

# ВЛИЯНИЕ ЦИТОЗОЛЬНОЙ ФРАКЦИИ КАРДИОМИОЦИТОВ И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА ФУНКЦИЮ МОНОЦИТОВ

Матвеева В.Г.<sup>1</sup>, Головкин А.С.<sup>1</sup>, Чернова М.Н.<sup>1</sup>,  
Кудрявцев И.В.<sup>2</sup>, Иванов С.В.<sup>1</sup>, Григорьев Е.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН, г. Кемерово, Россия

<sup>2</sup> НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Развитие осложненных форм системного воспалительного ответа у пациентов, перенесших операцию на открытом сердце, является серьезной проблемой кардиохирургии. До конца не изучены условия и триггерные механизмы, приводящие к таким осложнениям.

Мы исследовали влияние продуктов механического повреждения миокарда, попадающих в кровь в процессе операции на открытом сердце, липополисахарида, а также их комбинации – на изолированные моноциты.

Было выяснено, что механически поврежденная ткань миокарда может являться источником внеклеточного белка теплового шока 70 (Hsp70). При этом содержание Hsp70 в моделирующей механическое повреждение миокарда цитозольной фракции кардиомиоцитов соответствует уровню продукции провоспалительных цитокинов моноцитами и плотности поверхностной экспрессии TLR4. В результатах исследования подтверждается синергизм и потенцирование комбинированного влияния продуктов механического повреждения миокарда и липополисахарида на уровень синтеза цитокинов моноцитами.

*Ключевые слова:* моноциты, повреждение клеток, цитокины, воспаление

## Адрес для переписки:

Матвеева Вера Геннадьевна  
научный сотрудник лаборатории  
клеточных технологий, отдел  
Экспериментальной и клинической  
кардиологии ФГБУ «НИИ комплексных  
проблем сердечно-сосудистых  
заболеваний» СО РАМН  
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый  
бульвар, б.  
Тел.: 8 (3842) 64-41-56  
E-mail: matveeva\_vg@mail.ru

## Авторы:

Матвеева В.Г. – научный сотрудник лаборатории  
клеточных технологий, отдел Экспериментальной  
и клинической кардиологии ФГБУ «НИИ комплексных  
проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН,  
г. Кемерово

Головкин А.С. – к.м.н., заведующий отделом  
Экспериментальной и клинической кардиологии ФГБУ  
«НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых  
заболеваний» СО РАМН, г. Кемерово

Чернова М.Н. – лаборант-исследователь, лаборатория  
клеточных технологий, отдел Экспериментальной и  
клинической кардиологии ФГБУ «НИИ комплексных  
проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН,  
г. Кемерово

Кудрявцев И.В. – к.б.н., старший научный сотрудник  
НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-  
Петербург

Иванов С.В. – д.м.н., заведующий лабораторией  
реконструктивной хирургии ФГБУ «НИИ комплексных  
проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН,  
г. Кемерово

Григорьев Е.В. – д.м.н., профессор, заместитель директора  
ФГБУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых  
заболеваний» СО РАМН, г. Кемерово

Поступила 07.02.2013

Отправлена на доработку 18.02.2013

Принята к печати 19.02.2013

# EFFECTS OF MYOCARDIAL CYTOSOLIC FRACTION AND LIPOPOLYSACCHARIDE UPON MONOCYTIC FUNCTIONS

Matveeva V.G.<sup>a</sup>, Golovkin A.S.<sup>a</sup>, Chernova M.N.<sup>a</sup>,  
Kudryavtsev I.V.<sup>b</sup>, Ivanov S.V.<sup>a</sup>, Grigoriev E.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Kemerovo, Russian Federation

<sup>b</sup> Research Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, North Western Branch, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Complicated systemic inflammatory response syndrome in patients undergone open-heart surgery is an important issue of cardiac surgery. The conditions and trigger mechanisms leading to such a complication remain unclear.

We studied the impact of mechanical myocardial injury products released into blood during open-heart surgery, lipopolysaccharides and their combination on isolated monocytes.

It was found that mechanically injured myocardial tissue can be a source of intracellular heat shock protein 70 (Hsp70). The content of Hsp70 in the cytosolic cardiomyocyte fraction responsible for mechanical myocardial injury modeling corresponds to the level of proinflammatory cytokine production by monocytes and the density of TLR4 surface expression. The study results confirm the synergy and potentiation of the combined impact of mechanical myocardial injury products and lipopolysaccharides on the levels of cytokine production by monocytes. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 5, pp 439-448)

Keywords: monocytes, cellular damage, cytokines, inflammation

---

## Address for correspondence:

Matveeva Vera G.  
Research Associate, Cell Technology  
Laboratory, Department of Experimental  
and Clinical Cardiology, Research Institute  
for Complex Issues of Cardiovascular  
Diseases, Russian Academy of Medical  
Sciences, Siberian Branch  
665002, Russian Federation, Kemerovo,  
Sosnovy blvd, 6.  
Phone: 7 (3842) 64-41-56.  
E-mail: matveeva\_vg@mail.ru

---

## Authors:

Matveeva V.G., Research Associate, Cell Technology Laboratory,  
Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research  
Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Russian  
Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Kemerovo  
Golovkin A.S., PhD (Medicine), Chief, Department of Experimental  
and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of  
Cardiovascular Diseases, Russian Academy of Medical Sciences,  
Siberian Branch, Kemerovo  
Chernova M.N., Researcher, Cell Technology Laboratory,  
Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research  
Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Russian  
Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Kemerovo  
Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate,  
Research Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of  
Medical Sciences, North Western Branch, St. Petersburg  
Ivanov S.V., PhD, MD (Medicine), Chief, Reconstructive surgery  
laboratory, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular  
Diseases, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch,  
Kemerovo  
Grigoriev E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director,  
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,  
Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Kemerovo

