

Р.Л. Степаненко

ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ РОЗВИТКУ ІМУННОГО ЗАПАЛЕННЯ В ШКІРІ ПРИ ПСОРІАЗІ

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця,
м. Київ, Україна

e-mail: rstepanenko_md@mail.ru

Резюме: При проведенні імуногістохімічного дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянок шкіри у практично здорових людей, з метою виявлення характеру експресії *TLR2* в шкірі, було виявлено фонове дифузне цитоплазматичне і ядерне зафарбування клітин епідермісу, ендотелію судин і поодиноких макрофагальних клітин. При проведенні імуногістохімічної реакції з *TLR2* у біопсійному матеріалі, взятому у хворих на псоріаз із ділянок шкірної псоріатичної висипки, виявлялось інтенсивне дифузне фонове зафарбування епідермісу, ендотелію судин і частини клітин у запальних інфільтратах дерми. Кількість клітин епідермісу, що виявляли позитивне фонове забарвлення, становила близько 80%. Активовані макрофаги збільшуються в розмірах, активно експресують *TLR2* рецептори. Відповідні активовані макрофаги мігрують до основи сосочків, де включаються до складу запальних інфільтратів, розташованих периваскулярно. Результати проведених імуногістохімічних реакцій на виявлення експресії *TLR2* у ділянках шкірної псоріатичної висипки хворих на псоріаз після проведення системної імуносупресивної терапії вказували, що в епідермісі значно знижувалась кількість позитивно забарвлених клітин та інтенсивність реакції. В дермі спостерігалось суттєве зменшення кількості запальних клітин, у т.ч. *TLR2*- позитивних макрофагів, які розміщувались у субепітеліальних зонах, а також навколо судин у сосочковому шарі дерми. Встановлені зміни імуногістохімічної експресії *TLR2* в ділянках шкірної псоріатичної висипки у хворих на псоріаз у динаміці проведення лікування вказують на певне значення відповідного рецептора в розвитку імуного запалення в шкірі при псоріазі, а також може слугувати додатковим діагностично-прогностичним маркером характеру клінічного перебігу цього дерматозу. Крім цього, встановлені зміни експресії *TLR2* в ділянках шкірної псоріатичної висипки розширюють уявлення з патогенезу псоріазу.

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

Вступ. Перший рецептор *toll* сімейства був виявлений у плодової мушки *Drosophila melanogaster* у 1992 р.¹⁴ як компонент, що бере участь в ембріональному розвитку дрозофіл^{1,2}. Пізніше було встановлено, що *toll*-рецептор приймає участь в імунній відповіді у дорослих мух¹¹. 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 (*TLRs*)^{5,6,17}. В організмі людини більшість *TLRs* експресуються макрофагами, моноцитами, нейтрофілами, також існують дані про наявність їх на епітеліоцитах кишківника, ендотелію судин, кератиноцитах шкіри^{7,11,14}. Стимуляція *TLRs* сприяє утворенню тимчасової сигнальної багатокомпонентної структури, яка спонукає геном клітини до вироблення цитокінів, молекул адгезії та коstimуючих молекул, регулюючих активацію адаптивного імунітету^{3,4}.

Вивчення ролі та функції *TLRs* у шкірі людини проводяться порівняно недавно. Низка

авторів вважає, що *TLRs* активованих кератиноцитів здатні моделювати адаптивну імунну відповідь^{1,13}. У деяких дослідженнях встановлено, що *TLR*-стимульовані кератиноцити супернатанта здатні викликати дозрівання дендритних клітин^{9,12,18}. Активація *TLRs* була виявлена при деяких захворюваннях шкіри інфекційної етіології.

