

**ЭКСПРЕССИЯ TLR НА МОНОЦИТАХ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ**

Почернина В.В

Харьковский национальный медицинский университет

Ключевые слова: псориаз, Toll-подобные рецепторы, моноциты

Введение. Одним из важных классов сигнальных патогенраспознающих рецепторов, присутствующих в коже, являются Toll-подобные рецепторы (TLRs), которые после связывания с лигандом претерпевают конформационные изменения и формируют молекулярный каскад передачи сигнала к ядру клетки, что приводит к транскрипции генов провоспалительных цитокинов, молекул адгезии и костимулирующих молекул, инициирующих развитие адаптивного иммунного ответа. Защитные реакции в барьерных тканях направлены на распознавание патогенов, их уничтожение и удаление из организма. То есть от быстрой и эффективной работы компонентов иммунитета в этих тканях зависит исход контакта с патогенами. TLRs это первичные сенсоры микробных продуктов, регистрирующие сигнал опасности исходящий от патогенов и мобилизующий иммунную систему организма на борьбу с инфекционными агентами [1-4].

Существует много различных типов клеток в коже человека, которые экспрессируют TLRs. В эпидермисе было показано, что кератиноциты экспрессируют функциональные TLRs. Кроме того, в коже имеются резидентные и переносящие клетки иммунной системы, которые экспрессируют TLRs, в том числе клетки Лангерганса, моноциты/ макрофаги, дендритные клетки, Т и В-лимфоциты и тучные клетки. Наконец, эндотелиальные клетки микроциркуляторного русла и стромальные клетки, такие как фибробласты и адипоциты, также экспрессируют TLRs . Каждый из этих типов клеток имеет различные паттерны экспрессии TLRs и, вероятно, вносит вклад в кожный иммунный ответ [1-4].

В литературе накапливаются данные о том, что TLRs и их лиганды не только обеспечивают противoinфекционную защиту, но и, способствуя развитию воспалительного ответа, играют немаловажную роль в патогенезе аутоиммунных болезней. В настоящее время TLRs являются предметом активного изучения, как в норме, так и при патологиях. В последние годы возрастает интерес к изучению TLRs при псориазе. Это определяется включением этих рецепторов в общие механизмы защиты, а так же их присутствием на кератиноцитах [5-8].

Участие TLRs в патогенетических механизмах при псориазе подтверждают также исследования, направленные на изучение

эффективности анти-ФНО-терапии, которая показывает ингибирующий эффект на указанные факторы [9].

В патогенезе псориаза определенную роль играет микробный фактор, осложняя течение заболевания. TLR2 и TLR4 способны активировать иммунные клетки в ответ на грамположительные и грамотрицательные бактерии, соответственно. В частности, важная роль стимуляции TLR2 при псориатическом артрите придаётся грамположительному стрептококку [10].

С другой стороны, активация TLRs связана с устойчивостью к патогенным микроорганизмам. Устойчивость к бактериальным кожным инфекциям, например, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), основана на функции интактных врожденных иммунных механизмов. TLR2 распознает компоненты *S.aureus* и, как известно, экспрессируется на моноцитах. Стафилококковые экзотоксины, такие как стафилококковый энтеротоксин В или α -токсин, продуцируются многими штаммами *S.aureus*. α -токсин значительно повышал экспрессию TLR2. Опосредованная TLR2 секреция IL-1 β , IL-6 и IL-8 была значительно увеличена после активации с помощью стафилококковых экзотоксинов. Однако никаких различий не наблюдалось в моноцитах пациентов с псориазом по сравнению со здоровыми контролями [11, 12].

При псориазе наблюдается высокая экспрессия и активность антимикробных пептидов, что ингибирует функцию TLR4 на дендритных клетках и ведет к нарушению созревания дендритных клеток и высвобождения провоспалительных цитокинов, супрессируя тем самым реакции гиперчувствительности и подавляя воспаление. С одной стороны, TLRs могут способствовать повышению уровня антимикробных пептидов и кожных иммунных реакций в псориатических поражениях. С другой стороны, продемонстрировано, что антимикробный пептид кателицидин (LL-37), который обнаружен в большом количестве в псориатической коже, может превращать нестимулирующую аффинную ДНК в мощный активатор TLR9 в дендритных клетках, что приводит к продукции α -интерферона, приводящей к продукции цитокинов Th1 профиля и, вероятно, поддерживает кожное воспаление при псориазе. Это может быть одним из важных механизмов того, как TLRs могут стимулировать аутоиммунитет при псориазе [6, 13-15].