Received 07.02.2013  
Revision received 18.02.2013  
Accepted 19.02.2013

## Введение

Большинство кардиохирургических операций в раннем послеоперационном периоде вызывают системный воспалительный ответ (СВО), который является причиной тяжелых осложнений, характеризующихся высокой степенью летальности. При этом изначально СВО протекает по типу «стерильного воспаления», но в ряде случаев может происходить присоединение инфекционного компонента. В настоящее время важная роль в развертывании СВО отводится иммунной системе, а формирующееся понятие об аларминах позволяет объяснить некоторые механизмы стерильного СВО [13].

Иммунная система поддерживает постоянство внутренней среды при ее нарушениях, в том числе после воздействия повреждающих факторов, не связанных с влиянием микроорганизмов (механическая травма, ишемические и реперфузионные повреждения, ожоги, ультрафиолетовое излучение, радиация и т.д.) [2]. Неблагоприятные воздействия достаточной силы и продолжительности вызывают гибель клеток и немедленное выделение ими во внеклеточную среду эндогенных молекул или аларминов, которые в норме содержатся внутри клеток. Алармины активируют систему врожденного иммунитета, вызывая воспаление и способствуя восстановительным и репаративным процессам [4]. Однако в случае обширного повреждения тканей возможна генерализация факторов альтерации и формирование системных воспалительных реакций, таких как острофазный ответ, лихорадка, лейкоцитоз, стресс-реакция нейроэндокринной системы и т.д. [13].

Сходство септического и стерильного СВО связывают с тем, что иммунная система реагирует примерно однотипным комплексом защитных реакций как на внедрение патогена, так и на эндогенные молекулы поврежденных клеток (алармины). Многие алармины, подобно PAMP, являются лигандами для TLRs и NLRs [3, 4]. Так, HMGB-1 (амфотерин) является лигандом для TLR2 и TLR4, белок теплового шока 60 (Hsp60) и Hsp70 — для TLR2, TLR4 и CD14 [12, 17]. В результате активируются сигнальные каскады, приводящие к синтезу ключевых медиаторов провоспалительного ответа, включая цитокины и хемокины. Моноциты и макрофаги, являясь основными носителями TLR и продуцентами цитокинов, вносят серьезный вклад в формирование гиперцитокинемии — важного патогенетического звена СВО [1].

Операция на сердце, выполненная в условиях искусственного кровообращения, связана с воздействием множества негативных факторов, таких как ишемия/реперфузия, механиче-

ское повреждение тканей, токсическое действие лекарственных препаратов, контакт крови с нефизиологическими поверхностями аппарата ИК и т.д. Доказано активирующее действие поврежденных ишемией и реперфузией тканей на иммунную систему [14]. Однако, прямое активирующее действие продуктов механического повреждения миокарда на иммунокомпетентные клетки остается не изученным. Тем не менее некоторые специфические операции на сердце сопровождаются выраженным механическим повреждением тканей миокарда на этапах доступа, основного операционного приема и ушивания. Для создания модели механически поврежденных тканей миокарда была приготовлена цитозольная фракция кардиомиоцитов человека без применения химических реагентов и ферментов. В сравнении и для оценки комбинированного влияния эндотоксина мы использовали липополисахарид (LPS) — основной компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

**Целью нашего исследования** стало изучить влияния цитозольной фракции кардиомиоцитов, липополисахарида и их сочетания на цитокин-продуцирующую функцию и уровень поверхностной экспрессии активирующих рецепторов врожденного иммунитета моноцитов.

## Материалы и методы

### **Получение гомогената ушка предсердия и цитозольной фракции кардиомиоцитов**

Работа была одобрена Локальным этическим комитетом с оформлением информированного согласия пациентов. Резекция ушка левого предсердия была выполнена по медицинским показаниям и являлась необходимым и неотъемлемым этапом оперативного вмешательства. Полученный биоптат сразу помещали в жидкий азот и в дальнейшем хранили при  $-140^{\circ}\text{C}$ .

Гомогенат клеток готовили в асептических условиях при помощи механического растирания биоптата ткани ушка левого предсердия в гомогенизаторе Потера с добавлением стерильного PBS. Полученную взвесь центрифугировали при  $4^{\circ}\text{C}$  со скоростью 1000 g в течение 15 мин, супернатант аликвотировали, замораживали и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Для стандартизации результатов в данной работе использовался один и тот же супернатант, полученный из биоптата одного ушка предсердия. Непосредственно перед проведением эксперимента супернатант размораживали, доводили до нужной концентрации культуральной средой, фильтровали через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм, таким образом, получая цитозольную фракцию поврежденных кардиомиоцитов человека (ЦФК). Для удобства

восприятия использовались процентные выражения (в 1мл 1% ЦФК содержится 61,5 мкг ткани ушка предсердия; 2% ЦФК – 123 мкг ткани предсердия/мл, соответственно, в 5% – 307,5 мкг ткани/мл).

#### **Определение содержания Hsp70 в ЦФК**

Для определения концентрации Hsp70 в приготовленной ЦФК использовали набор для твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) Hsp70 High Sensitivity EIA Kit (фирма Assay designs, USA).

