

РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПАТОГЕНЕЗЕ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ

Гординская Н.А., Алейник Д.Я., Рубцова Ю.П., Чарыкова И.Н., Фролов А.П.

ФГБУ «ННИИТО» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия (603155, Нижний Новгород, Верхневолжская наб., 18/1), e-mail: info@nniito.ru

В работе проанализирована экспрессия Toll-подобных рецепторов (TLR2 и TLR4) на CD14⁺ клетках периферической крови и оценена их функциональная активность у пациентов с тяжелой термической травмой в острый период ожоговой болезни. Выявлено повышение экспрессии TLR2 и снижение экспрессии TLR4 ($p < 0,05$). Средняя интенсивность флюоресценции для TLR2 и TLR4 у тяжелообожженных достоверно ниже, чем у доноров. Наблюдалось снижение функциональной активности TLRs после ожога. У пострадавших с термической травмой продукция фактора некроза опухоли- α мононуклеарными клетками при использовании лиганда TLR2 (пептидогликана) и лиганда TLR4 (липолисахарида) была достоверно ниже, чем в группе доноров, что может служить причиной ослабления защитных функций при развитии ожоговой инфекции.

Ключевые слова: врожденный противоифекционный иммунитет, Толл-подобные рецепторы, ожоговая болезнь.

ROLE OF INNATE IMMUNITY RECEPTORS IN THE PATHOGENESIS OF BURN DISEASE

Gordinskaya N.A., Aleinik D.Y., Rubtsova Y.P., Charykova I.N., Frolov A.P.

Federal State Budgetary Institution "Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia (603155, Nizhny Novgorod, Verhnevolzhskaya nab., 18/1), e-mail: info@nniito.ru

This research analyzes expression of Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) on CD14⁺ peripheral blood cells and evaluates their functional activity in patients with severe thermal injuries in the acute period of burn disease. TLR2 expression increase and TLR4 expression decrease ($p < 0,05$) was detected. Medium intensity of fluorescence for TLR2 and TLR4 in patients with severe burns was truly lower than in donors. Decrease in functional activity of TLRs after burn was observed. Production of TNF alpha by mononuclear cells with the use of TLR2 ligand (peptidoglycane) and TLR4 ligand (lipopolysaccharide) was truly lower in patients with thermal injuries than in donor group, which may be the cause for weakening of protective functions in burn infection development.

Keywords: Innate anti-infectious immunity, Toll-like receptors, burn disease.

Введение

Патогенез многих заболеваний в настоящее время претерпевает дополнительную расшифровку в связи с появлением новых научных данных о ряде молекулярных событий в иммунной системе человека. Одним из основных свойств иммунной системы является способность к обнаружению и распознаванию чужеродных веществ и развитию ответных реакций, направленных на выведение или связывание этих веществ.

При оценке состояния системы иммунитета в клинических и научных исследованиях несколько десятилетий изучались показатели адаптивного иммунитета. Адаптивный (лимфоцитарный) иммунитет является мощной защитой, обеспечивающей целенаправленный антигенспецифический иммунный ответ с формированием иммунологической памяти. Разработаны системные подходы к оценке показателей

иммунитета, предложены многочисленные схемы иммунокоррекции при различных заболеваниях.