Кроме того, выявлена высокая экспрессия кератиноцитами в псориатических высыпаниях белков теплового шока HSPs, которые могут стимулировать секрецию TLR4 на антигенпрезентирующих клетках, главным образом клетках Лангерганса, играя главную роль в созревании и секреции ФНО и ИЛ-12 и, таким образом, участвуя в иммунопатологии псориаза [6, 16].

Основная масса научных работ показывает экспрессию TLRs на кератиноцитах, хотя немаловажную роль играют TLRs и на моноцитах периферической крови. Такие исследования встречаются крайне редко.

Цель работы - исследовать уровень экспрессии TOLL подобных рецепторов 2 и 4 типа на моноцитах крови больного псориазом и определить их влияние на развитие обострения при псориазе.

Материалы и методы. Больной Ф. обратился в ноябре 2016 на очередной осмотр дерматолога, находясь на диспансерном наблюдении с 2010 года, когда впервые был установлен диагноз: распространенный вульгарный бляшечная псориаз с умеренной степенью инфильтрации, стационарная стадия, умеренно рецидивирующее течение. Начало заболевания и последующие обострения кожного патологического процесса связывал с частыми нервными перенапряжениями. Наследственность по поводу псориазаотягощена по материнской линии. Обострение наблюдал 1 раз в год в зимний период. Неоднократно лечился амбулаторно и стационарно согласно протоколам. В течение 2016-2019 годов больной Ф. был госпитализирован 3 раза с жалобами на массивные высыпания на коже волосистой части головы, туловища, верхних и нижних конечностей . Периоды обострения продолжались от 2 до 3 месяцев.

17.11.2016 Во время осмотра на коже волосистой части головы, передней поверхности туловища, верхних конечностей обнаружено инфильтративные эритематозные очаги. Вся поверхность высыпаний покрыта серебристо-белыми чешуйками, которые легко отслаиваются. Псориатическая триада положительная. Индекс PASI = 38,3. По результатам клинико-лабораторного обследования установлен диагноз: распространенный вульгарный псориаз прогрессивная стадия.

1.11.2017 При осмотре на коже волосистой части головы (затылочной области), передней и задней поверхности туловища, местами на верхних и нижних конечностях обнаружено отечно-инфильтративные эритематозные очаги. Вся поверхность высыпаний покрыта серебристо-белыми чешуйками, которые легко отпадают. Псориатическая триада положительная. На ногтевых пластинках первого и второго пальца обеих рук наблюдаются точечные вдавления («симптом наперстка»). Индекс PASI = 45,8. По результатам клинико-лабораторного обследования установлен диагноз: распространенный вульгарный псориаз с торпидным течением, прогрессивная стадия, умеренно рецидивирующее течение. Псориатическая триада отрицательная.

30.10.2018 Во время осмотра на коже волосистой части головы, всех поверхностях туловища, верхних и нижних конечностей выявлено массивные, отечно-инфильтративные эритематозные очаги. Вся поверхность высыпаний покрыта серебристо-белыми чешуйками. Псориатическая триада положительная. На ногтевых пластинках наблюдаются многочисленные точечные вдавления («симптом

наперстка»), поперечные борозды. Индекс PASI = 53,6. По результатам клинично-лабораторного обследования установлен диагноз: распространенный вульгарный псориаз с торпидным течением и резко выраженной степенью инфильтрации, прогрессивная стадия, умеренно рецидивирующее течение. Псориатическая ониходистрофия. Течение псориаза классифицировано как тяжелое.

Во время каждого обострения болезни, когда больной Ф находился на стационарном лечении, до начала терапии проводились исследования уровня экспрессии TOLL подобных рецепторов 2 и 4 типов.

