

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ TLR4 ТА TLR-АКСЕСУАРНИХ МОЛЕКУЛ У ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГАСТРОДУОДЕНІТ

О.Є. Абатуров, О.М. Герасименко

Дніпропетровська державна медична академія

Резюме. В статті наведені дані щодо особливості експресії TLR4 в біоптаті слизової оболонки шлунка (СОШ) та вмісту sCD14 у сироватці крові дітей, хворих на хронічний гастродуоденіт, асоційований з *H. pylori*, в стадії загострення. Показано, що у дітей розвиток хронічного гастродуоденіту, асоційованого з *H. pylori*, супроводжується підвищенням експресії в СОШ TLR4, який є ключовим сенсором для LPS *H. pylori*, та низьким рівнем sCD14.

Ключові слова: хронічний гастродуоденіт, діти, *Helicobacter pylori*, TLR4, sCD14.

Вступ

Визнання інфекційного чинника в етіології хронічної гастродуоденальної патології зумовило активне вивчення особливостей патогенезу та перебігу захворювань, асоційованих з *Helicobacter pylori*. Колонізація шлунково-кишкового тракту *H. pylori* не завжди призводить до розвитку патологічного процесу. Відповідь організму на *H. pylori* залежить від стану імунітету людини, як вродженого, так і адаптивного, кількості рецепторів на поверхні шлунка, що сприяють адгезії мікроорганізму, вірулентності *H. pylori* тощо.

В основі хронічного НР-асоційованого гастродуоденіту лежить хронічна запальна реакція на вплив *H. pylori*. Інфекція характеризується хронічним хвилеподібним багаторічним перебігом з тенденцією до прогресування та поширення процесу.

Розкриття молекулярних механізмів неспецифічного вродженого імунітету, зокрема ролі Toll-like-рецепторів (TLR) та TLR-аксесуарних молекул, дало можливість уточнити значення останніх у розвитку хелікобактерної інфекції у дітей.

В основі клінічних проявів запалення лежить неспецифічна захисна реакція організму на вплив будь-якого екзогенного або ендогенного пошкоджуючого фактора, основною метою якої є елімінація патогенного агента, локалізація його дії і репарація пошкоджених органів і тканин. Захист макроорганізму від патогенних інфекційних агентів обумовлений функціонуванням двох взаємопов'язаних ієрархічних імунних систем — неспецифічної вродженої та специфічної адаптивної. Неспецифічні механізми вродженого імунітету є філогенетично більш давньою системою захисту організму від агресивної дії мікроорганізмів порівняно з адаптивною імунною системою. На відміну від специфічної відповіді імунної системи, для розвитку якої потрібен певний час, реакція неспецифічних механізмів захисту практично миттєва.

Рекогніція патогенних мікроорганізмів, у тому числі і в травному тракті, обумовлена сукупністю різноманітних солютабних, мембранних та цитоплазматичних рецепторів розпізнавання образів (PRR). PRR розпізнають унікальні, що не мають аналогів у макроорганізмі, консервативні молекулярні структури — патоген-асоційовані молекулярні структури (pathogen-associated molecular patterns — PAMP). Найбільш відомими PAMP грамнегативних бактерій, в т.ч. *H. pylori*, є ліпополісахариди (LPS) — структурні компоненти зовнішньої мембрани *H. pylori*.

Всі ідентифіковані до теперішнього часу види PRR характеризуються здатністю розпізнавати PAMP неза-

лежно від стадії життєвого циклу патогенних інфекційних агентів і конститутивно експресуватися клітинами макроорганізму, причому їх експресія не пов'язана з механізмами імунної пам'яті [1,3,5]. PRR існують у клітинно-асоційованому і солютабному стані. При взаємодії з PAMP інфекційних агентів відбувається активація PRR, яка призводить до розвитку захисної запальної реакції. PRR, що присутні у всіх клітинах імунної системи, зумовлюють неспецифічну захисну реакцію організму і формують наступну відповідь адаптивної імунної системи [4,10,11,12,16].