В настоящее время стало понятным, что адаптивный иммунный ответ является лишь эффекторным звеном врожденной иммунной системы. Система врожденного иммунитета, являясь филогенетически более древней линией защиты организма от патогенов, инициирует воспаление и фагоцитоз и обеспечивает быструю элиминацию патогенов и предотвращение инфекции на ранних этапах, когда механизмы адаптивного иммунитета еще отсутствуют. В отличие от адаптивного иммунитета, функционирование которого обеспечивают Т- и В-лимфоциты, механизмы врожденной защиты не имеют какой-либо дифференцированной системы клеток, а представляют собой разнообразные рецепторы, молекулы и их комплексы, которые присутствуют на разных клетках и имеют одинаковое предназначение [9]. Задачей врожденных механизмов защиты является распознавание одинаковых структур, присутствующих у различных патогенов, подобные структуры называют патогенассоциированными молекулярными образцами (pathogen-associated molecular patterns-PAMPs), а рецепторы, распознающие данные «образы», называют патогенраспознающие (pathogen recognition receptors-PRRs) [9, 10]. Миграция клеток к очагу повреждения контролируется распознаванием PAMP сосудистым эндотелием. В целом распознавание PAMP эндотелиальными, эпителиальными, гемопоэтическими клетками с помощью специфических рецепторов является интегральным для врожденного противои инфекционного иммунитета. Наиболее изученными PAMPs являются липополисахариды бактериальной стенки, липопротеины, гликолипиды, флагеллин, липотейхоевые кислоты, маннаны, зимозан грибов, ДНК и РНК бактерий и вирусов. Результаты научных исследований последних лет подтверждают, что в качестве PAMPs могут участвовать не только молекулярные структуры микроорганизмов, но и вещества немикробного происхождения. Было доказано, что к PAMPs относятся и различные эндогенные соединения макроорганизма, высвобождающиеся при массивном повреждении клеток, такие молекулы получили название «сигналы опасности» (damage associated molecular patterns-DAMPs). К DAMPs относят фибронектин, фибриноген, белки теплового шока Hsp70 и Hsp 60, которые вызывают выработку провоспалительных цитокинов при действии на TLR4 и TLR2 [6].

В зависимости от предназначения и функций патогенраспознающие рецепторы разделяют на три группы: секретлируемые, эндоцитозные и сигнальные. Секретлируемые PRRs выполняют функцию опсонингов, «помечая» микробные клетки и облегчая фагоцитоз. Эндоцитозные PRRs опосредуют разрушение патогена в лизосомах клеток макроорганизма и презентуют пептидные фрагменты макрофагам, сигнальные PRRs активизируют передачу сигнала в ядро клетки с целью экспрессии генов адаптивного (лимфоцитарного) иммунного

ответа [9]. К настоящему времени известны несколько семейств сигнальных PRRs: Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors-TLR), лектиновые рецепторы С-типа (C-type lectin receptors), рецепторы-мусорщики (scavenger receptors), NOD-подобные и RIG-подобные рецепторы [4].

Важность участия Toll-подобных рецепторов в деятельности иммунной системы было доказано в экспериментах на мышах с мутациями генов различных TLRs, где прослежена взаимосвязь с приобретенным иммунитетом через антигенпрезентирующие клетки [8]. Эти исследования послужили основой комплексного анализа системы Toll-подобных рецепторов при различных патологических состояниях человека. В настоящее время роль рецепторов врожденного иммунитета широко обсуждается при изучении патологии новорожденных детей, в исследованиях патогенеза различных дерматозов, колонизационной резистентности урогенитального тракта, регуляции противоопухолевого иммунитета, развития острого инфаркта миокарда и других заболеваний [1,2,3,5,7,11].

Цель исследования

Изучение экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 на моноцитах периферической крови у пациентов с тяжелой термической травмой в острый период ожоговой болезни.

Материал и методы исследования

Группу здоровых доноров периферической крови составили 12 человек в возрасте от 20 до 45 лет. Группу обследованных пациентов составили 23 человека с тяжелой термической травмой на площади от 32 % до 60 % поверхности тела. Больные находились на стационарном лечении в ожоговом центре Нижегородского НИИ травматологии и ортопедии, исследования проводились в острый период ожоговой болезни.

Выделение мононуклеарных клеток. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из гепаринизированной крови (25 ЕД на 1 мл) с помощью градиентного центрифугирования при 1500 об/мин (градиент фиколл-урографин ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) 40 минут и дважды отмывали средой RPMI 1640 при 1500 об/мин в течение 10 минут. После чего культивировали МНК в полной ростовой среде RPMI 1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (ООО «ПанЭко»), 2 % Мм глутамин и антибиотики (пенициллин 100 ЕД/мл и стрептомицин 50 мг/мл, ООО «ПанЭко»). Исходная концентрация МНК составляла 1×10^6 клеток/мл.

