

УДК 616.517-092:577.121

РОЛЬ ТОЛЛ-ПОДІБНОГО РЕЦЕПТОРА 4 (TLR4) В РОЗВИТКУ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ У ШКІРІ ПРИ ПСОРИАЗІ

Р.Л. Степаненко

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

РОЛЬ ТОЛЛ-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 4 (TLR4) В РАЗВИТИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В КОЖЕ ПРИ ПСОРИАЗЕ

Р.Л. Степаненко

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца

ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4 (TLR4) IN THE DEVELOPMENT OF INFLAMMATORY PROCESS IN SKIN OF PSORIASIS PATIENTS

R.L. Stepanenko

O.O. Bohomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Резюме. Мета роботи – дослідити механізми розвитку місцевого імунного запалення з урахуванням змін імуністохімічної експресії Толл-подібного рецептора 4 (TLR4) у шкірі хворих на псоріаз після проведення системної імуносупресивної терапії.

Матеріали та методи. Проведено імуногістохімічне дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянок шкірної псоріатичної висипки у 62 хворих на псоріаз в динаміці проведення системної імуносупресивної терапії. Крім того, для порівняння результатів відповідних імуногістохімічних досліджень проведено вивчення біопсійного матеріалу з шкіри передньої черевної стінки у практично здорових осіб відповідного віку (5 пацієнтів), взятого після оперативного втручання, зокрема, герніопластики. Для визначення характеру і розповсюдженості місцевих клітинних імунних і запальних реакцій у шкірі хворих на псоріаз застосовували імуногістохімічні методики з визначенням експресії маркера TLR4.

Результати та їх обговорення.

При вивченні експресії TLR4 в ділянках шкірної псоріатичної висипки виявляли фонове дифузне цитоплазматичне і ядерне зафарбування клітин епідермісу, ендотелію судин і поодиноких макрофагальних клітин. Кількість клітин епідермісу, що позитивно зафарбовувались, становила близько 80%. Після проведення курсу системної супресивної терапії препаратом Етанарцепт протягом 3-х місяців імуногістохімічна реакція на виявлення експресії TLR4 дозволило встановити, що в епідермісі значно знижується як кількість позитивно забарвлених клітин, так й інтенсивність реакції. Кількість клітин, що експресують TLR4 в епідермісі складає до 60%. 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.

Висновки.

Вірогідно, що ліганди, котрі активують толл-подібні рецептори макрофагів і наступну запальну реакцію, концентруються в дендритних клітинах епідермісу, про що свідчать результати проведених імуногістохімічних реакцій. TLR4- позитивні макрофаги після їх активації в сосочках дерми мігрують до основи сосочків, де включаються у склад запальних інфільтратів, розташованих периваскулярно. Після проведеного лікування в шкірі значно зменшується кількість клітин (як дендритних, так і макрофагів), в яких виявляється експресія TLR4. Однак продовжує існувати фонове готовність до сплеску активації толл-подібних рецепторів.

Ключові слова. Псоріаз, Толл-подібні рецептори, системна імуносупресивна терапія, імуногістохімічні зміни в шкірі.

Резюме. Цель работы – исследовать механизм развития иммунного воспаления с учетом изменения иммуногистохимической экспрессии Толл-подобного рецептора 4 (TLR4) в коже при псориазе после проведенной системной иммуносупресивной терапии.

Материалы и методы. Проведено иммуногистохимическое исследование биопсийного материала, взятого из участков каждой псориагической сыпьки у 62 больных на псориаз в динамике проведенной системной иммуносупресивной 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 распространённости местных клеточных иммунных и воспалительных реакций использовались иммуногистохимические методики для выявления экспрессии маркера TLR4.

Результаты и их обсуждение.

При изучении экспрессии TLR4 в участках каждой псориагической сыпьке определяется фоновое диффузное цитоплазматическое и ядерное окрашивание клеток эпидермиса, эндотелия сосудов и одиночных макрофагальных клеток. Количество клеток эпидермиса, что позитивно окрашиваются, составляет около 80%. После проведения курса системной супресивной терапии препаратом Етанарцепт

на протяженні 3-х місяців іммуногістохімічна реакція на виявлення експресії TLR4 дозволило установити, що в епідермісе значительно знижується як кількість позитивно окрашених кліток, так і інтенсивність реакції. Кількість кліток, що експресують TLR4 в епідермісе, становить около 60%. В епідермісе даже после проведеного лічення виявляється значительное количество TLR4 – позитивних дендритних кліток, которые имеют значительное увеличенные размеры и распространяются своими отростками до рогового слоя.