Для TLR характерна дуже низька щільність експресії по відношенню до інших мембранозв'язаних білків. Характерною особливістю онтогенетичної експресії TLR є поступове збільшення щільності рецепторів на поверхні мембран клітини протягом інтра- та постнатального розвитку індивідуума [6,19]. Рівень експресії TLR не є постійною величиною, активність експресії швидко збільшується у відповідь на вплив PAMP інфекційних агентів і зменшується в умовах відсутності специфічних лігандів [9].

Рекогніція PAMP інфекційних агентів TLR відбувається при безпосередній їх взаємодії або при взаємодії, опосередкованій аксесуарними молекулами.

Особливу роль у розвитку інфекційно-запального процесу, викликаного грамнегативними інфекційними агентами, у тому числі *H. pylori*, грає TLR4. Рецептор TLR4 — ключовий сенсор для LPS *H. pylori*. У рекогніції LPS *H. pylori* також беруть участь і аксесуарні молекули — ліпополісахарид-зв'язуючий білок (LBP), CD14, MD-2 [2,7]. Спочатку в екстрацелюлярному просторі LPS зв'язується з солютабним LBP, який функціонує як опсонін для глікозилфосфатидилінозитол (GPI)-пов'язаного білка CD14. Протеїн CD14 існує у двох формах — солютабній (sCD14) і мембранозв'язаній (mCD14). Комплекс LPS-LBP транспортується в печінку і зв'язується з mCD14 на поверхні макрофагів. Асоційований з цитоплазматичною мембраною клітини мультимер LPS/TLR4/MD-2, взаємодіючи з адаптерними молекулами MyD88, призводить до збудження каскаду сигнальних молекул і запуску внутрішньоклітинних молекулярних шляхів, які обумовлюють продукцію прозапальних цитокінів, хемокінів, активованих кисневмісних метаболітів і активних радикалів азоту, формуючи Th1-відповідь [14].

Адекватна PRR-асоційована відповідь організму обумовлює ефективну ерадикацію патогенного інфекційного агента, репарацію пошкоджених тканин, запобігання розвитку хвороби, а в разі захворювання — вилікування

Таблиця

Рівень sCD14 в сироватці крові та експресія TLR4 в біоптаті СОЖ дітей, хворих на хронічний гастродуоденіт (M±m)

| Показник | ХГД НР «+» | ХГД НР «-» |
|---------------|--------------|----------------|
| sCD14, ng/ml* | 4009,5±401,8 | 15033,3±1531,3 |
| TLR4** | 1,59±0,14 | 1,28±0,12 |

Примітка: * sCD14 – рівень солотабного CD14; ** TLR4 – експресія TLR4 по відношенню до β-актину (Δ Cp).

пацієнта. Однак дефіцитне збудження рецепторів при взаємодії з лігандами може стати основною причиною хронізації запалення, а надмірне – зумовити розвиток гострої системної запальної відповіді або виникнення аутоімунного процесу. У зв'язку з чим розуміння механізмів лігандопосередкованого порушення PRR – найважливіша умова для подальшого удосконалення методів лікування та профілактики захворювань, зокрема хронічної хеликобактерасоційованої гастродуоденальної патології [18].

Мета дослідження: визначення особливостей експресії TLR4 в біоптаті слизової оболонки шлунка (СОШ) та вмісту sCD14 у сироватці крові дітей, хворих на хронічний гастродуоденіт, асоційований з *H. pylori*, в стадії загострення.

