

УДК 616.94+612.017

DOI: 10.14427/jipai.2015.2.71

## Клиническая значимость экспрессии TLR2, TLR4 на клетках миелоидного ряда и сывороточного уровня цитокинов у пациентов с сепсисом

В.А. Лазанович, Е.В. Маркелова, А.В. Караулов \*

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток

\*ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России г. Москва

## Clinical significance of expression TLR2, TLR4 on the cell of the myeloid series and the serum cytokine levels in patients with sepsis

V.A. Lazanovich, E.V. Markelova, A.V. Karaulov \*

State budget educational institute of higher professional education Pacific State Medical University of Ministry of health of Russia, Vladivostok

\* State budget educational institute of higher professional education First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov

### Аннотация

Запуск иммунного ответа на внедрение бактериальных агентов реализуется через активацию механизмов врожденного иммунитета на клетках миелоидного ряда. В исследование были включены 38 пациентов, исследовали прогностическое значение уровня экспрессии TLR2, TLR4, CD14 на моноцитах и TLR2, TLR4 на нейтрофилах у пациентов с сепсисом, в зависимости от тяжести течения и клинических исходов заболевания, их взаимосвязь с содержанием уровня сывороточных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10. Для более тяжелого течения септического процесса характерно снижение уровня TLR2 на моноцитах. Предиктором неблагоприятного прогноза исходов сепсиса являются низкие показатели MFI на моноцитах TLR2 и TLR4 на нейтрофилах. Более низким показателям экспрессии MFI TLR2 и TLR4 на моноцитах, соответствовали высокие значения содержания IL-10.

### Ключевые слова

TOLL-рецепторы, моноциты, нейтрофил, цитокины, сепсис

### Summary

Starting of the immune response to the introduction of bacterial agents is realized through the activation of innate immunity mechanisms for cells of the myeloid series. The study included 38 patients. We studied the prognostic value of the expression level of TLR2, TLR4, CD14 on monocytes and TLR2, TLR4 on neutrophils in patients with sepsis, depending on the severity of the disease and clinical outcomes, their relationship with the contents of the level of serum cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10. More severe course of sepsis is characterized by reduction of TLR2 on monocytes. Predictors of poor prognosis of sepsis outcomes are the low levels of MFI on TLR2 and TLR4 monocytes on neutrophils. Lower rates of expression of MFI TLR2 and TLR4 on monocytes correspond to high values of the content of IL-10.

### Key words

TOLL-Like receptors,, monocytes, neutrophils, cytokines, sepsis

### **Введение**

Хирургический сепсис остается сложной мультидисциплинарной проблемой современной медицины, характеризуется неуклонной

тенденцией к росту, высокой летальностью, большими финансовыми затратами [1]. Понимание иммунопатогенеза при септических состояниях, поиск новых биомаркеров и стратегий

лечения, является актуальной задачей современной медицины.

В основе реакции организма на бактериальное повреждение лежит воспаление, которое в норме носит защитно-приспособительный характер. При сепсисе, воспалительная реакция в ответ на инфекцию приобретает генерализованное, неконтролируемое течение, вместо защиты приводит к повреждению собственных тканей и органов, а нередко к летальному исходу.

Запуск иммунного ответа на внедрение бактериальных агентов реализуется через активацию механизмов врожденного иммунитета. Образ распознающие рецепторы - PRRs (pattern recognition receptors) на иммунных клетках являются ключевыми в этом процессе. Они распознают молекулярных структуры (группы молекул) ассоциированных с патогеном (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) липопротеиды, пептидогликаны, липотейхоевые и маннуроновые кислоты, липополисахарид (LPS), флагеллин и др., а также эндогенные лиганды - Danger-associated molecular patterns (DAMPs), которые в большом количестве синтезируются при массивном бактериальном повреждении, некрозе тканей, травмах, ожогах [2].