Процедуру ИФА проводили по инструкции, предлагаемой производителем. Для измерения оптической плотности использовали ридер – многоканальный спектрофотометр – «Униплан» (Россия).

#### **Выделение моноцитов из крови**

Моноциты получали методом адгезии на пластике мононуклеаров периферической крови. Для этого выделенные на градиенте плотности (Ficoll Нураке 1,077 г/мл [Sigma-Aldrich]) клетки двукратно отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS), переносили в пластиковый 24-луночный планшет и инкубировали 1 час в питательной среде (RPMI-1640 с добавлением L-глутамин, 2% FBS, антибиотиков [100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина], 1% HEPES) при 37° и 5% CO<sub>2</sub>. Далее не прикрепившиеся к пластику лимфоциты удаляли, а прикрепившиеся к поверхности лунок клетки использовали для последующей культивации со стимуляторами. По результатам цитофлуориметрического анализа, процент CD14-позитивных клеток, прикрепившихся к поверхности пластика, составил 76-80%.

#### **Определение относительного количества погибших моноцитов методом проточной цитофлуориметрии с использованием пропидия йодида (PI)**

Изолированные моноциты инкубировали в питательной среде при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>, а также с добавлением стимуляторов: ЦФК и/или LPS. Через 6, 12 и 24 часов культивации клетки снимали с поверхности пластика трипсином, который после отделения клеток связывали фетальной бычьей сывороткой. Далее клетки отмывали избытком PBS и окрашивали пропидия йодидом (PI). Определяли относительное количество PI-позитивных клеток среди всей популяции, которые расценивались как погибшие некрозом или находящиеся в стадии позднего апоптоза. Исследование проводили на проточном лазерном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

#### **Исследование содержания цитокинов в культивационной среде**

Для изучения уровня продукции цитокинов моноцитами был забран объем культивационной среды через 6, 12, и 24 часов инкубации клеток без- и с добавлением стимуляторов. Образец за-

мораживали и хранили при -40 °С до исследования. Проведено 5 независимых экспериментов с моноцитами от 3 условно здоровых доноров.

Определение уровня цитокинов в среде выполнено с использованием набора CBA Inflammation Kit (BD), позволяющем в 50 мкл среды определять одновременно 6 различных цитокинов (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα, IL-12). Пробоподготовку и настройку прибора FACSCalibur осуществляли по протоколу фирмы производителя.

Для этого готовили предлагаемые концентрации стандартов цитокинов. Смешивали равные объемы бус с адсорбированными на их поверхности антителами к цитокинам. В пробирки вносили по 50 мкл подготовленных бус, исследуемых проб либо стандартов и реагента для детекции. Пробирки и инкубировали 3 часа при комнатной температуре в защищенном от света месте. После инкубации пробы однократно отмывали промывочным буфером с последующим центрифугированием. Супернатант аспирировали и вносили 300 мкл промывочного буфера для дальнейшего исследования на проточном цитометре. Расчет концентраций исследуемых цитокинов в среде проводили с помощью калибровочного графика.

#### **Исследование поверхностной экспрессии рецепторов TLR4 и TREM-1 на стимулированных моноцитах**

Цельную гепаринизированную кровь от здорового донора разводили 1:1 с питательной средой, далее 1 мл этой смеси инкубировали в силиконированных пробирках со стимуляторами LPS и/или ЦФК в течение 2 и 4 часов, в контрольную пробу был добавлен PBS. После инкубации стимулированная кровь была окрашена согласно протоколу конъюгированными с флуорохромами моноклональными антителами. Использовали следующие двуцветные панели: TLR2 или TLR4, конъюгированные с FITC (Nucult biotech) в комбинации CD14 – PE (BD) и CD14 – FITC (BD) совместно с TREM-1 – PE (R & D). Для выделения популяции моноцитов применялось двойное гейтирование по FS/SS и SS/CD14. Уровень поверхностной экспрессии изучаемых рецепторов определяли по средней интенсивности флуоресценции (MIF) с использованием значений Geomean. Было проведено 5 независимых экспериментов с кровью от 3 условно здоровых доноров.

Статистический анализ выполнен в программе Statistica 6.0 с использованием критерия Wilcoxon для парного сравнения. Данные представлены в виде медианы (Me), 25% и 75% квартилей (Q1-Q3) выборки показателей.

## **Результаты**

#### **Содержание Hsp70 в ЦФК**

Концентрация Hsp70 в ЦФК составила 10,2 нг/мл, что превышало содержание этого анализата в сы-

воротке крови пациентов перед операцией более чем в 100 раз (по результатам ранее проведенных нами исследований содержание Hsp70 в сыворотке крови 18 пациентов до операции АКШ соответствовало 0,060 [0,029-0,087] нг/мл [неопубликованные данные]).

Соответственно, в 1% разведении ЦФК концентрация Hsp70 0,102 нг/мл, 2% ЦФК – 0,204 нг/мл, 5% ЦФК – 0,51 нг/мл.

#### Определение оптимальной стимулирующей концентрации ЦФК и LPS и времени регистрации результатов синтеза цитокинов

В состав цитозольной фракции гомогената кардиомиоцитов входит большое количество компонентов, которые, в зависимости от концентрации, могут обладать различными цитотоксическими свойствами. В основу подбора оптимальной концентрации ЦФК для проведения эксперимента нами был положен принцип максимальных стимулирующих свойств при минимальной цитотоксичности. Для сравнения изучали цитотоксичность и стимулирующую активность LPS. На этом этапе предварительного определения оптимальных концентраций и времени регистрации результатов был выполнен один эксперимент.