Основними характеристиками патологічного процесу при псоріазі визнані: імунне запалення, що супроводжується активацією *T*-лімфоцитів, надмірною продукцією медіаторів імунної відповіді – цитокінів (ІФН- γ , ФНП- α , ІЛ-1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 17, 18, 19, 20, 22, 23), порушення диференціювання кератиноцитів, а також надлишковий ангіогенез та вазодилатація в дермі. Патологічний процес також характеризується присутністю аутоімунної компоненти та наявністю неадекватної активації клітинної ланки імунітету, що викликає тотальний процес із *Th-1* цитокіновим профілем, наявний гама-інтерферон у цитоплазмі, що стимулює міграцію макрофагів із вогнища запалення^{9,10,15,16,19}.

Враховуючи вищезазначене, вивчення експресії *TLRs* клітинами шкіри є важливим для поглибленого розуміння механізму розвитку імунного запалення в шкірі хворих на псоріаз.

Мета дослідження – дослідити механізми розвитку місцевого імунного запалення при псоріазі з урахуванням змін імуногістохімічної експресії toll-подібного рецептора 2 (*TLR2*) в шкірі хворих на цей дерматоз до та після проведення системної імуносупресивної терапії.

Матеріали та методи дослідження. Під нашим спостереженням перебувало 62 хворих на псоріаз вульгарний з прогресуючою стадією, середньоважким або важким ступенем важкості клінічного перебігу дерматозу. У хворих на псоріаз проводили біопсійне дослідження шкіри, зокрема з ділянок шкіри, ураженої псоріатичною висипкою до лікування та після проведення системної імуносупресивної терапії лікарським засобом (ЛЗ) етанарцепт протягом 3-х місяців. Біопсійний матеріал забирався у одних і тих же хворих із аналогічних ділянок. Окрім 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.

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

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).

Результати дослідження та їх обговорення. При проведенні імуногістохімічного дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянок шкіри у практично здорових людей з метою виявлення характеру експресії *TLR2* в шкірі, було виявлено фонове дифузне цитоплазматичне і ядерне зафарбування клітин епідермісу, ендотелію судин і поодинокі макрофагальних клітин. Характерні мем-

бранні патерни експресії цих маркерів спостерігались у дендритних клітинах епідермісу, опасистих клітинах, розташованих периваскулярно та в макрофагах (рис. 1). Прослідковувалось більш інтенсивне зафарбування в епідермісі в напрямку від поверхневих шарів до базального шару.

При проведенні імуногістохімічної реакції з *TLR2* у біопсійному матеріалі, взятому у хворих на псоріаз із ділянок шкірної псоріатичної висипки, виявляється інтенсивне дифузне фонове зафарбування епідермісу, ендотелію судин і частини клітин у запальних інфільтратах дерми. Кількість клітин епідермісу, що виявляють позитивне фонове забарвлення, становила близько 80%. Потрібно також відзначити феномен позитивного мембранного зафарбування ядер епітеліоцитів, розташованих безпосередньо під зроговілим шаром епідермісу.

Морфологічно виявлялась ідентичність локалізації продуктів імуногістохімічної реакції в дендритних клітинах епідермісу і в макрофагах сосочків дерми, що безпосередньо контактують з епітеліоцитами (рис. 2).

Топографічно прослідковується локалізація макрофагів у лімфатичних судинах, що відтікають у напрямку від верхівки сосочків до їх основи, де містяться скупчення судин. Морфологічно спостерігається значне витончення епідермісу над верхівками сосочків, аж до безпосереднього ерозування. Епітеліальний пласт, що оточує сосочок, особливо в зонах верхівок, є набряклим із 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* 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.

При проведенні імуногістохімічної реакції на виявлення експресії *TLR2*, після проведення обстеженим хворим на псоріаз системної імуносупресивної терапії було встановлено, що в епідермісі значно знижується як кількість позитивно забарвлених клітин, так й інтенсивність реакції.