Кровь набиралась из локтевой (кубитальной) вены. Для уменьшения травматизации пациента процедура забора крови для исследования совпадала во времени со сбором крови для рутинных исследований. Венозную кровь для исследования брали асептически натошак. Как стабилизатор использовать 3,8% раствор цитрата натрия.

Исследование экспрессии поверхностных рецепторов CD282 (TLR 2) и CD284 (TLR 4) на моноцитах периферической крови проводили методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител (Becton Dickinson, США). Цитофлуориметрический анализ окрашенных образцов проводили на проточном цитометре Navios (BeckmanCoulter, США). Проведена оценка экспрессии поверхностных рецепторов CD282 (TLR 2) и CD284 (TLR 4) на моноцитах по средней интенсивности флуоресценции MIF (mean intensity of fluorescence), соответствующей средней интенсивности флуоресценции для выделенной группы клеток. Фактически MIF характеризует уровень экспрессии указанных молекул на клеточной поверхности. Согласно выводам комиссии по вопросам этики и биоэтики ХНМУ описанные в статье методы исследования использовались с соблюдением прав человека, в соответствии с действующим в Украине законодательством, соответствуют международным этическим требованиям и не нарушают этических норм в науке и стандартов проведения биомедицинских исследований.

Результаты и обсуждение

Таблица I. Динамика уровня экспрессии TOLL подобных рецепторов

Показатели	Норма	Дата		
		17.11.16	1.11.17	30.10.18
TLR2	52,0-73,0	99,5	101,0	125,0
TLR4	2,6-3,6	3,2	3,4	3,18

Полученные данные свидетельствуют о том, что экспрессия TLR2 на моноцитах периферической крови была высокой. В то же время

TLR4 был преимущественно в пределах референтных значений $3,3 \pm 0,1$ mfi.

Это может свидетельствовать об участии TOLL-подобного рецептора 2 в обострении заболевания.

Одним из факторов определяющим степень тяжести псориаза является площадь высыпаний. Выявлена достоверная разница площади высыпаний у больного в зависимости от уровня экспрессии TLR2 на моноцитах периферической крови. Площадь высыпаний была больше в случае высокого уровня экспрессии TLR2.

Картина периферической крови, представленная абсолютным количеством иммунокомпетентных клеток, характеризуется повышенным содержанием лейкоцитов за счёт в большей или меньшей степени повышенного количества всех форменных элементов.

Таблица II

Показники	Норма	Дата		
		17.11.16	1.11.17	30.10.18
Эритроциты	4,0-5,0 Т/л	4,96 Т/л	5,0 Т/л	4,7 Т/л
Гемоглобин	130-160 г/л	162 г/л	158 г/л	150 г/л
Кольоровий показник	0,85-1,15	0,93	0,9	0,9
Лейкоциты	4,0-9,0 г/л	8,98 г/л	9,1 г/л	12,1 г/л
Еозінофіли	0,5-5,0%	1%	5%	2%
Палочко ядерні	1,0-6,0%	5%	7%	4%
Сегменто ядерні	47-72%	52%	59%	77%
Моноциты	3,0-11,0%	4%	4%	12%
Лімфоциты	19,0-37,0%	38%	25%	5%
ШОЕ	1-10 мм/год	12мм/год	10мм/год	20мм/год

Степень интенсивности флюоресценции TLR4 на моноцитах периферической крови не различается.

Выводы:

1. Экспрессия TLR2 на моноцитах периферической крови во всех трех исследованиях была высокой. Это свидетельствует о вовлечении этого фактора в патогенез данного заболевания.

