

Р.Л. Степаненко, С.Г. Свирид
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

Дослідження значення імуногістохімічної експресії толл-подібних рецепторів та мікробного компонента в шкірі в патогенезі псоріазу

Мета роботи — дослідити механізми розвитку місцевого імунного запалення з урахуванням змін імуногістохімічної експресії толл-подібних рецепторів за умови наявності мікробного компонента в шкірі хворих на псоріаз.

Матеріали та методи. Проведено імуногістохімічне дослідження біопсійного матеріалу, взятого з ділянок шкірної псоріатичної висипки та інтактної шкіри у 74 хворих на псоріаз. Для дослідження характеру і поширеності місцевих клітинних імунних і запальних реакцій у згаданих ділянках застосовували імуногістохімічні методики з визначенням експресії маркера TLR2, TLR4, а також наявності й видового складу колоній мікроорганізмів. Для порівняння результатів імуногістохімічних досліджень вивчали біопсійний матеріал зі шкіри передньої черевної стінки у практично здорових людей відповідного віку (5 пацієнтів), взятий після оперативного втручання, зокрема герніопластики.

Результати та обговорення. Простежувалася тісний контакт TLR2-позитивних макрофагів у субепітеліальних ділянках з позитивно забарвленими дендритними клітинами епідермісу, причому в цих зонах експресія маркера спостерігалася в епітеліоцитах на всю товщу шару аж до рогового шару. Вказані структурні особливості можуть свідчити про активізацію макрофагів дендритними клітинами епідермісу, котрі зв'язують і концентрують відповідні ліганди. Аналогічні зміни спостерігали й під час вивчення експресії TLR4. У епідермісі навіть після лікування виявляли значну кількість TLR4-позитивних дендритних клітин, які мали значно збільшені розміри і поширювалися відростками аж до рогового шару. Причому простежувалося досить інтенсивне фонове цитоплазматичне забарвлення цих клітин. Слід зазначити, що в рогових лусочках шкіри спостерігалися колонії мікроорганізмів. Лусочки рогової речовини у хворих на псоріаз мають пухку пошарову структуру, що створює умови для колонізації їх значною кількістю мікроорганізмів, продукти життєдіяльності яких можуть виступати лігандами в активації толл-подібних рецепторів. Результати імуногістохімічних досліджень біопсійного матеріалу, взятого з ділянок шкіри, ураженої псоріатичною висипкою, та інтактної шкіри до та після курсу системної імуносупресивної терапії, вказують на вагоме значення в розвитку імунного запалення в шкірі експресії толл-подібних рецепторів 2 та 4 (TLR2, TLR4) за умови наявності мікробного компонента у відповідних ділянках.

Висновки. У хворих на псоріаз встановлено наявність гіперпродукції і гіперсекреції епітеліоцитами шкіри прозапальних біологічних маркерів, зокрема TLR2- і 4-позитивних клітин. При цьому відповідні TLR-позитивні клітини виявляють у ділянках як ураженої псоріатичною висипкою шкіри, так і інтактної. TLR2-, TLR4-позитивні макрофаги після їхньої активації в сосочках дерми мігрують до основи сосочків, де включають у склад запальних інфільтратів, розташованих периваскулярно. Після лікування хворих на псоріаз із залученням системної імуносупресивної терапії в ділянках шкіри, ураженої псоріатичною висипкою, встановлено зменшення кількості клітин (як дендритних, так і макрофагів), у яких виявляють експресію TLR2 та TLR4. Тривала присутність бактеріального компонента в уражених псоріатичною висипкою ділянках шкіри може бути одним із патогенетичних стимулюючих чинників активації продукції прозапальних цитокінів, що сприяє підтримці запального псоріатичного процесу. 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 в поверхневих шарах шкіри. Подальші поглиблені дослідження взаємозв'язку персистуючих у шкірі стафілококів із факторами природженого імунітету, а саме толл-подібними рецепторами, є перспективними в аспекті отримання новітніх даних про патогенез псоріазу з деталізацією порушень природженого імунітету і проліферативної активності кератиноцитів у псоріатичних бляшках.

Ключові слова

Псоріаз, толл-подібні рецептори, мікрофлора шкіри, системна імуносупресивна терапія.

Псоріаз є одним із найпоширеніших хронічних дерматозів. Поширеність його в різних країнах світу коливається від 0,2 до 5 % загальної популяції, становлячи в середньому 3 %, а в структурі патології шкіри питома вага цього дерматозу сягає 15 % [2].

У останні десятиліття спостерігається тенденція до зростання захворюваності на псоріаз, зокрема в Україні. Зокрема, за офіційними статистичними даними, у 2015 р. цей показник становив 246,8 на 100 тис. населення. У 2015 р. в Україні було зареєстровано 105 517 хворих на псоріаз, із них 5953 дітей віком до 17 років. Означилася також тенденція до «омолодження» контингенту хворих на псоріаз, зокрема понад 70 % із них — люди працездатного віку, від 20 до 50 років. Псоріаз нерідко призводить до тривалої втрати працездатності, а також інвалідності, що в поєднанні з високим рівнем захворюваності визначає його важливе медико-соціальне значення [2].