Матеріал і методи дослідження

Під спостереженням перебувало 33 дітини у віці від 8 до 17 років, які були обрані методом випадкових чисел, хворі на хронічний гастродуоденіт в стадії загострення. Всім дітям для верифікації діагнозу, поряд із з'ясуванням скарг і анамнезу захворювання, фізикальним оглядом, загальноклінічним лабораторним обстеженням, проведено ендоскопічне дослідження стравоходу, шлунка та дванадцятипалої кишки за загальноприйнятою методикою з узяттям біоптатів [2] слизової оболонки антрального відділу шлунка. Для діагностики НР-інфекції використовували: швидкий уреазний тест «Хелпіл»-тест (ТОВ «АМА», Росія, Санкт-Петербург); дихальний «Хелік»-тест з використанням індикаторних «Хелік»-трубок (ТОВ «АМА», Росія, Санкт-Петербург); визначення наявності антигену (Ag) *H. pylori* у калі за допомогою СІТО TEST, визначення в сироватці венозної крові сумарних імуноглобулінів (IgM, IgA, IgG) до Ag CagA білка *H. pylori* методом ІФА (використовували діагностичні тест-системи «Хеліко-Бест-антитіла», «Вектор-Бест», Росія). Метод твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) застосовували для оцінки концентрації в сироватці крові sCD14, використовуючи ELISA test kit (Diacclone, Франція). Середня концентрація sCD14 для 73 зразків нормальної сироватки людини дорівнює 7,4 μg/ml. Сироватка попередньо розведена в 100 разів, результати наведені після множення на фактор розведення в ng/ml (нг/мл).

Рівень експресії гена TLR4 визначався методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) у режимі реального часу (Real-time). Виділення загальної РНК з клітин СОШ проводили за допомогою комплексу реагентів «РИБО-золь-В» (AmpliSens, Росія). Для отримання кДНК в реакції оберненої транскрипції використовували праймер оліго(dT)18. Аналізували експресію гена Toll-подібного рецептора TLR4 методом ПЛР в реальному часі в присутності барвника SYBR Green I, шляхом відносного кількісного аналізу. В якості референтного гена використовували ген β-актину. Для аналізу даних застосовували відносний Cp метод з розрахунком за формулою:

$$\Delta Cp = Cp(TLR4) - Cp(\beta\text{-актину}).$$

Результати дослідження та їх обговорення

Діти, які знаходились під наглядом, були розподілені на дві групи за наявністю *H. pylori*. В І групу увійшли 26 (78,8%) дітей, хворих на хронічний *H. pylori*-асоційований гастродуоденіт (ХГД НР «+»), в ІІ – 7 (21,2%) дітей, хворих на хронічний гастродуоденіт, не асоційований з хеликобактерною інфекцією (ХГД НР «-»), в стадії загострення. Хлопчики в І групі дітей склали 73,1%, у ІІ групі – 71,4%; дівчатка – 26,9% і 28,6% відповідно. Середній вік

дітей, хворих на хронічний *H. pylori*-асоційований гастродуоденіт, був 14,12±2,42 року, у ІІ групі – 16,14±0,64 року.

Результати досліджень експресії TLR4 в біоптаті СОЖ дітей, хворих на хронічний гастродуоденіт, та рівня sCD14 в сироватці крові наведені в таблиці.

Рівень sCD14 був значно збільшений у сироватці крові дітей, хворих на ХГД НР «-» порівняно з показниками в групі дітей, хворих на ХГД НР «+» (середнє значення 15033,3 ng/ml та 4009,5 ng/ml відповідно в ІІ та в І групах).

Експресія TLR4 в біоптаті СОШ дітей, хворих на ХГД НР «+», була збільшена порівняно з показниками дітей, хворих на ХГД НР «-» (середнє значення 1,59 та 1,28 відповідно в І та в ІІ групах).

Результати дослідження дозволяють припустити, що розвиток у дітей хронічного гастродуоденіту, асоційованого з *H. pylori*, супроводжується підвищенням експресії в СОШ TLR4, який є ключовим сенсором для LPS *H. pylori*. Подібні дані наведені в роботах Shigetada Teshima і співавторів [13,20], зокрема автори надали докази безпосереднього впливу LPS *H. pylori* на активність запального процесу СОШ. Надалі й інші дослідники показали, що при хеликобактерній інфекції саме з дією LPS *H. pylori* асоційована продукція прозапальних цитокінів, хемокінів та ін., які є медіаторами запального процесу слизової оболонки шлунка і зумовлюють перебіг захворювання [2,13,20].

