

ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ TLR2 И TLR4 У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Ганковская Л.В.¹, Стаховская Л.В.¹, Греченко В.В.¹, Кольцова Е.А.¹,
Уварова О.С.², Демина М.Д.¹, Громова Т.В.¹, Свитиц О.А.¹

¹ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. В патогенез ишемического инсульта активно вовлечена система врожденного иммунитета. В условиях церебральной ишемии высвобождается ряд биологически активных веществ, которые взаимодействуют с рецепторами врожденного иммунитета, в частности TLR2 и TLR4, что усугубляет воспаление в тканях головного мозга. Выявление предикторов на уровне системы врожденного иммунитета может позволить прогнозировать клиническое течение ишемического инсульта и обеспечить проведение своевременной терапии. Цель работы – изучение экспрессии рецепторов TLR2 и TLR4 в лейкоцитах периферической крови у больных с ишемическим инсультом в динамике заболевания. В исследование включено 27 человек. Основная группа – пациенты с ишемическим инсультом различной степени тяжести (n = 19). Пациенты основной группы были разделены на две подгруппы: со значением индекса NIHSS менее 10 (n = 10) и более 10 (n = 9). Контрольная группа включала здоровых доноров с отсутствием острых и хронических воспалительных заболеваний в анамнезе (n = 8). В качестве исследуемого материала были использованы лейкоциты периферической крови. Для определения экспрессии генов TLR2 и TLR4 применялся метод ОТ-ПЦР в реальном времени. Определение поверхностной экспрессии TLRs осуществлялось с помощью проточной цитофлуориметрии.

Изучение экспрессии генов TLR2 и TLR4 показало, что на 1-е, 3-и и 7-е сутки после развития инсульта экспрессия гена TLR4 у больных достоверно повышена по сравнению с группой контроля (p < 0,01), в то время как экспрессия гена TLR2 на 3-и сутки болезни статистически не отличается от контрольной группы. Проведенное исследование поверхностной экспрессии рецепторов показало, что средняя интенсивность флуоресценции TLR2 на моноцитах периферической крови больных достоверно повышена на 1-е и 3-и сутки развития заболевания по сравнению с группой контроля. Поверхностная экспрессия TLR4 на моноцитах имеет статистически достоверное повышение лишь на 7-е сутки. Оценка данных поверхностной экспрессии TLRs в подгруппах с разными значениями тяжести по NIHSS показала, что пациенты с индексом NIHSS > 10 имели достоверно более высокий

Адрес для переписки:

Греченко Вячеслав Владимирович
ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 9.
Тел./факс: 8 (916) 828-34-69, (915) 079-87-82,
(926) 702-78-30, (495) 434-90-00, 434-31-65
E-mail: grechenko_v@mail.ru, olga.uvarova.imm@yandex.ru,
lvgan@mail.ru

Address for correspondence:

Grechenko Vyacheslav V.
N. Pirogov Russian National Research Medical University
117997, Russian Federation, Moscow,
Ostrovityanov str., 1, bldg 9.
Phone/fax: 7 (916) 828-34-69, (915) 079-87-82,
(926) 702-78-30, (495) 434-90-00, 434-31-65
E-mail: grechenko_v@mail.ru, olga.uvarova.imm@yandex.ru,
lvgan@mail.ru

Образец цитирования:

Л.В. Ганковская, Л.В. Стаховская, В.В. Греченко,
Е.А. Кольцова, О.С. Уварова, М.Д. Демина,
Громова Т.В., О.А. Свитиц «Гиперэкспрессия TLR2
и TLR4 у больных с ишемическим инсультом в остром
периоде заболевания» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 4. С. 665-674.
doi: 10.15789/1563-0625-HOT-1971

© Ганковская Л.В. и соавт., 2020

For citation:

L.V. Gankovskaya, L.V. Stakhovskaya, V.V. Grechenko,
E.A. Koltsova, O.S. Uvarova, M.D. Demina, T.V. Gromova,
O.A. Svitich "Hyperexpression of TLR2 and TLR4 in patients
with ischemic stroke in acute period of the disease", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 4, pp. 665-674.
doi: 10.15789/1563-0625-HOT-1971

DOI: 10.15789/1563-0625-HOT-1971

уровень поверхностной экспрессии TLR2 в течение всего периода наблюдения, в то время как наибольшая разница в экспрессии TLR4 в подгруппах наблюдалась в 1-е сутки заболевания ($p < 0,05$). У пациентов с ишемическим инсультом выявлено повышение экспрессии TLR2 и TLR4 на уровне генов и молекул по сравнению со здоровыми донорами. Данные показатели могут рассматриваться в качестве возможных предикторов прогноза ишемического инсульта.