TLRs - рецепторы наиболее хорошо изученная подгруппа PRR. Они относятся к суперсемейству IL-1R/TLR (IL-1 receptor type /Toll-like receptor) и представляют трансмембранные гликопротеины I типа, состоящие из внеклеточного лейцин содержащего домена LRR (Leucine-Rich Repeat domain) контактирующего с лигандом, коротким трансмембранным участком и внутриклеточного компонента TIR (Toll-interleukin-1 receptor) - домена. Взаимодействие лигандов и данного сигнального комплекса (сигналы) приводит к активации факторов транскрипции NFκB (nuclear factor kappa B), AP-1 (activator protein 1) и IRF-3 и 5 (interferon response factor) клетки. В результате чего, происходит связывание с промоторными участками генов молекул, активирующих и регулирующих продукцию основных цитокинов воспаления, IL-1β (интерлейкин 1), TNF-α (фактор некроза опухоли), IL-6 (интерлейкин 6), интерферонов I типа. Центральная роль в активации врожденного и адаптивного иммунного ответа, а также патофизиологических механизмах развития септических состояний принадлежит TLR2 и 4, так как они ответственны за распознавание наибольшего количества PAMP грамположительных и грамотрицательных бактерий [3].

**Цель работы:** проанализировать значение уровня экспрессии TLR2, TLR4, CD14 на моноцитах и нейтрофилах у пациентов с сепсисом, в зависимости от тяжести течения и клинических исходов заболевания, оценить их взаимосвязь с содержанием сывороточных цитокинов IL-1β, TNF-α, IL-10.

### Материалы и методы

Представлены результаты исследования, проведенного на базе краевого Центра анестезиологии и реаниматологии, ГБУЗ Приморской краевой клинической больницы №1 г. Владивостока. В исследование были включены 38 пациентов, от 18 до 73 лет, в первые 48 часов после установления диагноза сепсиса, тяжелого сепсиса или септического шока, в соответствии с клиническими критериями (ACCP/SCCM Consensus Conference committee, 1992). Источниками септического процесса были органы брюшной полости 69% (n=26), легкие 16% (n=6), мочевыводящие пути 10% (n=4), инфекции кожи 5% (n=2).

Клиническую стратификацию пациентов проводили по тяжести сепсиса, используя интегральную шкалу APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation). Демографические данные приведены в таблице 1.

При оценке спектра причинно-значимых патогенов, с грамотрицательной флорой было выявлено 24% (n=9), грамположительные культуры 18% (n=7), смешанной этиологии 11% (n=4). У 45% (n=17) выявить возбудитель не удалось. Возможно, это связано с назначением деэскалационной терапии тяжелым пациентам с сепсисом и СПОН на ранних этапах лечения и не всегда возможным своевременного микробиологического мониторинга. В контрольную группу вошли 12 клинически здоровых людей, сопоставимых по полу, возрасту и расовой принадлежности.

Критериями исключения являлись: терминальное состояние (прогнозируемая гибель в течение 48 часов), риск летального исхода не связанного с сепсисом (тромбоэмболия, инфаркт миокарда, нарушения мозгового кровообращения), онкологические, ВИЧ-инфицированные, пациенты, получавшие иммуносупрессивную терапию.

Цитофлюориметрический анализ популяции моноцитов и нейтрофилов, экспрессии активационных маркеров выполняли в течение 2 часов после забора крови, из периферической вены, в пробирки с добавлением КЗЭДТА, на проточном цитометре "FACS Calibur BD", по стан-

дартному протоколу в программе CellQuestPro. В каждой пробе анализировали не менее 104 клеток. Использовали моноклональные антитела к молекулам CD14-FITC, CD282(TLR2)-APC, CD284(TLR4)-PE производства ("Beckman Coulter" США). С целью корректного исключения из зоны анализа клеток, которые не соответствовали параметрам, вводили необходимые логические ограничения в гистограммы распределения частиц по малоугловому, боковому светорассеянию (SSC). Оценку уровня экспрессии исследуемых поверхностных рецепторов проводили по средней интенсивности флуоресценции (MFI - mean fluorescence intensity). Уровень IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 определяли в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа ИФА с использованием реактивов «R&DdiagnosticInc.» США. Граница чувствительности метода 1 пг/мл.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы «StatPlus 2010». Рассчитывали средние значения и стандартное отклонение ( $M \pm \sigma$ ). Для сравнения параметров использовали t-критерий Стьюдента. Для оценки взаимосвязей между

показателями использовали метод ранговой корреляции Спирмена.