Етіологія та патогенез псоріазу з'ясовані недостатньо. Значна увага дослідників прикута до вивчення ролі розпізнавальних рецепторів у ініціації імунного запалення в шкірі хворих на псоріаз. Толл-подібні рецептори (TLR) — клас клітинних рецепторів з одним трансмембранним фрагментом, які розпізнають консервативні структури мікроорганізмів і активізують клітинну імунну відповідь [1, 3]. Згідно з клітинною локалізацією, TLR ділять на дві групи. До першої належать TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 та TLR6, які виявляють на поверхні цитоплазматичних мембран клітини. Лігандами для них є позаклітинні патогенасоційовані молекулярні патерни. Другу групу представляють TLR3, TLR7, TLR8 та TLR9, що локалізуються в мембранах внутрішньоклітинних органел — ендосом, лізосом, апарату Гольджі [10, 14]. Кожен TLR відіграє важливу роль у швидкому розпізнаванні специфічних мікробних компонентів включно з бактеріями, грибами, вірусами, простішими. TLR2-рецептор основним чином розпізнає пептидоглікан — головний структурний компонент клітинної стінки грампозитивних бактерій і мікробних ліпопептидів, виявлених у грампозитивних та грамнегативних бактеріях [20]. TLR4, мембранний білок, член групи толл-подібних рецепторів, що забезпечують функціонування природженого імунітету, який зв'язує ліпополісахарид клітинної стінки бактерій. TLR4 — ключовий медіатор імунної відповіді на грамнегативні бактерії.

Виникнення у хворих на псоріаз запалення шкіри свідчить про наявність активованого стану клітин епідермісу та дерми, що поряд з іншими факторами може бути зумовлено участю

толл-подібних рецепторів [12]. Збільшення експресії TLR2 і TLR4 в епідермісі та запальному інфільтраті дерми хворих на псоріаз вказує на можливість її взаємозв'язку з бактеріальним фактором. Проте в літературі немає робіт, присвячених дослідженню експресії толл-подібних рецепторів за наявності персистуючих в шкірі мікроорганізмів.

Толл-подібні рецептори відіграють провідну роль у ідентифікації патогенів у шкірі і запускають каскад імунних реакцій. У епідермісі ці рецептори експресуються, зокрема на кератиноцитах і клітинах Лангерганса. Толл-подібні рецептори ідентифіковано на епітеліальних клітинах, що вказує на їхню участь у формуванні епітеліального мікробного бар'єру [9].

Первинним захисним бар'єром у разі проникнення екзогенних патогенів у шкіру є кератиноцити, які формують резистентність до інфекції завдяки функціонуванню власних імунних механізмів, таких як продукція антимікробних пептидів підсімейства людських β-дефензинів, регуляція функції яких відбувається завдяки запальним і інфекційним стимуляторам: ФНП-α, ІЛ-1, бактеріальним ліпополісахаридам, чи бактеріям, зокрема виду *Staphylococcus*. Дослідження експресії толл-подібних рецепторів у епідермісі та культурі кератиноцитів свідчить, що TLR2 є специфічним рецептором для *Staphylococcus aureus* і індукує TLR2-опосередковані сигнали. На кератиноцитах помічено виразну експресію TLR2, який розпізнає компоненти клітинної стінки бактерій [11, 17]. Деякі автори встановили, що стимуляція кератиноцитів патогеном *Staphylococcus aureus* призводила до транслокації ядерного транскрипційного фактора NF-κB, а в подальшому — до підвищення продукції ІЛ-8 та іNOS і швидкої протективної відповіді. Ця запальна відповідь була залежною від TLR2. Дисфункція в TLR2-залежних сигналах є причиною стафілококової персистенції у хворих на дерматози внаслідок порушення індукції антимікробних пептидів на прикладі бета-дефензину-2. Було також доведено, що TLR2 розпізнає різноманітні компоненти *Staphylococcus aureus*, включно з пептидогліканами і ліпопептидами. Чимало авторів продемонстрували, що TLR2 у кератиноцитах сприяв регуляції β-дефензину 3, який мав потенційну мікробну активність проти *Staphylococcus aureus* [6, 7, 13, 15, 16, 19,]. Таким чином, дисфункція в системі толл-подібних рецепторів, зокрема TLR2, частково пояснює хронізацію та рецидивування персистенції *Staphylococcus aureus* внаслідок порушення взаємовідносин між клітинами природженого та, як наслідок, адаптивного імунітету.

Значний вплив на розвиток та перебіг деяких дерматозів, зокрема псоріазу, справляє колонізація шкіри хворих різноманітними патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами. Перебіг захворювання може ускладнюватися через персистенцію *Staphylococcus aureus*. Пептидоглікан клітинної стінки *Staphylococcus aureus* у разі колонізації цими мікроорганізмами шкіри хворих на псоріаз індукує продукцію кератиноцитами у вогнищах запалення медіаторів запалення та прозапальних цитокінів [5, 15, 18].