Ключевые слова: ишемический инсульт, Toll-подобные рецепторы, TLR2, TLR4, врожденный иммунитет, воспаление

HYPEREXPRESSION OF TLR2 AND TLR4 IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE IN ACUTE PERIOD OF THE DISEASE

Gankovskaya L.V.^a, Stakhovskaya L.V.^a, Grechenko V.V.^a,
Koltsova E.A.^a, Uvarova O.S.^b, Demina M.D.^a, Gromova T.V.^a,
Svitich O.A.^a

^a N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

^b First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Pathogenesis of ischemic stroke is actively involved in the system of innate immunity. Under conditions of cerebral ischemia, a number of biologically active substances are released that interact with innate immunity receptors, in particular TLR2 and TLR4, which exacerbate inflammation in brain tissue. Identification of predictor markers at the level of the innate immunity system may foresee the clinical course of ischemic stroke and ensure timely treatment. Our objective was to study expression of TLR2 and TLR4 receptors in peripheral blood leukocytes in patients with ischemic stroke in the dynamics of the disease. 27 people were included in the study. The main group consisted of patients with ischemic stroke of varying severity ($n = 19$). Patients of the main group were divided into two subgroups: with an NIHSS index value of < 10 ($n = 10$) and > 10 ($n = 9$). The control group included healthy donors with no history of acute and chronic inflammatory diseases ($n = 8$). Peripheral blood leukocytes were used as the test material. To determine expression of the TLR2 and TLR4 genes, RT-PCR in real time was used. Surface expression of TLRs was determined by flow cytometry. A study of the TLR2 and TLR4 gene expression showed that on the 1st, 3rd and 7th day post-stroke, the TLR4 gene expression in patients was significantly increased, when compared to the control group ($p < 0.01$), whereas TLR2 gene expression on the 3rd day of the disease was not statistically different from the control group. A study of surface expression of receptors showed that the average TLR2 fluorescence intensity on the patients' peripheral blood monocytes was significantly increased on the 1st and 3rd day of disease when compared to the control group. The surface expression of TLR4 on monocytes has a statistically significant increase only on day 7. Assessment of surface expression of TLRs in subgroups with different severity values by NIHSS showed that patients with a NIHSS index > 10 had a significantly higher level of surface of TLR2 expression over the observation period, while the largest difference in TLR4 expression in the subgroups was observed on the 1st day of the disease ($p < 0.05$). Patients with ischemic stroke showed an increase in TLR2 and TLR4 expression at the gene and protein level, compared to healthy donors. These indices can be considered possible predictors for clinical prognosis of ischemic stroke.

Keywords: ischemic stroke, Toll-like receptors, TLR2, TLR4, innate immunity, inflammation

Введение

Ишемический инсульт (ИИ) — острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), возникающее вследствие резкого снижения или прекращения кровотока в сосудах головного мозга, что сопровождается некротическими изменени-

ями 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 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 [12, 15, 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: TNF α , VCAM-1, IL-1 β и IL-6 [5, 21]. В экспериментальных моделях тромбоэмболического инсульта на животных установлено, что внутриклеточная экспрессия провоспалительного цитокина IL-1 β 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 IFN γ [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 [15, 22]. На мышинных 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 РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России с ишемическим инсультом различной степени тяжести по шкале NIHSS. В группу вошло 19 человек (n = 19), среди которых 10 женщин (средний возраст 73,6 \pm 13 лет) и 9 мужчин (средний возраст 68,9 \pm 10 лет);

Критерии включения в исследование:

1) первые 24 часа от развития ишемического инсульта;

2) подписание пациентом информированного согласия на участие 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 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 (Красный С.А., Фещенко С.П., Богданова Н.В., Торбашевич Е.С. Молекулярные методы оценки генетического риска и мониторинга соматических мутаций для семей, получивших дополнительное ионизирующее облучение, 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) с целью 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: $(35,476 - Cp) \times 352,6$. Реакцию проводили в амплификаторе ДТ-96.

