



Л.Н. Мамедова¹, Г.Н. Тарасова¹, Е.А. Чумакова², И.Г. Столярова¹

ДИНАМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ TOLL-РЕЦЕПТОРОВ У БОЛЬНЫХ С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

¹Ростовский государственный медицинский университет

Кафедра пропедевтики внутренних болезней

Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29, e-mail: lili.mamedova@yandex.ru

²МБУЗ «Городская больница №1» им. Н.А. Семашко

городская иммунологическая лаборатория

Россия, 344000, г. Ростов-на-Дону, пр. Ворошиловский, 105.

Цель: динамическое определение TLR 2,4,6 у больных с рецидивом ЯК с оценкой возможности использования показателей, характеризующих состояние системы TLR, в качестве маркеров достижения ремиссии.

Материалы и методы: В исследовании приняло участие 86 больных с рецидивом ЯК, 39 из которых достигли клинико-эндоскопической ремиссии. Экспрессию TLR на моноцитах периферической крови определяли в иммунофлуоресцентном тесте с использованием мышиных моноклональных антител к TLR2 (CD14+CD282+), TLR4 (CD14+CD284+) и TLR6 (CD14+CD286+), конъюгированных с FITC (изотиоцианат флуоресцеина) и PE (фикоэритрин) - меченые (HyCultbiotechnology, Голландия).

Результаты: количества моноцитов, экспрессирующих TLR 2,4,6 находились в прямой зависимости от стадии и течения заболевания.

Заключение: возможно использование количества моноцитов, экспрессирующих TLR 2,4,6 в качестве маркера достижения клинической ремиссии ЯК.

Ключевые слова: язвенный колит, врожденный иммунитет, toll-like receptors..

L.N. Mamedova¹, G.N. Tarasova¹, E.A. Chumakova¹, I.G. Stolyarova¹

DYNAMICALLY DETERMINE TOLL-RECEPTORS PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS

¹Rostov State Medical University,

Department propaedeutic of internal medicine

29 Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia. E-mail: lili.mamedova@yandex.ru

²Semashko «Hospital №1»

City immunological laboratory

105, Voroshilovsky av., Rostov-on-Don, 344000, Russia.

Purpose: Dynamic determination of TLR 2,4,6 in patients with relapsed UC with an assessment of the use of indicators characterizing the state of TLR, as markers of remission.

Materials and Methods: The study included 86 patients with recurrent UC, 39 of which have reached clinical and endoscopic remission. TLR expression on peripheral blood monocytes was determined in immunofluorescence test using monoclonal antibodies to TLR2 (CD14+CD282+), TLR4 (CD14+CD284+) и TLR6 (CD14+CD286+), conjugated with FITC (fluorescein isothiocyanate) and PE (phycoerythrin) - labeled (HyCultbiotechnology, Holland).

Results: number of monocytes expressing TLR 2,4,6 increased activation of the inflammatory process, with remission rates expression of TLR 2,4,6 not different from those in the control group.

Conclusion: you can use the number of monocytes expressing TLR 2,4,6 as a marker of remission.

Keywords: ulcerative colitis, innate immunity, toll-like receptors.



