин в запальних інфільтратах дерми складала до 30% (рис. 3).

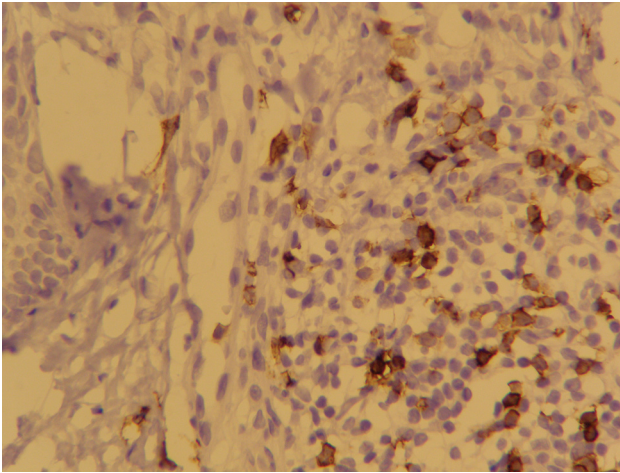


Рис. 3. Псоріатична бляшка. Значна кількість CD8-позитивних клітин в запальному інфільтраті в сосочковому шарі дерми. x400.

За умови незначного потовщення і набряку епітеліального шару кількість таких клітин в епідермісі також була незначною. Однак в ділянках набряку і пошкодження епідермісу в його товщі виявлялась досить значна інфільтрація CD8-позитивних клітин. Кількість таких клітин в верхівках сосочків є відносно більшою у порівнянні з CD4+ клітинами. Відмічено також вихід таких клітин і їх активне накопичення в епітеліальному пласті. Виявляються численні контакти активованих CD8+ клітин з епітеліоцитами і деструкція як епітелію, так і лімфоцитів (рис. 4) в цих ділянках.

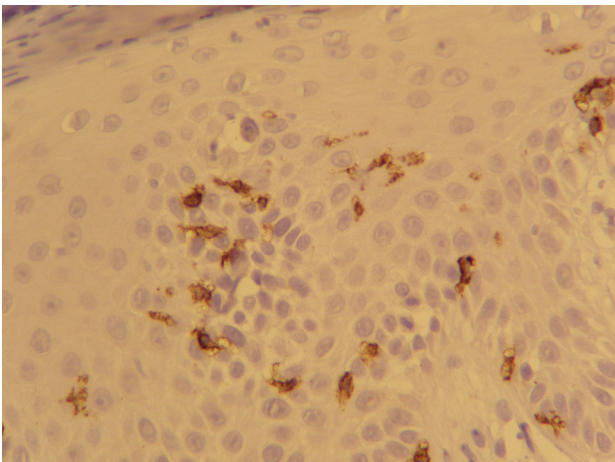


Рис. 4. Псоріатична бляшка. Контакт CD8-позитивних клітин з епітеліоцитами. X400.

Як правило, присутність CD8+ клітин зростає в суброгових ділянках, в місцях деструкції епідермісу, що супроводжується також лейкоцитарною інфільтрацією. Вочевидь, можна стверджувати про цитотоксичний ефект CD8+ клітин у відношенні до епітеліоцитів. Тісні контакти CD8+ клітин та епітеліоцитів спостерігаються переважно в ростковій зоні в ділянках верхівок сосочків і бокових їх поверхонь.

Епітеліоцити, з якими контактують CD8+ клітини, містять збільшені ядра, де виявляється одно чи кілька ядерць, навколо яких спостерігаються периядерцеві вакуолі. Вказані зміни ядер епітеліоцитів можуть свідчити за присутність в них антигенних компонентів. Ділянки активної проліферації базальних відділів епідермісу супроводжувалась вираженою локальною субепітеліальною інфільтрацією CD8-позитивних клітин.

Нечисленні CD20+ клітини виявляються переважно в запальних інфільтратах в основі сосочків. Поодинокі клітини виявляються в ділянці верхівок сосочків. Міграція в епітеліальний шар відсутня. Виявлений феномен неспецифічного зафарбування ядерць епітеліоцитів, насамперед тих, які пошкоджені і мають ознаки набряку. Цей феномен притаманний тим епітеліоцитам, які містять два-три ядерця.

При імуногістохімічному дослідженні CD56+клітини виявляються в запальних інфільтратах дерми, де їх кількість складає 1-2% від загальної кількості запальних клітин (рис. 5). В інфільтратах спостерігається утворення скопичень з 2-3 CD56+клітин. В сосочках виявляються тільки поодинокі клітини - переважно в тих ділянках, де спостерігається пошкодження епідермісу і наявні ексудативні процеси.

