



О.С. Жеребятъев, О.М. Камишний

## ВПЛИВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІЛЕЇТУ НА ЕКСПРЕСІЮ TLR-2 ЛІМФОЦИТАМИ ТОНКОЇ КИШКИ

Запорізький державний медичний університет

**Ключові слова:** тонка кишка, ілеїт, TLR-2.

В експерименті досліджували вплив гострого ілеїту на інтенсивність експресії TLR-2 лімфоцитами тонкої кишки. Для визначення TLR-2<sup>+</sup>-клітин застосовано метод прямої імунофлуоресценції з використанням моноклональних антитіл до TLR-2 щура. Встановлено, що розвиток ілеїту супроводжувався збільшенням кількості TLR-2<sup>+</sup>-лімфоцитів і впливав на їхню щільність на цитоплазматичній мембрані.

### Влияние экспериментального илеита на экспрессию TLR-2 лимфоцитами тонкой кишки

А.С. Жеребятъев, А.М. Камышный

В эксперименте исследовали влияние острого илеита на интенсивность экспрессии TLR-2 лимфоцитами тонкой кишки. Для определения TLR-2<sup>+</sup>-клеток применен метод прямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к TLR-2 крысы. Установлено, что развитие илеита сопровождалось увеличением количества TLR-2<sup>+</sup>-лимфоцитов и влияло на их плотность на цитоплазматической мембране.

**Ключевые слова:** тонкая кишка, илеит, TLR-2.

### Influence of experimental ileitis on expression of TLR-2 in lymphocytes of small intestine

A.S. Zherebiatiev, A.M. Kamyshnyi

We studied the effect of acute ileitis on expression intensity of TLR-2 in lymphocytes of small intestine. The TLR-2<sup>+</sup> cells were determined using a direct immunofluorescence technique with using a monoclonal rat anti-TLR-2 antibody. We established that development of ileitis was accompanied with the increase of amount of TLR-2<sup>+</sup> lymphocytes and this had influence on their density on cytoplasmic membrane.

**Key words:** small intestine, ileitis, TLR-2.

Запальні захворювання кишечника (ЗЗК), до яких належать неспецифічний виразковий коліт (НВК) і хвороба Крона (ХК), є однією з найактуальніших проблем сучасної гастроентерології, що зумовлено їх рецидивуючим перебігом і несприятливим медико-соціальним прогнозом, оскільки ЗЗК призводять до збільшення інвалідності та смертності людей працездатного віку [1]. Важливим патогенетичним фактором розвитку ЗЗК є порушення взаємодії між компонентами вродженої імунної системи кишечника і коменсальною мікрофлорою [2]. Значну роль у цьому процесі можуть відігравати Toll-подібні рецептори (Toll-like receptors – TLR), що є представниками суперродини трансмембранних сигнальних образрозпізнаючих рецепторів (pattern-recognition receptors – PRR) і беруть участь в ідентифікації патоген-асоційованих молекулярних образів (pathogen-associated molecular patterns-PAMP) мікроорганізмів та індукції генів адаптивної імунної відповіді [3]. Одним із таких рецепторів є TLR-2, який функціонально пов'язаний із цитоплазматичною мембраною клітини і розпізнає PAMP бактерій, грибів, вірусів і паразитів, котрі містять ліпопротеїди, ліпотейхоєві кислоти, пептидоглікан, ліпоарабіноманнан, зімосан, хітин, гемаглютиніни, глікоінозитолфосфоліпіди, поріни [4]. Як правило, TLR-2 утворює гетеродимери з TLR-1 для розпізнавання грам-негативних бактерій і мікобактерій, бактерій роду *Neisseria* або з TLR-6 для ідентифікації грам-позитивних бактерій, мікобактерій і мікоплазм, а також білків теплового шоку HSP70 [4].

#### МЕТА РОБОТИ

Вивчення експресії TLR-2 лімфоцитами тонкої кишки щурів лінії Вістар в умовах експериментального індометацин-індукованого ілеїту.