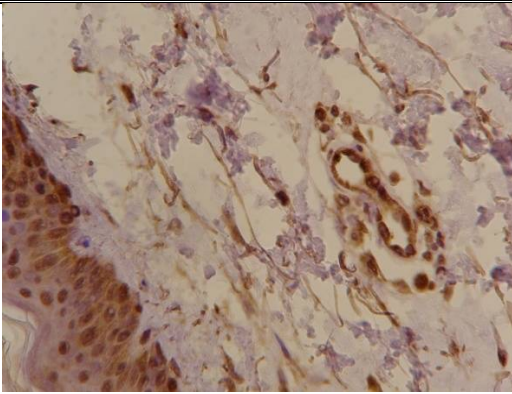


Рис. 1. Імуногістохімічне дослідження ділянки шкіри практично здорових людей. Експресія *TLR2* в макрофагах, дендритних клітинах епідермісу та ендотелії судин. X400.

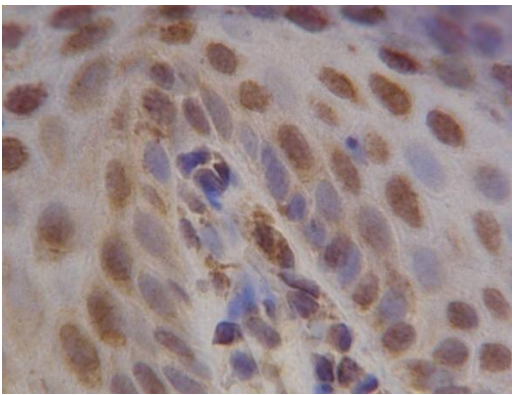


Рис. 2. Імуногістохімічне дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянки шкіри, ураженої псоріатичною висипкою. Експресія *TLR2* в макрофагах, дендритних клітинах епідермісу. X1000.

Таким чином, прослідковується значна роль дендритних клітин в адсорбції лігандів мікроорганізмів і активації *toll*-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 (рис. 3).

Було також встановлено, що кількість позитивно забарвлених *TLR2* епітеліоцитів епідермісу становила близько 50%. Характерна мембранна експресія виявляється тільки в дендритних клітинах і в макрофагах, що розташовуються безпосередньо під базальним шаром (рис. 4).

У шкірі хворих на псоріаз після проведення курсу системної супресивної терапії, на відміну від шкіри практично здорових людей, зазначається позитивне фонове ядерне

забарвлення епітеліоцитів у поверхневих шарах епідермісу

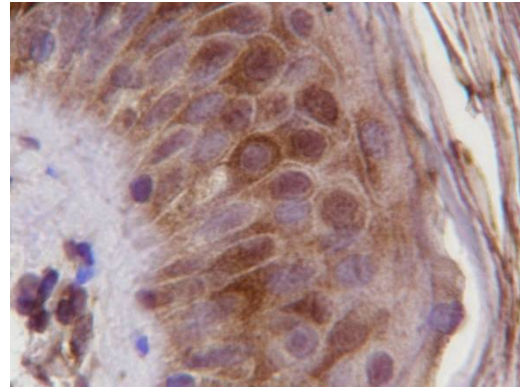


Рис. 3. Імуногістохімічне дослідження ділянки шкіри, ураженої псоріатичною висипкою, після проведення курсу системної супресивної терапії. Субепідермально виявляються позитивно забарвлені макрофаги. X1000.

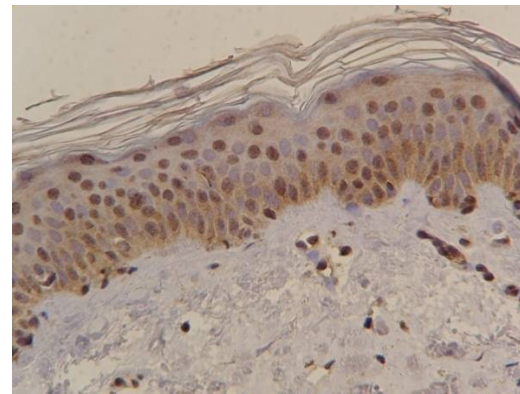


Рис. 4. Імуногістохімічне дослідження ділянки шкіри, ураженої псоріатичною висипкою, після проведення курсу системної супресивної терапії. Позитивна експресія *TLR2* в нечисленних макрофагах дерми. X400.