#### 1. Изучение цитотоксичности различных концентраций ЦФК и LPS по отношению к моноцитам

Количество клеток, погибших некрозом или находящихся в поздней стадии апоптоза, мы оценивали по относительному содержанию PI<sup>+</sup> клеток.

Моноциты продемонстрировали низкую устойчивость к воздействию стимуляторов и культивации в целом. В течение 24 часов наблюдения в контроле прогрессивно увеличива-

лось относительное количество PI<sup>+</sup> моноцитов и к концу суток составило 19% (рис. 1). Этот факт вполне объясним, если учесть, что время жизни моноцитов в циркулирующей крови – от 24 до 72 ч, затем не мигрировавшие в ткани клетки погибают апоптозом.

Присутствие LPS и ЦФК увеличивало количество погибших моноцитов. Через сутки инкубации с различными концентрациями LPS и ЦФК 1 и 2% относительное содержание PI<sup>+</sup> клеток составило около 30%. В то же время ЦФК 5% вызвала гибель более 50% моноцитов, что может свидетельствовать в пользу цитотоксических свойств данной концентрации.

#### 2. Оценка уровня синтеза цитокинов моноцитами при воздействии различных концентраций ЦФК и LPS (липополисахарида)

Воздействие различных концентраций LPS и ЦФК на моноциты приводило к увеличению продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, TNF $\alpha$ ) (рис. 2). Инкубация моноцитов в присутствии LPS 1 нг/мл и 5 нг/мл сопровождалась значительным повышением уровня провоспалительных цитокинов (рис. 2Б). В то же время результаты влияния LPS 0,1 нг/мл мало отличались от контрольных значений, отражая низкую стимулирующую активность.

ЦФК 2% и 5% увеличивала выработку моноцитами провоспалительных цитокинов (рис. 2А). Для проведения дальнейших исследований нами была выбрана ЦФК 2% с достаточной стимулирующей активностью и одновременно минимальной цитотоксичностью по отношению к моноцитам.

Продукция IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$  под влиянием LPS в концентрации 5 нг/мл многократно превы-

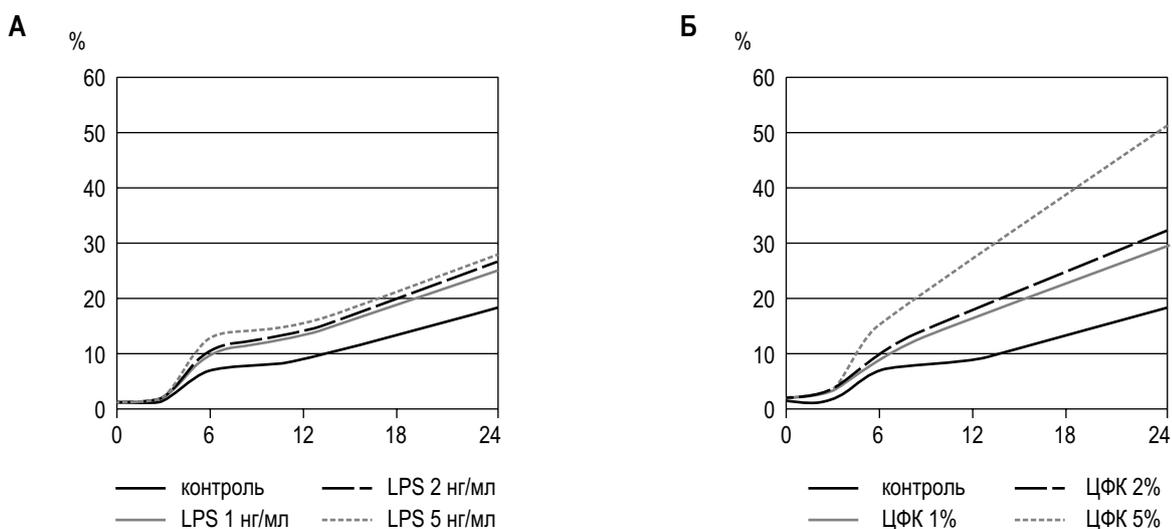


Рисунок 1. Динамика количества PI<sup>+</sup> моноцитов в процессе 24-часовой инкубации с различными концентрациями LPS и ЦФК

