

ДЕРМАТОЛОГІЯ

<https://doi.org/10.35339/ekm.2020.89.04.05>

УДК 616.517-036.17-092:612.017

В.В. Почерніна

Харківський національний медичний університет, Україна

**РОЛЬ TOLL-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ 2-ГО ТА 4-ГО ТИПІВ
У ПАТОГЕНЕЗІ ПРОГРЕСУЮЧОЇ СТАДІЇ
РІЗНИХ КЛІНІЧНИХ ТИПІВ ПСОРІАЗУ**

У статті зроблено огляд на сучасні погляди щодо ролі Toll-подібних рецепторів у системі вродженого імунітету, розглянуто їх роль при псоріазі. Також наведені дані власного дослідження, щодо визначення Toll-подібних рецепторів 2-го та 4-го типів у крові хворих на різні клінічні форми псоріазу у прогресуючій стадії. Було виявлено достовірне підвищення TLR2 у всіх клінічних формах псоріазу. При псоріазі в прогресуючій стадії виявлено достовірне збільшення експресії TLR4 на лімфоцитах периферичної крові при PsE, PsP, dPsV, PsG, а при PsF та lPsV рівень експресії TLR4 на лімфоцитах майже не відрізнявся від аналогічного показника контрольної групи.

Ключові слова: псоріаз, Toll-подібні рецептори, імунітет, еритродермія.

Вступ

На сьогодні псоріаз залишається одним з актуальних і складних захворювань з огляду на патогенетичні особливості, як маніфестації, так і перебігу. Останнім часом провідними фаховими дослідниками ретельно проводиться вивчення ролі вродженого та адаптивного імунітету у виникненні та перебігу псоріазу, зокрема значення сигнальних молекул та Toll-подібних рецепторів (TLRs), які є частиною вродженого імунітету та відносяться до класу сигнальних PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) рецепторів і експресуються на клітинах, що здійснюють першу лінію захисту, а саме нейтрофілах, макрофагах, дендритних, ендотеліальних та епітеліальних клітинах [1–3]. За літературними даними різні дослідники знаходять зміни TLRs в шкірі хворих на псоріаз [4, 5], але ці дані є часом неузгоджені та, навіть, суперечливі [6].

Відомо, що TLRs експресуються на нейтрофілах, макрофагах, дендритних клітинах. Ці клітини здійснюють першу лінію захисту. Взаємодія PAMP з TLR призводить до послідовних етапів розвитку запальної реакції, що

є основним механізмом реалізації вродженого імунітету [7, 8].

Роль і функція TLRs в шкірі людини стали предметом вивчення порівняно недавно. У зарубіжній літературі наводяться нечисленні відомості про наявність різних TLRs на кератиноцитах різних верств епідермісу здорових осіб.

За даними В. Baker, TLRs, які експресуються на клітинах епідермісу, можуть зазнавати зміни шляхом просування кератиноцитів від базального шару епідермісу до рогового [4]. На думку Е. James, кератиноцити шкіри здорових осіб експресують TLR1, TLR2, TLR4 і TLR5 [9]. А. Pivarcsi було встановлено наявність TLR2 і TLR4 у всіх шарах епідермісу шкіри здорових осіб [10]. У дослідженнях М. Mempel [11] показано, що культура первинних кератиноцитів здорової людини виробляє TLR1, TLR2, TLR3, TLR5 і TLR9, разом з тим TLR4, TLR6, TLR7 і TLR8 в цій же культурі не були виявлені.

Ряд авторів вважають, що TLRs активовані кератиноцити здатні ініціювати адаптивну імунну відповідь, зокрема, в дослідженнях

S. Akira було встановлено, що TLR-стимульовані кератиноцити викликали дозрівання дендритних клітин [3].

Роль TLRs при псоріазі дуже мало вивчена. Так, E. Vugone і співавт. виявили виражену експресію TLR1 на кератиноцитах базального шару епідермісу хворих на псоріаз [5]. У дослідженнях В. Baker в ураженій шкірі хворих на псоріаз виявлена виражена експресія TLR2 у верхніх рядах шипуватого шару епідермісу, в той час, як в шкірі здорових осіб та неуразжених ділянках шкіри хворих на псоріаз експресія TLR2 була виявлена в нижніх рядах шипуватого шару, що розташовувалися над базальним шаром [4].