### Результаты

Проводя анализ оценки экспрессии рецепторов врожденного иммунитета на клетках миелоидного ряда были выявлены различия в исследуемых группах. Уровень MFI для TLR 2,4 на моноцитах был существенно выше у пациентов с сепсисом, а CD14 ниже по сравнению с группой контроля. На нейтрофилах различия отмечены только для TLR 4 (табл. 2).

Для оценки функциональной активности TLR2, TLR4, CD14 изучалась корреляционная взаимосвязь их экспрессии на клетках миелоидного ряда и уровнем сывороточных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10. Так нами была выявлена обратная корреляция между уровнем экспрессии MFI TLR4 на моноцитах и содержанием в сыворотке IL-10 ( $R = -0,64, p < 0,05$ ). Для TLR2, также отмечена корреляционная зависимость с IL-10 ( $R = -0,49, p < 0,05$ ), рисунок 1. Никакой взаимосвязи между уровнем экспрессии TLR2, TLR4, CD14 на моноцитах и сывороточным содержанием IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  не обнаружено. Вы-

**Таблица 1. Демографические и клинические данные пациентов с сепсисом**

Показатели	Результаты
Средний возраст $M \pm \sigma$	56 $\pm$ 18,4
Мужчины/женщины	18/20
Тяжесть сепсиса по шкале APACHE II $M \pm \sigma$	16 $\pm$ 9,02
< 20 баллов (группа I)	14 (37 %)
> 20 баллов (группа II)	20(53%)
Септический шок	4 (10%)
28 дневная смертность	8 (21%)

**Таблица 2. Уровень экспрессии (MFI) TLR2, TLR4, CD14 на моноцитах и нейтрофилах здоровых лиц и пациентов с сепсисом**

Моноциты	Здоровые	Пациенты	p
TLR 2	74,1 $\pm$ 12,1	99,6 $\pm$ 48,4	p<0,05
TLR 4	4,5 $\pm$ 1,08	12,6 $\pm$ 7,1	p<0,05
CD14	356,1 $\pm$ 43,3	235,7 $\pm$ 78,6	p<0,05
нейтрофилы			
TLR 2	32,2 $\pm$ 5,3	31,5 $\pm$ 12,3	p>0,05
TLR 4	14,2 $\pm$ 3,5	21,8 $\pm$ 8,1	p<0,05

ражение TLR2, TLR4 на нейтрофилах не имело никакой значимой корреляционной связи с уровнем сывороточных цитокинов L-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10.

Проводя анализ зависимости экспрессии на моноцитах TLR2, TLR4, CD14 и TLR2, TLR4 на нейтрофилах от тяжести течения сепсиса и клинических исходов заболевания было установлено несколько важных фактов. Так обратная корреляционная связь между экспрессией на моноцитах и нейтрофилах и тяжестью в баллах по шкале APACHE II определена только для лишь TLR2 на моноцитах ( $R = -0,69, p < 0,05$ ), рисунок 2.

Неблагоприятные исходы сепсиса, были сопряжены с низкой экспрессией на циркулирующих моноцитах периферической крови молекул врожденного иммунитета TLR2 ( $p < 0,05$ ), а также TLR4 на нейтрофилах (таблица 3).

### Обсуждение

В ходе работы выявлены высокие показатели экспрессии TLR2, TLR4 на моноцитах при сепсисе по сравнению со здоровыми людьми. Для CD14 напротив, был зафиксирован низкий уровень MFI у пациентов, по сравнению с контрольной группой. Результаты по CD14 отличаются от исследований проведенных ранее [4]. На нейтрофилах различия отмечены только для TLR 4, выше у пациентов по сравнению с группой контроля.