Введение

Язвенный колит (ЯК) является хроническим идиопатическим заболеванием желудочно-кишечного тракта, поражающим толстую кишку и представляющим одну из основных нозологических форм, входящих в группу воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Этиология ЯК до сих пор неизвестна, но заболевание рассматривается как многофакторное, с участием генетических, иммунологических и экологических компонентов. Из факторов окружающей среды выделяют, в первую очередь, инфекционные агенты, нарушающие естественную микрофлору кишечника. При этом известно, что кишечная стенка представляет первое препятствие на пути проникновения бактерий в виде многокомпонентной системы, где механическим барьером является кишечный эпителий, иммунным - лимфоидная ткань кишечника, кишечная слизь, продуцирующая иммуноглобулины, антимикробные пептиды, а кишечная микрофлора представляет собой биологическую преграду [1]. Кроме этого, она непрерывно контролирует состав микробиоты кишечника и обеспечивает выработку эндогенных антимикробных факторов для поддержания иммунного гомеостаза. Установлено, что бактерии играют ключевую роль в инициации и прогрессии ВЗК, и врожденные иммунные процессы, которые являются жестко определенными структурными компонентами микробного мира, интегральные участники развития воспаления, ассоциированного с ВЗК. В настоящее время известно, что стимулировать мощный иммунный ответ вследствие взаимодействия со структурами клеточной стенки могут так называемые образраспознающие рецепторы, среди которых наиболее изучены toll-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLR) [2]. В организме млекопитающих обнаружено 11 TLR, каждому из которых соответствует свой лиганд, при взаимодействии с которым в дальнейшем запускается каскад реакций, приводящих к ответу организма [2]. Можно предположить, что в случае сбоя в системе врожденного иммунного ответа гиперактивация TLRs эндогенными лигандами бактерий может быть одним из основных механизмов реактивации хронического воспаления в толстой кишке и формирования раннего рецидива ЯК. Снижение экспрессии TLR следует расценивать как признак иммунодефицитного состояния организма [3, 4].

Цель исследования - динамическое определение TLR 2,4,6 у больных с рецидивом ЯК с оценкой возможности использования показателей, характеризующих состояние системы TLR, в качестве маркеров достижения ремиссии.

Материалы и методы

В исследовании приняло участие 86 больных (37 - мужчин, 49 - женщин) с рецидивом ЯК. Средний возраст составил $38,7 \pm 12,9$ лет, в группе контроля - 20 практически здоровых добровольцев в возрасте $26,1 \pm 1,9$ лет. В ходе исследования 39 (45,3%) больных достигли стадии клиническо-эндоскопической ремиссии. Под клинико-эндоскопической ремиссией понимали отсутствие или незначительную выраженность основных клинических симптомов и полное заживление слизистой оболочки, под рецидивом заболевания - появление типичных симпто-

мов заболевания у больных с ЯК в стадии клинической ремиссии, спонтанно или медикаментозно поддерживаемой [5]. Диагноз больных устанавливался после выполнения стандартного протокола клинико-инструментального обследования, включающего эндоскопические и морфологические методы исследования. Лечение осуществлялось в соответствии со стандартами ведения больных с воспалительными заболеваниями кишечника [5].

В зависимости от локализации (распространенности) воспалительного процесса больные были стратифицированы на 3 группы: 1 группа - 15 (17,4%) больных с дистальной формой ЯК, 2 группа - 42 (48,8%) больных с левосторонней формой и 3 группа - 29 (33,7%) больных с тотальной формой заболевания. Преобладали больные со средне-тяжелым и тяжелым течением ЯК: 45 (52,3%) и 28 (32,6%) больных соответственно, легкая форма ЯК отмечалась у 13 больных (15,1%).

Экспрессию TLR на моноцитах периферической крови определяли в иммунофлуоресцентном тесте. Оценивали процент моноцитов (CD14⁺ -клеток), несущих на своей поверхности TLR 2,4,6. Для этого проводили поверхностное окрашивание клеток моноклональными антителами (MkAT), конъюгированными с фикоэритрином (PE), к маркеру моноцитов CD14 (Beckman Coulter, США) и мышиными моноклональными антителами к TLR2 (CD14⁺CD282⁺), TLR4 (CD14⁺CD284⁺) и TLR6 (CD14⁺CD286⁺), конъюгированными с FITC (изотиоцианат флуоресцеина) и меченые PE (фикоэритрин) (HyCultbiotechnology, Голландия). В исследовании также использовали соответствующие изотипические контроли, подготовленные аналогичным образом. Двухцветный анализ проводили на проточном лазерном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Для статистической обработки данных использовался пакет Access, Excel программы Microsoft Office 2010. Данные, полученные с использованием встроенных математических модулей Access Microsoft Office 2010, были подвергнуты полному статистическому анализу с использованием программ БИОСТАТ 4.03 и Statistica release 6.0 for Windows (StatSoft, USA). В различных статистических ситуациях (количественные, качественные показатели; малые группы, ассиметричное распределение) использовались как параметрические, так и непараметрические статистические критерии. Полученные результаты оценивали как статистически значимые при значениях $p < 0,05$. Все данные представлены в виде средних величин $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