J. Curry і співавт. виявили зменшення експресії TLR5 на кератиноцитах базального шару епідермісу ураженої шкіри хворих на псоріаз у порівнянні зі шкірою здорових осіб [12]. Так само О.Р. Кагуніна і співавт. виявили, що в дермі хворих на псоріаз експресія TLR2 і TLR4 спостерігалася на ендотелії кровоносних судин, клітинах макрофагального і гістіоцитарного ряду запальних інфільтратів [13].

Ряд досліджень показали, що базальні кератиноцити в псоріатичних осередках експресують TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9. Виявлена висока експресія кератиноцитами в псоріатичних висипаннях білків теплового шоку HSPs, які можуть стимулювати секрецію TLR4 на антигенпрезентуючих клітинах, таким чином беруть участь в іммунопатології псоріазу [14].

Імунопатогенез псоріазу складний, багатофакторний і ще недостатньо вивчений. Нині наголошується на системному, запальному та аутоімунному аспектах псоріазу [15, 16]. Toll-подібні рецептори (TLR) характеризуються як рецептори розпізнавання пускових екзогенних факторів виникнення псоріазу, які здатні активувати різні типи імунних клітин. TLR низхідних сигнальних шляхів призводять до вироблення широкого спектра імуностимулюючих цитокінів та хемокінів. Аберантна активація TLR може призвести до необмеженої запальної реакції, тому рецептори можуть відігравати ключову роль у розвитку іммунопатогенезу псоріазу, зокрема запальних та аутоімунних порушень [17]. Тому здається цікавим визначення патогенетичної ролі TLR, зокрема TLR2 та TLR4, при різних клінічних варіантах перебігу псоріазу в прогресуючій стадії.

Матеріали та методи

В основну групу досліджуваних увійшло 100 хворих на псоріаз в прогресуючій стадії,

з них 70 жінок і 30 чоловіків, що страждали на псоріаз в стадії прогресування, у віці 18–60 років, без наявності важкої соматичної або інфекційної патології. Контрольну групу становили 10 практично здорових осіб.

Дослідження експресії поверхневих рецепторів CD282 (TLR 2) і CD284 (TLR 4) на моноцитах периферичної крові проводили методом проточної цитометрії із застосуванням моноклональних антитіл (Becton Dickinson, США). Об'єктом дослідження була венозна кров, отримана шляхом пункції периферичної вени та зібрана у вакуумні пробірки з додаванням К2ЕДТА.

Пробопідготовку та фарбування антитілами проводили за стандартною методикою відповідно до рекомендацій виробника (далі наведено її узагальнений опис).

100 мкл цільної ЕДТА-стабілізованої крові було забарвлено шляхом додавання відповідних моноклональних антитіл, що несуть певну флуоресцентну мітку. Усі процедури виконувалися відповідно до рекомендацій виробника реактивів – Becton Dickinson, USA. В якості ізотипічного контролю використовували аналогічний об'єм антитіл того ж виробника. Клітини інкубували з антитілами в темряві при кімнатній температурі упродовж 30 хв. Після цього для лізису еритроцитів в кожену пробірку додавали 2 мл робочого буферу, який отримували шляхом десятиразового розведення BD PharmLyse™ Lysing Buffer. Після 15 хв. інкубації клітини відмивали (300g, 5 хв. при кімнатній температурі) надлишком забуференого фосфатами фізіологічного розчину. Отриманий осад ресуспендировали у 0,5 мл Stain Buffer (FBS) BD Pharmingen™.

Цитофлуориметричний аналіз пофарбованих зразків проводили на проточному цитометрі Navios™ (BeckmanCoulter, США), оснащеному трьома діодними лазерами (десять кольорів) з використанням єдиних налаштувань приладу для усіх зразків. Дослідження виконувались у день забору крові. Отримані результати було проаналізовано за допомогою програмного забезпечення Navios™ Software v1.2 (BeckmanCoulter, США).

Для кожного зі зразків проводили аналіз не менш ніж 3000 моноцитів.