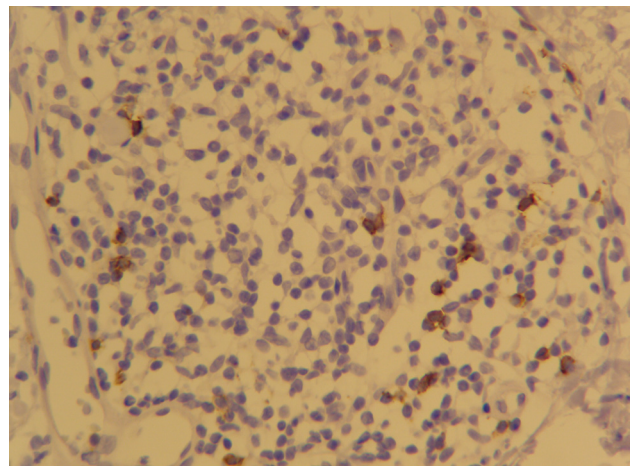


Рис. 5. Псоріатична бляшка. CD56-позитивні клітини в інфільтратах сосочкового шару дерми. x400.

Основна маса CD68+ клітини виявляються в складі запальних інфільтратів в дермі на межі сосочкового шару, а також в сосочках, особливо їх верхівках. В дермі CD68-позитивні клітини розташовуються у периваскулярних просторах і складають до 10% клітин запального інфільтрату. Локалізація цих клітин відповідає гістотопографії лімфатичних судин (рис. 6).

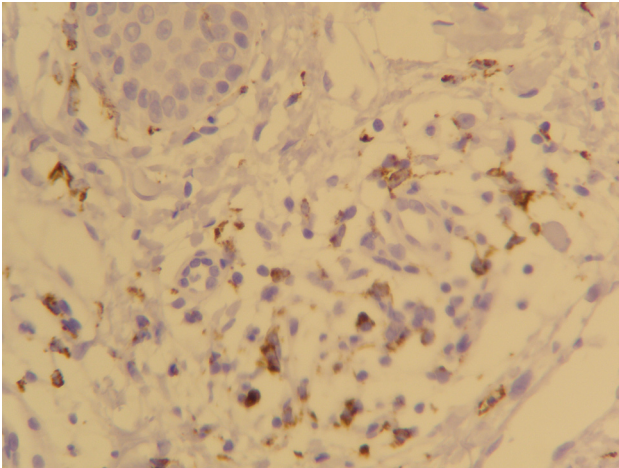


Рис. 6. Псоріатична бляшка. CD68-позитивні клітини в периваскулярних інфільтратах сосочкового шару дерми. Х400.

Прослідковується периваскулярне розташування CD68+ клітин і ознаки їх міграції із сосочків в дерму по ходу кровонесних і лімфатичних капілярів і навпаки із сосочків в епідерміс. Мігруючі CD68+ клітини мають значні розміри, неправильну форму і перевантажені гранулами (рис. 7).

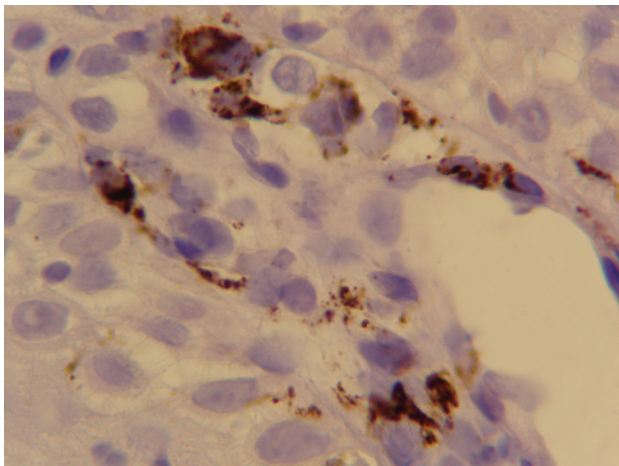


Рис. 7. Псоріатична бляшка. Мігруючі CD68-позитивні клітини в сосочках на межі з епідермісом. Х1000.

