**Гиперэкспрессия TLR2 и TLR4 у больных с ишемическим инсультом в остром периоде заболевания**

**Введение**

 Ишемический инсульт (ИИ) – острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), возникающее вследствие резкого снижения или прекращения кровотока в сосудах головного мозга, что сопровождается некротическими изменениями в тканях мозга и нарушением его функций. ИИ является одним из ведущих заболеваний, приводящих к инвалидизации и смертности населения по всему миру [4]. Заболеваемость ИИ в России составляет 2,5-3,52 случая на 1000 населения в год, а смертность в остром периоде ОНМК достигает 35%, увеличиваясь на 12-15% к концу первого года, а в течение 5-и лет после инсульта умирают 44% пациентов [4].

Согласно современным научным данным, помимо сосудистых нарушений и других факторов, являющихся непосредственной причиной инсульта, в патогенез ИИ активно вовлечена система врожденного иммунитета, способная индуцировать процесс воспаления в тканях головного мозга [9] на фоне ишемического повреждения [3,9]. В условиях церебральной ишемии в результате гибели нейронов и других клеток высвобождается ряд биологически активных веществ, ассоциированных с повреждением (DAMPs - damage associated molecular patterns), которые способны взаимодействовать с рецепторами врожденного иммунитета [13,14,23]. Среди таких рецепторов наибольший интерес представляет семейство Toll-подобных рецепторов (TLRs), в частности TLR2 и TLR4. В настоящее время собрано уже немало доказательств вовлеченности этих рецепторов в патогенез ИИ. Так, например, имеются данные научной литературы, показывающие, что повышенный уровень экспрессии TLR2 и TLR4 ассоциируется с плохим прогнозом ОНМК и коррелирует с более высокими уровнями провоспалительных цитокинов в сыворотке: TNFα, VCAM-1, IL-1β и IL-6 [5,21]. В экспериментальных моделях тромбоэмболического инсульта на животных установлено, что внутриклеточная экспрессия провоспалительного цитокина IL-1β снижается у мышей с дефицитом TLR2 и TLR4 [21]. Кроме того, в этих же работах показано, что выраженная экспрессия TLR4 связана с функциональным исходом и объемом инфаркта головного мозга [5,24]. При этом, активация TLR4 способна усиливать экспрессию факторов, усугубляющих церебральное повреждение, таких как iNOS и INFγ, [10]. Уровень экспрессии TLR4 связывают с инфильтрацией очага некроза нейтрофилами и моноцитами, а также с активностью микроглии: у TLR4-дефицитных мышей заметно снижалось воспаление на границе с зоной ишемии, обусловленное рекрутированием этих клеток [2].

Также показана и функциональная значимость TLR2 в развитии ИИ. Доказано, что микроглиальные клетки в условиях церебральной ишемии способны усиливать повреждение нейронов при повышении экспрессии провоспалительных медиаторов, ассоциированных с TLR2 [14,22]. На мышиных моделях ИИ установлено, что у животных с нокаутом гена TLR2 объем инфаркта мозга намного меньше, чем у мышей дикого типа [22]. Более того, усиленная экспрессия TLR2 сопряжена с усилением продукции IL-17 и IL-23 микроглией, что приводит к усилению апоптоза нейронов [22].

Таким образом, накопленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что TLR4 и TLR2 играют важную роль в модулировании воспалительного ответа, вызванного церебральной ишемией. Однако роль TLRs в организме больных ишемическим инсультом на системном уровне до сих пор не установлена.

**Целью нашего исследования** являлось изучение экспрессии генов и белков рецепторов врожденного иммунитета (TLR2 и TLR4) в лейкоцитах периферической крови у больных с ишемическим инсультом в динамике заболевания.

**Материалы и методы**

В исследование включено 27 человек, среди которых 13 женщин и 14 мужчин. Пациенты были разделены на 2 группы:

1. Основная группа – пациенты, госпитализированные в стационар кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики педиатрического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России с ишемическим инсультом различной степенью тяжести по шкале NIHSS. В группу вошло 19 человек (N=19), среди которых 10 женщин (средний возраст 73,6±13 лет) и 9 мужчин (средний возраст 68,9±10 лет);

Критерии включения в исследование:

1. первые 24 часа от развития ишемического инсульта;

2. подписание пациентом информированного согласия участия в исследовании;

3. наличие результатов исследований - нейровизуализации, биохимического

анализа крови с определением уровня холестерина, триглицеридов,

липопротеидов высокой, низкой и очень низкой плотности, глюкозы,

коагулограммы и агрегатограммы, дуплексного сканирования брахиоцефальных артерий.