Надалі була проведена оцінка експресії поверхневих рецепторів CD282 (TLR2) і CD284 (TLR4) на моноцитах по середній інтенсивності флуоресценції MIF (mean intensity of fluorescence), відповідній середній інтенсивності флуоресценції для виділеної гру-

пи клітин. Фактично MIF характеризує рівень експресії зазначених молекул на клітинній поверхні.

Результати та їх обговорення

В результаті проведеного дослідження було встановлено, що рівень експресії TLR2 та TLR4 при різних клінічних формах псоріазу в прогресуючій стадії відрізнявся, а саме: мала місце тенденція до підвищення експресії TLR4 на лімфоцитах при псоріазі згинальних поверхонь (PsF) [(4,8±0,31) mfi] та майже не відрізнялася від контрольних значень [(3,3±0,26) mfi] при локалізованому вульгарному псоріазі (IPsV) [(3,5±0,29) mfi]. Статистично достовірні результати були здобуті щодо підвищення експресії TLR4 при інших клінічних формах перебігу псоріазу в прогресуючій стадії: при пустульозному псоріазі (PsP) рівень експресії TLR4 був підвищений у 3,2 раза, при краплеподібному псоріазі (PsG) – у 2,8 раза, при ерит-

родермічному (PsE) – у 2,7 раза, при дифузному вульгарному псоріазі (dPsV) – у 2 рази у порівнянні з контролем (*рис. 1*).

При визначенні експресії TLR2 на лімфоцитах було встановлено, що рівень її достовірно перевищив аналогічні показники контрольної групи: при пустульозному та креплеподібному псоріазі – у 2 рази, при еритродермічному – у 1,6 раза, при дифузному вульгарному псоріазі – у 2 рази, при псоріазі згинальних поверхонь та локалізованій формі вульгарного псоріазу – у 1,5 раза (*рис. 2*).

Здобуті у дослідженні результати можна пояснити тим, що TLR2 та TLR4 активуються факторами патогенності мікроорганізмів, які вегетують, як на уражених, так і на інтактних ділянках шкіри хворих на псоріаз в прогресуючій стадії захворювання, їх експресія підвищується за дії прозапальних цитокінів. Незначне збільшення експресії TLR4 при IPsV

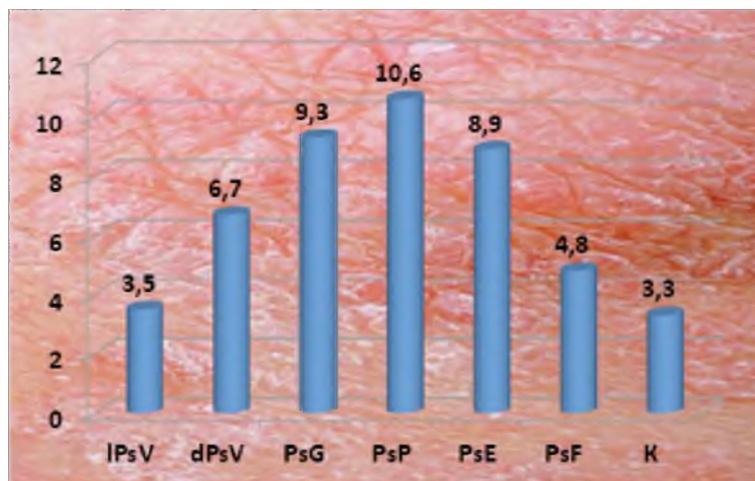


Рис. 1. Рівень експресії TLR4 (mfi) на лімфоцитах хворих на псоріаз в прогресуючій стадії залежно від клінічної форми захворювання