Средние значения количества CD14⁺CD282⁺ - клеток в период обострения ЯК составили $80,6 \pm 1,5\%$, в период ремиссии значения соответствовали $64,8 \pm 1,4\%$. Количество клеток с фенотипом CD14⁺CD284⁺ в период обострения и ремиссии составили $12,6 \pm 0,5\%$ и $6,9 \pm 0,7\%$, а CD14⁺CD286⁺ - $8,5 \pm 0,5\%$ и $4,1 \pm 0,4\%$ соответственно. Гендерные отличия экспрессии TLR 2,4,6 были статистически недостоверны. Количество CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺ и CD14⁺CD286⁺ среди лиц женского и мужского пола в исследовательской базе пациентов составило: $81,6 \pm 1,6\%$ и $79,3 \pm 2,7\%$; $12,7 \pm 0,5\%$ и $12,3 \pm 0,7\%$; $8,3 \pm 1,4\%$ и $11,4 \pm 0,7\%$ соответственно ($p > 0,05$).



Таблица 1

Экспрессия TLR 2, 4, 6 в зависимости от длительности ЯК, М±m

Длительность заболевания	Группа контроля (n=20)	Впервые выявленный (n=18)	1-5 лет (n=21)	5-10 лет (n=25)	Более 10 лет (n=22)
TLR2 (CD14+ CD282+) % клеток	66,7±0,8	78,7±4,2	77,4±2,5	85,9±1,1	88,1±0,8
TLR4 (CD14+CD284+) % клеток	3,7±0,3	12,7±1,1*	11,9±0,5*	13,2±0,8*	15,3±1,2*
TLR4 (CD14+CD286+) % клеток	3,4±0,2	9,1±0,7*	8,6±0,5*	9,2±0,7*	10,1±0,8*

*- p<0,05 (по сравнению с показателями группы контроля)

У больных с ЯК (табл. 1) зарегистрирована статистически достоверная зависимость экспрессии TLR 4 и 6 от длительности заболевания. Так, в группе с впервые выявленным ЯК количество моноцитов CD14+, отражающих экспрессию TLR4 и TLR6 в 3,4 и 2,6 раза превышало значения группы контроля. Максимальные значения установлены при длительности заболевания более 10 лет: 15,3±1,2% и 10,1±0,8%, что в 4,1 и 3 раза превышало

значения в контрольной группе здоровых добровольцев (p<0,05). Изменение прироста моноцитов CD14+CD282+ было менее динамично и при детальном анализе зарегистрирована лишь тенденция к увеличению экспрессии TLR2 с максимальным приростом в группе с длительностью ЯК в интервалах 5-10 лет и более 10 лет: на 20% (85,9±1,1%) и 32% (88,1±0,8%) соответственно (p>0,05).

Таблица 2

Экспрессия TLR 2,4,6 в зависимости от протяженности воспалительного процесса у больных с ЯК в период рецидива заболевания, М±m

Локализация воспаления	Группа контроля (n=20)	Дистальный (n=15)	Левосторонний (n=42)	Тотальный (n=29)
TLR2 (CD14+CD282+) % клеток	66,7±0,8	82,3±3,6	82,4±1,6	76,7±3,3**
TLR4 (CD14+CD284+) % клеток	3,7±0,3	12,3±0,9	12,8±0,5	12,2±0,8**
TLR6 (CD14+CD286+) % клеток	3,4±0,2	8,4±0,6	9,1±0,5	8,1±0,7**