Определение экспрессии TLRs на поверхности клеток периферической крови осуществлялось с помощью проточной цитофлуориметрии. Исследование проводилось по следующей методике. 100 мкл цельной крови окрашивались моноклональными антителами (МАТ) против TLR2 (или TLR4) (e-Biosciences, США), мечеными флуорохромом Alexa Fluor 488, а также МАТ против CD14 (e-Biosciences, США), мечеными APC. В качестве изотипического контроля использовали IgG2, меченные соответствующими флуорохромами. Цельная кровь инкубировалась с МАТ в течение 30 мин при температуре 4 °С, 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 цитофлуориметре (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 флуоресценции клеток (MFI) определялась как отношение средней интенсивности флуоресценции образца к средней интенсивности флуоресценции соответствующего изотипического контроля: $MFI = MFI_{sample} / MFI_{iso}$.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета Statistica 10, программы GraphPad Prism 5 и программы Microsoft Excel 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 интерквартильному 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 Краскела–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 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 ($p < 0,01$) (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. 3).

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 более 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 TLR4 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, 14, 20]. Известно, что в культуре глиальных клеток HMGB1 индуцирует экспрессию iNOS, IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF α [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].

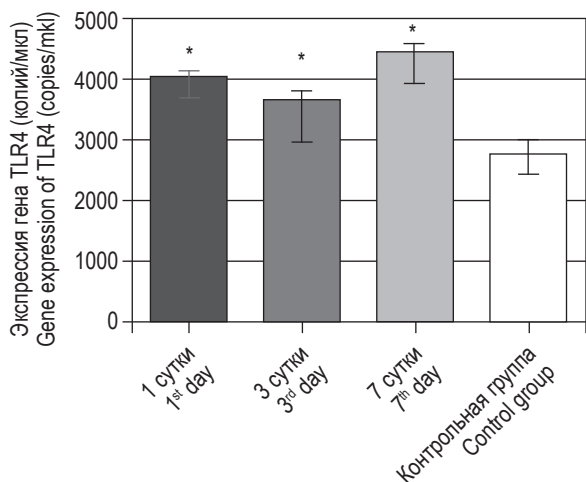


Рисунок 1. Экспрессии гена TLR4 в лейкоцитарной массе больных с ишемическим инсультом на 1-е, 3-и и 7-е сутки после его развития с контрольной группой
Примечание. * – различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$).

Figure 1. Gene expression of TLR4 in the leukocyte mass of patients with ischemic stroke on the 1st, 3rd and 7th day after its development with the control group

Note. *, statistical significance referring to control group ($p < 0.01$).

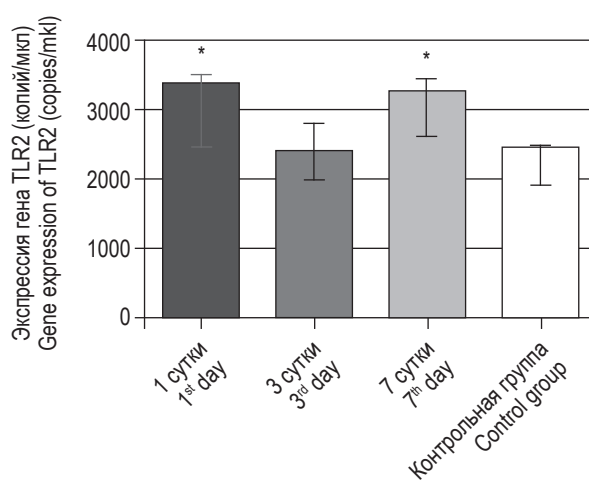


Рисунок 2. Экспрессии гена TLR2 в лейкоцитарной массе больных с ишемическим инсультом на 1-е, 3-и и 7-е сутки после его развития с контрольной группой
Примечание. * – различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$).