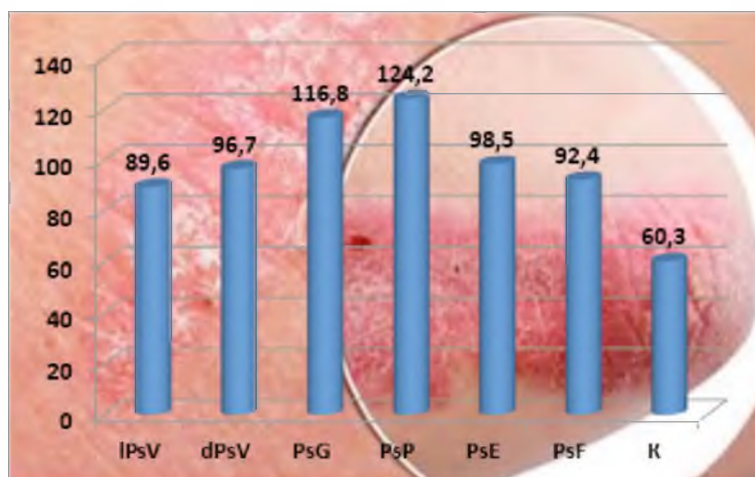


Рис. 2. Рівень експресії TLR2 (mfi) на лімфоцитах хворих на псоріаз в прогресуючій стадії залежно від клінічної форми захворювання

та PsF можливо пов'язано з надмірною стимуляцією Toll-рецепторів екзогенними лігандами до початку або в дебюті захворювання. Розвиток стану рефрактерності TLR в подальшому перебігу захворювання є захисною реакцією від гіперергічного запалення та, за даними літератури, носить транзиторний характер. У випадках PsP, PsE, PsG, dPsV спостерігалось достовірне зростання експресії TLR2 та TLR4 на лімфоцитах, що свідчить про гіперергічну запальну реакцію з залученням в процес судинного тракту. Отже, зростання експресії дослідних типів Toll-рецепторів на лімфоцитах свідчить про активність самого аутоімунного процесу.

Висновки

1. При псоріазі в прогресуючій стадії виявлено достовірне збільшення експресії TLR4 на лімфоцитах периферичної крові при PsE, PsP, dPsV, PsG ($p < 0,01$), а при PsF та IPsV рівень експресії TLR4 на лімфоцитах майже

не відрізнявся від аналогічного показника контрольної групи. Рівень TLR2 був достовірно вищим за показник контрольної групи при всіх клінічних формах псоріазу в прогресуючій стадії захворювання.

2. Найбільше патогенетичне значення в розвитку псоріазу в прогресуючій стадії є експресія TLR2 та TLR4 на лімфоцитах периферичної крові.

3. У хворих на псоріаз встановлено гіперпродукцію і гіперсекрецію епітеліоцитами шкіри прозапальних біологічних маркерів, зокрема TLR4 позитивних клітин. Відповідні TLR4 клітини визначаються, як в уражених псоріатичними висипаннями ділянках шкіри, так і в інтактній шкірі, але кількість відповідних клітин в ділянках ураженої шкіри більше, ніж в інтактній.

Подальше вивчення Toll-подібних рецепторів дозволить покращити розуміння їх ролі в патогенезі псоріазу.

Література

1. Прогноз течения вульгарного псориаза с использованием данных генотипирования толл-подобных рецепторов 4-го и 9-го типов / В. А. Охлопков, А. И. Новиков, А. В. Кононов [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. – 2013. – № 4. – С. 16–20.
2. Песляк М. Ю. Модель патогенеза псориаза. Ч. 1. Системный псориатический процесс // М. Ю. Песляк. – [изд. r4.0 (испр. и доп.)]. – М.: МУРЕ, 2012. – 94 с.
3. Akira S. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity / S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho // Nature Immunol. – 2001. – Vol. 2. – P. 675–680.
4. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: Modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis / B. S. Baker, J. M. Ovigine, A. V. Powles [et al.] // Br J Dermatol. – 2013. – № 48. – P. 670–679.
5. Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin / E. Bugone, L. Michel, B. Flageul [et al.] // Europ J Derm. – 2007. – №17 (6). – P. 497–506.
6. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8 / D. Ganguly, G. Chamilos, R. Lande [et al.]. // J Exp Med. – 2009. – Vol. 206, Issue 9. – P. 1983–1994.
7. Wolkenstein P. Living with psoriasis / P. Wolkenstein // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. – 2006. – Vol. 20, Issue 2. – P. 28–32.
8. Psoriasis in France and associated risk factors: results of a case control study based on a large community survey / P. Wolkenstein, J. Revuz, J. C. Roujeau [et al.] // Dermatology. – 2009. – Vol. 218. – P. 103–109.
9. 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 Dermatol. – 2005. – Vol. 1. – P. 1–8.
10. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes / A. Pivarsci, L. Bodai, B. Rethi [et al.] // Int Immunol. – 2003. – Vol. 15. – P. 721–730.
11. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: Nuclear factor kappaB controlled gene activation by Staphylococcus aureus is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent / M. Mempel, V. Voelcker, G. Kollisch [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2003. – Vol. 121. – P. 1389–1396.
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. – Vol. 127. – P. 178–186.
13. Катуніна О. Р. Современные представления об участии кожи в иммунных процессах / О. Р. Катуніна, А. В. Резайкина // Вестник дерматологии и венерологии. – 2009. – № 2. – С. 36–39.