*- p<0,05 (по сравнению с показателями группы контроля)

** - p>0,05 (внутригрупповое сравнение между дистальной и тотальной формой заболевания)

Внутригрупповой анализ количественных характеристик моноцитов CD14⁺⁺ констатировал их конкордатный рост в период рецидива ЯК, однако зависимость между распространенностью воспалительного процесса в толстой кишке и увеличением количества моноцитов не зарегистрирована (p>0,05) (табл. 2). В этой связи был проведен внутригрупповой анализ изменений количества моноцитов CD14⁺⁺ в период рецидива и ремиссии заболевания (табл. 3).

Как следует из представленных данных, практически во всех группах наблюдения зарегистрировано снижение экспрессии TLR 2,4,6 в период ремиссии. Максимальное снижение количества CD14⁺⁺ CD284⁺ (5,3±0,5%) и (6,7±0,9%) было зарегистрировано в группах с дистальной и левосторонней локализацией воспаления соответственно, что в 1,6 и 1,9 раза было ниже их уровня в период рецидива заболевания (p<0,05). Экспрессия CD14⁺ CD282⁺ во всех группах снизилась до уровня значений группы контроля.



Таблица 3

Сравнительный анализ количества CD14+CD282+-, CD14+CD284+-, CD14+CD286+- клеток у больных с ЯК в период рецидива и ремиссии

Локализация Стадия	Дистальный		Левосторонний		Тотальный		Группа контроля
	рецидив	ремиссия	рецидив	ремиссия	рецидив	ремиссия	
TLR2 (CD282+) % клеток	82,3±3,6	65,2±3,3*	82,4±1,6	64,1±2,0*	76,7±3,3	65,8±2,1	66,7±0,8
TLR4 (CD284+) % клеток	12,3±0,9	5,3±0,5*	12,8±0,5	6,7±0,9*	12,2±0,8	7,9±1,4*	3,7±0,3
TLR6 (CD286+) % клеток	8,4±0,6	3,1±0,7*	9,1±0,5	4,1±0,4*	8,1±0,7	4,6±1,0*	3,4±0,2

Примечание: * - $p < 0,05$ (по сравнению с показателями в период рецидива ЯК)

Аналогичные изменения зарегистрированы при оценке количества моноцитов, экспрессирующих TLR6 (CD286+) при дистальной и левосторонней форме ЯК: снижение в 2,7 ($3,1 \pm 0,7\%$) и 2,2 ($4,1 \pm 0,4\%$) раза соответственно (табл.3).

Выводы

У больных с рецидивом ЯК регистрируется увеличение количества моноцитов в периферической крови, ответственных за экспрессию TLR 2,4,6, зависящее от стадии и длительности заболевания.

При достижении клинко-эндоскопической ремиссии ЯК регистрируется статистически достоверное снижение количества моноцитов, экспрессирующих TLR 2,4,6, зависящее от локализации воспалительного процесса в толстой кишке.

Количественная оценка моноцитов, экспрессирующих на своей поверхности TLR 2,4,6 может явиться интегральным маркером прогноза формирования клинко-эндоскопической ремиссии заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cucchiara S., Stronati L., Aloï M. Interactions between intestinal microbiota and innate immune system in pediatric inflammatory bowel disease // J. Clin. Gastroenterol. – 2012. – Vol. 46. – Suppl. S. 64-6.
2. Trine H. Mogensen. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses // Clin. Microbiol. Rev. – 2009 Vol. 22(2). – P. 240–273
3. Kumar H., Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and innate immunity // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2009. – Vol. 388(4). – P. 621-625
4. Gersemann M., Wehkamp J., Stange E. F. Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease // Journal of Internal Medicine. – 2012. – Vol. 271. – P. 421–428
5. Гастроэнтерология. Национальное руководство / под ред. В.Т. Ивашкина, Т.Л. Лапиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2011. – 480с.

ПОСТУПИЛА: 14.04.2013