Кератиноцити в непошкодженій шкірі слугують бар'єрними клітинами, не беручи участі в імунному процесі. Разом із тим під впливом пошкодження, мікроорганізмів та продуктів їхньої життєдіяльності, а потім і цитокінів вони активізуються та експресують молекули адгезії з подальшим виділенням цитокінів, що є пусковими факторами і медіаторами імунних реакцій у шкірі. Надмірна активізація, підтримувана толл-подібними рецепторами, може призвести до запуску каскаду ланцюгових імунних реакцій, що призводить до хронізації процесу.

Низка авторів виявили високу експресію білків теплового шоку кератиноцитами в ділянках шкірної псоріатичної висипки. Вони можуть стимулювати секрецію TLR4 на антигенпрезентуючих клітинах, головним чином на клітинах Лангерганса, що відіграє провідну роль у дозріванні та секретії ФНП- α та ІЛ-12 й зумовлює участь у імунопатогенезі псоріазу [4, 8, 21]. Таким чином, толл-подібні рецептори і їхні ліганди не тільки забезпечують протиінфекційний захист, а й сприяють розвитку запального процесу та відіграють важливу роль у розвитку окремих хронічних запальних дерматозів.

Хоча роль толл-подібних рецепторів у патогенезі псоріазу не до кінця з'ясована, значення дисфункції TLR2 та TLR4-рецепторів при цьому дерматозі очевидне й потребує подальшого поглибленого дослідження.

Мета роботи — дослідити механізми розвитку місцевого імунного запалення з урахуванням змін імуногістохімічної експресії толл-подібних рецепторів за умови наявності мікробного компонента в шкірі хворих на псоріаз.

Матеріали та методи

Під нашим спостереженням перебувало 74 хворих на псоріаз вульгарний (прогресуюча або стаціонарна стадія, середньотяжкий або тяжкий перебіг). Вік хворих коливався від 18 до 73 років, жінок було 32 (43,24 %), чоловіків 42 (56,76 %). Усі хворі перед призначенням лікування підлягали комплексному загальноклінічному, лабораторному та спеціальному обстеженню. У хво-

рих на псоріаз проводили двократне біопсійне дослідження, зокрема з ділянок шкіри, ураженої псоріатичною висипкою, та з інтактною шкіри, до лікування та після системної імуносупресивної терапії препаратом «Етанарцепт» протягом 3 міс. Біопсійний матеріал брали у одних і тих самих хворих з аналогічних ділянок. Крім того, для порівняння результатів імуногістохімічного дослідження вивчали біопсійний матеріал зі шкіри передньої черевної стінки у практично здорових осіб відповідного віку (5 пацієнтів), взятий після оперативного втручання, зокрема герніопластики. Фрагменти біопсійного матеріалу шкіри фіксували в 10 % нейтральному формаліні. У подальшому біопсійний матеріал проводили по спиртах і заливали в парафінові блоки, з яких готували гістологічні зрізи завтовшки 4–6 мкм.

Під час постановки імуногістохімічних реакцій для демаскування антигенів проведено теплову обробку зрізів та блокування неспецифічного зв'язування білків протеїновим блоком DAKO і ендогенної пероксидазної активності пероксидазним блоком DAKO, після цього наносили первинні антитіла. За допомогою детекції DAKO EnVizion + проводили візуалізацію первинних антитіл. Для візуалізації гістологічних структур імуногістохімічні препарати дофарбовували гематоксиліном Майєра, покривали канадським бальзамом та 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 із позитивним забарвленням у 10 випадково обраних полях зору мікроскопа за збільшення в 400 разів. Оцінювали ступінь інтенсивності забарвлення: 0 — відсутність забарвлення, 1 (+) — слабе забарвлення світло-коричневого кольору, 2 (++) — помірне забарвлення коричневого кольору, 3 (+++) — виразне забарвлення темно-коричневого кольору. Результати імуногістохімічної реакції оцінювали напівкількісним методом у балах від 0 до 6 за загальноприйнятою методикою з урахуванням забарвлених клітин. 0 балів визначали за відсутності зафарбовування, 1 бал — до 10 %, 2 бали — до 20 %, 3 бали — до 30 %, 4 бали — до 40 %, 5 балів — до 50 %, 6 балів — понад 50 % забарвлених клітин.

Для вивчення характеру і поширеності місцевих клітинних імунних і запальних реакцій у шкірі застосовували імуногістохімічні методики з визначенням експресії маркера TLR2, TLR4.

Для дослідження в гістологічних зрізах видового складу колоній мікроорганізмів проводили низку специфічних імуногістохімічних реакцій.

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

Вірогідність різниці порівнюваних величин визначали за допомогою критерію Стьюдента (t). Різницю між середніми значеннями досліджених показників вважали вірогідною з ймовірністю 95 % і вище. Зв'язок між ознаками визначали за допомогою коефіцієнта кореляції. Всі встановлені параметри послужили вихідними даними для статистичного аналізу 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 пакета Statistica 7. Різницю вважали статистично вірогідною при рівні надійності 0,05 і вище.