Запальні інфільтрати в дермі формуються периваскулярно. CD68+ клітини виявляються в тих ділянках, які гістотопографічно також відповідають лімфатичним судинам. В них якраз і відмічається найбільша кількість CD68+ клітин (рис. 7). В інфільтратах спостерігаються контакти CD68+ клітин з лімфоїдними елементами. В епідермісі на межі сосочків CD68+ клітини контактують з базальними епітеліоцитами, спостерігається міграція поодиноких клітин в епітеліальний шар і їх проникнення аж до поверхневих відділів епідермісу. Відмічаються контакти CD68+ клітини з епітеліоцитами (рис. 8). Однак основна кількість

CD68+ клітини знаходиться в сосочках дерми і в запальних інфільтратах основи сосочків.

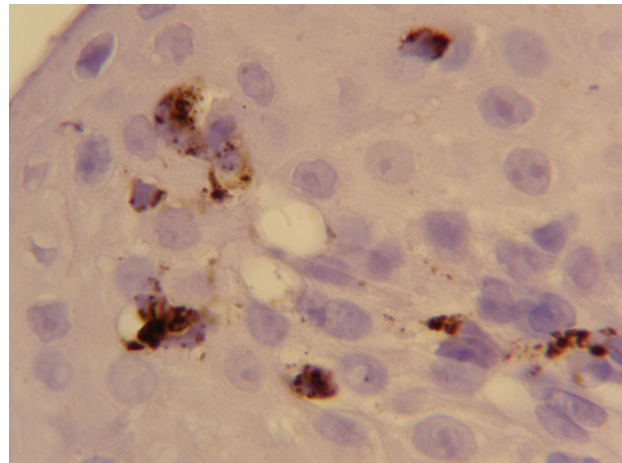


Рис. 8. Псоріатична бляшка. Контакти CD68-позитивних клітин з епідермісом. Х1000.

Перфорин-місткі лімфоцити поодинокі і виявляються у верхівках сосочків, переважно там, де спостерігається пошкодження. У цих же зонах можна виявити дегранульовані клітини. Такі клітини також можна виявити в просвіті судин дерми в ділянках формування запальних інфільтратів. Топографія перфоринмістких клітин і їх кількість дозволяє стверджувати, що ці клітини проникають в інфільтрати із просвіту судин, звідки мігрують в зону епідермісу, де можуть відбуватись цитолітичні процеси, про що свідчить контакти таких клітин з іншими і де прослідковується їх дегрануляція. Однак ми не виявили прямих контактів перфоринмістких клітин з епітеліоцитами. Контакти спостерігаються з клітинами стінок судин чи з периваскулярними клітинними елементами (рис. 9).

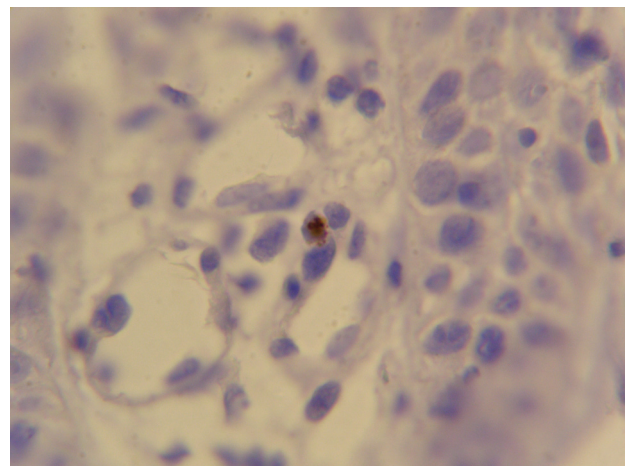


Рис. 9. Псоріатична бляшка. Перфоринмісна клітина в верхівці сосочка на межі з епідермісом. Х1000.

При імуногістохімічному виявленні експресії TLR9 спостерігається позитивна реакція ма-

крофагів, моноцитів, слабо позитивна частини лімфоїдних елементів та дендритних клітин епідермісу. Ми брали до уваги внутрішньоклітинні патерни експресії, а не тільки ядерні. При формуванні бляшок в гіперплазованих пластах епідермісу спостерігались скупчення крупних дендритних клітин, що виявляли слабо позитивну реакцію. 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. У фолікулоподібних скупченнях запальних клітин в сосочковому шарі дерми безпосередньо під епідермісом виявляється позитивна експресія TLR9 в крупних макрофагах і слабопозитивна реакція – в частині лімфоїдних клітин (рис. 10).