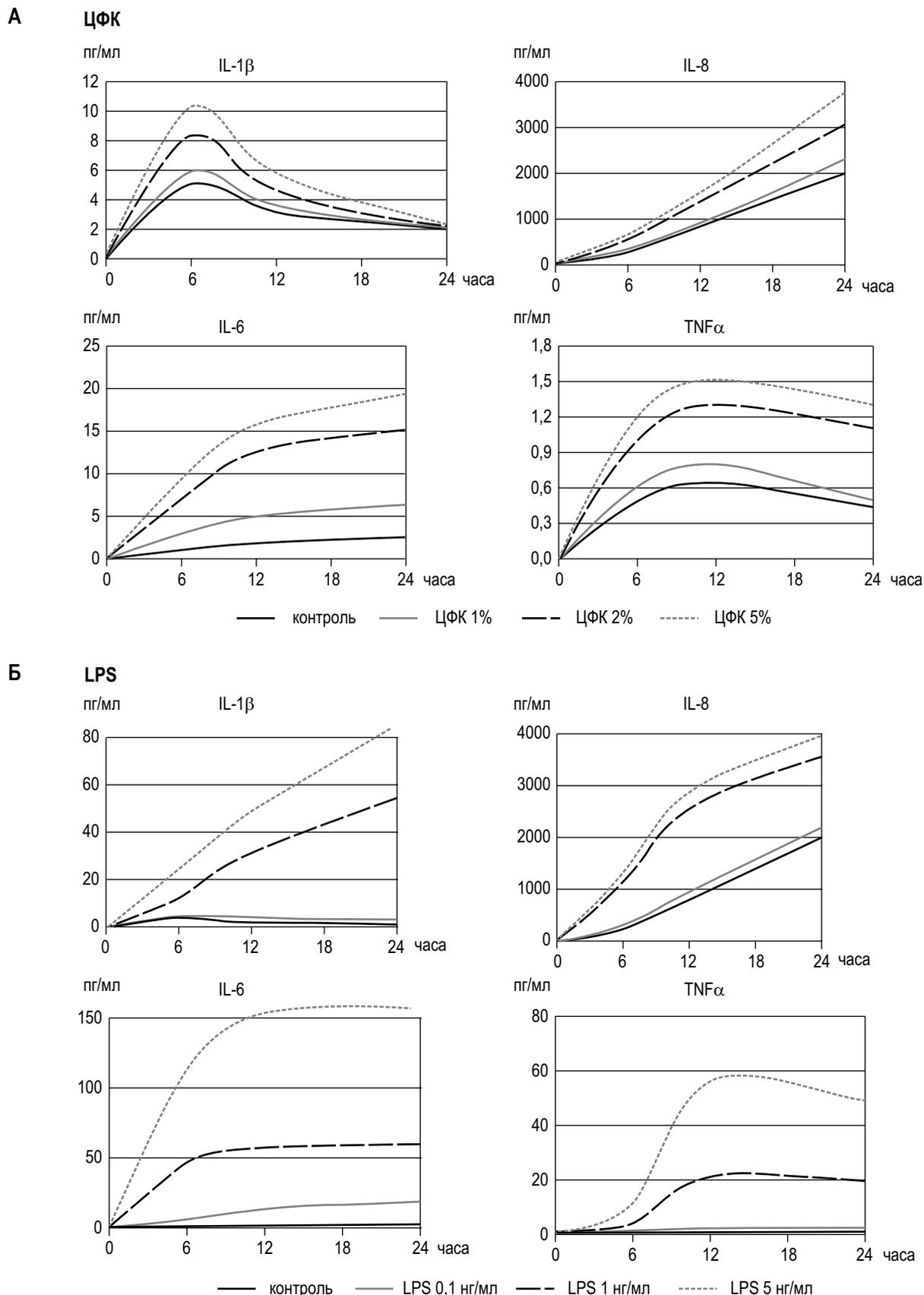


Рисунок 2. Содержание цитокинов в культивационной среде при инкубации моноцитов с различными концентрациями ЦФК (А) и LPS (Б)

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СРЕДЕ В ПРОЦЕССЕ ИНКУБАЦИИ МОНОЦИТОВ В ПРИСУТСТВИИ LPS, ЦФК И ИХ КОМБИНАЦИИ, А ТАКЖЕ СУММА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗОЛИРОВАННОЙ СТИМУЛЯЦИИ LPS И ЦФК, Me (Q1-Q3)**

Группы n = 5	6 часов	12 часов			
	IL-1 $\beta$ (пг/мл)	IL-1 $\beta$ (пг/мл)	IL-8 (пг/мл)	IL-6 (пг/мл)	TNF $\alpha$ (пг/мл)
Контроль	4,0 (3,9-4,1)	3,2 (3,1-3,3)	848,4 (804,8-872,8)	1,7 (1,6-1,9)	0,7 (0,7-0,9)
ЦФК 2%	6,3* (5,4-13,1)	4,9* (4,2-10,9)	1345,4* (1323,1-1723,6)	12,7* (6,2-16,3)	1,2* (1,1-3,1)
LPS 1 нг/мл	15,4*.*. (9,6-19,6)	38,6*.*. (24,2-48,9)	2688,5*.*. (2012,7-3325)	57,9*.*. (45,4-63,1)	21,3*.*. (16,0-24,6)
Комбинация LPS и ЦФК	32,8*.*.*.# (29,9-34,9)	50,7*.*.*.# (44,9-61,2)	5576*.*.*.# (4369,6-6245,6)	108,8*.*.*.# (89,4-150,3)	33,0*.*.*.# (26,6-39,1)
LPS + ЦФК	20,8 $\Delta$ (15,9-32,7)	42,8 $\Delta$ (29,1-59,8)	4011,6 $\Delta$ (3358,1-5048,6)	69,3 $\Delta$ (58,1-74,2)	22,4 $\Delta$ (17,2-27,7)

**Примечание.** \* – p < 0,02 по сравнению с контролем; \*\* – p < 0,02 по сравнению с ЦФК; # – p < 0,02 по сравнению с LPS;  $\Delta$  – p < 0,02 по сравнению с совместным воздействием LPS и ЦФК.

шал ответ на ЦФК 2% (рис. 2Б), поэтому для лучшей совместимости и наибольшей наглядности результатов совместной стимуляции ЦФК и LPS в эксперименте был использован LPS в концентрации 1 нг/мл.