TLR4 рассматривают как наиболее значимую и потенциально перспективную цель с точки зрения терапии тяжелого сепсиса и септического шока. Многочисленные экспериментальные исследования на модели TLR4-дефицитных мышей показали их гипореактивность к введению

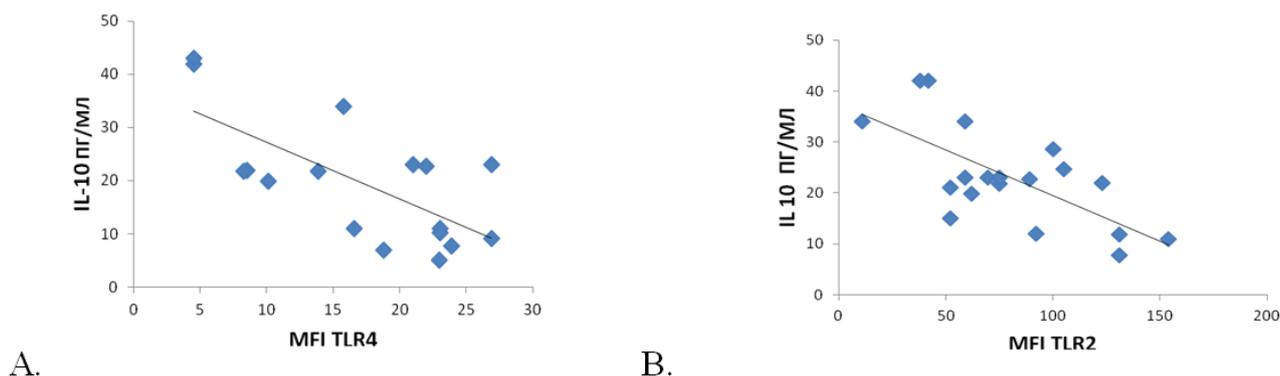


Рис. 1. Корреляция уровня экспрессии А. MFI TLR4 на моноцитах и содержанием IL-10 в сыворотке у пациентов с сепсисом. В. MFI TLR2 на моноцитах и содержанием IL-10 в сыворотке у пациентов с сепсисом.

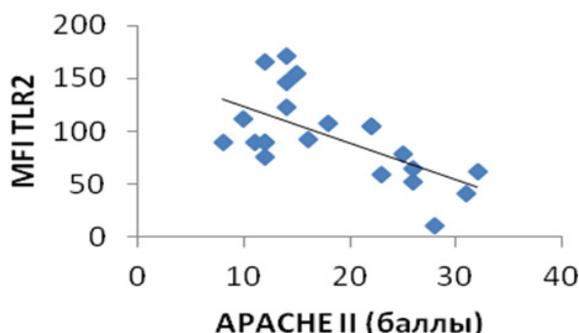


Рис. 2. Корреляция между уровнем экспрессии TLR2 на моноцитах и тяжестью в баллах по шкале APACHE II у пациентов с сепсисом.

**Таблица 3. Уровень экспрессии (MFI) TLR-2, TLR-4, CD14 на моноцитах и нейтрофилах с учетом 28 дневной летальности**

Моноциты	выжившие (n = 31)	умершие (n = 7)	p
TLR 2	92,0±28,7	58,9±28,7	p<0,05
TLR 4	12,75±4,5	10,65±4,1	p>0,05
CD14	244,1±45,8	226,5±57,5	p>0,05
нейтрофилы			
TLR 2	33,5± 14,6	28,5± 16,1	p>0,05
TLR 4	23,8±10,1	13,8±7,1	p<0,05

сублетальных доз ЛПС. Однако чаще эти исследования носят экспериментальный характер, считают, что они весьма ценны, но в полной мере не могут отражать многообразие действия других бактериальных паттернов при развитии сепсиса в клинических условиях. На практике, все больше работ, где не находят существенной связи между степенью экспрессии данных сигнальных молекул и тяжестью течения сепсиса [5]. В результате наблюдения не было выявлено достоверных различий экспрессии TLR4 на моноцитах, в зависимости от тяжести течения сепсиса и исходов заболевания. На нейтрофилах, экспрессия TLR4 имела значимые различия только в зависимости от исхода заболевания, при этом более низкие показатели выявлены при неблагоприятном исходе.