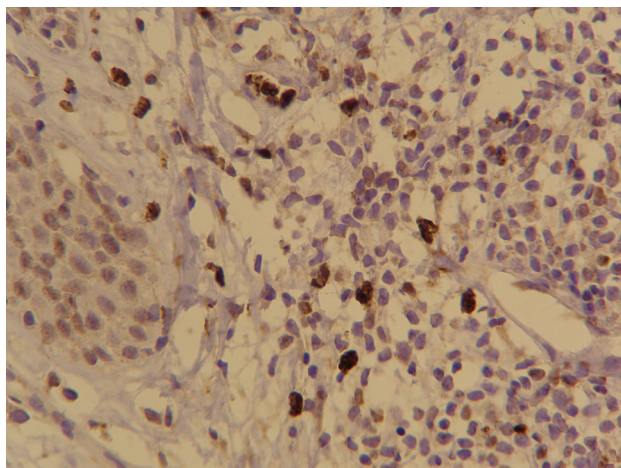


Рис. 10. Псоріатична бляшка. TLR9-позитивні клітини в запальних інфільтратах в сосочковому шарі дерми і в епідермісі. X400.

TLR9-позитивні клітини в епідермісі виявляються в ділянках набряку і значно менш представлені в місцях компактного розташування епітеліоцитів (рис. 11).

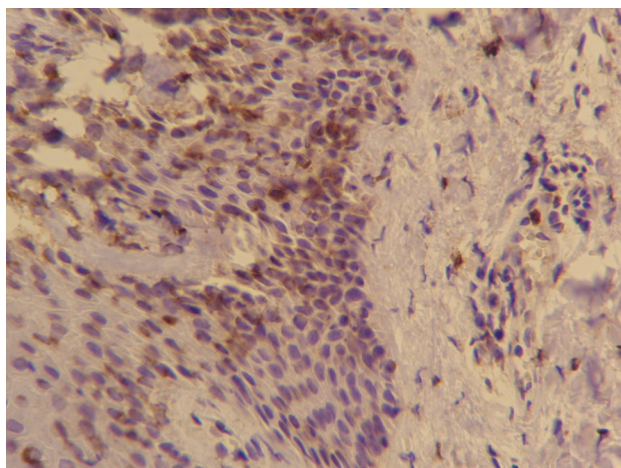


Рис. 11. Псоріатична бляшка. Значна кількість TLR9-позитивних клітин в ділянках пошкодження епідермісу. X400.

Відповідно кількість макрофагів, що виявляють експресію TLR9, зростає у сосочковому шарі дерми, яка знаходиться під бляшками. Позитивні клітини виявляються і в гіпертрофованих сосочках, які проникають в епідермальний компонент псоріатичної бляшки.

ВИСНОВКИ

1. Запальний процес в шкірі при псоріазі розвивається в результаті імунopatологічних реакцій, про що свідчить переважаєння в запальних інфільтратах імунотетентних клітин. Найбільш представленою у відповідних псоріатичних запальних інфільтратах є клітинна ланка – CD4, CD8, CD68.
2. У псоріатичних бляшках відмічено два полюси концентрації імунотетентних клітин, зокрема – в сосочках дерми на межі з епідермісом і в самому епідермісі, а також в дермі - в периваскулярних просторах в основі сосочків. Очевидно, що відповідні особливості пов'язані з місцями концентрації антигенів.
3. Виявлена міграція імунотетентних клітин, перш за все – CD4, CD8, CD68, в епітеліальний шар аж до поверхневих рогових мас. Також значна кількість CD68+ клітин мігрує по сосочках в зворотньому напрямку - від епідермісу в дерму (по ходу лімфатичних капілярів).
4. Доведено, що одним із механізмів загоєння запальних реакцій є активація імунотетентних клітин через TL – рецептори. Зокрема, виявлено значне збільшення TLR9+ клітин в ділянках пошкодження і набряку епідермісу (бляшок), що свідчить про певну роль бактеріальних антигенів в патогенезі захворювання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дерматологія, венерологія: підручник / За ред. В.І. Степаненка.- К.: КІМ, 2012.- 848 с.
2. Пальцев М.А., Потекаєв Н.Н., Казанцева І.А., Кряжева С.С. Клинико-морфологическая диагностика и принципы лечения кожных болезней. Руководство для врачей. – М: ОАО «Издательство «Медицина», 2006. - 512 с.
3. Пинсон І.Я. К вопросу о патогенезе псориаза // Российский журнал кожных и венерических болезней.- 2006.- №2.- С. 24-27.
4. Долгушин І.І., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз / Екатеринбург, 2001.- 278 с.
5. Куц Л.В. Современные аспекты патогенеза псориаза // Запорожский медицинский журнал.- 2011.- Т. 13, № 5.- С. 29-32.

6. Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, Ashcroft DM; Identification and Management of Psoriasis and Associated Comorbidity (IMPACT) project team (February 2013). «Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence». J. Invest Dermatol 133 (2): 377–85. DOI:10.1038/jid.2012.339. PMID 23014338.
7. Nockowski P., Baran W. Novel approach to psoriasis // Terapia.- 2005.- Vol. 3.- P. 20–24.
8. Ozawa M., Aiba S. Immunopathogenesis of Psoriasis // Curr Drug Targets Inflamm Allergy.- 2004.- Vol. 3.- P. 137–144.
9. Lima E.A., Lima M.A. Reviewing concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. An Bras Dermatol 2011; 86 (6): 1151 – 8.

РЕЗЮМЕ

ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ В ШКІРІ ПРИ ПСОРИАЗІ

Степаненко Р.Л.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Матеріали та методи. Проведено дослідження в 42 пацієнтів з псоріазом. Вивчали особливості запального процесу в морфологічних елементах шкірної псоріатичної висипки з використанням імуногістохімічних методів.

Результати. Запальний процес в шкірі при псоріазі розвивається в результаті імунопатологічних реакцій. Найбільш представленою є клітинна ланка - CD4, CD8, CD68.

Висновки. Одним з механізмів загострення запальних реакцій є активація імунокомпетентних клітин через Толл- лайк рецептори.

Ключові слова: псоріаз, імуногістохімічні зміни, Толл - лайк рецептори.

РЕЗЮМЕ

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КОЖЕ ПРИ ПСОРИАЗЕ

Степаненко Р.Л.

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца,

Материалы и методы. Проведено исследование в 42 пациентов с псоріазом. Изучали особенности воспалительного процесса в морфологических элементах кожной псоріатической сыпке с использованием иммуногістохіміческих методов.

Результаты. Воспалительный процесс в коже при псоріазе развивается в результате иммунопатологических реакций. Наиболее представленной является клеточное звено – CD4, CD8, CD68.

Выводы. Одним из механизмов обострения воспалительных реакций является активация иммунокомпетентных клеток через толл-лайк рецепторы.

Ключевые слова: псоріаз, иммуногістохіміческие изменения, Толл-лайк рецепторы.

SUMMARY

IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURE OF INFLAMMATORY PROCESS IN SKIN WITH PSORIASIS

R. Stepanenko

Bogomolets National Medical University, Kyiv,

Purpose of the work – to investigate specifics of inflammation process in morphological elements of psoriasis skin with the aid of immunohistochemical methods.

Materials and methods. Immunohistochemical study of biopsy material is undertaken from areas to the skin psoriasis pouring out at 42 patients on psoriasis. The row of immunohistochemical methodologies was used also for the exposure of expression of CD4, CD8, CD20, CD56, CD68, CD289 (TLR9) and perforin.

Results and discussion. Psoriatic plaques are characterized by the presence of inflammatory infiltrates. They determined a significant number (40%) CD4-positive cells, indicating that, above all, the presence of induced T-helper cells. Most of CD8-positive cells observed in inflammatory infiltrates in the papillary dermis basis. The proportion of CD8-positive cells in the inflammatory infiltrate of the dermis was 30%. A few CD20 + cells are mainly in the inflammatory infiltrates the basis papillae. Single cells are found in the area of the tops of papillae. When Immunohistochemical study CD56 + cells are inflammatory infiltrates in the dermis, where their number is 1-2% of the total number of inflammatory cells. The bulk of the CD68 + cells are composed of inflammatory infiltrate in the dermis papillary layer at the border and in the papilla, especially their tops. In the dermis CD68-positive cells are located in the perivascular spaces and up to 10% of the cells of the inflammatory infiltrate. Perforines-containing single cells and are found in the tips of papillae, preferably where there is damage. In immunohistochemical detection of the expression of TLR9 a positive response of macrophages, monocytes, weakly positive of lymphoid cells and dendritic epidermal cells. TLR9-positive cells in the epidermis are found in areas of edema and considerably less represented in areas where epithelial location.

Conclusions. An inflammatory process in a skin at psoriasis develops as a result immunopathological reactions. Most presented is a cellular link – CD4, CD8, CD68. One of mechanism of intensifying of inflammatory reactions is activating of immunocompetency cages through toll-like receptors.

Key words: psoriasis, pathogenesis, immunohistochemical changes.