Динамика синтеза цитокинов моноцитами имела определенную закономерность. Максимальный уровень продукции IL-1 $\beta$  в ответ на ЦФК регистрировался через 6 часов инкубации, при добавлении LPS 1 нг/мл и 5 нг/мл содержание IL-1 $\beta$  в среде повышалось на протяжении 24 часов (рис. 2). Так же прогрессивно увеличивалась выработка IL-8 в ответ на LPS и ЦФК. Максимальная продукция IL-6 и TNF $\alpha$  при инкубации моноцитов в присутствии ЦФК и LPS приходилась на 12 часов культивации. Сопоставление времени пиков максимальной концентрации цитокинов показало, что оптимальным временем регистрации результатов синтеза IL-1 $\beta$  является 6 и 12 часов стимуляции, для всех остальных цитокинов – 12 часов.

#### **Влияние LPS, ЦФК и их комбинации на цитокинпродуцирующую функцию моноцитов**

Инкубация моноцитов в присутствии LPS и ЦФК приводила к достоверному повышению в среде концентрации IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, TNF $\alpha$  (табл. 1), что свидетельствует об активации моноцитов и усилении синтеза провоспалительных цитокинов. Через 12 часов воздействия на моноциты ЦФК, LPS и их комбинации регистрировалось достоверно более высокое содержание

IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$  по сравнению с контрольными значениями. Аналогичные результаты получены для IL-1 $\beta$  на 6 часу инкубации с теми же стимуляторами.

Уровень синтеза всех исследуемых цитокинов в ответ на ЦФК был ниже, чем на LPS (табл. 1).

Примечательно, что через 12 часов совместного воздействия LPS и ЦФК на моноциты содержание в среде IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  было достоверно выше суммы изолированной стимуляции LPS и ЦФК (табл. 1). Такой же эффект наблюдается для IL-1 $\beta$  через 6 часов инкубации.

#### **Влияние LPS, ЦФК и их комбинации на экспрессию TLR2, TLR4, TREM-1 на поверхности моноцитов**

Стимуляция крови LPS в течение 2-4 часов приводила к усилению экспрессии TLR4, TLR2 и TREM-1 на поверхности моноцитов по сравнению с контрольной пробой (рис. 3). Двухчасовое воздействие ЦФК повышало плотность TLR4 на моноцитах по сравнению с контролем, по истечению 4 часа достоверной разницы уже не наблюдалось. В то же время ЦФК не оказывала достоверного влияния на уровень поверхностной экспрессии рецепторов TREM-1 и TLR2.

Инкубация крови при одновременном присутствии LPS и ЦФК повышала среднюю интенсивность флуоресценции (MIF) рецепторов TLR2 и TREM-1 на моноцитах сильнее, чем изолированное воздействие той же концентрации LPS.

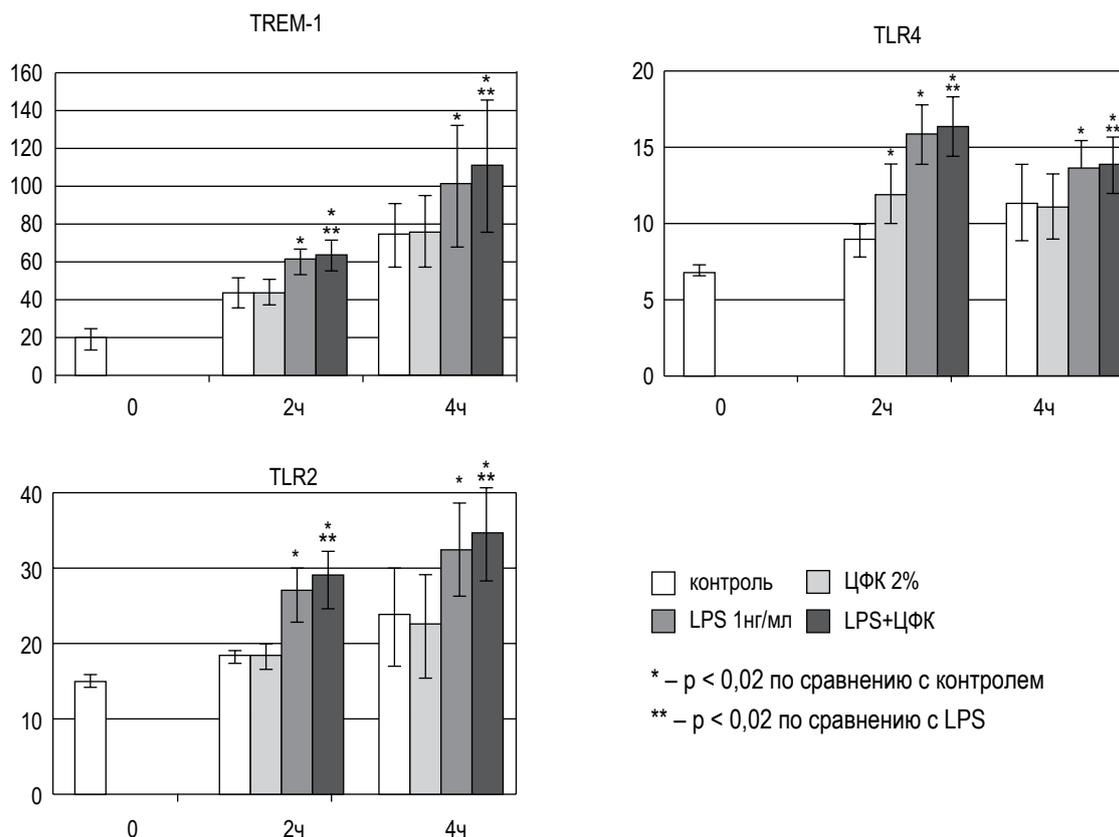


Рисунок 3. Уровень поверхностной экспрессии TLR2, TLR4 и TREM-1 на моноцитах при отдельной и совместной стимуляции LPS и ЦФК (n = 5)

## Обсуждение

В литературе описано влияние аларминов на моноциты и макрофаги в условиях получения лизатов из клеток предварительно стимулированных патогенами [9]. Эта модель хорошо описывает изменения, связанные с высвобождением аларминов, в ответ на инфекционные воздействия и не затрагивает вопросов механического повреждения клеток и тканей. Тем не менее важную роль в развитии системной воспалительной реакции в раннем послеоперационном периоде играет массивный выброс различных аларминов из поврежденных тканей.