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконано на 20 самцях-щурах лінії Вістар вагою 115–135 г. Експериментальну частину роботи виконували відповідно до національних «Загальних етичних принципів досліджень на тваринах» (Україна, 2001) і положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1985). Тварини розподілені на дві групи по 10 щурів у кожній. Перша група – контрольні тварини, друга – тварини з експериментальною патологією – гострим індометацин-індукованим ілеїтом (ГІІ). ГІІ індукували одноразовим підшкірним введенням 0,15% розчину індометацину (Sigma, США) в дозі 15 мг/кг [5]. На 5 добу після введення індометацину тварин виводили з експерименту декапітуванням під наркозом. Вилучали ділянки клубової кишки, які на 20 годин занурювали у фіксатор Буена.

Структуру популяції TLR-2<sup>+</sup>-лімфоцитів вивчали на основі аналізу серійних гістологічних зрізів і даних їхніх морфометричних і денситометричних характеристик. Для здійснення дослідження на ротаційному мікроскопі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи клубової кишки, які потім депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%), відмивали у 0,1 М фосфатному буфері (pH=7,4) і фарбували гематоксиліном-еозином або моноклональними антитілами (МКАТ) до TLR-2 (NucultBiotech, Нідерланди), кон'югованими з флуоресцеїну ізотіоціанатом (FITC), протягом 18 годин у вологій камері при T = 4°C. Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і розміщували в суміші гліцерину і фосфатного буфера (9:1) для подальшої люмінесцентної мікроскопії.

Оброблені гістологічні зрізи вивчали за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (NIH, США). Зображення, отримане на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (FITC) за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина), негайно вводили в комп'ютер. При цьому в автоматичному режимі визначали області зі статистично значущою флуоресценцією, характерною для лімфоїдних клітин, що експресують TLR-2. Обчислювали морфометричні й денситометричні характеристики імунітопозитивних клітин. При фарбуванні МКАТ досліджували TLR-2<sup>+</sup>-лімфоцити, розташовані у власній пластинці слизової оболонки ворсинок (ВПСОВ) й ізольованих лімфоїдних вузликах (ІЛВ).

Усі отримані експериментальні дані оброблено на персональному комп'ютері за допомогою пакета прикладних і статистичних програм EXCEL з пакета MS Office 2010 (Microsoft Corp., США), STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Для виявлення вірогідності різниць результатів досліджень у групах тварин визначали коефіцієнт Стьюдента (t), після чого визначали можливість різниці вибірок (p) і довірчий інтервал середньої. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез вважали рівним 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток ГПШ у тварин супроводжувався макроскопічними змінами в тонкому кишечнику, зокрема появою вираженого набряку, гіперемії, множинних ерозій і виразок. При гістологічному дослідженні тканин, забарвлених гематоксиліном-еозином, спостерігали ознаки запалення з пошкодженням епітеліального бар'єра, дефектами ворсинок і сильною інфільтрацією власної пластинки слизової оболонки нейтрофілами, макрофагами і лімфоцитами.

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих із МКАТ до TLR-2, засвідчив, що сумарна щільність TLR-2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ становила 31±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 23% більше, ніж у ІЛВ (табл. 1). Серед TLR-2<sup>+</sup>-клітин в обох досліджених морфофункціональних зонах переважали TLR-2<sup>+</sup>-мали лімфоцити, на частку яких припадало близько половини від загальної кількості імунітопозитивних лімфоцитів, тоді як найменше представленими у структурі популяції ВПСОВ були TLR-2<sup>+</sup>-середні лімфоцити, в ІЛВ – TLR-2<sup>+</sup>-лімфобласти (табл. 1).

Встановлено, що розвиток ГПШ супроводжувався збільшенням сумарної щільності популяції TLR-2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ на 19% (p<0,05) і в ІЛВ на 92% (p<0,05). При цьому вивчення розподілу окремих класів TLR-2<sup>+</sup>-клітин у ВПСОВ засвідчило збільшення щільності популяції (ЩП) TLR-2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів (на 50%, p<0,05) і TLR-2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів (на 25 %, p<0,05) у порівнянні з контролем, а також збільшення відсоткової долі TLR-2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів (на

Таблиця 1

Кількість TLR-2<sup>+</sup>-лімфоцитів у клубовій кишці щурів (M±m)