Стимуляция клеток. В качестве лигандов TLR использовали стимуляторы ЛПС (*E.coli* O127: B8; Sigma) в дозе 0,1 мкг/мл и пептидогликан (*Staphylococcus aureus*; «Sigma») в дозе 5 мкг/мл. Оптимальные дозы были выбраны на основании методических рекомендаций фирм производителей используемых лигандов и литературных данных. Клетки инкубировали в CO₂ инкубаторе фирмы Sanyo (Япония) при 5 % CO₂, 37 °С и абсолютной влажности.

Спонтанную выработку фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) определяли, культивируя МНК в полной ростовой среде без стимуляторов. По окончании культивирования клетки осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 15 минут. Отбирали супернатанты и хранили их в течение 1–2 месяцев при 80 °С. Рассчитывали индекс стимуляции как отношение количества ФНО- α при использовании соответствующего лиганда к спонтанной выработке цитокина клетками.

Определение цитокинов. Продукцию ФНО- α определяли в супернатантах культур методом ИФА с помощью тест-систем фирмы Bioscience (США) на анализаторе Sunrise Tecan (Австрия), оснащенный системой Magellan, позволяющей в автоматическом режиме производить подсчет оптической плотности.

Определение экспрессии TLR. Для определения экспрессии TLR2 и TLR4 на моноцитах периферической крови МНК инкубировали с Fitc-мечеными антителами к CD14 (Beckman Coulter, США), PE-мечеными антителами к TLR2 и APC-мечеными антителами к TLR4 (Bioscience) с соответствующими изотипическими контролями (Beckman Coulter) в течение 30 минут при 4 °С. Анализ экспрессии CD14, TLR2 и TLR4 проводили на проточном цитофлуориметре (Beckman Coulter). Оценивали процент моноцитов, несущих на своей поверхности TLR2 и TLR4 и среднюю интенсивность флюоресценции (СИФ), величину которой выражали в условных единицах (усл. ед.) флюоресценции.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica.

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение экспрессии TLR и их функциональной активности у тяжелообожженных больных является в определенной степени предварительным. Как показали результаты работы, экспрессия TLR2 на моноцитах периферической крови пациентов в первые пять суток после ожога достоверно выше, чем в группе доноров ($p < 0,05$). Экспрессия TLR4 рецепторов, напротив, в острый период после травмы снижена ($p < 0,05$, табл.1). Средняя интенсивность флюоресценции для TLR2 и TLR4 у тяжелообожженных больных значительно ниже, чем у здоровых доноров.

Таблица 1. Экспрессия TLR2 и TLR4 на моноцитах периферической крови пациентов с тяжелой термической травмой и здоровых доноров

Группа обследованных	TLR2	СИФ	TLR4	СИФ
Доноры	55,6± 11%	100,0± 9,0	42± 4,6%	97,8± 12,4
Пациенты	97,3± 8,9%	13,4±5,1	27,04± 6,2%	3,08±0,9

Параллельно с изучением экспрессии Toll-подобных рецепторов анализировали выработку ФНО- α CD14⁺ клетками. Спонтанная выработка ФНО- α МНК периферической крови пациентов с тяжелой термической травмой была многократно выше, чем в группе доноров (табл. 2).

Таблица 2. Выработка ФНО- α МНК периферической крови здоровых доноров и пациентов с тяжелой термической травмой (пкг/мл)

Группа обследованных	Спонтанная выработка	Стимулированная ПГ	Стимулированная ЛПС
Доноры	25,4 \pm 6,8	59,7 \pm 3,2	687 \pm 18,8
Пациенты	1369 \pm 820	2152 \pm 976	3284 \pm 1080