Отримані нами результати щодо значного підвищення рівня sCD14 у дітей, хворих на ХГД НР «-», порівняно з показниками в групі дітей, хворих на ХГД НР «+», можуть свідчити, що хеликобактерна інфекція розвивається за наявності зниженого рівня sCD14. Ймовірно, дані щодо інтактності LPS *H. pylori* більшою мірою свідчать не про відсутність взаємодії LPS *H. pylori* з TLR4, а про перешкоджання взаємодії LPS *H. pylori* з TLR-аксесуарною молекулою sCD14 при його високому рівні. Взаємодія комплексу LPS/LBP з достатньою кількістю солотабної форми sCD14 зумовлює його зв'язування і передачу сироватковим ліпопротеїнам високої щільності, які слугують своєрідним «стоком» LPS, що забезпечує елімінацію LPS з організму і, таким чином, знижує виразність LPS-асоційованих ефектів. При зменшеному рівні sCD14, ймовірно, комплекс LPS/LBP взаємодіє з мембранозв'язаною формою mCD14 і каталізує зв'язування LPS з мембрано-асоційованим протеїном MD-2. Мультіммер LPS/TLR4/MD-2 призводить до збудження каскаду сигнальних молекул, активації певних факторів транскрипції, які посилюють експресію генів, відповідальних за синтез прозапальних цитокінів. Активація синтезу і секреції прозапальних цитокінів призводить до розвитку запальної реакції в СОШ.