В ЦФК мы исследовали концентрацию внеклеточного Hsp70 который является эндогенным сигналом тревоги и активатором иммунной системы [2]. По данным литературы, в первые 5 часов после операции АКШ в сыворотке крови пациентов регистрируется значительное увеличение содержания Hsp70 с его последующим резким снижением практически до исходных значений. Такая кинетика Hsp70 хорошо коррелирует с концентрацией IL-6 и манифестацией воспалительного ответа в послеоперационном периоде [8].

Без сомнения, Hsp70 не единственный алармин, присутствующий в ЦФК, однако, учитывая его связь с системными воспалительными

проявлениями в послеоперационном периоде, именно он был выбран для дальнейшего исследования. Механически поврежденная ткань миокарда может являться источником внеклеточного Hsp70 [2, 3, 8], и об этом свидетельствует его высокая концентрация в приготовленной нами ЦФК. При этом стимулирующее влияние ЦФК на моноциты коррелировало с содержанием в ней Hsp70. Так, содержание Hsp70 в активирующей моноциты 2% и 5% ЦФК было в несколько раз выше, чем в сыворотке крови, а в слабо стимулирующей 1% ЦФК концентрация Hsp70 незначительно превышала аналогичные показатели сыворотки.

Как было сказано ранее, TLRs являются активирующими рецепторами врожденного иммунитета, способными распознавать как паттерны микроорганизмов, так и алармины [2]. По данным литературы, взаимодействие TLRs с лигандами приводит к повышению mRNA и уровня поверхностной экспрессии TLRs [10], более того, является первым необходимым этапом повышения экспрессии активирующего рецептора миелоидных клеток TREM-1 [5]. Следовательно, участие TLRs в активации моноцитов предполагает повышение экспрессии TLRs и TREM-1 на их поверхности.

Стимуляция моноцитов продуктами механического повреждения миокарда, сопровождалась усилением поверхностной экспрессии TLR4. Известно, что Hsp70-зависимая активация моноцитов и макрофагов протекает с вовлечением рецептора TLR4 и повышением его экспрессии [8]. Следовательно, высокое содержание Hsp70 в активирующей моноциты ЦФК и сопутствующее повышение поверхностной экспрессии TLR4 может свидетельствовать о причастности Hsp70 к стимулирующему влиянию ЦФК.

Воздействие на кровь LPS в течение 2-4 часов приводило к повышению экспрессии TLR2, TLR4 и TREM-1 на поверхности моноцитов. Поскольку LPS является лигандом для TLR4, это объясняет увеличение поверхностной экспрессии TLR4 и TREM-1, но не TLR2. Механизм этого явления связан с феноменом праймирования. В литературе описано праймирование моноцитов пептидогликаном для усиления цитокинового ответа на LPS. В основе лежит способность регуляции экспрессии каждого TLR не только собственным лигандом, но и паттернами микроорганизмов, не ассоциированными с данным рецептором [10], что позволяет повышать чувствительность клеток к другим лигандам и увеличивать синтез цитокинов.

Важная особенность активации TREM-1 в присутствии лигандов TLR связана с амплификацией воспалительного ответа и многократным усилением продукции провоспалительных цитокинов моноцитами по сравнению с раздельной стимуляцией каждого рецептора [6, 7]. Следовательно, увеличение экспрессии TREM-1 и TLRs на поверхности моноцитов косвенно указывает на повышение их провоспалительного потенциала.

Стимулированная поверхностная экспрессия TLRs имела специфичную динамику во времени. К 4 часу инкубации моноцитов в присутствии LPS и LPS с ЦФК экспрессия TLR2 на их поверхности продолжала увеличиваться, в то время как TLR4 уже снижалась. Схожая динамика поверхностной экспрессии TLR2 и TLR4 получена и другими исследователями [10]. Отмечено быстрое увеличение MIF TLR4 через 2-2,5 часа после стимуляции LPS и LTA и столь же резкое снижение MIF к 5-6 часу. Для TLR2

зарегистрировано плавное повышение экспрессии вплоть до 24 часов стимуляции [10]. Работы последних лет свидетельствуют, что поверхностная экспрессия TLR2 и TLR4 зависит не только от экспрессии матричной RNA, но тесно связана с эндоцитозом LPS и LTA в составе комплексов CD14/MD2/TLR4 и CD14/TLR2 и обратной рециркуляции этих комплексов к плазматической мембране [11, 15]. Поэтому уровень поверхностной экспрессии TLR2 и TLR4 является сложным динамичным процессом и отражает несколько составляющих одновременно (уровень синтеза, процессы эндоцитоза и рециркуляции этих рецепторов).