2. Моноциты во всех трех исследованиях крови показали крайне высокую интенсивность флюоресценции TLR2 на изучаемых клетках, в 1,5-2 раза превышающую таковую у здоровых лиц

3. Экспрессия TLR4 на моноцитах периферической крови во всех 3 исследованиях были в пределах референтных значений. Что свидетельствует об отсутствие информативности этого фактора в патогенезе псориаза

ЛИТЕРАТУРА

1. Miller L.S. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol.* 2008;24:71-87.
2. [Chen J.Q.](#), [Szodoray P.](#), [Zeher M.](#) Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016; 50(1):1-17
3. [Ermertcan A.T.](#), [Öztürk F.](#), [Gündüz K.](#) Toll-like receptors and skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25(9):997-1006
4. Spivak N.J., Bogdanova I.M., Martirosova N.I. et al. Rol` Toll-podobnih receptorov v regulytsii immunogo otveta v norme i pri patologii [The role of Toll-like receptors in the regulation of the immune response in normal and pathological conditions] *Physiology journal.* 2008; 54 (6): 87-99 (In Russian)
5. Daschuk A.M. Rol` Toll-podobnih receptorov v regulytsii i initsiatsii immunogo otveta pri psoriase [The role of Toll-like receptors in the regulation and initiation of the immune response in psoriasis]. In Plotnikova V.V., Daschuk A.M. Actual problems of dermatology, venereology and AID-infections: materials of scientific-practical conference. Kharkiv: SAM.2015, p. 71-76(In Russian)
6. Sorokina I.V. Toll-podobnie receptori i pervichnoe raspoznavanie patogena pri dermatozah infekcionnoi i neinfekcionnoi etiologii [Toll-like receptors and primary pathogen recognition in dermatoses of infectious and non-infectious etiology], *Immunopathology, allergology, infectology.* 2012; 2:6-15 (In Russian)
7. Kulczycka L., Sysa-Jędrzejowska A., Robak E. Udział receptorów Toll-like w patogenezie wybranych chorób skóry//*Postepy Hig Med Dosw.* 2010; 64: 364-371
8. [Shi G.](#), [Wang T.](#), [Li S.](#), et al. TLR2 and TLR4 polymorphisms in Southern Chinese Psoriasis Vulgaris patients. 2016; 83(2): 145-147.
9. Vagelid P., Exarchou A., Zafiriou E., et al. Effect of TNF- α inhibitors on transcriptional levels of pro-inflammatory interleukin-33 and Toll-like receptors-2 and -9 in psoriatic plaques// *Exp Ther Med.* 2015; 10: 1573-1577
10. [Carrasco S.](#), [Neves F.S.](#), [Fonseca M.H.](#) et al. Toll-like receptor (TLR) 2 is upregulated on peripheral blood monocytes of patients with psoriatic arthritis: a role for a gram-positive inflammatory trigger? *Clin Exp Rheumatol.* 2011; 29(6): 958-962.
11. Valins W., Amini S., Berman B. The Expression of Toll-like Receptors in Dermatological Diseases and the Therapeutic Effect of Current and Newer Topical Toll-like Receptor Modulators. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2010; 3(9): 20-29
12. Niebuhr M., Schorling K., Heratizadeh A. et al. Staphylococcal α -toxin induces a functional upregulation of TLR-2 on human peripheral blood monocytes. *Exp Dermatol.* 2015;24(5): 321-400

13. Lande R., Gregorio J., Facchinetti V. et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 2007; 449(7162): 564–569

14. Büchau A.S., Gallo R.L. Immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clin Dermatol*. 2007; 25(6):616–624.

15. Gilliet M., Lande R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(4):401–407.

16. Seung N.R., Park E.J., Kim C.W. et al. Comparison of expression of heat-shock protein 60, Toll-like receptors 2 and 4, and T-cell receptor gamma delta in plaque and guttate psoriasis. *Cutan Pathol*. 2007; 34(12):903–911.