2. Контрольная группа – здоровые доноры с отсутствием острых и хронических воспалительных заболеваний и инсульта в анамнезе. В группу вошло 8 человек (N=8), среди которых 2 женщины и 6 мужчин.

В исследование были включены пациенты с ишемическим инсультом после подписания ими или их ближайшими родственниками информированного согласия. Все пациенты, включенные в исследование, госпитализированы в первые 24 часа от дебюта симптоматики, причем 6 из них в первые 4,5 часа. Первый забор крови для исследования проводился в максимально ранние сроки от момента поступления пациентов в стационар.

При анализе основных модифицируемых факторов риска у пациентов были установлены следующие особенности.

У 17 (94%) больных была выявлена артериальная гипертензия (АД), причем более чем у половины из них заболевание длилось не менее 5 лет, адекватной антигипертензивной терапии пациенты не принимали. На момент поступления у половины больных уровень АД превышал цифры 180/100 мм. рт. ст.

Курили больше половины пациентов (55,5%), стаж курения на момент исследования составил в среднем более 10 лет. Алкоголем злоупотребляли 4 (22%) человека.

Сахарный диабет 2 типа выявлен у 2 (11%) больных. У 5 пациентов (28%) была повышенная масса тела, преимущественно за счет абдоминального ожирения. У 12 (67%) больных выявлена дислипидемия, причем на момент возникновения инсульта только один пациент с целью коррекции нарушений обмена липидов принимал статины. Трое пациентов (17%) в анамнезе перенесли инфаркт миокарда.

Ультразвуковое исследование магистральных артерий головы проводили всем пациентам. Атеросклеротические изменения сосудов выявлены у всех пациентов. Стенозирующий атеросклеротический процесс обнаружен у 14 (78%) больных. Стенозы малых градаций (до 50%) выявлены у 9 (50 %) пациентов. Осложненные атеросклеротические бляшки выявлены у 5 (28%) больных.

У 3 (17%) больных выявлены сосудистые аномалии (гипоплазия позвоночной артерии, передняя трифуркация, задняя трифуркация, деформации сонных артерий, гипертоническая макроангиопатия).

Семейный анамнез был исследован у всех пациентов. Выясняли наличие у родственников сердечно-сосудистой патологии (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, артериальная гипертензия) и цереброваскулярных заболеваний (ишемический инсульт).

У 15 (83%) больных выявлена наследственная отягощенность по инсульту. Наследственная отягощенность по инфаркту миокарда была установлена у 41 (39%). У 13 (72%) пациентов выявлена наследственная предрасположенность к артериальной гипертензии. Наследственность по сердечно-сосудистой патологии из всей выборки выявлена у 16 (88%) больных.

С целью изучения экспрессии генов TLR2 и TLR4 в качестве исследуемого материала была использована лейкоцитарная масса, полученная из цельной крови с использованием стерильного 6% раствора декстрана, по методике, описанной ранее [Молекулярные методы оценки генетического риска и мониторинга соматических мутаций для семей, получивших дополнительное ионизирующее облучение, С.А. Красный, С.П. Фещенко, Н.В. Богданова, Е.С. Торбашевич, 2004]. Из лейкоцитов крови выделяли общую РНК жидкостнофазным методом, используя набор для выделения РНК «РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис, Россия) согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием «Набора для проведения реакции обратной транскрипции» (Синтол, Россия) для синтеза ДНК на матрице РНК интересующего гена (TLR2 и TLR4) для последующего определения числа копий с помощью ПЦР в реальном времени. Реакцию проводили в соответствии с протоколом производителя с применением «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBRGreen I» и праймеров, синтезированных на фирме «Синтол», Россия. Количество копий ДНК изучаемых генов рассчитывалось по формуле: (35,476 – Ср)\*352,6. Реакцию проводили в амплификаторе ДТ-96.

Определение экспрессии TLRs на поверхности клеток периферической крови осуществлялось с помощью проточной цитофлюориметрии. Исследование проводилось по следующей методике. 100 мкл цельной крови окрашивались моноклональными антителами (МАТ) против TLR2 (или TLR4) (e-Biosciences, США), меченными флуюорохромом Alexa Fluor 488, а также МАТ против CD14 (e-Biosciences, США), меченными APC. В качестве изотипического контроля использовались IgG2, меченные соответствующими флюорохромами. Цельная кровь инкубировалась с МАТ в течение 30 мин. при температуре 40С, затем осуществлялось удаление эритроцитов с помощью лизирующего буфера (IOTest 3 Lysing Solution, Beckman Coulter, США). Окрашенные клетки отмывались в фосфатно-солевом буфере и затем анализировались на проточном цитофлюориметре (Beckman Coulter Navios, Beckman Coulter, США).