Figure 2. Gene expression of TLR2 in the leukocyte mass of patients with ischemic stroke on the 1st, 3rd and 7th day after its development with the control group

Note. *, statistical significance referring to control group ($p < 0.01$).

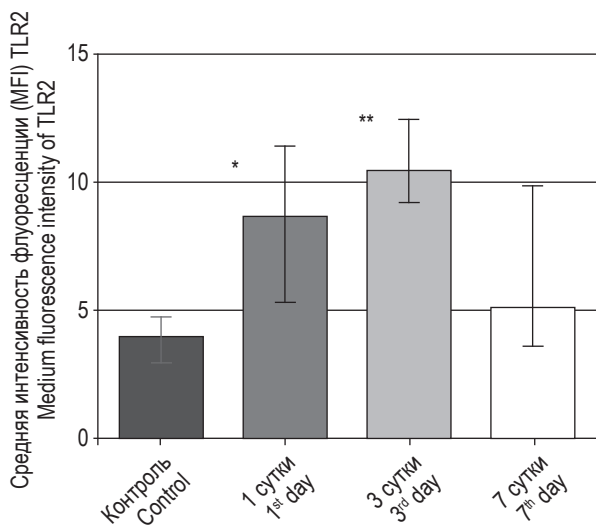


Рисунок 3. Поверхностная экспрессия TLR2 на CD14⁺ моноцитах периферической крови больных с ишемическим инсультом в динамике

Примечание. * – различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$); ** – различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$).

Figure 3. Surface expression TLR2 on CD14⁺ monocytes of peripheral blood of patients with ischemic stroke in dynamic

Note. *, statistical significance referring to control group ($p < 0.05$); **, statistical significance referring to control group ($p < 0.01$).

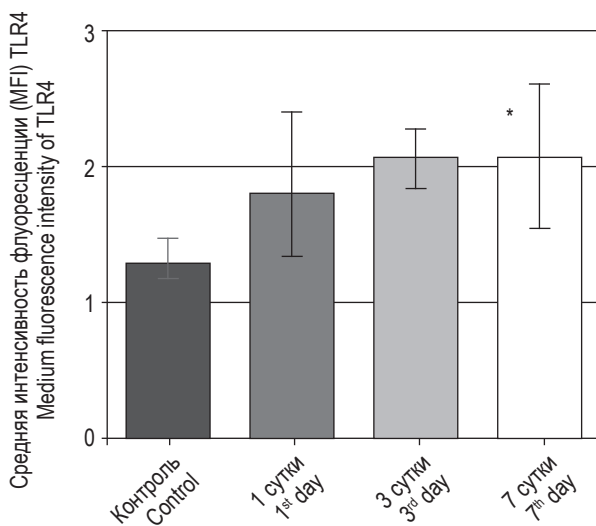


Рисунок 4. Поверхностная экспрессия TLR4 на CD14⁺ моноцитах периферической крови больных с ишемическим инсультом в динамике

Примечание. * – различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Figure 4. Surface expression TLR4 on CD14⁺ monocytes of peripheral blood of patients with ischemic stroke in dynamic

Note. *, statistical significance referring to control group ($p < 0.05$).

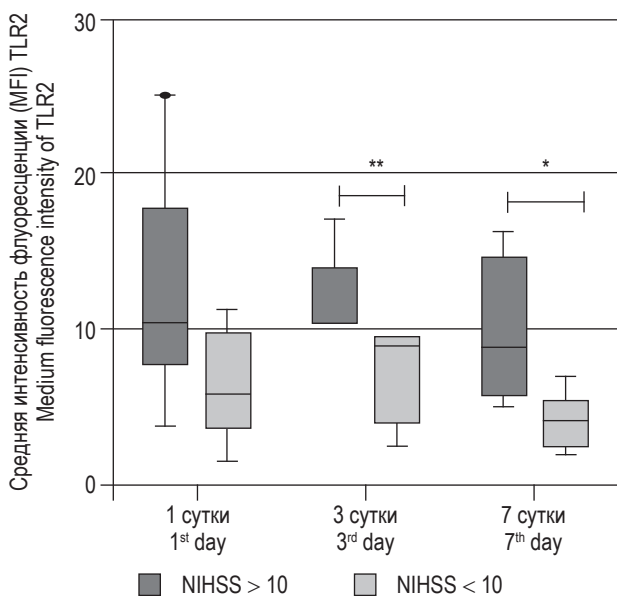


Рисунок 5. Поверхностная экспрессия TLR2 на CD14⁺ моноцитах периферической крови больных с ишемическим инсультом в динамике и с учетом оценки тяжести по шкале NIHSS

Примечание. * – различия между группами достоверны ($p < 0,05$); ** – различия между группами достоверны ($p < 0,01$).