Результати та обговорення

З метою виявлення характеру експресії TLR2 та TLR4 в шкірі під час постановки імуногістохімічних реакцій в нормі було виявлено фонове дифузне цитоплазматичне і ядерне забарвлення клітин епідермісу, ендотелію судин і поодиноких макрофагальних клітин. Характерні мембранні патерни експресії цих маркерів спостерігалися в дендритних клітинах епідермісу, опасистих клітинах, розташованих периваскулярно, та в макрофагах. Простежувалося інтенсивніше забарвлення в епідермісі в напрямку від поверхневих шарів до базального шару. Помітно було чітке розмежування клітин із позитивною реакцією і клітин з негативною експресією. В дермі позитивна експресія маркера виявлялась в поодиноких запальних клітинах. При цьому експресія рецептора була переважно ядерна; в цитоплазмі епітеліоцитів позитивне забарвлення було мінімальним.

У ділянках інтактної шкіри хворих на псоріаз до лікування під час постановки імуногістохімічної реакції на TLR2 виявлено позитивну реакцію з ядерними патернами експресії в епітеліоцитах та дендритних клітинах базального шару епідермісу. Також спостерігалося неспецифічне забарвлення в цитоплазмі цих клітин. У поверхневих клітинах епідермісу реакція була негативною. У дермі зауважено позитивну експресію TLR2 в ендотелії частини кровоносних

судин і в поодиноких клітинах легкого запального інфільтрату.

Під час постановки імуногістохімічної реакції на виявлення експресії TLR4 візуалізувалося інтенсивніше і поширене ядерне і цитоплазматичне забарвлення клітин епідермісу. Інтенсивніша реакція була в базальному шарі епідермісу, однак позитивне забарвлення спостерігалося і в епітеліоцитах поверхневих шарів. Навіть у субкератиновому шарі виявлено поодинокі епітеліоцити з експресією цього маркера. Слід зауважити також позитивну дифузно-вогнищеву реакцію в зроговілому шарі. В дермі також виявляли значну кількість позитивно забарвлених клітин як ендотелію, так і запального інфільтрату. Запальні клітини, що експресують цей маркер, локалізувалися переважно периваскулярно.

Під час дослідження експресії TLR4 у ділянках шкірної псоріатичної висипки хворих також виявляли фонове дифузне цитоплазматичне і ядерне забарвлення клітин епідермісу, ендотелію судин і поодиноких макрофагальних клітин. Позитивно забарвлювалися майже 80 % клітин епідермісу. За великого збільшення простежувалося експресія маркера дендритними клітинами епідермісу, навколо яких утворювалася «корона» із позитивно забарвлених численних міжклітинних з'єднань (містків). У цих клітинах виявлялось слабе забарвлення мембран і гранулярних матеріалів у цитоплазмі. Характерне мембранне забарвлення спостерігалося в макрофагах, розташованих у сосочках за безпосереднього контакту цих клітин з дендритними клітинами епідермісу. Найінтенсивніша характерна реакція спостерігалася в макрофагах, розташованих у сосочках і периваскулярно в дермі.

Під час оцінки експресії TLR2 виявляли менш інтенсивне дифузне фонове забарвлення епідермісу, ендотелію судин і частини клітин у запальних інфільтратах дерми. Майже 80 % клітин епідермісу мали позитивне фонове забарвлення. Спостерігався також феномен позитивного мембранного забарвлення ядер епітеліоцитів, розташованих безпосередньо під зроговілим шаром епідермісу. Характерну мембранну експресію виявляли в макрофагах сосочків дерми і макрофагах, що мігрують у епітеліальний пласт. Причому морфологічно зауважували ідентичність локалізації продуктів імуногістохімічної реакції в дендритних клітинах епідермісу і макрофагах сосочків дерми, що безпосередньо контактували з епітеліоцитами. Найвиразніша позитивна реакція спостерігалася в макрофагах, розташованих у запальних периваскулярних інфільтратах у основі сосочків дерми.

У хворих на псоріаз у ділянках шкірної псоріатичної висипки встановлено виразну мембранну експресію TLR4 численними макрофагами сосочків дерми. Макрофаги збільшувалися і групувалися. Значну кількість позитивних макрофагів виявляли в епідермісі над верхівками сосочків. Характерним був також феномен позитивного ядерного мембранного забарвлення епітеліальних клітин, що межують зі зроговілими масами на поверхні шкіри. Як у окремих макрофагах, розташованих периваскулярно, так і в складі периваскулярних запальних інфільтратів сосочкового шару дерми виявлено мембранну експресію TLR4.

Локалізувалися макрофаги у лімфатичних судинах, що відтікають у напрямку від верхівки сосочків до їхньої основи, де скупчені судини. Морфологічно спостерігалось значне стоншення епідермісу над верхівками сосочків аж до безпосереднього ерозуювання. Епітеліальний шар, що оточує сосочок, особливо в зонах верхівок, був набряклим, з відокремленими клітинами 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 у епітеліальний шар. При цьому макрофаги активуються, збільшуються й активно експресують TLR2 та TLR4-рецептори. Очевидно, що макрофаги після активації мігрують до основи сосочків, де включаються в склад запальних інфільтратів, розташованих периваскулярно. У цих ділянках відбуваються основні взаємодії макрофагів та лімфоїдних клітин.