Регионы лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов устанавливались по показателям светорассеяния, регион моноцитов дополнительно определялся по маркеру CD14.

Процент связывания TLR2 и TLR4 оценивался с учетом неспецифического связывания, определяемого по изотипическому контролю. Средняя интенсивность флюоресценции клеток (MFI) определялась, как отношение средней интенсивности флуюоресценции образца к средней интенсивности флуюоресценции соответсвующего изотипического контроля: MFI=MFIsample/MFIiso.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета «STATISTICA 10», программы GraphPad Prizm 5 и программы Microsoft Exel 2010. Перед проведением анализа выборки показателей были исследованы на нормальность, симметричность и равенство дисперсий. По результатам проверки отдано предпочтение непараметрическим методам анализа. Также значения выборок данных были проверены на наличие выбросов (по интерквантильному размаху), в результате чего часть данных была отклонена. Множественное сравнение показателей поверхностной экспрессии TLR2 и TLR4 в динамике с контрольной группой здоровых доноров проводилось с использованием критерия Крускала-Уоллиса (Kruskal-Wallis test) с апостериорным сравнением по критерию Данна (Dunn’s test).

Однократные сравнения показателей из несвязанных групп проводились с использованием критерия Манна-Уитни. Для оценки взаимосвязи между показателями определялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Работа выполнена на базе кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

**Результаты**

**Изучение экспрессии генов TLR2 и TLR4 в лейкоцитах крови у больных ИИ**

В результате сравнения экспрессии генов TLR2 и TLR4 у больных ишемическим инсультом с контрольной группой было установлено, что на 1-е, 3-и и 7-е сутки после развития инсульта экспрессия гена TLR4 у больных ИИ достоверно повышена по сравнению с группой здоровых доноров (р<0,01) (рис. 1). При этом на 3-и сутки отмечается незначительное снижение экспрессии гена TLR4 по сравнению с 1-и сутками болезни. Однако на 7-е сутки экспрессия изучаемого гена вновь повышается и оказывается выше, чем в 1-е сутки болезни пациентов.

Динамика экспрессии гена TLR2 у больных с ишемическим инсультом имеет несколько иную тенденцию. Наиболее высокая экспрессия гена наблюдается на 1-е сутки болезни пациентов. При этом на 3-и сутки отмечается снижение экспрессии, которая статистически не отличается от группы контроля, однако на 7-е сутки экспрессия снова достоверно возрастает (рис. 2).

**Изучение поверхностной экспрессии TLR2 и TLR4 на лейкоцитах крови у больных с ИИ**

Проведенное исследование поверхностной экспрессии рецепторов показало, что показатели средней интенсивности флуоресценции TLR2 на CD14+ моноцитах периферической крови больных ишемическим инсультом достоверно повышены на 1 и 3 сутки развития заболевания по сравнению с группой контроля. На 7 сутки развития заболевания показатель экспрессии TLR2 снижается и статистически не отличается от группы здоровых доноров (рис. 5).

Динамика поверхностной экспрессии TLR4 на CD14+ моноцитах периферической крови больных ишемическим инсультом имеет несколько отличающуюся тенденцию. На протяжении всего исследования (1-7 сутки заболевания), значение средней интенсивности флуоресценции TLR4 на моноцитах имеет тенденцию к повышению, при этом на 7 сутки отмечается статистически достоверное повышение показателя, по сравнению с группой контроля (p<0,05) (рис. 4).

Оценка данных показателей на других популяциях клеток периферической крови не показала достоверных отличий от контрольной группы здоровых доноров.

Корреляционный анализ показателей поверхностной экспрессии TLR2 и TLR4 и клинических показателей тяжести состояния пациентов выявил слабую положительную корреляцию между показателями поверхностной экспрессии TLR2 и значениями шкалы NIHSS (r=0,42, p<0,05). Более детальный анализ показателей позволил разделить пациентов исследуемой группы на две подгруппы: со значением индекса NIHSS менее 10 и более 10.

Оценка данных поверхностной экспрессии TLR2 в этих подгруппах показала, что пациенты с индексом NIHSS>10 имели боле высокий уровень поверхностной экспрессии TLR2 с 1 по 7 сутки наблюдения. При этом на 3 и 7 сутки разница между подгруппами статистически достоверна (рис. 5).