Проводя анализ полученных результатов по TLR2, нами отмечено снижение экспрессии данного маркера на моноцитах периферической крови у пациентов с более тяжелым течением септического процесса и с неблагоприятными исходами заболевания. Корреляционная взаимосвязь между экспрессией рецепторов врожденного иммунитета на клетках миелоидного ряда и тяжестью в баллах по шкале APACHE II, установлена только лишь для TLR2 на моноцитах. TLR2 обладает широким репертуаром распознаваемых паттернов, и кооперирует в этом с другими рецепторами врожденного иммунитета такими как TLR1 и TLR6. TLR10, маннозо-фукозный рецептор (CD206), скэвенджер-рецептор (CD36), также способны образовывать гетеродимеры взаимодействуя с TLR2. Данный синергизм усиливает внутриклеточную передачу сигнала и активацию клеток. В связи с этим, при одновременном воздействии большого количества PAMPs и DAMPs, в качестве участника «комбинаторного» распознавания паттернов, TLR2 воз-

можно имеет большее значение при септических состояниях, чем TLR4.

Взаимодействию TLRs на клетках макрофагально-гранулоцитарного звена с PAMPs патогенов, приводит к повышению продукции IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- I типа [6]. Уровень секреции цитокинов претерпевает динамические изменения, отражая тип и стадию иммунного ответа [7]. Сывороточным уровнем некоторых из них, напрямую связывают степень органной дисфункции и прогноз септического процесса. Так, например высокий уровень TNF- $\alpha$  ответственен за клинические проявления эндотелиальной дисфункции и септического шока, и высокую летальность в первые дни септического процесса [8]. Напротив, противовоспалительные медиаторы IL-10, TGF - $\beta$  (трансформирующий фактор роста), ответственны за феномен «иммунопаралича» при сепсисе, отражают гипореактивность, нарушают иммунный ответ при вторичной инфекции и обуславливают неблагоприятные исходы сепсиса на поздних этапах [9].

Индукция генов ответственных за синтез тех или иных медиаторов воспаления не одинаковы. Исследования выявили специфичность внутриклеточной передачи сигналов, что приводит к дифференциальной секреции цитокинов для конкретных PAMPs. TLRs способны индуцировать различные реакции в дендритных клетках, что может влиять на дифференцировку Т-хелперов и тип иммунного ответа [10]. Так агонисты TLR4 способствовали секреции дендритными клетками Th1-индуцирующих цитокинов, IL-12 и интерферон- $\gamma$  индуцибельного белка (IP10) [11]. В отличие от этого, стимуляция TLR2 вызывала освобождение IL-12 ингибиторного гомодимера p40, и индукции IL-8, что способствует развитию Th2-ответа. Кроме этого стимуляция TLR2 вызывала повы-

шенную секрецию индукции противовоспалительного IL-10 [12]. Другими словами, TLRs на АПК регулируют механизмы не только врожденных, но и адаптивных иммунных реакций, влияют на дифференцировку Т-хелперных клеток, направляя иммунный ответ по клеточному или гуморальному типу в зависимости от характера PAMPs. Были проанализированы уровень экспрессии рецепторов врожденного иммунитета на моноцитах и нейтрофилах, и содержание IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 в сыворотки крови у пациентов с сепсисом. Корреляционная взаимосвязь между экспрессией данных сигнальных молекул, обратная, средней силы, выявлена лишь с IL-10.

Выявленные изменения экспрессии на моноцитах TLR2, TLR4 и повышение уровня сывороточного IL10 отражает гипореактивность, снижение иммунного ответа на бактериальное повреждение, свидетельствует о неблагоприятном течении генерализованного воспаления и негативно сказывается на исходе заболевания.