Серії	TLR-2 <sup>+</sup> лімфобласти	TLR-2 <sup>+</sup> середні лімфоцити	TLR-2 <sup>+</sup> мали лімфоцити	Сумарна щільність TLR-2 <sup>+</sup> лімфоцити
Власна пластинка слизової оболонки ворсинок				
контроль	8±1 27,5±1,7%	6±1 18,9±1,7%	16±1 53,6±3,3%	31±1
гострий ілеїт	9±1 23,9±1,4%	9±1 <sup>1</sup> 23,3±1,3% <sup>1</sup>	20±1 <sup>1</sup> 52,8±2,3%	37±1 <sup>1</sup>
Ізольовані лімфоїдні вузлики				
контроль	4±1 16,4±1,5%	8±1 35,0±1,8%	12±1 48,5±2,7%	24±1
гострий ілеїт	12±1 <sup>1</sup> 26,3±1,8% <sup>1</sup>	13±1 <sup>1</sup> 28,5±1,6% <sup>1</sup>	21±1 <sup>1</sup> 45,2±3,0%	46±2 <sup>1</sup>

Примітка: в чисельнику – щільність популяції TLR-2<sup>+</sup> лімфоцитів (на 1 мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів TLR-2<sup>+</sup> лімфоцитів; <sup>1</sup> – вірогідність відмінностей показників p<0,05 стосовно контролю.

Таблиця 2

Щільність TLR-2 (УО<sub>10</sub>) у лімфоцитах клубової кишки (M±m)

Серії	TLR-2 <sup>+</sup> лімфобласти	TLR-2 <sup>+</sup> середні лімфоцити	TLR-2 <sup>+</sup> мали лімфоцити
Власна пластинка слизової оболонки ворсинок			
контроль	0,562±0,012	0,321±0,003	0,143±0,002
гострий ілеїт	0,590±0,012	0,314±0,002	0,149±0,002 <sup>1</sup>
Ізольовані лімфоїдні вузлики			
контроль	0,511±0,012	0,313±0,003	0,165±0,002
гострий ілеїт	0,588±0,014 <sup>1</sup>	0,316±0,002	0,156±0,002 <sup>1</sup>

Примітка: <sup>1</sup> – вірогідність відмінностей показників p<0,05 стосовно контролю.



23%,  $p < 0,05$ ). В ІЛВ спостерігали ще вираженішу тенденцію до збільшення кількості TLR-2<sup>+</sup>-лімфоцитів. Так, ЩП TLR-2<sup>+</sup>-лімфоцитів зростає втричі ( $p < 0,05$ ), TLR-2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів – на 63% ( $p < 0,05$ ), TLR-2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів – на 75% ( $p < 0,05$ ) порівняно з контролем, а у структурі популяції відсоток частка TLR-2<sup>+</sup>-лімфоцитів збільшувалась (на 60%,  $p < 0,05$ ), і TLR-2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів зменшувалась (на 19%,  $p < 0,05$ ) (табл. 1). Вивчення щільності TLR-2 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ГПІ супроводжувався вірогідним збільшенням цього показника в TLR-2<sup>+</sup>-малих лімфоцитах ВПСОВ порівняно з контролем, а в ІЛВ визначено різноспрямовану тенденцію до збільшення щільності TLR-2 в лімфоцитах (на 15%,  $p < 0,05$ ) і зменшення в малих лімфоцитах (на 6%,  $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Дані наукової літератури засвідчують неоднорідний рівень експресії TLR-2 різними типами клітин ШКТ. І якщо їх наявність на АПК і кишкового епітелію функціонально зрозуміла (сенсінг PAMP, збереження щільних контактів між епітеліоцитами) [4], то наявність рецепторів вродженого імунітету на клітинах адаптивної імунної системи (Т- і В-лімфоцитах) викликає багато питань. Т-лімфоцити розрізняють за рівнем експресії TLR-2. Так, на CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> Т-клітинах пам'яті й активованих лімфоцитах їх експресія істотно більше, ніж на наївних CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Т-клітинах, і TLR-2 виконують у цьому випадку костимуляторні функції [6]. Рівень мРНК TLR-2 у цитотоксичних лімфоцитах у 7–10 разів більше, ніж у наївних CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитах. При цьому TLR-2 мають прямі ефекти на Т-лімфоцити, що їх експресують. До них належить підвищення клітинної проліферації та виживання, стимулювання цитотоксичної активності антиген-активованих CD8<sup>+</sup> Т-клітин і посилення продукції ними IFN- $\gamma$  і гранзиму В, генерація Т-клітин пам'яті у відповідь на слабкі сигнали від Т-клітинних рецепторів, збільшення проліферації Т-регуляторних лімфоцитів (Treg) [7]. Крім того, TLR-2 також стимулюють Treg, що призводить до секреції трансформуючого фактора росту TGF- $\beta$ , який має важливе значення для репарації тканин і відновлення кишкового епітелію. TLR-2 є потужними індукторами протизапального інтерлейкіну-10 (IL-10), який інгібує ефекторні функції макрофагів і дендритних клітин, обмежуючи гіперактивацію імунної відповіді [8].