Уровень поверхностной экспрессии TRL4 на моноцитах периферической крови больных этих подгрупп также различался. Однако наибольшая разница в экспрессии TLR4 наблюдалась в 1 сутки заболевания (p<0,05). На 3 и 7 сутки динамики наблюдения в группе с NIHSS>10 хоть и наблюдалась тенденция к повышению значений, но статистических отличий выявить не удалось (рис. 6).

**Обсуждение**

 В результате проведенного исследования было установлено, что как внутриклеточная, так и поверхностная экспрессии TLR2 и TLR4 у больных с ИИ имеют общую тенденцию к повышению, что может быть связано с высвобождением большого количества эндогенных лигандов этих рецепторов во время церебрального повреждения.

Среди возможных эндогенных лигандов TLRs, вовлеченных в патогенез ИИ, в настоящий момент хорошо изучена роль белков HMGB1, секретируемых в условиях клеточного стресса [9,11,20]. Известно, что в культуре глиальных клеток HMGB1 индуцирует экспрессию iNOS, IL-1β, IL-6, IL-8 и TNFα [6]. Также уровень HMGB1 повышается в крови пациентов с ИИ, при этом, согласно литературным данным, известно, что данный белок может быть предиктором 12-месячного исхода заболевания [6].

В качестве активных индукторов TLRs при ИИ представляется также группа белков теплового шока (HSP). Из всех представителей HSP наибольший интерес в патогенезе ИИ представляют HSP60 и HSP70. Так, например, установлено, что связывание HSP60 и HSP70 с TLR2 и TLR4 приводит к повышению синтеза TNFα, IL-1β и IL-6 в ишемизированном мозге [5,21].

При оценке экспрессии генов TLR2 и TLR4 было выявлено, что в 1-е сутки болезни экспрессия изучаемых генов достоверно превышает экспрессию генов в контрольной группе. При этом на 3-и сутки экспрессия изучаемых генов имеет тенденцию к снижению. Возможно, это связано с реализацией механизмов ранней защиты мозговой ткани от повреждения. Имеются данные, указывающие, что после создания модели ИИ у мышей и последующей вивисекции в головном мозге через 3 суток после ишемии отмечаются признаки восстановления нервной ткани, хотя одновременно с этим происходит нарастание патологических процессов [10]. Относительно недавно опубликованы результаты исследований, в которых сообщается о нейропротективной роли HSP70 и HSP27 в раннем постишемическом периоде [3,12,14,16,19]. Также имеются данные, сообщающие о нейропротективной роли microRNA в остром периоде инсульта [18,22,7]. Однако на 7-е сутки вновь отмечается увеличение экспрессии, что, возможно, связано с так называемым феноменом отсроченной гибели нейронов, согласно которому гибель нейронов при ишемическом повреждении происходит по времени неоднородно [2].

Проведение корреляционного анализа между экспрессией генов рецепторов TLR2 и TLR4 и их белками на поверхности моноцитов не выявило прямой взаимосвязи между указанными показателями. Данный факт может быть связан с тем, что мРНК после транскрипции подвергается, с одной стороны, деградации ввиду работы ферментов РНКаз [15], а с другой стороны, действию процесса РНК-интерференции с участием siRNA [11]

В исследовании была выявлена положительная корреляция между степенью тяжести ИИ по шкале NIHSS и экспрессией изучаемых рецепторов. Полученные результаты хорошо подтверждают ранее опубликованные данные Brea D с соавторами [13] где было показано, что в зависимости от тяжести состояния (определяемой по шкале Рэнкин), увеличивается поверхностная экспрессия TLR2 и TLR4 на моноцитах периферической крови больных c ишемическим инсультом. Этот факт может быть связан с большим объемом инфаркта мозга и, соответственно, с большим количеством DAMPs, поступающих в системный кровоток, что в свою очередь приводит к повышению активации системы врожденного иммунитета.

Полученные в результате исследования данные об изменении поверхностной и внутриклеточной экспрессии TLR2 и TLR4 позволяют оценить изменение активности воспалительного процесса у больных ИИ на системном уровне. Новые данные об изменении экспрессии TLRs при ИИ вносят вклад в понимание патогенеза данного заболевания, что обосновывает необходимость дальнейшего исследования роли врожденного иммунитета в развитии ИИ для разработки и внедрения новых подходов к прогнозированию течения и исхода заболевания, а также таргетной терапии.