## Литература

1. Mayr F.B., Yende S., Angus D.C. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014; 5(1): 4-11.
2. Xu J., Zhang X., Pelayo R. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*, 2009; 15(11): 1318-1321.
3. Байракова, А.Л., Воропаева Е.А., Афанасьева С.С., Алешкин В.А., Несвижский Ю.В., Караулов А. В., Кафарская Л.И., Егорова Е. А., Метельская В. А., Гречишникова О. Г., Рубальский О.В. Роль и биологическое значение толл-подобных рецепторов в антиинфекционной резистентности организма. *Вестник РАМН*, 2008; 1: 45 – 55.
4. Schaaf B., Luitjens K., Goldmann T., van Bremen T., Sayk F., Dodt C., Dalhoff K., Droemann D. Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. *Diagn. Pathol*, 2009; 16: 4-12.
5. Armstrong L., Medford A.R., Hunter K.J. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clin. Exp. Immunol*, 2004; 136: 312-319.
6. Sabroe I., Parker L.C., Dower S.K. et al. The role of TLR activation in inflammation. *J. Pathol*, 2008; 214: 126 – 135.
7. Лазанович В.А., Степанюк В.Н., Смирнов Г.А. Маркелова Е.В., Биомаркеры воспаления в прогнозе исхода абдоминального сепсиса. *Фундаментальные исследования*. 2012; 4: 311-315.

## Заключение

В результате проведенной работы по изучению экспрессии TLRs на моноцитах и нейтрофилах у пациентов хирургического профиля с сепсисом определено ряд важных закономерностей. Для более тяжелого течения септического процесса характерно снижение уровня TLR2 на моноцитах. Предиктором неблагоприятного прогноза клинических исходов сепсиса являются низкие показатели MFI на моноцитах TLR2 и TLR4 на нейтрофилах, что подтверждает не только их теоретическую, но и практическую значимость [13]. При оценке корреляционных взаимосвязей экспрессии TLRs на клетках миелоидного ряда с уровнем наиболее значимых сывороточных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, выявлена корреляционная связь лишь между TLR2, TLR4 и IL-10. Более низким показателям экспрессии MFI TLR2 и TLR4 на моноцитах, соответствовали высокие значения содержания IL-10.

8. Van der Poll T., Lowry S.F. Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock*. 1995; 3(1): 1–12.
9. White M., Lawless M.W., O'Dwyer M.J. Transforming growth factor beta-1 and interleukin-17 gene transcription in peripheral blood mononuclear cells and the human response to infection. *Cytokine*. 2010; 50(3): 322-327.
10. Re F, Strominger J.L Heterogeneity of TLR-induced responses in dendritic cells: from innate to adaptive immunity. *Immunobiology*. 2004; 209(1-2):191-198.
11. Re. F., Strominger J.L. Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 Differentially Activate Human Dendritic Cells *J. Biol. Chem*. 2001; 276(40): 37692–37699
12. Re F, Strominger J.L. IL-10 Released by Concomitant TLR2 Stimulation Blocks the Induction of a Subset of Th1 Cytokines That Are Specifically Induced by TLR4 or TLR3 in Human Dendritic Cells. *J. Immunol*. 2004; 173(12): 7548-7555.
13. Новиков Д.К., Сергеев Ю.В. Иммунодиагностика: неиспользуемые возможности и достоверность получаемой информации. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 1999; 1: 8-14.

## Сведения об авторах:

Лазанович Владимир Анатольевич, к.м.н., ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии. Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Владивосток. 690062. Г. Владивосток Пр. 100-я 14-49. 690062 Vladivostok, The stoletiya Prospekt 14-49. Тел. +79147034509, e-mail: immuno2003@mail.ru  
Маркелова Елена Владимировна, д.м.н., профессор, зав. кафедрой физиологии человека. ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток.  
Караулов Александр Викторович. д. м.н., профессор, член-корреспондент РАМН, зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России г. Москва

Поступила 9.06.2015 г.