Выводы.

Вероятно, что легенды, которые активируют толл-подобные рецепторы макрофагов и дальнейшую воспалительную реакцию, концентрируются в дендритных клетках эпидермиса, о чем свидетельствуют результаты проведённых иммуногістохімічних реакцій. TLR4- позитивные макрофаги после их активации в сосочках дермы мигрируют к основанию сосочков, где включаются в состав воспалительных инфильтратов, размещённых периваскулярно. После проведеного лічення в коже значительно уменьшается количество клеток (как дендритных, так и макрофагов), в которых выявляется экспресия TLR4. Несмотря на это, продолжает существовать фоновая готовность к всплеску активации толл-подобных рецепторов.

Ключевые слова. Псоріаз, Толл-подобные рецепторы, системная иммуносупрессивная терапия, иммуногістохіміческие изменения в коже.

Abstract. The objective of the research was to study the mechanisms of developing local immune inflammation considering changes in immunohistochemical expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in skin of psoriasis patients after systemic immunosuppressive therapy.

Materials and methods. Immunohistochemical dynamic analysis of biopsy material taken from psoriaform skin areas in 62 psoriasis patients receiving systemic immunosuppressive therapy was made. Beyond that, to compare the results of the appropriate immunohistochemical examinations biopsy material from anterior abdominal wall taken after surgical intervention (e.g. hernia repair) in practically healthy persons of an appropriate age (5 patients) was studied. To determine the nature and area of local cellular immune and inflammatory reactions in skin of psoriasis patients, immunohistochemical techniques for determining TLR4 marker expression were used.

Results and discussion. While studying TLR4 expression, background diffuse cytoplasmic and nuclear staining of epidermis, vascular endothelium and single macrophage cells were identified in psoriaform skin areas. The number of positive-stained epidermis cells was about 80%. After a course of systemic suppressive therapy with Etanercept during 3 months, immunohistochemical reaction to identify TLR4 expression allowed us to establish that both the number of positive-stained cells and response intensity in epidermis considerably reduced. The number of cells expressing TLR4 in the epidermis was up to 60%. Even after treatment, a considerable number of TLR4-positive dendrite cells with a greatly increased size and extended with their processes up to the horny layer were identified in the epidermis.

Conclusions. The ligands activating toll-like receptors of macrophages and subsequent inflammatory reaction probably concentrate in epidermis dendrite cells as evidenced by immunohistochemical reactions. TLR4-positive macrophages after activation in dermal papilla migrate to the papilla base to be then included as a component of inflammatory perivascular infiltrates. After treatment, the number of cells (both dendrite and macrophage) with TLR expression significantly decreased. However, the background readiness to a burst of activity of toll-like receptors persists.

Keywords: psoriasis; Toll-like receptors; systemic immunosuppressive therapy; immunohistochemical changes in skin.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Сучасні уявлення з патогенезу псоріазу не обмежуються ураженням шкіри. Псоріаз вважається загальним захворюванням організму. Системність цього дерматозу підтверджується наявністю функціональних і органічних змін у ряді органів і систем, в тому числі, шлунково-кишковому тракці, гепатобіліарній системі, серцево-судинній системі, опорно-руховому апараті. Накопичений на теперішній час значний матеріал свідчить про значення імунних, ендокринних, метаболічних порушень, а також роль генетичного чинника в розвитку цього дерматозу. При цьому, провідними в патогенезі псоріазу вважаються імунологічні та генетичні чинники [3].

Основними характеристиками патологічного процесу при псоріазі визнані: імунне запалення, що супроводжується активацією Т-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 [2, 3].

На теперішній час загальноновизнаним вважається те, що виникнення запалення в шкірі у хворих на псоріаз починається з активації клітин шкіри. Роль активованих клітин шкіри полягає не тільки в ініціації «до імунного» запального процесу у відповідь на проникнення невідомого антигену, а й 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 [4]. 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 [8, 11].