У інтактній шкірі хворих на псоріаз після курсу системної імуносупресивної терапії спостерігалось певне зменшення інтенсивності імуногістохімічної реакції на TLR2. У ядрах епітеліоцитів експресія цього маркера виявлялася у вигляді дрібногранулярного забарвлення частини епітеліоцитів, розташованих переважно в базальних відділах епідермісу. Спостерігалось також неспецифічне цитоплазматичне дрібногранулярне забарвлення (переважно перинуклеарне). Кератиновий шар епідермісу не зазнавав тинкторіальних змін. У дермі позитивна експресія була аналогічною інтактній шкірі до лікування: забарвлювалися ендотеліоцити кровоносних судин і поодинокі клітини легкого запального інфільтрату.

Після курсу системної імуносупресивної терапії в шкірі з ділянок регресу псоріатичної висипки значно зменшувалися інтенсивність і поширеність імуногістохімічної реакції на TLR4. Незначна позитивна ядерна експресія спостері-

галася тільки в поодиноких клітинах епідермісу, переважно в базальних ділянках. При цьому в ядрі спостерігалось не суцільне, а дрібногранулярне забарвлення. Позитивно забарвлювався і кератиновий шар епідермісу. Неспецифічне цитоплазматичне (навколоядерне) забарвлення виявлено в більшості епітеліоцитів епідермісу, що локалізувалося ближче до базальної мембрани.

У дермі внаслідок зменшення кількості запальних клітин експресія TLR4 спостерігалася тільки в поодиноких макрофагах, а також у ендотелії кровоносних судин.

За допомогою імуногістохімічних реакцій на виявлення експресії TLR2 та TLR4 встановлено, що після лікування в епідермісі з ділянок регресу псоріатичної висипки значно зменшувалися як кількість позитивно забарвлених клітин, так і інтенсивність реакції. Кількість клітин, що експресують TLR4 в епідермісі, сягала майже 60 %. Найчіткіше реакція була у дендритних клітинах значних розмірів. Після лікування в епідермісі з'являлися ділянки, де практично не було експресії TLR4. Очевидно, в цих зонах незначна кількість дендритних клітин.

Отримані дані вказують на суттєву роль дендритних клітин у адсорбції лігандів мікроорганізмів і активації толл-подібних рецепторів. Гістотопографічно відростки дендритних клітин досягали поверхневих шарів епідермісу, де під зроговілим шаром містилися гранулярні позитивно забарвлені колонії мікроорганізмів. Субепідермально виявляли позитивно забарвлені макрофаги. Аналогічними були також особливості експресії клітинами епідермісу TLR2. Позитивно забарвлених епітеліоцитів було майже 50 %. Характерну мембранну експресію зауважено тільки в дендритних клітинах і макрофагах, що розташовувалися безпосередньо під базальним шаром.

Після лікування в дермі з ділянок регресу псоріатичної висипки помітно зменшилася кількість запальних клітин, включно з TLR2- та TLR4-позитивними макрофагами. Останні спостерігалися в субепітеліальних зонах, а також навколо судин у сосочковому шарі дерми.

Простежувався тісний контакт TLR2-позитивних макрофагів у субепітеліальних ділянках з позитивно забарвленими дендритними клітинами епідермісу, причому в цих зонах експресія маркера спостерігалася в епітеліоцитах на всю товщу аж до рогового шару. Вказані структурні особливості можуть свідчити про активацію макрофагів дендритними клітинами епідермісу, котрі зв'язують і концентрують відповідні ліганди. Аналогічні зміни виявляли і стосовно експресії TLR4. У епідермісі навіть після лікування

виявляли значну кількість TLR4-позитивних дендритних клітин, які мали значно збільшені розміри і поширювалися своїми відростками аж до рогового шару. Причому фонове цитоплазматичне забарвлення цих клітин було досить інтенсивним. У рогових лусочках шкіри спостерігалися колонії мікроорганізмів. Лусочки рогової речовини у хворих на псоріаз мають пухку пошарову структуру, що створює умови для колонізації їх значною кількістю мікроорганізмів, продукти життєдіяльності яких можуть виступати лігандами в активації толл-подібних рецепторів. У глибших шарах дерми позитивно забарвлені макрофаги розташовувалися периваскулярно в невеликій кількості.

За результатами проведених до початку лікування спеціальних морфологічних та імуногістохімічних досліджень біоптатів шкіри з ділянок шкірної псоріатичної висипки встановлено наявність численних колоній мікроорганізмів під роговим шаром епідермісу у 49 (66,21 %) із 74 хворих на псоріаз. Крім цього, у 19 (25,67 %) хворих колонії мікроорганізмів під роговим шаром епідермісу також виявлено в біоптатах із ділянок інтактної шкіри. За антигенними властивостями відповідні мікроорганізми належать до виду *Staphylococcus aureus*.

Після курсу системної імуносупресивної терапії препаратом «Етанарцепт» протягом 3 міс у всіх 74 хворих на псоріаз досягнуто повної клінічної ремісії, спостерігався повний регрес на шкірної псоріатичної висипки.

Після курсу лікування у 21 (28,38 %) із 74 хворих на псоріаз під роговим шаром епідермісу біоптатів шкіри з ділянок регресу псоріатичної висипки виявлено колонії мікроорганізмів, які за антигенними властивостями належать до виду *Staphylococcus aureus*. Крім цього, у 8 (10,81 %) пацієнтів їх також виявлено під роговим шаром епідермісу біоптатів із ділянок інтактної шкіри.