Figure 5. Surface expression TLR2 on CD14⁺ monocytes of peripheral blood of patients with ischemic stroke in dynamic with different NIHSS index

Note. *, statistically significant difference between groups ($p < 0.05$); **, statistically significant difference between groups ($p < 0.01$).

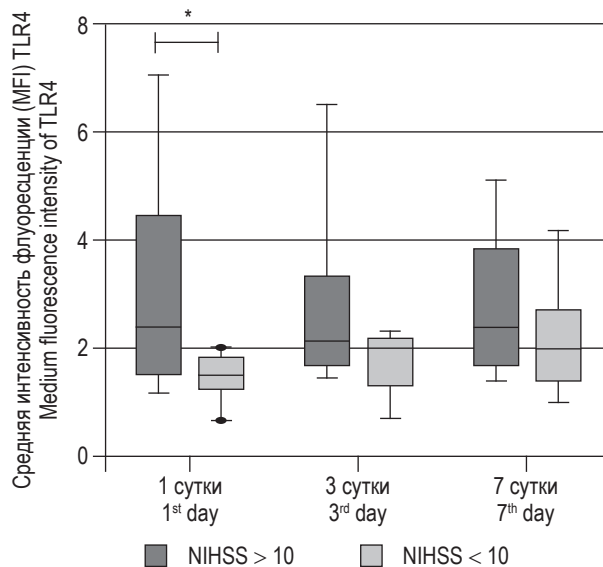


Рисунок 6. Поверхностная экспрессия TLR4 на CD14⁺ моноцитах периферической крови больных с ишемическим инсультом в динамике и с учетом оценки тяжести по шкале NIHSS

Примечание. * – различия между группами достоверны ($p < 0,05$).

Figure 6. Surface expression TLR4 on CD14⁺ monocytes of peripheral blood of patients with ischemic stroke in dynamic with different NIHSS index

Note. *, statistically significant difference between groups ($p < 0.05$).

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 $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ 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, 11, 15, 16, 18]. Также имеются данные, сообщающие о нейропротективной роли microRNA в остром периоде инсульта [7, 19, 22]. 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 [13], а с другой – действию процесса РНК-интерференции с участием siRNA [14].

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. и соавт. [12], где было показано, что в зависимости от тяжести состояния (определяемой по шкале Рэн-

кин) увеличивается поверхностная экспрессия TLR2 и TLR4 на моноцитах периферической крови больных с 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.