Розпізнавання PAMPs відбувається за допомогою так званих толл-подібних рецепторів (Toll-like receptors (TLRs)) [12]. 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 [7, 9, 10].

В тому випадку коли активовані клітини шкіри не можуть самостійно знищити патоген і забезпечити переривання «доімунного» запалення, в процес включуються 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 [1, 5]. У деяких дослідженнях встановлено, що TLR-стимульовані кератиноцити супернатанта здатні викликати дозрівання дендритних клітин [6]. 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 у шкірі хворих на псоріаз.

Мета роботи – дослідити механізми розвитку місцевого імунного запалення з урахуванням змін імуногістохімічної експресії Толл-подібного рецептора 4 (TLR2) у шкірі хворих на псоріаз після проведення системної імуносупресивної терапії.

Матеріал і методи

Під нашим спостереженням 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 до лікування та після проведення системної імуносупресивної терапії препаратом етанерцепт 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 стін-

ки у практично здорових осіб відповідного віку (5 пацієнтів), взятого після оперативного втручання, зокрема герніопластики. Фрагменти біопсійного матеріалу шкіри фіксували в 10% нейтральному формаліні. У 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 TLR4.

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 та їх обговорення

У шкірі в практично здорових людей при постановці імуногістохімічної реакції з метою виявлення характеру експресії TLR4 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, опасистих клітинах, розташованих периваскулярно та в макрофагах (рис. 1). Визначається більш інтенсивне зафарбування в епідермісі в напрямку від поверхневих шарів до базального шару.

При вивченні 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 до 80%. На великому збільшенні прослідковується експресія маркера дендритними клітинами епідермісу, навколо яких утворюється «корона» із позитивно забарвлених численних міжклітинних з'єднань (містків) (Рис.2).

У 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 (Рис. 3).

Характерна мембранна експресія виявляється в макрофагах сосочків дерми і макрофагах, що мігрують в епітеліальний пласт. Причому морфологічно виявляється

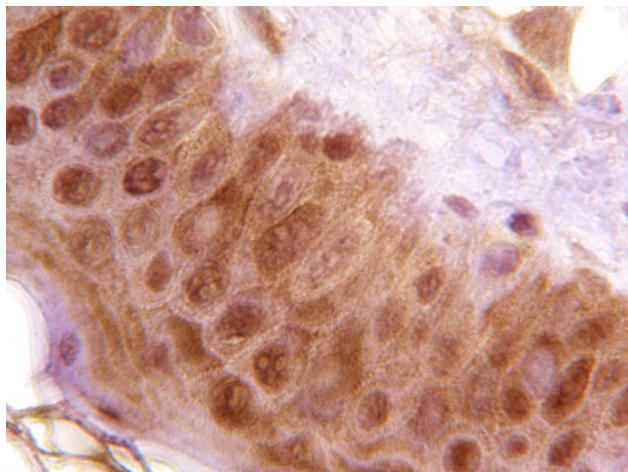


Рис. 1. Імуногістохімічне дослідження ділянки шкіри практично здорових людей. Експресія TLR4 в макрофагах, дендритних клітинах епідермісу. X1000

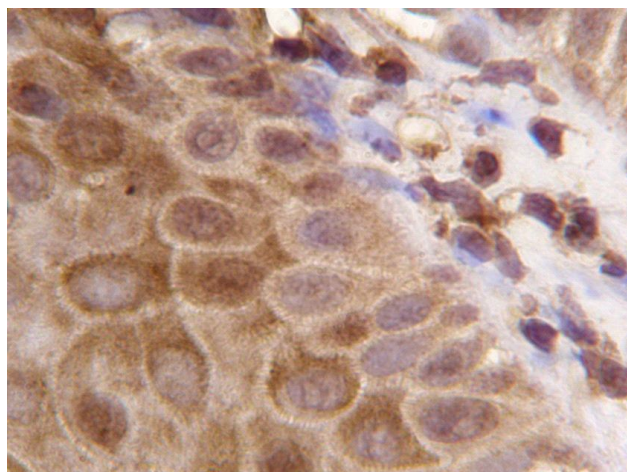


Рис.2. Імуногістохімічне дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянки шкіри, яка уражена псоріатичною висипкою. Експресія TLR4 дендритними клітинами епідермісу, навколо яких утворюється «корона» із позитивно забарвлених численних міжклітинних з'єднань. X1000

ідентичність локалізації продуктів імуногістохімічної 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 інфільтраціях в основі сосочків дерми.