Обнаружен синергизм и потенцирование действия LPS и ЦФК на внеклеточный синтез провоспалительных цитокинов моноцитами, поскольку результат совместного влияния LPS и ЦФК превышает сумму результатов изолированной стимуляции. Этот важный вывод согласуется с результатами других исследователей, показывающих, что алармины не только активируют воспаление поврежденных тканей, но и действуют в синергизме с патогенами микроорганизмов, усиливая воспалительную реакцию клеток врожденного иммунитета [13, 16].

Обширные повреждения тканей при наличии сопутствующих микробных факторов могут провоцировать переход местного воспаления к системному воспалительному ответу [13]. Кроме того, операция на сердце в условиях ИК связана с гипоперфузией внутренних органов, приводящей к ишемическому повреждению кишечной стенки, нарушению барьерной функции кишечника и транслокации в кровь бактерий и других токсических продуктов, также создает предпосылки для развития осложненных форм СВО.

Таким образом, нами было показано, что механически поврежденная ткань миокарда может являться источником аларминов, в частности внеклеточного Hsp70. При этом обнаружено соответствие содержания Hsp70 в среде и уровня синтеза моноцитами провоспалительных цитокинов, а также поверхностной экспрессии TLR4. Подтвержден синергизм и потенцирование влияния LPS и ЦФК на синтез провоспалительных цитокинов моноцитами.

## Список литературы

1. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Юрченко Л.Н. Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса // Цитокины и воспаление. — 2007. — Т. 6, № 4. — С. 9-21.
2. Пинегин Б.В., Карсонова М.И. Алармины — эндогенные активаторы воспаления и врожденного иммунитета // Иммунология. — 2010. — Т. 5. — С. 246-255.

Ссылки 3-17 см. в References (стр. 448). See References for numbers 3-17 at pp. 448.

## References

1. Gusev E.Yu., Chereshnev V.A., Yurchenko L.N. Sistemnoe vospalenie s pozitsii teorii tipovogo patologicheskogo protsessa [Systemic inflammation with position of theory of the pathological process]. *Tsitokiny i vospalenie – Cytokines and Inflammation*, 2007, vol. 6, no. 4, pp. 9-21.
2. Pinegin B.V., Karsonova M.I. Alarminy – endogennye aktivatory vospaleniya i vrozhdennoogo immuniteta [Alarmins – endogenous activators of inflammation and innate immunity]. *Immunologiya – Immunology*, 2010, vol. 5, pp. 246-255.
3. Adib-Conquy M., Cavaillon J. Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Letters*, vol. 581, iss. 19, pp. 3723-3733.
4. Bianchi M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, vol. 81, pp. 1-5.
5. Bleharski J.R., Kiessler V., Buonsanti C., Sieling P.A., Stenger S., Colonna M., Modlin R.L. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J. Immunol.*, 2003, vol. 170, no. 7, pp. 3812-3818.
6. Bouchon A., Dietrich J., Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, no. 10, pp. 4991-4995.
7. Bouchon A., Facchetti F., Weigand M.A., Colonna M. TREM1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature*, 2001, vol. 410, no. 6832, pp. 1103-1107.
8. Dybdahl B., Wahba A., Lien E., Flo T., Waage A., Qureshi N., Sellevold O., Espevik T., Sundan A. Inflammatory Response After Open Heart Surgery Release of Heat-Shock Protein 70 and Signaling Through Toll-Like Receptor-4. *Circulation*, 2002, vol. 105, pp. 685-690.
9. El Mezayen R., El Gazzar M., Seeds M.C., McCall C.E., Dreskin S.C., Nicolls M.R. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol. Lett.*, 2007, vol. 111, no. 1, pp. 36-44.
10. Hadley J.S., Wang J.E., Foster S.J., Thiemermann C., Hinds C. J. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* Upregulates Monocyte Expression of CD14, Toll-Like Receptor 2 (TLR2), and TLR4 in Human Blood: Possible Implications for Priming of Lipopolysaccharide Signaling. *J. Infection and Immunity*, 2005, pp. 7613-7619.
11. Husebye H., Halaas O., Stenmark H., Tunheim G., Sandanger O., Bogen B., Brech A., Latz E., Espevik T. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *J. EMBO*, 2006, vol. 25, no. 4, pp. 683-692.
12. Kono H., Rock K.L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, vol. 8, no. 4, pp. 279-289.
13. Pugin J. How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Annals of Intensive Care*, 2012, vol. 2, no. 27. doi:10.1186/2110-5820-2-27.
14. Timmers L., Pasterkamp G., Hoog V., Arslan F., Appelman Y., Kleijn D. The innate immune response in reperfused myocardium. *J. Cardiovascular Research*, 2012, vol. 94, pp. 276-283.
15. Triantafilou M., Manukyan M., Mackie A., Morath S., Hartung T, Heine H., Triantafilou K. Lipoteichoic Acid and Toll-like Receptor 2 Internalization and Targeting to the Golgi Are Lipid Raft-dependent. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 24, no. 279, pp. 40882-40889.
16. Tsung A., Zheng N., Jeyabalan G., Izuishi K., R.K.J., Geller D.A., Lotze M.T., Lu L., Billiar T.R. Increasing numbers of hepatic dendritic cells promote HMGB1 mediated ischemia-reperfusion injury. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, vol. 81, pp. 119-128.
17. Zhou J., An H., Xu H., Liu S., Cao X. Heat shock up-regulates expression of Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in human monocytes via p38 kinase signal pathway. *J. Immun.*, 2005, vol. 114, no. 4, pp. 522-530.