Список литературы / References

1. Абатуров А.Е., Волосовец А.П., Юлиш Е.И. Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 2. Лиганды TLR // Здоровье ребенка, 2012. № 6 (41). С. 213-217. [Abaturov A.E., Volosovets A.P., Yulish E.I. The role of Toll-like receptors in recognition of pathogen-associated molecular structures of infectious pathogenic agents and the development of inflammation. Part 2. *Zdorovye rebenka = Child Health*, 2012, no. 6 (41), pp. 213-217. (In Russ.)]
2. Баринов Э.Ф., Евтушенко С.К., Максименко Т.Л., Баринова М.Э., Твердохлеб Т.А., Евтушенко И.С. Механизмы регуляции воспаления в ишемизированном мозге // Международный неврологический журнал, 2013. № 8 (62). С. 17. [Barinov E.F., Evtushenko S.K., Maksimenko T.L., Barinova M.E., Tverdohleb T.A., Evtushenko I.S. Mechanisms of regulation of inflammation in the ischemic brain. *Mezhdunarodnyy neurologicheskiy zhurnal = International Neurological Journal*, 2013, no. 8 (62), p. 17. (In Russ.)]
3. Беленичев И.Ф. Роль белков теплового шока в реализации молекулярно-биохимических механизмов нейропротекции // Фармакология и лекарственная токсикология, 2013. № 6 (36). С. 72-80. [Belenichev I.F. The role of heat shock proteins in the implementation of molecular-biochemical mechanisms of neuroprotection. *Farmakologiya i lekarstvennaya toksikologiya = Pharmacology and Drug Toxicology*, 2013, no. 6 (36), pp. 72-80. (In Russ.)]
4. Ковальчук В.В., Богатырева М.Д., Минуллин Т.И. Современные аспекты реабилитации больных, перенесших инсульт // Неврология и психиатрия, 2014. № 6. С. 101-102. [Kovalchuk V.V., Bogatyreva M.D., Minullin T.I. Current aspects of rehabilitation of stroke patients. *Nevrologiya i psikhatriya = Neurology and Psychiatry*, no. 6, pp. 101-102. (In Russ.)]
5. Константинова Е.В., Кочетов А.Г., Шостак Н.А., Шурдумова М.Х., Еремин И.И., Лянг О.В., Скворцова В. И. Особенности иммунного ответа и воспалительной реакции при атеротромботическом инсульте и инфаркте миокарда // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2015. № 12 (2). С. 48-53. [Konstantinova E.V., Kochetov A.G., Shostak N.A., Shurdumova M.H., Eremin I.I., Lyang O.V., Skvortsova V.I. Characteristics of immune response and inflammatory reaction in atherothrombotic stroke and myocardial infarction. *Zhurnal neurologii i psikhatrii im. S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2015, no. 12 (2), pp. 48-53. (In Russ.)]
6. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Салль Т.С. Алармин 1 (HMGB1) и возрастная патология. Эпигенетические механизмы регуляции // Успехи физиологических наук, 2017. № 4. С. 40-46. [Kuznik B.I., Khavinson V.Kh., Linkova N.S., Sall T.S. Alarmin 1 (HMGB1) and age-related pathology. Epigenetic mechanisms of regulation. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk = Advances in Physiological Sciences*, 2017, no. 4, pp. 40-46. (In Russ.)]
7. Новикова Л.Б., Минибаева Г.М. Роль микроРНК в патогенезе ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2018. № 2. С. 44-46. [Novikova L.B., Minibaeva G.M. A role of microRNA in the pathogenesis of ischemic stroke. *Zhurnal neurologii i psikhatrii im. S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2018, no. 2, pp. 44-46. (In Russ.)]
8. Успенская Ю.А., Комлева Ю.К., Пожиленкова Е.А., Салмин В.В., Лопатина О.Л., Фурсов А.А., Лаврентьев П.В., Белова О.А., Салмина А.Б. Лиганды RAGE-белков: роль в межклеточной коммуникации и патогенезе воспаления // Вестник РАМН, 2015. № 6. С. 696-700. [Uspenskaya Yu.A., Komleva Yu.K., Pozhilenkova E.A., Salmin V.V., Furosov A.A., Lavrentyev P.V., Belova O.A., Salmina A.B. Ligands of RAGE-proteins: role in intercellular communication and the pathogenesis of inflammation. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, no. 6, pp. 696-700. (In Russ.)]
9. Черных Е.Р., Шевела Е.Я., Морозов С.А., Останин А.А. Иммунопатогенетические аспекты ишемического инсульта // Медицинская иммунология, 2018. № 1. С. 19-34. [Chernih E.R., Shevela E.Ya., Morozov S.A., Ostanin A.A. Immunopathogenetic aspects of ischemic stroke. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, no. 1, pp. 19-34. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-19-34.