Псоріатичні бляшки 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. Слід відзначити феномен позитивного ядерного мембранного зафарбування епітеліальних клітин, що межують із зроговілими масами на поверхні шкіри (рис. 4).

В сосочковому шарі дерми характерна мембранна експресія TLR4 виявляється як в окремих макрофагах, розташованих периваскулярно, так і особливо в складі периваскулярних запальних інфільтратів (рис. 5).

У ділянці шкірної псоріатичної висипки прослідковується локалізація макрофагів в лімфатичних судинах, що відтікають

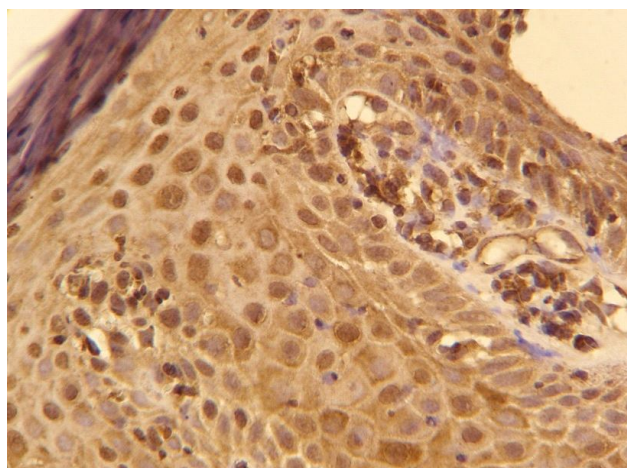


Рис. 3. Імуногістохімічне дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянки шкіри, яка уражена псоріатичною висипкою. Експресія TLR4 макрофагами, розташованими в сосочках дерми, а також дендритними клітинами епідермісу. X400

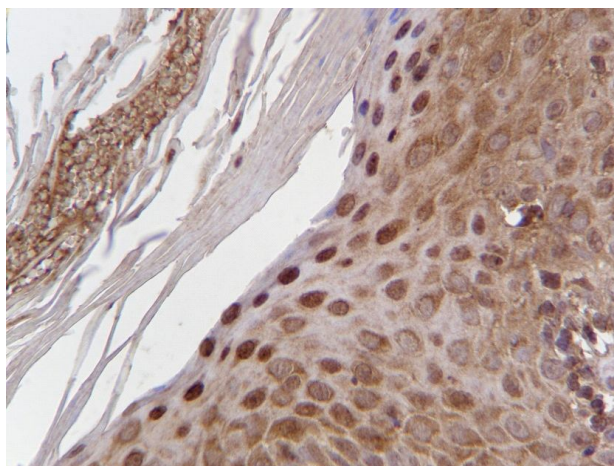


Рис. 4. Імуногістохімічне дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянки шкіри, яка уражена псоріатичною висипкою. Феномен позитивного ядерного мембранного зафарбування епітеліальних клітин, що межують із зроговілими масами на поверхні шкіри. Реакція на виявлення експресії TLR4. X400

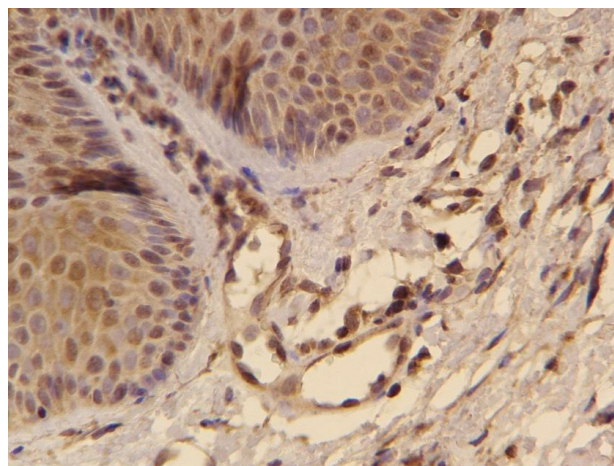


Рис. 5. Імуногістохімічне дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянки шкіри, яка уражена псоріатичною висипкою. Експресія TLR4 макрофагами, розташованими в сосочковому шарі дерми. X400