Висновки

1. У дітей, хворих на хронічний гастродуоденіт, асоційований з *H. pylori*, розвиток запального процесу в слизовій оболонці шлунка обумовлений взаємодією LPS *Helicobacter pylori* як з TLR4, так і з TLR-аксесуарною молекулою sCD14.
2. Від рівня sCD14 і експресії TLR4 на епітеліоцитах СОШ залежить виразність LPS-асоційованих ефектів *Helicobacter pylori*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абатуров А. Е. Молекулярные механизмы неспецифической защиты респираторного тракта: распознавание патоген-ассоциированных молекулярных структур / А. Е. Абатуров // *Здоровье ребенка*. — 2006. — № 2. — С. 87—92.
2. Абатуров О. Є. Модуляція активності TLR4 епітеліоцитів слизової оболонки шлунка при хелікобактерній інфекції / О. Є. Абатуров, О. М. Герасименко // *Совр. педиатрия*. — 2009. — № 6 (28). — С. 141—146.
3. Захарова Л. А. Эволюция адаптивного иммунитета / Л. А. Захарова // *Известия РАН*. — 2009. — № 2. — С. 143—154. — (Серия биологическая).
4. Лебедев К. А. Иммунология образраспознающих рецепторов (интегральная иммунология) / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. — Кн. дом «ЛИБРОКОМ», 2009. — 256 с.
5. Сківка Л. М. Реакції за участю Toll-like-рецепторів у протективному імунітеті та за патологічних станів / Л. М. Сківка, В. В. Позур // *Укр. біохім. журн.* — 2008. — Т. 80, № 3. — С. 5—20.
6. Толстопятова М. А. Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии инфекционной патологии у новорожденных детей / М. А. Толстопятова, Г. А. Буслаева, И. Г. Козлов // *Педиатрия*. — 2009. — Т. 87, № 1. — С. 115—120.
7. Akashi-Takamura S. TLR accessory molecules / S. Akashi-Takamura, K. Miyake // *Curr Opin Immunol.* — 2008. — Vol. 20, № 4. — P. 420—5.
8. Akira S. Pathogen recognition and innate immunity / S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi // *Cell*. — 2006. — Vol. 124, № 4. — P. 783—801.
9. Akira S. TLR signaling / S. Akira // *Curr Top Microbiol Immunol.* — 2006. — Vol. 311. — P. 1—16.
10. Bauer S. Pattern recognition by Toll-like receptors. Review / S. Bauer, T. Muller, S. Hamm // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2009. — Vol. 653. — P. 15—34.
11. CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9 / Baumann C. L., Aspalter I. M. Sharif O. [et al.] // *J. Exp Med.* — 2010. — Vol. 207, № 12. — P. 2689—701.
12. Gon Y. Toll-like receptors and airway inflammation / Y. Gon // *Allergol Int.* — 2008. — Vol. 57, № 1. — P. 33—7.
13. Guinea pig gastric mucosal cells produce abundant superoxide anion through an NADPH oxidase-like system / Teshima S., Rokutan K., Nikawa T., Kishi K. // *Gastroenterology*. — 1998. — Vol. 115, № 5. — P. 1186—1196.
14. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. / Ishii K. J., Koyama S., Nakagawa A. [et al.] // *Cell Host Microbe*. — 2008. — Vol. 3, № 6. — P. 352—63.
15. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition / R. Jerala // *Int. J. Med. Microbiol.* — 2007. — Vol. 297, № 5. — P. 353—63.
16. Kawai T. Toll-like receptor downstream signaling / T. Kawai, S. Akira // *Arthritis Res Ther.* — 2005. — Vol. 7, № 1. — P. 12—9.
17. Liu A. H. Innate microbial sensors and their relevance to allergy / A. H. Liu // *J. Allergy Clin Immunol.* — 2008. — Vol. 122, № 5. — P. 846—58.
18. Monie T. P. Structure and regulation of cytoplasmic adapter proteins involved in innate immune signaling / T. P. Monie, M. C. Moncrieffe, N. J. Gay // *Immunol Rev.* — 2009. — Vol. 227, № 1. — P. 161—75.
19. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells / Mazoni A., Spitzer J. H., Wylie D. H. [et al.] // *J. Immunol.* — 2001. — Vol. 166, № 1. — P. 249—55.
20. Teshima S. Helicobacter pylori lipopolysaccharide enhances the expression of NADPH oxidase components in cultured guinea pig gastric mucosal cells / S. Teshima, S. Tsunawaki, K. Rokutan // *FEBS. Lett.* — 1999. — Vol. 452, № 3. — P. 243—246.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ TLR4 И TLR-АКСЕССУАРНЫХ МОЛЕКУЛ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРОДУОДЕНИТОМ

А.Е. Абатуров, О.Н. Герасименко

Резюме. В статье приведены данные об особенностях экспрессии TLR4 в биоптате слизистой оболочки желудка (СОЖ) и содержания sCD14 в сыворотке крови детей, больных хроническим гастродуоденитом, ассоциированным с *H. pylori*. Показано, что у детей развитие хронического гастродуоденита, ассоциированного с *H. pylori*, сопровождается повышением экспрессии в СОЖ TLR4, который является ключевым сенсором для LPS *H. pylori*, и низким уровнем sCD14.

Ключевые слова: хронический гастродуоденит, дети, *Helicobacter pylori*, TLR4, sCD14.

EXPRESSION TLR4 AND TLR-ACCESSORY MOLECULES IN CHILDREN WITH CHRONIC GASTRODUODENITIS

A.E. Abatur, O.N. Gerasimenko

Summary. The article presents data on peculiarities of the expression of TLR4 in biopsies of gastric mucosa and the content of sCD14 in the serum of children with chronic gastroduodenitis associated with *H. pylori* in the acute stage. Shown that development in children of chronic gastroduodenitis associated with *H. pylori*, accompanied by increased expression of gastric mucosa in TLR4, which is a key sensor for LPS *H. pylori*, and low sCD14.

Key words: chronic gastroduodenitis, children, *Helicobacter pylori*, TLR4, sCD14.