10. Шертаев М.М., Ибрагимов У.К., Икрамова С.Х., Якубова Ф.Т., Ибрагимов К.У. Морфологические изменения в тканях головного мозга при экспериментальной ишемии // Вестник НГПУ, 2015. № 1 (23). С. 73-77. [Shertaev M.M., Ibragimov U.K., Ikramova S.Kh., Yakubova F.T., Ibragimov K.U. Morphological changes in brain tissue during experimental ischemia. *Vestnik NGPU = Bulletin of the Novosibirsk State Pedagogical University*, 2015, no. 1 (23), pp. 73-77. (In Russ.)]
11. Brea D., Agulla J., Staes A., Gevaert K., Campos F., Sobrino T., Blanco M., Dávalos A., Castillo J., Ramos-Cabrer P. Study of protein expression in peri-infarct tissue after cerebral ischemia. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 12030. doi: 10.1038/srep12030.
12. Brea D., Blanco M., Ramos-Cabrer P., Moldes O., Arias S., Pérez-Mato M., Leira R., Sobrino T., Castillo J. Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2011, Vol. 31, no. 6, pp. 1424-1431.
13. Chanfreau G.F. Impact of RNA modifications and RNA-modifying enzymes on eukaryotic ribonucleases. *Enzymes*, 2017, Vol. 41, pp. 299-329.
14. Fukuda A.M., Badaut J. siRNA treatment: "A Sword-in-the-Stone" for acute brain injuries. *Genes*, Vol. 4, no. 3, pp. 435-450.
15. Gülke E., Gelderblom M., Magnus T. Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, 2018, Vol. 11, 1756286418774254. doi: 10.1177/1756286418774254.
16. Kim J.Y., Han Y., Lee J.E., Yenari M.A. The 70-kDa heat shock protein (Hsp70) as a therapeutic target for stroke. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2018, Vol. 22, no. 3, pp. 191-199.
17. Lackie R.E., Maciejewski A., Ostapchenko V.G., Marques-Lopes J., Choy W.Y., Duennwald M.L., Prado V.F., Prado M.A.M. The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.*, 2017, Vol. 11, 254. doi: 10.3389/fnins.2017.00254.
18. Liu W., Chen X., Zhang Y. Effects of microRNA-21 and microRNA-24 inhibitors on neuronal apoptosis in ischemic stroke. *Am. J. Transl. Res.*, 2016, Vol. 8, no. 7, pp. 3179-3187.
19. Ma L., Sun P., Zhang J.C., Zhang Q., Yao S.L. Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. *Int. J. Mol. Med.*, 2017, Vol. 40, no. 1, pp. 31-38.
20. Sharp F.R., Zhan X., Liu D.Z. Heat shock proteins in the brain: role of Hsp70, Hsp 27 and HO-1 (Hsp32) and their therapeutic potential. *Transl. Stroke Res.*, 2013, Vol. 4, no. 6, pp. 685-692.
21. Shichita T., Ito M., Yoshimura A. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection. *Front. Cell. Neurosci.*, 2014, Vol. 8, 319. doi: 10.3389/fncel.2014.00319.
22. Wang Y., Ge P., Zhu Y. TLR2 and TLR4 in the brain injury caused by cerebral ischemia and reperfusion. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, 124614. doi: 10.1155/2013/124614.
23. Zhou J., Zhang J. Indefication of miRNA-21 and miRNA-24 in plasma as potential early stage markers of acute cerebral infarction. *Mol. Med. Rep.*, 2014, Vol. 10, no. 2, pp. 971-976.
24. Ziegler G., Prinz V., Albrecht M.W., Harhausen D., Khojasteh U., Nacken W., Endres M., Dirnagl U., Niefeld W., Trendelenburg G. Mrp-8 and -14 mediate CNS injury in focal cerebral ischemia. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, Vol. 1792, no. 12, pp. 1198-1204.

Авторы:

Ганковская Л.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Стаховская Л.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Gankovskaya L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, Faculty of Biomedicine, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Stakhovskaya L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Греченко В.В. — к.м.н., доцент, доцент кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кольцова Е.А. — к.м.н., профессор кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Уварова О.С. — студент 6 курса Института клинической медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Демина М.Д. — студент 6 курса, ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Громова Т.В. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, профессор кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Grechenko V.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Biomedicine, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Koltsova E.A., PhD (Medicine), Professor, Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Uvarova O.S., 6th year Student, Institute of Clinical Medicine, First Moscow State I. Sechenov Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Demina M.D., 6th year Student, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Gromova T.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Biomedicine, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Department of Immunology, Faculty of Biomedicine, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 18.03.2020
Принята к печати 06.05.2020

Received 18.03.2020
Accepted 06.05.2020