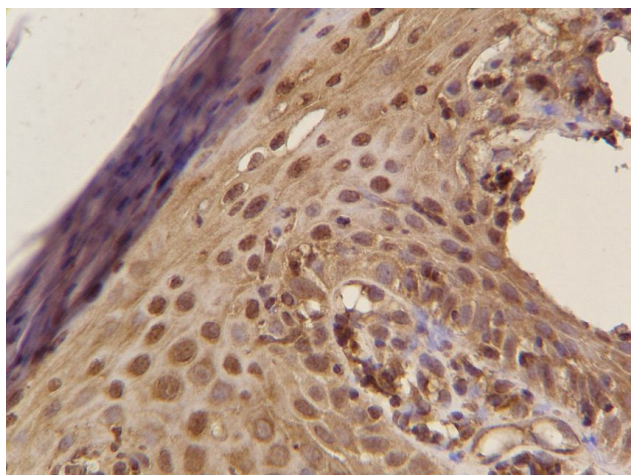


Рис. 6. Імуногістохімічне дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянки шкіри, яка уражена псоріатичною висипкою. Міграція TLR4-позитивних макрофагів в епідерміс. X400

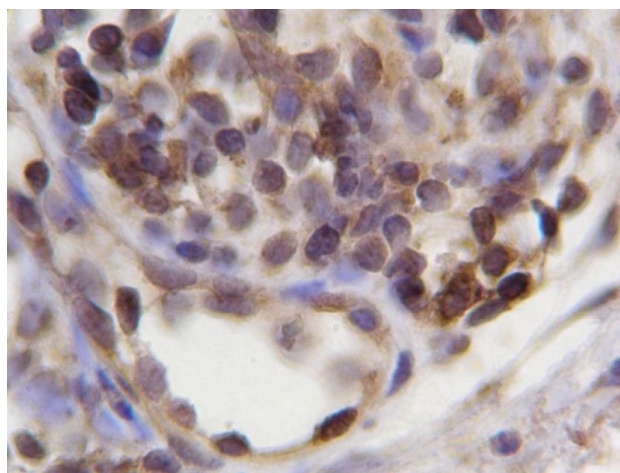


Рис. 7. Імуногістохімічне дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянки шкіри, яка уражена псоріатичною висипкою. Взаємодія TLR4-позитивних макрофагів та лімфодних клітин у периваскулярних просторах сосочкового шару дерми. X1000

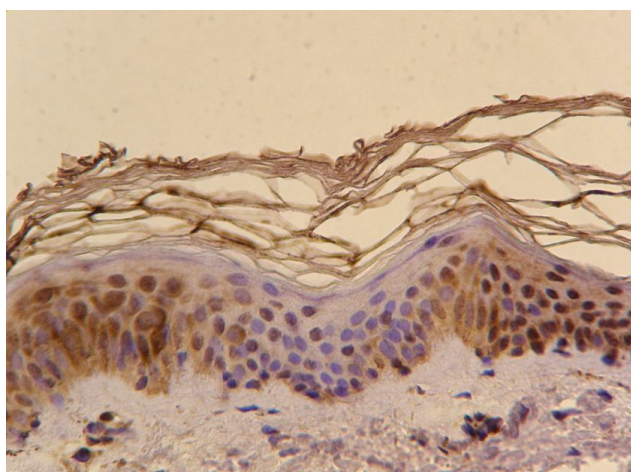


Рис. 8. Імуногістохімічне дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянки шкіри, яка уражена псоріатичною висипкою після проведеного лікування. Зони відсутності експресії TLR4 в епідермісі. X400

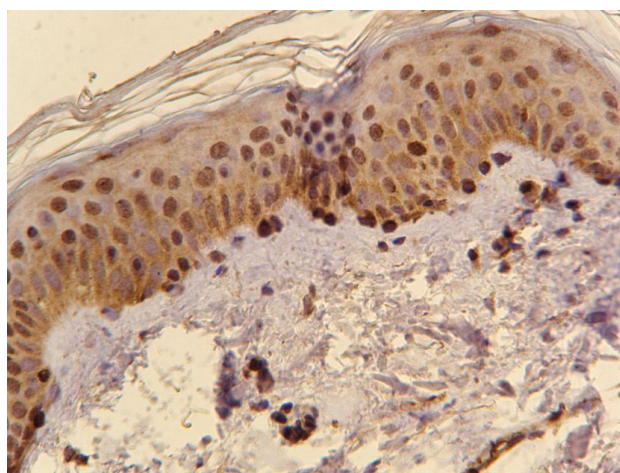


Рис. 9. Імуногістохімічне дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянки шкіри, яка уражена псоріатичною висипкою після проведеного лікування. TLR4-позитивні макрофаги в субепітеліальних зонах, а також навколо судин в сосочковому шарі дерми. X400