14. Tian T. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies / T. Tian, Z. Wang, J. Zhang // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2017. – Vol. 45. – P. 351–394.
15. О вирусной этиологии псориаза / В. Ф. Корсун, А. В. Станевич, Н. З. Яговдик, М. М. Левин // *Вести дерматологии.* – 2019. – № 4. – С. 9–11.
16. Ayala-Fontanez N. Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases / N. Ayala-Fontanez, D. C. Soler, T. S. McCormick // *Psoriasis.* – 2016. – Vol. 6. – P. 7–32.
17. Functions of Toll-like receptors as an inborn immunity component and their participation in the pathogenesis of dermatoses of different etiologies / O. R. Katunina [et al.] // *J Exp Med.* – 2011. – Vol. 2. – P. 18–25.

References

1. Okhlopkov V.A., Novikov A.I., Kononov A.V. et al. (2013). Prognostic prediction of the course of psoriasis vulgaris using genotyping data for toll-like receptors of the 4th and 9th types [Prediction of the course of psoriasis vulgaris using genotyping data for toll-like receptors of the 4th and 9th types]. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya – Clinical Dermatology and Venereology*, vol. 4, pp. 16-20 [in Russian].
2. Peslyak M.Yu. (2012). *Model patogeneza psoriaza. Chast 1. Sistemnyy psoriaticheskiy protsess* [Model of pathogenesis of psoriasis. Part 1. Systemic psoriatic process]. (Edition r4.0, revised and supplemented). M.: МУПЕ. 94 p. [in Russian].
3. Akira S., Takeda K., Kaisho T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol.*, vol. 2, pp. 675–680.
4. Baker B.S., Ovigne J.M., Powles A.V. et al. (2013). Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: Modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol.*, vol. 48, pp. 670–679.
5. Bugone E., Michel L., Flageul B. et al. (2007). Expression, subcellular localization and cytokine modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Europ J Derm.*, vol. 17 (6), pp. 497–506.
6. Ganguly D., Chamilos G., Lande R., Gregorio J., Meller S. et al. (2009). Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med.*, vol. 206, issue 9, pp. 1983–1994.
7. Wolkenstein P. (2006). Living with psoriasis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, vol. 20, issue 2, pp. 28–32.
8. Wolkenstein P., Revuz J., Roujeau J.C. et al. (2009). Psoriasis in France and associated risk factors: results of a case control study based on a large community survey. *Dermatology*, vol. 218, pp. 103–109.
9. James E., McInturff R., Modlin J. K. (2005). The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol.*, vol. 1, pp. 1–8.
10. Pivarski A., Bodai L., Rethi B. et al. (2003). Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol*, vol.15, pp. 721–730.
11. Mempel M., Voelcker V., Kollisch G. et al. (2003). Toll-like receptor expression in human keratinocytes: Nuclear factor kappaB controlled gene activation by Staphylococcus aureus is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *J Invest Dermatol.*, vol. 121, pp. 1389–1396.
12. Curry J.L., Qin J.Z., Bonish B. et al. (2003). Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch Path Lab Med.*, vol.127, pp. 178–186.
13. Katunina O.R., Rezykina A.V. (2009). Sovremennyye predstavleniya ob uchastii kozhi v immunnykh protsessakh [Modern ideas about the participation of the skin in the immune processes]. *Vestnik dermatologii i venerologii – Bulletin of Dermatology and Venereology*, vol. 2, pp. 36–39 [in Russian].
14. Tian T., Wang Z., Zhang J. (2017). Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 45, pp. 351–394.
15. Korsun V.F., Stanевич A.V., Yagovdik N.Z., Levin M.M. (2019). О вирусной этиологии псориаза [On the viral etiology of psoriasis]. *Vesti dermatologii – Lead Dermatology*, vol. 4, pp. 9–11 [in Russian].
16. Ayala-Fontanez N., Soler D.C., McCormick T.S. (2016). Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. *Psoriasis*, vol. 6, pp. 7–32.
17. Katunina O.R. et al. (2011). Functions of Toll-like receptors as an inborn immunity component and their participation in the pathogenesis of dermatoses of different etiologies. *J Exp Med.*, vol. 2, pp. 18–25.