Аналіз результатів досліджень свідчить про можливу роль відповідного бактеріального компонента в розвитку рецидиву псоріатичної висипки. Підтвердженням цього є значна кількість колоній мікроорганізмів під роговим шаром епідермісу шкіри у частини хворих на псоріаз після курсу лікування, при цьому запальної інфільтрації дерми і епідермісу не зауважено. Очевидно, бактеріальний фактор приєднується як ускладнення за умови розвитку пошкоджень епідермісу (набрякання, десквамація) у відповідь на небактеріальне запалення. Крім цього, виявлена нами у переважної кількості хворих на псоріаз з прогресуючою або стаціонарною стадією перебігу дерматозу наявність численних

колоній мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* під роговим шаром епідермісу в біоптатах з ділянок шкірної псоріатичної висипки вказує на сприятливі умови для активної життєдіяльності цих умовно-патогенних бактерій у відповідних зонах, а також можливість участі відповідного мікробного компонента в підтримці шкірного запального процесу. Разом із тим встановлена нами у хворих на псоріаз з прогресуючою або стаціонарною стадією перебігу наявність колоній *Staphylococcus aureus* під роговим шаром у біоптатах з ділянок інтактної шкіри та без патоморфологічних змін потребує поглибленого дослідження та обговорення.

Таким чином, результати імуногістохімічних досліджень біопсійного матеріалу, взятого з уражених псоріатичною висипкою ділянок шкіри та ділянок інтактної шкіри у хворих на псоріаз до та після курсу системної імуносупресивної терапії, вказують на вагомий роль у розвитку імунного запалення в шкірі експресії толл-подібних рецепторів 2 та 4 (TLR2, TLR4) за умови наявності мікробного компонента у відповідних ділянках.

Висновки

У хворих на псоріаз зауважено гіперпродукцію і гіперсекрецію епітеліоцитами шкіри прозапальних біологічних маркерів, зокрема TLR2- та TLR4-позитивних клітин. При цьому відповідні TLR-позитивні клітини виявляють у ділянках як ураженої псоріатичною висипкою шкіри, так і інтактної. Разом із тим кількість відповідних клітин у ділянках шкіри з псоріатичними бляшками була вищою порівняно з ділянками інтактної.

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

Після лікування хворих на псоріаз із залученням системної імуносупресивної терапії в ділянках ураженої псоріатичною висипкою шкіри зменшилася кількість клітин (як дендритних, так і макрофагів) з експресією TLR2 та TLR4. Однак продовжує існувати фонові готовність до активації толл-подібних рецепторів.

Тривала присутність бактеріального компонента в ділянках шкіри, уражених псоріатичною висипкою, може бути одним із патогенетичних чинників стимулювання активації продукції прозапальних цитокінів, що сприяє підтримці запального псоріатичного процесу.

Встановлена в епідермісі і дермі хворих на псоріаз експресія TLR-позитивних клітин вка-

зує, що важливою ланкою в патогенезі цього дерматозу є антигенна стимуляція імунотензивних клітин, яка призводить до розвитку запального процесу в поверхневих шарах шкіри. Зміни імуностохімічної експресії TLR2 і TLR4 в ділянках шкірної псоріатичної висипки хворих на псоріаз у динаміці лікування вказують на певне значення відповідного рецептора для розвитку імунного запалення в шкірі при псоріазі, а також може слугувати додатковим діагностично-прогностичним маркером характеру клінічного перебігу цього дерматозу. Крім цього, зміни експресії TLR2 і TLR4 в ділянках шкірної псоріатичної висипки розширюють уявлення про патогенез псоріазу.

Подальші поглиблені дослідження взаємозв'язку персистуючих у шкірі стафілококів із факторами природженого імунітету, а саме толл-подібними рецепторами, є перспективними в аспекті отримання новітніх даних про патогенез псоріазу з деталізацією порушень природженого імунітету і проліферативної активності кератиноцитів у псоріатичних бляшках. Результати досліджень також важливі в терапевтичному аспекті, зокрема щодо можливості впливу на суперантигени, які формуються мікроорганізмами в елементах псоріатичної висипки й інтактній шкірі хворих на псоріаз за допомогою таргетних лікувальних засобів. Це дасть змогу ефективніше контролювати клінічний перебіг псоріазу.