по напрямку від верхівки сосочків до їх основи, де містяться скупчення судин. Також відзначається значне стоншення епідермісу над верхівками сосочків аж до безпосереднього ерозування. Епітеліальний пласт, що оточує сосочок, особливо в зонах верхівок, є набряклим з відокремленням клітин між собою за рахунок міжклітинної рідини. Внаслідок цього ліганди мікроорганізмів можуть вільно проникати до сосочкового шару і реагувати з макрофагами. Останні активно мігрують до верхівки сосочків, навіть проникають в епітеліальний пласт (Рис. 6).

Відзначається активація макрофагів, збільшення їх у розмірах та процес активного експресування ними TLR4 рецепторів. 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 (Рис. 7).

Після проведення курсу системної супресивної терапії препаратом Етанарцепт протягом 3-х місяців імуногістохімічна реакція на виявлення експресії TLR4 дозволило встановити, що в епідермісі значно знижується як кількість позитивно забарвлених клітин, так й інтенсивність реакції. Кількість клітин, що експресують TLR4 в епідермісі, складає до 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 (Рис. 8).

Отже, 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.

Після проведення курсу системної супресивної терапії в дермі відзначається різке зменшення кількості запальних клітин, включаючи TLR4-позитивні макрофаги. Останні спостерігаються в субепітеліальних зонах, а також навколо судин в сосочковому шарі дерми (Рис. 9).

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.

Висновки

1. Вірогідно, що ліганди, котрі активують толл-подібні рецептори макрофагів і наступну запальну реакцію, концентруються в дендритних клітинах епідермісу, про що свідчать результати проведених імуногістохімічних реакцій. Виявлено тісний контакт макрофагів з дендритними клітинами епідермісу.

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

3. Після проведеного лікування в шкірі значно зменшується кількість клітин (як дендритних, так і макрофагів), в яких виявляється експресія TLR4. Однак продовжує існувати фонове готовність до сплеску активації толл-подібних рецепторів.

Перспективи подальших досліджень

Отже, результати проведених імуногістохімічних досліджень вказують на вагоме значення Толл-подібного рецептора 4 (TLR4) в розвитку імунного запалення в шкірі у хворих на псоріаз, та потребують подальшого поглибленого вивчення цього рецептора в розвитку псоріатичного процесу.

Література

1. Меджитов Р. Врожденный иммунитет / Р. Меджитов, Ч. Джаневей // Казанский мед. журн. – 2004ю - № 85: 3. – С. 161—67.
2. Толстопятова М.А. Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии инфекционной патологии у новорожденных детей / М.А. Толстопятова, Г.А. Буслаева, И.Г. Козлов // Педиатрия. – 2009. - № 87. – С. 115—120.
3. Хайтов Р.М. Иммунология. Норма и патология. / Р.М. Хайтов, Г.А. Игнатъева, И.Г. Сидорович // М.: Медицина. – 2010. – С. 111-164.
4. Sandor F. Toll-like Receptors. I. Structure, Function and Their Ligands / F. Sandor, M. Buc // Folia biol (Praha). – 2005. - № 51. – P. 148—156.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Takeda K. Toll-receptors in innate immunity / K. Takeda, S. Akira // Int Immunol. – 2005/ - № 17. – P. 1—14.
9. 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.
10. Medzhitov R. Toll-like receptors in innate immunity / R. Medzhitov // New Engl J Med. – 2000. - № 1. – P. 343—344.
11. Janeway C.A. Innate immune recognition / C.A. Janeway, R. Medzhitov // Annu Rev Immunol. – 2002. - № 20. – P. 197 – 2016.
12. 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.

Одержано 14.03.2016 року.