Після проведеного курсу лікування в дермі виявляється суттєве зменшення кількості запальних клітин, включаючи *TLR2*-позитивні макрофаги. Останні розміщуються в субепітеліальних зонах, а також навколо судин у сосочковому шарі дерми.

Прослідковується також тісний контакт *TLR2*-позитивних макрофагів у субепітеліальних ділянках із позитивно забарвленими дендритними клітинами епідермісу (рис. 5). При цьому, у відповідних зонах експресія маркера спостерігається в епітеліоцитах на всю товщу епідермісу, включаючи роговий шар.

Виявлені структурні особливості свідчать про активацію макрофагів дендритними клітинами епідермісу, які зв'язують і концент-

рують відповідні ліганди. Прослідковується досить інтенсивне фонове цитоплазматичне забарвлення цих клітин.

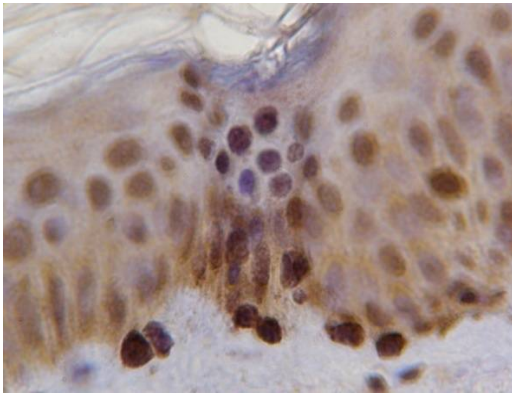


Рис. 5. Імуногістохімічне дослідження ділянки шкірної псоріатичної висипки після проведення курсу системної супресивної терапії. Взаємодія *TLR2*-позитивних макрофагів у субепітеліальних ділянках із позитивно забарвленими дендритними клітинами епідермісу. X1000.

Потрібно також зазначити, що в рогових лусочках шкіри спостерігаються колонії мікроорганізмів (рис. 6). Лусочки рогової речовини у хворих на псоріаз мають рихлу шарову структуру, що створює умови для колонізації їх значною кількістю мікроорганізмів, продукти життєдіяльності яких можуть виступати лігандами в активації *toll*-подібних рецепторів. У більш глибоких шарах дерми

позитивно забарвлені макрофаги визначаються периваскулярно в невеликій кількості.

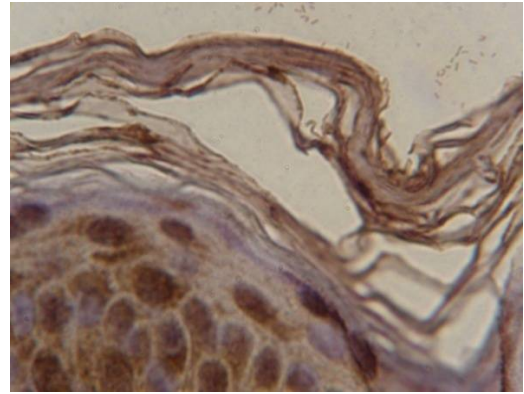


Рис. 6. Імуногістохімічне дослідження ділянки шкірної псоріатичної висипки після проведення курсу системної супресивної терапії. Наявність колонії мікроорганізмів в рогових лусочках шкіри. X1000.