Список літератури

1. Катуніна О.Р. Функции Толл-подобных рецепторов как компонента врожденного иммунитета и их участие в патогенезе дерматозов различной этиологии // *Вестн. дерматол. и венерол.* — 2011. — № 2. — С. 18–23.
2. Котвіцька А.А., Карло В.В. Дослідження показників поширеності псоріазу в країнах світу та Україні // *Запорозький мед. журн.* — 2013. — № 3 (78). — С. 38–42.
3. Меджитов Р.А., Джаневей Ч.И. Врожденный иммунитет // *Казанский мед. журн.* — 2004. — № 1. — С. 161–167.
4. Akira S., Takeda K., Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity // *Nat. Immunol.* — 2001. — N 2. — P. 675–680.
5. Curry J.L., Qin J.Z., Bonish B. et al. Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin // *Arch. Path. Lab. Med.* — 2003. — N 127. — P. 178–186.
6. Hashimoto M., Tawarasumida K., Kariya H. et al. Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus* // *J. Immunol.* — 2006. — N 177 (5). — P. 3162–3169.
7. Hoebe K., Georgel P., Rutschmann S. CD36 is a sensor of diacylglycerides // *Nature.* — 2005. — N 433. — P. 523–527.
8. James E., McInturff R., Modlin J.K. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease // *J. Invest. Derm.* — 2005. — N 1. — P. 1–8.
9. Kollisch G., Voelcker B. et al. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes // *Immunol.* — 2005. — N 114 (4). — P. 531–541.
10. Kopp E.B., Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity // *Curr. Opin. Immunol.* — 1999. — N 11. — P. 13–28.
11. Lorenz E., Mira J.P. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection // *Infect. Immun.* — 2000. — N 68 (11). — P. 6398–6401.
12. Lu Y.C., Ohashi P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway Cytokine 42 // *Immunology.* — 2008. — Vol. 2, N 10. — P. 145–151.
13. Medzhitov R., Janeway C. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition // *Cell.* — 1997. — N 91. — P. 295–298.
14. Medzhitov R. Toll-like receptors in innate immunity // *New Engl. J. Med.* — 2000. — N 1. — P. 343–344.
15. Menzies B.E., Kenoyer A. Signal transduction and nuclear responses in *Staphylococcus aureus*-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes // *Infect. Immun.* — 2006. — N 74 (12). — P. 6847–6854.
16. Sandor F., Buc M. Toll-like Receptors. I. Structure, Function and Their Ligands // *Folia biol. (Praha).* — 2005. — N 51. — P. 148–156.
17. Schroder N.W., Morath S., Alexander C. et al. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved // *J. Biol. Chem.* — 2003. — N 278 (18). — P. 15587–15594.
18. Takeda K., Akira S. Toll-receptors in innate immunity // *Int. Immunol.* — 2005. — N 17. — P. 1–14.
19. Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recording of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components // *Immunity.* — 1999. — N 11 (4). — P. 443–451.
20. Tapping R.I., Johnson C.M. Genetic polymorphisms within the human Toll-like receptor 2 subfamily // *Dermatol.* — 2007. — Vol. 50, N 8. — P. 25–29.
21. Trinchieri G., Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence // *Nat. Rev. Immunol.* — 2007. — N 7 (3). — P. 179–190.

Р.Л. Степаненко, С.Г. Свирид

Національний медичний університет імені А.А. Богомольця, Київ

Исследование значения иммуногистохимической экспрессии толл-подобных рецепторов и микробного компонента в коже в патогенезе псориаза

Цель работы — исследовать механизмы развития местного иммунного воспаления с учетом изменений иммуногистохимической экспрессии толл-подобных рецепторов с условием наличия микробного компонента в коже при псориазе.

Материалы и методы. Проведено иммуногистохимическое исследование биопсийного материала, взятого из областей кожной псоріатической висыпки и інтактной кожи у 74 больных на псоріаз. Для определения характера и распространенности местных клеточных иммунных и воспалительных реакций в указанных областях использовали

иммуногистохимические методики для выявления экспрессии маркера TLR2, TLR4, а также наличие и видовой состав колоний микроорганизмов. Для сравнения результатов иммуногистохимического исследования проведено исследование биопсийного материала кожи передней брюшной стенки у практически здоровых лиц соответствующего возраста (5 пациентов), которым выполняли операцию герниопластики.

Результаты и обсуждение. Отслеживается тесный контакт TLR2-позитивных макрофагов в субэпителиальных областях с позитивно окрашенными дендритными клетками эпидермиса, причем в этих зонах экспрессия маркера наблюдалась в эпителиоцитах на всю толщину слоя вплоть до рогового шара. Указанные структурные особенности могут свидетельствовать об активации макрофагов дендритными клетками эпидермиса, которые связывают и концентрируют соответствующие лиганды. Аналогичные изменения определяются и при изучении экспрессии TLR4. В эпидермисе даже после лечения определялось значительное количество TLR4-позитивных дендритных клеток значительно больших размеров, которые распространялись отростками вплоть до рогового шара. Причем отмечалось достаточно интенсивное фоновое цитоплазматическое окрашивание этих клеток. Следует отметить, что в роговых чешуйках кожи отмечались колонии микроорганизмов. Чешуйки рогового слоя больных псориазом имеют рыхлую структуру, что создает условия для колонизации их значительным количеством микроорганизмов, продукты жизнедеятельности которых могут выступать лигандами в активации толл-подобных рецепторов. Результаты иммуногистохимических исследований биопсийного материала, взятого с области кожи, поврежденной псориазом, и с области интактной кожи до и после курса системной иммуносупрессивной терапии, указывают на существенную роль в развитии иммунного воспаления в коже экспрессии толл-подобных рецепторов 2 и 4 (TLR2, TLR4) с учетом наличия микробного компонента в соответствующих областях.