Найбільший інтерес викликають дані про прямий вплив TLR-2 на Т-регуляторні клітини і Т-хелпери 17 типу, що їх експресують. Цей вплив здатен змінювати баланс Treg/Th17. З одного боку, сигналізація через TLR-2 виступає в ролі модулятора функцій Treg і підсилює в них експресію Foxp3, а у нокаутних за TLR-2<sup>-/-</sup> мишей менша кількість CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg-клітин у порівнянні з контролем [8]. З іншого боку, незважаючи на те, що введення агоністів TLR-2 стимулюють проліферацію Treg, їхні супресорні функції можуть бути тимчасово пригнічені. Крім того, посилення експресії TLR-2 на наївних лімфоцитах може стимулювати синтез IL-17 і їх диференціювання в напрямі Th17-клітин, а також провокувати утворення навіть із зрілих Treg-клітин лімфоцитів із так званим «Th17-подібним фенотипом» і скороченою супресорною активністю [9].

Експресія TLRs відіграє важливу роль і при В-клітинному диференціюванні та активації, регулює гуморальні імунні відповіді, включаючи формування ГЦ і продукцію аутоантитіл [10]. Так, Meffre (2011) продемонстрував збільшення кількості аутореактивних В-клітин і 30-разове зменшення утворення IgG у пацієнтів, дефектних за адаптерною молекулою MyD88 у В-лімфоцитах, що здійснює внутрішньоклітинну передачу сигналів з TLR [11]. Стимуляція зрілих В-лімфоцитів лігандами до їх TLR призводить до проліферації цих клітин і диференціюванню їх у плазмодити [12].

Отримані результати не суперечать даним інших дослідників, які визначили важливу роль TLR-2 у розвитку ЗЗК. Зокрема, Tanaka K. et al. (2008) при вивченні експресії Toll-подібних рецепторів у слизовій оболонці кишечника пацієнтів із ЗЗК виявив збільшення рівня TLR-2 і TLR-4 у клубовій кишці порівняно зі здоровими волонтерами [13]. Аналогічні результати отримали Szébeni B. et al. (2008), вивчаючи цю патологію у дітей [14]. Frolova L. et al. (2008), які вивчали біоптати пацієнтів з ЗЗК, показали значне підвищення експресії TLR-2 у клубовій кишці у хворих із хворобою Крона і виразковим колітом [15]. Candia E. et al. (2012) визначили, що у таких пацієнтів відбувається збільшення вироблення розчинної форми TLR-2 мононуклеарними клітинами власної пластинки слизової оболонки кишечника [16]. Noronha A. et al. (2009) прийшли до висновку, що клінічна активність хвороби Крона безпосередньо корелює з В-клітинною експресією TLR-2 і продукцією такими клітинами IL-8 [17], а Cario E. (2008) встановила, що TLR-2 відіграють ключову роль у підтримці цілісності слизової оболонки в мишачій моделі пошкодження епітеліального бар'єра кишечника [18].

Разом з тим, є й протилежні погляди на цю проблему. Так, Mowat A. (2010) показав, що нокаут за TLR-2 не перешкоджає розвитку різних моделей ЗЗК у експериментальних тварин [19]. Крім того, Foxp3<sup>+</sup> Treg, здатні запобігати розвитку ЗЗК, не обов'язково мають експресувати TLR-2 безпосередньо [19]. Можливо, ці розбіжності зумовлені тим, що TLR-2 сигналізація відіграє важливішу роль при гострих запальних процесах у кишечнику, а не при хронічних, а також при використанні різних експериментальних моделей ЗЗК (хімічно індуктованих і генетичних, пов'язаних із нокаутом певних генів).

## ВИСНОВКИ

1. TLR-2 активно експресуються клітинами адаптивної імунної системи – Т- і В-лімфоцитами. Рівень цієї експресії здатний здійснювати прямі ефекти на функціональний стан лімфоцитів, впливаючи на рівень їх диференціювання, виживання та проліферації.