ЭКСПРЕССИЯ TLR НА МОНОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

Почернина В.В

Аннотация: Toll-подобные рецепторы являются сигнальными паттернраспознающими рецепторами, которые играют немаловажную роль в инициации иммунного ответа при псориазе. В литературе имеется очень мало сведений о исследовании этих рецепторов в крови. Цель данной работы - исследовать уровень экспрессии TOLL подобных рецепторов 2 и 4 типа на моноцитах крови больного псориазом. С 2016 по 2018 года было проведено трехкратное исследование TLRs 2 и 4 в крови у больного псориазом во время обострения до начала лечения. Исследование экспрессии поверхностных рецепторов CD282 (TLR 2) и CD284 (TLR 4) на моноцитах периферической крови проводили методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител. Полученные данные свидетельствуют о том, что экспрессия TLR2 на моноцитах периферической крови была высокой. В то же время TLR4 был преимущественно в пределах референтных значений $3,3 \pm 0,1$ mfi.. Таким образом, проведенные исследования показали, что: экспрессия TLR2 на моноцитах периферической крови во всех трех исследованиях была высокой. Это свидетельствует о вовлечении этого фактора в патогенез данного заболевания. Моноциты во всех трех исследованиях крови показали крайне высокую интенсивность флуоресценции TLR2 на изучаемых клетках, в 1,5-2 раза превышающую таковую у здоровых лиц. Экспрессия TLR4 на моноцитах периферической крови во всех 3 исследованиях были в пределах референтных значений. Что свидетельствует об отсутствие информативности этого фактора в патогенезе псориаза

ЕКСПРЕСІЇ TLR НА МОНОЦИТИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА ПСОРИАЗ

Почерніна В.В

Анотація: Toll-подібні рецептори є сигнальними паттернраспознаючими рецепторами, які грають важливу роль в

ініціації імунної відповіді при псоріазі. У літературі є дуже мало відомостей про дослідження цих рецепторів в крові. Мета даної роботи - дослідити рівень експресії TOLL подібних рецепторів 2 та 4 типу на моноцитах крові хворого на псоріаз. З 2016 по 2018 року було проведено триразове дослідження TLRs 2 і 4 в крові у хворого на псоріаз під час загострення до початку лікування. Дослідження експресії поверхневих рецепторів CD282 (TLR 2) і CD284 (TLR 4) на моноцитах периферичної крові проводили методом проточної цитометрії із застосуванням моноклональних антитіл. Отримані дані свідчать про те, що експресія TLR2 на моноцитах периферичної крові була високою. У той же час TLR4 був переважно в межах референтних значень $3,3 \pm 0,1$ mfi .. Таким чином, проведені дослідження показали, що: експресія TLR2 на моноцитах периферичної крові у всіх трьох дослідженнях була високою. Це свідчить про залучення цього фактора в патогенез даного захворювання. Моноцити у всіх трьох дослідженнях крові показали вкрай високу інтенсивність флюоресценції TLR2 на досліджуваних клітинах, в 1,5-2 рази перевищує таку у здорових осіб. Експресія TLR4 на моноцитах периферичної крові у всіх 3 дослідженнях були в межах референтних значень. Що свідчить про відсутність інформативності цього фактора в патогенезі псоріазу

EXPRESSION OF TLR ON PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH PSORIASIS

Pochernina V.V.

Abstract: Toll-like receptors are signaling pattern recognition receptors that play an important role in the initiation of an immune response in psoriasis. In the literature there is very little information about the study of these receptors in the blood. The aim of this work is to investigate the level of expression of TOLL-like receptors of type 2 and 4 on blood monocytes of a patient with psoriasis. From 2016 to 2018, a triple study of TLRs 2 and 4 in the blood of a patient with psoriasis was performed during an exacerbation before treatment. A study of the expression of surface receptors CD282 (TLR 2) and CD284 (TLR 4) on peripheral blood monocytes was performed by flow cytometry using monoclonal antibodies. The data obtained indicate that the expression of TLR2 on peripheral blood monocytes was high. At the same time, TLR4 was predominantly within the reference values of 3.3 ± 0.1 mfi .. Thus, the studies performed showed that: TLR2 expression on peripheral blood monocytes in all three studies was high. This indicates the involvement of this factor in the pathogenesis of this disease. Monocytes in all three blood tests showed an extremely high TLR2 fluorescence intensity on the studied cells, 1.5-2 times higher than that in healthy individuals. The expression of TLR4 on peripheral blood monocytes in all 3 studies was within the reference values. This indicates the lack of informational content of this factor in the pathogenesis of psoriasis