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

Висновки:

1. При проведенні імуногістохімічних досліджень біоптатів, взятих у хворих на псоріаз, із ділянок шкіри, уражених псоріатичною висипкою, встановлено, що ліганди які активують *toll*-подібні рецептори макрофагів і подальшу запальну реакцію, концентруються у дендритних клітинах епідермісу. Виявлено тісний контакт макрофагів із дендритними клітинами епідермісу.
2. Встановлено, що в ділянках шкіри, уражених псоріатичною висипкою, *TLR2*-позитивні макрофаги після їх активації в сосочках дерми мігрують до основи сосочків та включаються до складу запальних інфільтратів, розташованих периваскулярно. У відповідних ділянках відбуваються основні взаємодії макрофагів та лімфоїдних клітин.
3. У біоптатах, взятих із ділянок шкірної псоріатичної висипки, після проведення хворим курсу системної імуносупресивної терапії встановлено зменшення кількості дендритних клітин та макрофагів, у яких виявляється експресія *TLR2*.
4. Встановлені зміни імуногістохімічної експресії *TLR2* в ділянках шкірної висипки у хворих на псоріаз у 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* в ділянках шкірної псоріатичної висипки розширюють уявлення з патогенезу псоріазу.

Література:

1. *Меджитов Р.* Врожденный иммунитет / *Р. Меджитов, Ч. Джаневей* // Казанский мед. журн. – 2004. - № 85 (3). – С. 161-167.
2. *Толстомятова М.А.* Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии инфекционной патологии у новорожденных детей / *М.А. Толстомятова, Г.А. Буслаева, И.Г. Козлов* // Педиатрия. – 2009. - № 87. – С. 115-120.
3. *Хаитов Р.М.* Иммунология. Норма и патология. / *Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатъева, И.Г. Сидорович* // М.: Медицина. – 2010. – С. 111-164.
4. *Ярилина А.А.* Иммунные процессы в коже / *А.А. Ярилина* // Косметика и медицина. – 2006. - № 1. – С. 30-41.
5. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. / *F.L. Rock, G. Hardiman, J.C. Timains* [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1998. - №95. – P.588-593.
6. A human homologue of *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity / *R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C.A. Jr. Janeway* // Nature. – 1997. – №388. – P.394-397.
7. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria / *D. Zhang, G. Zhang, M.S. Hayden* [et al.] // Science. – 2004. – Vol. 303. – P.1522-1526.
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. *Asadullah K.* Cytokines: interleukin and interferon therapy in dermatology / *K. Asadullah, W. Sterry, U. Trefzer* // Clin. Exp. Dermatol. – 2002. – Vol. 27. – P. 578-584.
10. Elevated tumor necrosis factor-alpha (TNF) biological activity in psoriatic skin lesions / *P. Ettehadi, M. Greaves, D. Wallach* [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 1994. – Vol. 96. – P.146-151.
11. *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. 14337-14342.
12. 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.
13. *James E.* 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.
14. *Medzhitov R.* Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition / *R. Medzhitov, C. Janeway* // Cell. – 1997. – № 91. – P. 295-298.
15. *Nockowski P.* Novel approach to psoriasis / *P. Nockowski, W. Baran* // Terapia. – 2005. – Vol. 3. – P.20-24.
16. *Ozawa M.* Immunopathogenesis of Psoriasis / *M. Ozawa, S. Aiba* // Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy. – 2004. – Vol. 3. – P. 137-144.
17. *Sandor F.* Toll-like Receptors. I. Structure, Function and Their Ligands / *F. Sandor, M. Buc* // Folia boil. (Praha). – 2005. – №51. – P.148-156.
18. *Takeda K.* Toll-receptors in innate immunity / *K. Takeda, S. Akira* // Int. Immunol. – 2005. – №17. – P.1-14.
19. T-cell activation is potentiated by cytokines released by lesional psoriatic, but not normal, epidermis / *E. Chan, C. Hammerberg, G. Fisher* [et al.] // Arch. Dermatol. – 1992. – Vol. 128. – P. 1479-1485.