2. В умовах гострого ілеїту спостерігають збільшення кількості TLR-2<sup>+</sup>-лімфоцитів, змінюється їхня щільність на цитоплазматичній мембрані, що може бути одним із факторів, які підтримують прогресування ЗЗК.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kaser A. Inflammatory Bowel Disease / Kaser A., Zeissig S., Blumberg R. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 573–621.
2. Malloy K. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory



- bowel disease / Maloy K., Powrie F. // *Nature*. – 2011. – Vol. 474. – P. 298–306.
3. *Song D.* Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors / Song D., Lee J. // *Immunol Rev.* – 2012. – Vol. 250 (1). – P. 216–219.
  4. *Borrello S.* TLR2: a crossroads between infections and autoimmunity? / Borrello S., Nicolt C., Delogu G. // *Int J Immunopathol Pharmacol.* – 2011. – Vol. 24 (3). – P. 549–456.
  5. *Nandi J.* TNF-alpha modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis / Nandi J, Saud B, Zinkievich J, Yang Z, Levine R. // *Mol Cell Biochem.* – 2010. – Vol. 336 (1–2). – P. 17–24.
  6. *Komai M.* TLR2 is expressed activated T cells as a costimulatory receptor/ Komai M., Jones L., Ogg G., Xu D., Liew F. // *PNAS.* – 2004. – Vol. 101. – P. 3029–3034.
  7. *Chapman N.* Distinct signaling pathways regulate TLR2 costimulatory function in human T cells / Chapman N., Bilal M., Houtman J. // *Cellular Signalling.* – 2013. – Vol. 25. – P. 639–650.
  8. *Liu G.* Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells / Liu G, Zhao Y. // *Immunology.* – 2007. – Vol. 122. – P. 149–156.
  9. *Reynolds J.* Toll-like receptor 2 signaling in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease / Reynolds J., Pappu B., Peng J. // *Immunity.* – 2010. – Vol. 32. – P. 692–702.
  10. *Hua Z.* TLR signaling in B-cell development and activation / Hua Z., Hou B. // *Cellular & Molecular Immunology.* – 2013. – Vol. 10. – P. 103–106.
  11. *Meffre E.* The establishment of early B cell tolerance in humans: lessons from primary immunodeficiency diseases // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2011. – Vol. 1246. – P. 10–11.
  12. *Green N.* Toll-like receptor driven B cell activation in the induction of systemic autoimmunity/ Green N, Marshak-Rothstein A. // *Semin.Immunol.* – 2011. – Vol. 23. – P. 106–112.
  13. *Tanaka K.* Expression of Toll-like receptors in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease / Tanaka K. // *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2008. – Vol. 2 (2). – P. 193–196.
  14. *Szebeni B.* Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease / Szebeni B. // *Clin. Exp.Immunol.* – 2008. – Vol. 151 (1). – P. 34–41.
  15. *Frolova L.* Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis / Frolova L., Drastich P., Rossmann P. // *J.Histochem.Cytochem.* – 2008. – Vol. 56 (3). – P. 267–274.
  16. *Candia E.* Increased production of soluble TLR2 by lamina propria mononuclear cells from ulcerative colitis patients / Candia E., Дназ-Жимйнез D., Langjahr P. // *Immunobiology.* – 2012. – Vol. 217 (6). – P. 634–642.
  17. *Noronha A.* Hyperactivated B cells in human inflammatory bowel disease. / Noronha A. M., Liang Y., Hetzel J. T. // *J.Leukoc. Biol.* – 2009. – Vol. 86 (4). – P. 1007–1016.
  18. *Cario E.* Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. / Cario E. // *Mucosal Immunol.* – 2008. – Vol. 1. – P. 62–66.
  19. *Mowat A.M.* Does TLR2 regulate intestinal inflammation? / Mowat A.M. // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – Vol. 40 (2). – P. 318–320.

**Відомості про авторів:**

Жеребятєв О.С., ст. лаборант каф. мікробіології, вірусології та імунології ЗДМУ.

Камишний О.М., д. мед. н., доцент, зав. каф. мікробіології, вірусології та імунології ЗДМУ.

Поступила в редакцію 16.04.2013 г.