Стимуляция МНК лигандами TLR приводила к увеличению продукции ФНО- α , однако в группе доноров индекс стимуляции составил 2,3 при использовании пептидогликана и 27,0 при использовании липополисахарида, а в группе пациентов – лишь 1,7 и 2,4 соответственно. Таким образом, острый период ожоговой болезни после тяжелой термической травмы характеризуется изменением экспрессии Толл-подобных рецепторов на мононуклеарных клетках периферической крови и усилением их функциональной активности, однако общий потенциал TLR2 и TLR4 у пациентов относительно показателей у доноров достоверно снижается. Низкий прирост уровня ФНО- α в ответ на лиганды TLR2 и TLR4 может служить причиной ослабления защитных функций у тяжелообожженных при развитии ожоговой инфекции. Зависимости экспрессии TLR2 и TLR4 от этиологии раневой ожоговой инфекции в период наблюдений не было выявлено, направленность изменений сохранялась как у пациентов с грамотрицательной, так и у пациентов с грамположительной инфекцией. Динамический анализ изученных показателей в процессе лечения ожоговой болезни показал достаточную разнонаправленность как экспрессии Толл-подобных рецепторов, так и выработки ФНО- α МНК, вместе с тем наблюдалась прямая зависимость течения болезни и выраженности изученных показателей. У двух пациентов с летальным исходом болезни регистрировали резкое снижение функциональной активности TLR в отношении и спонтанной продукции ФНО- α , и стимулированной лигандами TLR практически до нуля, при этом экспрессия рецепторов соответствовала таковой у выживших пациентов.

Выводы

Таким образом, анализ выработки цитокинов стимулированными лигандами TLR мононуклеарных клеток периферической крови и определение поверхностной экспрессии

CD14⁺ Толл-подобных рецепторов дают важную информацию при оценке функционального состояния врожденного иммунитета и должны рассматриваться в качестве маркеров течения ожоговой болезни. Лекарственные воздействия через Толл-подобные рецепторы, по всей вероятности, могут дать возможность управления выраженностью системной воспалительной реакции в разные периоды ожоговой болезни.

Список литературы

1. Байракова А.Л. Роль клеточных Толл-подобных рецепторов в формировании колонизационной резистентности урогенитального тракта при хламидиозе: Автореф. дис... канд. биол. наук. – М., 2009. – 17 с.
2. Двойственная роль толлподобных рецепторов в регуляции противоопухолевого иммунитета / И.О. Чикилева [и др.] //Иммунология. – 2010. – № 1. – С.52-55.
3. Катунина О.Р. Функции Толл-подобных рецепторов как компонента врожденного иммунитета и их участие в патогенезе дерматозов различной этиологии // Вестн. дерматол. и венерол. – 2011. – № 2. – С.18-25.
4. Хаитов Р.М., Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Биология рецепторов врожденной иммунной системы // Физиол. и патол. иммун. сист. – 2008. – Т.12, № 6. – С.3-28.
5. Хорева М.В. Комплексный анализ системы Толл-подобных рецепторов при различных патологических состояниях человека: Автореф. дис... д-ра мед. наук. – М., 2012. – 22 с.
6. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? / Erridge C. [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2010. – Vol. 87, № 6. – P.989-999.
7. Expression of Toll-like receptors in neonatal sepsis /D.Viemann [et.al.] // J. Pediatr. Res. – 2005. – Vol. 58. – P.654-659.
8. Iwasaki A., Mtdzhidov R. TLR-like receptor control of the adaptive immune responses // Nat. Immun. – 2004. –Vol. 5, № 10. – P.987-995.
9. Medzhidov R., Janeway Ch. Inname immune recognition // Curr. Opin. Immunol. – 1997. – № 9. – P. 4-9.
10. Medzhidov R., Janeway Ch. The TLR family and microbial recognition // Trends Microbiol. – 2000. – Vol. 8, № 10. – P.452-457.
11. Monocyte TLR4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging / E.K. Forster-Waldi [et al.] // J. Pediatr.Res. – 2005. – Vol. 58. – P.121-124.

Рецензенты:

Никифоров В.А., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией микробиологии ФБУН
ННИИЭМ им. Академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород.

Заславская М.И., д.б.н., профессор кафедры микробиологии и иммунологии, ГБОУ ВПО
НиЖГМА Минздрава России, г. Нижний Новгород.