В.В. Почернина

РОЛЬ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 2-ГО И 4-ГО ТИПОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ СТАДИИ РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ТИПОВ ПСОРИАЗА

В статье сделан обзор на современные взгляды о роли Toll-подобных рецепторов в системе врожденного иммунитета, рассмотрена их роль при псориазе. Также приведены данные собственного исследования по определению Toll-подобных рецепторов 2-го и 4-го типов в крови больных на различные клинические формы псориаза в прогрессирующей стадии. Было выявлено достоверное повышение TLR2 во всех клинических формах псориаза. При псориазе в прогрессирующей стадии выявлено достоверное увеличение экспрессии TLR4 на лимфоцитах периферической крови при PsE, PsP, dPsV, PsG, а при PsF и IPsV уровень экспрессии TLR4 на лимфоцитах почти не отличался от аналогичного показателя контрольной группы.

Ключевые слова: псориаз, Toll-подобные рецепторы, иммунитет, эритродермия.

V.V. Pochernina

THE ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTORS OF TYPES 2 AND 4 IN THE PATHOGENESIS OF THE PROGRESSIVE STAGE OF VARIOUS CLINICAL TYPES OF PSORIASIS

The article reviews current views on the role of Toll-like receptors in the innate immune system, discusses their role in psoriasis. We also present our own data on the determination of Toll-like receptors of 2 and 4 types in the blood of patients with various clinical forms of psoriasis in the advanced stage. In determining the leading criteria for the etiopathogenesis of psoriasis by establishing the role of Toll-like receptors (TLR) triggering exogenous psoriasis factors that can activate different types of immune cells, it was found that the expression level of TLR2 and TLR4 in different clinical forms of psoriasis in the advanced stage differed, namely: there was a tendency to increase the expression of TLR4 on lymphocytes (8 ± 0.31 mfi) and almost did not differ from the control values (3.3 ± 0.26 mfi) at IPsV (3.5 ± 0.29 mfi). Statistically significant results were obtained to increase the expression of TLR4 in other clinical forms of psoriasis in the advanced stage: with PsP the level of TLR4 expression was increased 3.2 times, with PsG – 2.8 times, with PsE – 2.7 times, at dPsV – 2 times compared with the control. When determining the expression of TLR2 on lymphocytes, it was found that its level significantly exceeded similar indicators of the control group: with PsP and PsG – 2 times, with PsE – 1.6 times, with dPsV – 2 times, with PsF and IPsV – 1.5 times. The results obtained from the study can be explained by the fact that TLR2 and TLR4 are activated by pathogenic factors of microorganisms that grow on both affected and intact areas of the skin of patients with psoriasis in the advanced stage of the disease, their expression is increased by proinflammatory cytokines. A slight increase in TLR4 expression in IPsV and PsF may be associated with excessive stimulation of Toll receptors by exogenous ligands before or at the onset of the disease and the development of TLR refractory in the subsequent development of disease and in some cases is a protective response to hyperergic inflammation.

Keywords: psoriasis, Toll-like receptors, immunity, erythroderma.

Надійшла до редакції 15.11.2020

Відомості про автора

Почерніна Валерія Вадимівна – асистент кафедри дерматології, венерології і СНІДу Харківського національного медичного університету.

Адреса: Україна, 61002, м. Харків, узвіз Куликівський, 15, кафедра дерматології, венерології і СНІДу.

Тел.: +38(093)973-03-59.

E-mail: valeriapochernina@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2701-5125>.