УДК 616.517-092:577.121

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАЗВИТИЯ ИММУНОГО ВОСПАЛЕНИЯ В КОЖЕ ПРИ ПСОРИАЗЕ

Р.Л. Степаненко

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

Резюме: При проведении иммуногистохимического исследования биопсийного материала, взятого с участков кожи у практически здоровых людей, с целью определения характера экспрессии *TLR2* в коже, было определено фоновое диффузное цитоплазматическое и ядерное окрашивание клеток эпидермиса, эндотелия сосудов и единичных макрофагальных клеток. При проведении иммуногистохимической реакции с *TLR2* в биопсийном материале, взятом у больных псориазом с участков кожной псориатической сыпи, выявлялось интенсивное диффузное фоновое окрашивание эпидермиса, эндотелия сосудов и части клеток в воспалительных инфильтратах дермы. Количество клеток эпидермиса, что имело позитивное фоновое окрашивание составляла около 80%. Активированные макрофаги увеличиваются в размерах, активно экспрессируют *TLR2* рецепторы. Соответствующие активированные макрофаги мигрируют к основанию сосочков, где включаются в состав воспалительных инфильтратов, которые локализируются периваскулярно. Результаты проведенных иммуногистохимических реакций на определение экспрессии *TLR2* в участках кожной псориатической сыпи больных псориазом после проведения системной иммуносупрессивной терапии указывало, что в эпидермисе значительно снижалось количество позитивно окрашенных клеток и интенсивность реакции. В дерме отмечалось существенное уменьшение количества воспалительных клеток, в т.ч. *TLR2*-позитивных макрофагов, которые локализируются в субэпидермальных зонах, а также вокруг сосудов в сосочковом слое дермы. Выявленные изменения иммуногистохимической экспрессии *TLR2* в участках кожной псориатической сыпи у больных псориазом в динамике проведения лечения указывают на определенное значение соответствующего рецептора в развитии иммунного воспаления в коже при псориазе, а также может служить дополнительным диагностически-прогностическим маркером

ISSN 2070-3112

«Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація»

2015, №3-4

характера клинического протекания этого дерматоза. Кроме этого, выявленные изменения экспрессии *TLR2* в участках кожной псориатической сыпи расширяют представление о патогенезе псориаза.

Ключевые слова: псориаз, *toll*-подобные рецепторы, системная иммуносупрессивная терапия, иммуногистохимические изменения в коже.

UDC 616.517-092:577.121

INVESTIGATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS OF IMMUNE SKIN INFLAMMATION IN PSORIASIS

R.L. Stepanenko

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Summary: Immunohistochemical study of biopsy material taken from healthy individuals for determining the *TLR2* expression pattern in the skin revealed background diffuse cytoplasmic and nuclear staining of epidermal cells, vascular endothelial and macrophage cell units. Intense diffuse background staining of the epidermis and vascular endothelial cells of the inflammatory infiltrates in the dermis was detected during the immunohistochemical reaction with *TLR2* in biopsies taken from psoriatic patients. The number of epidermis cells with positive background staining was about 80%. Activated macrophages increased in size and expressed *TLR2* receptors actively. Corresponding activated macrophages migrated to the bottom of the papillae where they were included in inflammatory infiltrates localized perivascularly. The results of performed immunohistological reactions for determining *TLR2* expression in areas of psoriatic skin rash in patients with psoriasis after systemic immunosuppressive therapy indicated significant decrease in positively stained cells of the epidermis and the intensity of the reaction. The dermis showed a significant decrease in inflammatory cells, including *TLR2*-positive macrophages localized in the subepidermal zone, as well as around the blood vessels in the papillary dermis.

The determined changes of immunohistochemical *TLR 2* expression in psoriatic skin rash in patients with psoriasis in the treatment dynamics indicated certain value of the corresponding receptor in developing immune inflammation in psoriatic skin, and may also serve as an additional diagnostic and prognostic marker for the clinical course of dermatosis. In addition, identified changes of *TLR2* expression in psoriatic skin rash areas may clarify the pathogenesis of psoriasis.

Keywords: psoriasis, toll-like receptors, systemic immunosuppressive therapy, immunohistochemical changes.

Надійшла до редакції 17.01.2016 р.