Выводы. У больных псориазом выявлено гиперпродукцию и гиперсекрецию эпителиоцитами кожи провоспалительных биологических маркеров, непосредственно TLR2- и 4-позитивных клеток. При этом соответствующие TLR-позитивные клетки определяются в области как кожи, которая поражена псориазической сыпью, так и интактной. TLR2-, TLR4-позитивные макрофаги после их активации в сосочках дермы мигрируют к основанию сосочков, где включаются в состав воспалительных инфильтратов, расположенных периваскулярно. После лечения больных псориазом с использованием системной иммуносупрессивной терапии в области пораженной псориазической сыпью кожи восстановлено уменьшение количества клеток (как дендритных, так и макрофагов), в которых определяется экспрессия TLR2 и TLR4. Длительное присутствие бактериального компонента в области кожи, пораженной псориазической сыпью, может быть одним из патогенетических стимулирующих факторов активации продукции провоспалительных цитокинов, что способствует поддержанию воспалительного псориазического процесса. Определённая в эпидермисе и дерме больных псориазом экспрессия TLR-позитивных клеток указывает, что важной цепью в патогенезе этого дерматоза является антигенная стимуляция иммунокомпетентных клеток, которая приводит к развитию воспалительного процесса в поверхностных слоях кожи. Дальнейшие углубленные исследования взаимосвязи персистирующих в коже стафилококков с факторами врожденного иммунитета, непосредственно толл-подобными рецепторами, является перспективным в аспекте получения новых данных о патогенезе псориаза с детализацией нарушений врожденного иммунитета и пролиферативной активности кератиноцитов в псориазических бляшках.

Ключевые слова: псориаз, толл-подобные рецепторы, микрофлора кожи, системная иммуносупрессивная терапия.

R.L. Stepanenko, S.G. Svirid

O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv

Value of immunohistochemical expression of Toll-like receptors and microbe components in skin for pathogenesis of psoriasis

Objective – to investigate the mechanisms of local immune inflammation with consideration of changes in immunohistochemical expression of Toll-like receptors in case of presence of microbe components in the skin of patients with psoriasis.

Materials and methods. An immunohistochemical study was conducted of biopsies taken from areas of skin psoriasis rash and intact skin of 74 patients with psoriasis. To determine the nature and extent of local cellular immune and inflammatory responses in these areas we used immunohistochemical techniques for detecting the expression of TLR2, TLR4 markers as well as the presence and species composition of microbial colonies. To compare the results of immunohistochemical study we investigated the biopsy material of anterior abdominal wall skin in healthy age-matched individuals (5 patients) who underwent hernia repair surgery.

Results and discussion. A close contact was revealed of TLR2-positive macrophages in subepithelial areas with positively stained dendritic cells of the epidermis. In these areas, the marker expression was observed in the epithelial cells on the entire thickness of the layer down to the keratic layer. These structural features are indicative of macrophage activation by dendritic cells of the epidermis which bind and concentrate the appropriate ligands. Similar changes are determined in TLR4 expression. Even after treatment we determined a significant number of TLR4-positive dendritic cells of significantly larger size which were distributed in the epidermis down to the keratic layer. Moreover we observed an intense background cytoplasmic staining of these cells. There were colonies of microorganisms in the keratic scales. The scales of the keratic layer of patients with psoriasis have a loose structure, which creates conditions for their colonization by a significant number of microorganisms whose waste products can act as ligands to activation of Toll-like receptors. The results of

immunohistochemical studies of biopsy material taken from the area of skin damaged by psoriasis, and the area of intact skin before and after a course of systemic immunosuppressive therapy, suggest a significant role of Toll-like receptors (TLR2, TLR4) expression and presence of microbial components in the development of immune inflammation.

Conclusions. Patients with psoriasis showed overproduction and hypersecretion of epithelial cells of proinflammatory biomarkers, particularly, TLR2- and TLR4-positive cells. The corresponding TLR-positive cells were found both in psoriatic and intact skin. TLR2- and TLR4-positive macrophages after their activation in the dermal papilla migrate to the base of the papillae, where they penetrate into the inflammatory infiltrates located around blood vessels. After systemic immunosuppressive therapy we observed a reduction of number of cells (both dendritic and macrophages) marked with TLR2 and TLR4 expression. The continued presence of the bacterial component in the area of skin affected with psoriatic rash may be one of the pathogenetic factors stimulating the production of proinflammatory cytokines, which contributes to the inflammatory psoriatic process. The expression of TLR-positive cells in the epidermis and dermis of psoriasis patients indicates that an important link in the pathogenesis of this dermatosis is the antigenic stimulation of immunocompetent cells which leads to the development of inflammation in the superficial layers of the skin. Further in-depth research into the relationship of persistent skin staphylococci with factors of innate immunity, particularly, Toll-like receptors, is promising for obtaining new data on the pathogenesis of psoriasis and detailed information about violations of innate immunity and proliferative activity of keratinocytes in psoriatic plaques.

Key words: psoriasis, Toll-like receptors, microflora of skin, systemic immunosuppressive therapy.

Дані про авторів:

Степаненко Роман Леонідович, к. мед. н., асист. кафедри дерматології та венерології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця

01601, м. Київ, бульв. Тараса Шевченка, 13

E-mail: roman19820324@mail.ru

Свирид Сергій Григорович, д. мед. н., проф. кафедри дерматології та венерології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця