

Оценка возможности влияния антимедиаторной терапии на экспрессию матричной РНК в мононуклеарных клетках крови больных острым деструктивным панкреатитом

В.А.ГОРСКИЙ, М.А.АГАПОВ, М.В.ХОРЕВА, И.В.ЛЕОНЕНКО

The evaluation of the possibility of mediator treatment influence on the expression of messenger RNA in mononuclear blood cells in patients with acute pancreatitis

V.A.GORSKI, M.A.AGAPOV, M.V.HOREVA, I.V.LEONENKO

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова
Городская клиническая больница №55, г. Москва

Недавние исследования установили ведущую роль воспалительных медиаторов в патогенезе острого панкреатита. Одним из механизмов запуска всего каскада воспаления является активация компонента системы врожденного иммунитета – Toll - подобных рецепторов. В настоящем исследовании проанализирована возможность воздействия на уровень экспрессии матричной РНК TLR2 и TLR4 рецепторов в мононуклеарных клетках периферической крови больных острым панкреатитом посредством антимедиаторной терапии.

Ключевые слова: острый панкреатит, Toll - подобные рецепторы, антимедиаторная терапия

Recent studies have established the leading role of inflammatory mediators in the pathogenesis of acute pancreatitis. One of the mechanisms for starting of the whole cascade of inflammation is the activation of the innate immune system component - Toll - like receptors. In this study the possibility of effects on the level of expression of messenger RNA TLR2 and TLR4 receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute pancreatitis by anti-mediator therapy was analyzed.

Key words: acute pancreatitis, Toll - like receptors, anti-mediator therapy

Достоверно известно, что ведущую роль в патогенезе острого деструктивного панкреатита (ОДП) играют медиаторы воспаления - провоспалительные цитокины, такие как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО α [9]. Эффект их влияния проявляется: в увеличении сосудистой проницаемости, миграции лейкоцитов, локальном повреждении тканей, генерализации воспалительной реакции, повреждении почек, легких и других органов с развитием полиорганной недостаточности в особо тяжелых случаях [1]. Причиной же выброса цитокинов является активация мононуклеарных клеток посредством Toll-подобных рецепторов (TLR).

TLR - относятся к семейству паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунитета. Они играют центральную роль в идентификации микробных патогенов (экзогенные лиганды) клетками иммунной системы. Однако было доказано, что эндогенные лиганды (гепарансульфат, белки теплового шока, фибронектин и др.) также активируют рецепторы врожденного иммунитета и запускают асептическое воспаление, сопровождающееся высокой выработкой провоспалительных цитокинов [6]. В физиологических концентрациях эндогенные лиганды способствуют процессам восстановления и заживления тканей, тогда как высвобождение эндогенных лигандов в избыточных количествах может привести к повреждению тканей.

В частности при остром панкреатите, лиганды эндогенного происхождения, высвобождаемые при

клеточной деструкции (гепаран сульфат и панкреатическая эластаза) могут активировать TLR. Известно, что большинство эндогенных лигандов взаимодействуют с TLR2 и TLR4 рецепторами [2].

После взаимодействия эндогенных лиганд с TLR, происходит активация MID88 зависимого пути, что приводит к миграции в ядро ядерного фактора карра В (NF карра В) и запуску синтеза цитокинов. Кроме того, по данным ряда экспериментальных исследований в мононуклеарных клетках происходит увеличение экспрессии матричной РНК TLR (мРНК TLR) [4]. При этом, в конечном итоге, увеличение экспрессии мРНК TLR должно привести к повышенной экспрессии TLR на поверхности мембраны клетки, и, как следствие, еще большей выработке цитокинов (рис. 1).

Таким образом, возникает замкнутый круг, разобщение связей которого может улучшить результаты лечения ОДП.

Целью настоящего исследования явился анализ возможности воздействия антимедиаторной терапии на уровень экспрессии мРНК TLR2 и TLR4 рецепторов в мононуклеарных клетках периферической крови больных ОДП.

Материалы и методы

Антимедиаторную терапию проводили путем инфузии НПВС «Лорноксикам», являющегося единственным зарегистрированным в РФ препаратом

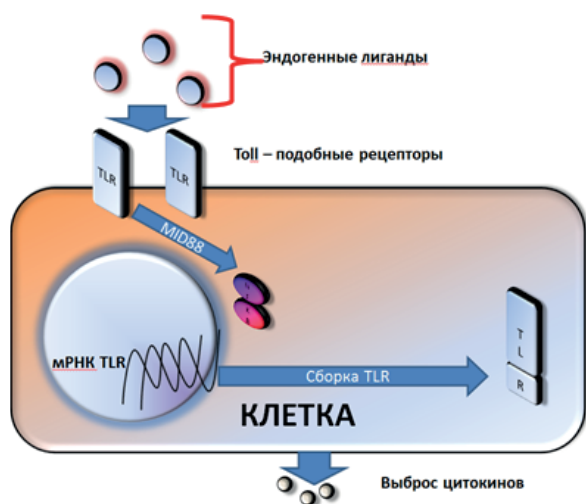


Рис. 1. Схема взаимодействия мононуклеарной клетки с эндогенными лигандами.

группы оксикамов с возможностью внутрисосудистого введения. Препарат вводили внутривенно капельно в течение первых пяти дней от момента поступления в дозировке 32, 32, 24, 16 и 16 мг в сутки, соответственно.

За 2011 год обследовано 19 больных ОДП алиментарной этиологии в возрасте от 20 до 60 лет. Все пациенты поделены на две группы. В 1 группу включены 10 пациентов, получающих только стандартную терапию. Базисная терапия пациентов 2 группы (9 больных) дополнительно включала «Лорноксикам». В соответствии с классификацией Атланты 2009 (3-й пересмотр) [8], все пациенты каждой группы, в зависимости от балльной оценки тяжести состояния по шкале APACHE II, были разделены на две подгруппы: подгруппа тяжелой степени исходного состояния (ПТС) (15-18 баллов) и подгруппа средней степени тяжести (ПССТ) исходного состояния (10-14 баллов) (таб. 1).

Периферическую кровь для исследования забирали на 1, 3, 7 и 14-е сутки после госпитализации. Исследование проводилось на базе 1 и 2-го хирургических отделений городской клинической больницы № 55 г. Москвы. Для контроля исследовали кровь у 20 человек (группа здоровых доноров) в возрасте 20-45 лет: 11 мужчин и 9 женщин. Донорская кровь была предоставлена отделением переливания крови и гравитационной хирургии РДКБ (Российская детская клиническая больница г. Москвы).

МНК выделяли из гепаринизированной периферической крови (25 ед. в 1 мл крови) здоровых доноров и больных ОДП в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина (Pharmacia, $\rho=1,077$ г/см³). Рабочая концентрация клеток составляла 1×10^6 в 1 мл среды RPMI 1640 (Sigma), содержащей 5% сыворотки эмбрионов коров ("HyClone, Perbio"), 2mM L-глутамин (НПП «ПанЭко»), антибиотик – 100 мкг/мл гентамицина (ОАО "Дальхимфарм", г. Хабаровск). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью 0,1% раствора трипанового синего. Выделенные клетки хранили в растворе для стабилизации РНК "RNAlater RNA stabilization reagent" (Qiagen) при -70°C .

Для выделения РНК из мононуклеарных клеток периферической крови человека использовали коммерческие наборы "RNeasy Plus Mini Kit" (Qiagen, США). Каждый образец содержал 1×10^6 клеток. Выделение проводилось в соответствии с инструкцией по применению наборов. Концентрацию выделенной из образцов РНК измеряли на спектрофотометре Picodrop (Thermo scientific, США). Концентрация РНК в образцах доноров и пациентов составила 16-80 нг/мкл. Рекомендуемая концентрация для проведения реакции обратной транскрипции от 1 пг/мкл до 1 мг/мкл.

Для проведения реакции обратной транскрипции использовали набор реагентов "High capacity RNA to cDNA Master mix" (Applied Biosystems, США). Равные количества РНК от здоровых доноров и пациентов с ОДП были использованы для проведения реакции обратной транскрипции. Реакцию обратной транскрипции проводили в объеме 20 мкл на приборе Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР в режиме реального времени.

Анализ проводили на приборе Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Смесь для реакции готовили по инструкции к реагентам "Taqman Gene Expression Master Mix", использовали набор праймеров для определения генов *tlr2* (Hs01014511-m1, Applied Biosystems), *tlr4* (Hs00152939-m1, Applied Biosystems). Реакционная смесь содержала 12,5 мкл "Taqman Gene Expression Master Mix", 1,25 мкл праймеров, 2,5 мкл кДНК в общем объеме 25 мкл. Уровни экспрессии TLR нормировали по гену β -актина (Human ACTB Endogenous Control (FAM / MGB Probe), Applied Biosystems, США). Режим для проведения реакции амплификации: 2 мин при $t = 50^{\circ}\text{C}$, 10 мин при $t = 95^{\circ}\text{C}$, 15 сек при $t = 95^{\circ}\text{C}$, 1 мин при $t = 60^{\circ}\text{C}$. Количество циклов 40. Расчет осу-

Таблица 1

Распределение больных в зависимости от тяжести исходного состояния по шкале APACHE II

	Подгруппа тяжелой степени тяжести исходного состояния (ПТС) (15-18 баллов)	Подгруппа средней тяжести (ПССТ) (10-14 баллов)
I группа (10 больных)	4	6
II группа (9 больных)	5	4

ществлялся в программе к прибору Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, версия 2.0.5. Метод $\Delta\Delta C_t$ - это относительный метод измерения, при применении которого получали результаты в виде относительных единиц (ОЕ), которые показывают уровень экспрессии гена-мишени в исследуемом образце по отношению к калибратору. В качестве шага 1 проводили нормализацию по эндогенному контролю (C_t гена-мишени - C_t эндогенного контроля = ΔC_t), шаг 2: нормализация по калибратору (ΔC_t образца - ΔC_t калибратора = $\Delta\Delta C_t$), $ОЕ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$. ОЕ показывают уровень экспрессии гена-мишени в исследуемом образце по отношению к калибратору (за калибратор принимали пулированную кДНК доноров).

Обработку данных проводили в программном пакете StatSoft Statistica. Результаты выражали как среднее арифметическое для анализируемой группы показателей \pm стандартное отклонение. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием непараметрических критериев. Для сравнения групп по количественным признакам использовали U-критерий Манна-Уитни и критерий Вилкоксона. Различия показателей в группах считались статистически значимым при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Уровень экспрессии мРНК TLR2 в мононуклеарах больных ОДП обеих групп во всех временных точках заболевания был достоверно выше, чем у здоровых доноров (табл. 2).

У больных ПТС 1 группы пик экспрессии мРНК TLR2 приходился на 3-и сутки стационарного лечения. К 7, 14-м суткам значения мРНК TLR2 снижались, но все еще значительно превышали показатели в группе здоровых доноров (табл. 2). Кроме того, уровень экспрессии мРНК TLR2 у больных ПССТ 1 группы был статистически значимо ниже, чем в ПТС 1 группы на 1, 3 и 7-е сутки заболевания. В ПТС и ПССТ 2 группы пик экспрессии мРНК TLR2 наблюдали на 1-е сутки заболевания, в дальнейшем отмечали постепенное снижение изучаемого показателя. В ПТС 2 группы также значения экспрессии мРНК TLR2 были статистически значимо выше, чем в ПССТ этой же группы (табл. 2).

У больных с тяжелым течением, получающих лорноксикам, уровень экспрессии мРНК TLR2 достоверно ниже, начиная с 3-х суток по сравнению с пациентами ПТС 1 группы (табл. 2). У больных со среднетяжелым течением как в 1, так и во 2 группах на 3-и сутки выявили снижение экспрессии. В дальнейшем, в группе больных, получающих «Лорноксикам» наблюдается постепенное снижение экспрессии мРНК TLR2, у больных 1 группы отмечается повышение экспрессии на 7-е сутки заболевания с последующим снижением к 14-м суткам.

При оценке экспрессии мРНК TLR4 было отмечено, что экспрессия мРНК TLR4 в мононуклеарах больных ОДП 1 и 2-й групп была достоверно выше, чем у здоровых доноров (табл. 3).

Таблица 2

Экспрессия мРНК TLR2 у больных ОДП

	Больные 1 группы		Больные 2 группы	
	ПТС	ПССТ	ПТС	ПССТ
1 сутки	43,75 \pm 23,78*	14,54 \pm 6,78	42,99 \pm 25,67*	20,46 \pm 16,28
3 сутки	47,54 \pm 4,49*#	9,73 \pm 5,76	28,97 \pm 13,78*#	11,01 \pm 4,87
7 сутки	31,58 \pm 21,86	21,9 \pm 11,89	27,64 \pm 12,34*	11,49 \pm 8,35
14 сутки	25,08 \pm 23,78*#	6,32 \pm 2,87	11,69 \pm 8,12*#	5,72 \pm 0,73

Результаты в таблице представлены в ОЕ по отношению к контролю,

* - достоверные различия между больными с тяжелым течением и больными с течением средней тяжести в группе;

#- достоверные различия между больными 1 и 2 групп

Таблица 3

Экспрессия мРНК TLR4 у больных ОДП

	Больные 1 группы		Больные 2 группы	
	ПТС	ПССТ	ПТС	ПССТ
1 сутки	11,83 \pm 6,84	7,27 \pm 4,1	10,81 \pm 4,32	8,48 \pm 4,59
3 сутки	10,22 \pm 7,17*	2,54 \pm 1,12	8,84 \pm 3,84	4,54 \pm 2,18
7 сутки	7,83 \pm 3,27	15,1 \pm 7,34#	7,51 \pm 4,57	4,73 \pm 1,98
14 сутки	6,24 \pm 3,15	2,19 \pm 0,98	3,76 \pm 4,32	2,12 \pm 1,32

Результаты в таблице представлены в относительных единицах,

* - достоверные различия между больными с тяжелым течением и больными с течением средней тяжести в группе;

#- достоверные различия между больными 1 и 2 групп

Анализируя экспрессию мРНК TLR4 в мононуклеарах больных ОДП, мы не выявили статистически значимых различий в динамике этих показателей между группами. Единственным отличием было то, что в ПССТ 2 группы изучаемый показатель был ниже, чем в ПССТ 1 группы на 7-е сутки стационарного лечения. К 14-м суткам в обеих подгруппах 2 группы экспрессия мРНК TLR4 достоверно снижалась по сравнению с больными 1 группы. Не выявили достоверного различия в экспрессии мРНК TLR4 в МНК периферической крови больных ПТС и ПССТ 1 и 2 групп.

Анализирована динамика изменений среднего балла по шкале APACHE II у пациентов ПССТ, в двух группах, в зависимости от использования в комплексе лечения НПВС «Лорноксикам» (рис. 2).

Из гистограммы видно, что у больных обеих групп происходит снижение исследуемого показателя, однако более выраженное и раннее его снижение зафиксировано у больных в комплексное лечение которых был включен НПВС «Лорноксикам». Наиболее отчетливо это заметно на 7-е сутки стационарного лечения, когда средний балл по шкале APACHE II в группе сравнения превышает средний балл основной группы в 1,3 раза.

При анализе данных динамики среднего балла по шкале APACHE II у пациентов ПТС, выявили, что на первом этапе стационарного наблюдения степень тяжести исходного состояния примерно одинакова в обеих группах (рис. 3).

На 3-и сутки лечения в группе больных, получавших «Лорноксикам» наблюдается более выраженная положительная динамика изменения общего состояния, чем у больных контрольной группы. Так, если на 3-и сутки разница в баллах между группами составляет 1,2 балла по шкале APACHE II, то на 7-е сутки лечения это различие уже достигает 2,9 баллов. Та же тенденция прослежена и на 14-е сутки.

Четырем пациентам 2-ой группы выполнены санационные лапароскопии по поводу ферментативного перитонита. Трое из них имели тяжелое течение ОДП. В 1 группе оперировано 6 больных, из них в ПТС – 2, в ПССТ – 4. Оба пациента в ПТС перенесли оперативные вмешательства по поводу инфицированных форм ОДП. У одного больного выполнена лапаротомия, дополненная люмботомией по поводу абдоминальной флегмоны, у второго вскрытие, дренирование нагноившейся кисты поджелудочной железы. Остальным больным 1 группы выполнены лапароскопические санации брюшной полости по поводу ферментативного перитонита.

При анализе формы ОДП в группах, обнаружили, что у всех пациентов 2 группы были различные асептические формы течения заболевания, в то время как в группе 1 двое пациентов ПТС имели инфицированные формы ОДП, описанные выше.

Во 2 группе летальных исходов не было. В группе 1 зафиксировано 2 летальных исхода, оба в подгруппе

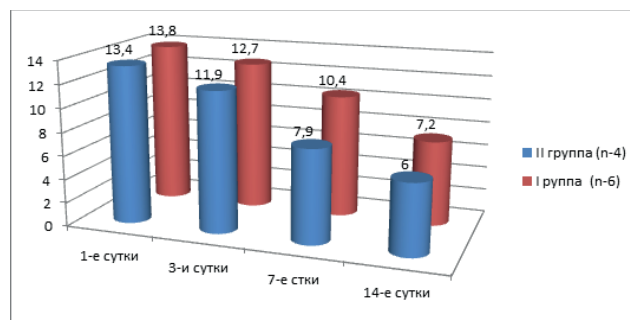


Рис. 2. Динамика изменения среднего балла по шкале APACHE II у больных средней степени тяжести исходного состояния.

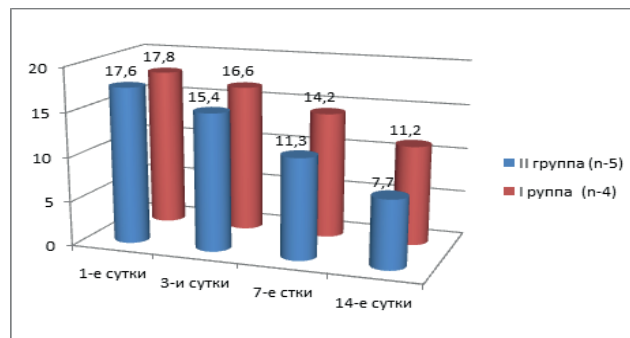


Рис. 3. Динамика изменения среднего балла по шкале APACHE II у больных с тяжелой степенью тяжести исходного состояния.

ПТС. В одном случае смерть больного была связана с развитием абдоминальной флегмоны, у второго больного имело место прогрессирование панкреатогенной токсемии, приведшее к развитию полиорганной недостаточности.

Изучение функции системы TLR имеет важное значение в понимании патогенеза ОДП, так как повышенная экспрессия TLR, особенно на ранней стадии заболевания, может приводить к чрезмерной активации иммунной системы, гиперпродукции провоспалительных цитокинов, развитию системной воспалительной реакции и полиорганной недостаточности. С другой стороны, дефицит TLR усугубляет транслокацию грамотрицательных бактерий, что, в свою очередь, может приводить к развитию инфекционных осложнений у больных ОДП.

На сегодняшний день известно, что TLR играют важную роль не только в защите организма от микробной инфекции, распознавая эндогенные лиганды, высвобождаемые при повреждении тканей, деструкции клеток. TLR способствуют также регуляции воспаления, процессов восстановления и антимикробной защиты в зоне повреждения. Показано, что TLR вовлечены в патогенез атеросклероза, сепсиса, воспалительных заболеваний кишечника, аутоиммунных заболеваний [7].

Выявленные повышенные уровни экспрессии мРНК TLR2 и TLR4 в МНК больных ОДП свидетельствуют о вовлечении механизмов врожденного иммунитета и TLR в патогенез заболевания. При ОДП происходит массивная клеточная деструкция и вы-

брос активаторов TLR эндогенного происхождения во внеклеточную среду, что возможно создает условия для активации сигнального пути TLR и повышения экспрессии генов TLR2 и TLR4. Высвобождаемые ферменты поджелудочной железы, такие как панкреатическая эластаза и др. способны активировать TLR4. На экспериментальной модели острого панкреатита у мышей показано, что уровни мРНК и белка TLR4 были снижены через 4 часа после индукции заболевания и значительно повышены через 24 часа [5].

В нашем исследовании у больных ОДП на 1, 3, 7 и 14-е сутки заболевания наблюдали повышение экспрессии мРНК TLR2 и TLR4 в мононуклеарных клетках периферической крови. При этом было выявлено, что у больных средней степени тяжести экспрессия мРНК TLR2 и TLR4 снижается на 3, 7-е сутки, а у больных с тяжелым течением заболевания и развитием осложнений уровень экспрессии мРНК TLR2 и TLR4 продолжает повышаться, что может свидетельствовать о гиперактивации системы TLR в случае тяжелого течения заболевания.

В исследованиях L.Harter и соавт. (2004) показано, что увеличение экспрессии TLR2 и TLR4 является плохим прогностическим фактором у пациентов с сепсисом, тогда как низкая экспрессия может защищать от чрезмерного воспаления и тканевого разрушения [3]. В нашем исследовании высокая экспрессия генов TLR2 и TLR4 у больных ОДП, а также дальнейшее повышение экспрессии этих генов к 7-м суткам может служить прогностическим критерием неблагоприят-

ного исхода заболевания и развития осложнений, что подтверждает данные авторов цитируемой статьи.

При анализе экспрессии мРНК TLR2 и TLR4 в группе больных, получавших в дополнение к стандартной терапии «Лорноксикам» (2 группа), не обнаружили повышения экспрессии мРНК TLR2 на 3-и сутки заболевания как в 1 группе больных. Снижение экспрессии мРНК TLR2 у больных 2 группы происходило на 7-е сутки заболевания. Что касается экспрессии мРНК TLR4 у больных 2 группы, то достоверное снижение показателя отмечали на 7-е сутки по сравнению с больными 1 группы.

Заключение

Проведенное исследование показало увеличение уровня экспрессии мРНК TLR2 и TLR4 у всех больных ОДП. Экспрессия мРНК TLR2 в случаях тяжелого течения ОДП достоверно выше, чем у больных со средней тяжестью течения заболевания. Это может служить прогностическим критерием определения тяжести ОДП. Показатели экспрессии мРНК TLR4 в группах значимо не различались. Возможно это связано с малой выборкой больных. Дальнейшие исследования помогут нам подтвердить или опровергнуть данный факт.

Введение антимедиаторного препарата «Лорноксикам» в базисную терапию на начальных этапах развития ОДП привело к снижению экспрессии мРНК TLR2 и TLR4 в мононуклеарах периферической крови больных. Поэтому внедрение антимедиаторной терапии следует рассматривать как новое и перспективное направление в лечении больных ОДП.

Список литературы

1. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007, 81, 1–5.
2. Erridge C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J. Leukoc Biol.* 2010, 87(6), 989-99.
3. Harter L., Mica L., Stocker R., Trentz O., Keel M. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock*, 2004, 22(5), 403-409.
4. Hidehiro Sawa., Takashi Ueda. Yoshifumi Takeyama, Takeo Yasuda, Makoto Shinzeri et al. Role of Toll-like receptor 4 in the pathophysiology of severe acute pancreatitis in mice. *Surg.Today*, 2007, 37, 867-873.
5. Li Y., Zou Z.G. Xia Q.J., Zang J., Li H.G. et al. Toll-like receptor 4 detected in exocrine pancreas and the change of expression in cerulean-induced pancreatitis. *Pancreas*. 2005, 30, 375-381.
6. Li Yu, Liantang Wang, Shangwu Chen Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J.Cell. Mol.Med.* 2010, 14(11), 2592-2603.
7. Montero Vega M.T., de Andrés Martín A. The significance of toll-like receptors in human diseases. *Allergol Immunopathol.*, 2009, 37(5), 252-263.
8. Petrov M.S., Windsor J.A. Classification of the Severity of Acute Pancreatitis: How Many Categories Make Sense? *Am. J. Gastroenterol* 2010; 105:74–76.
9. Sabroe I., Parker L.C., Dower S.K., Whyte M.K. The role of TLR activation in inflammation. *J Pathol.*, 2008 214(2), 126-135

Информация об авторах

1. Горский Виктор Александрович – д.м.н., проф. кафедры хирургии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова; e-mail: getinfo911@mail.ru
2. Агапов Михаил Андреевич – к.м.н., доц. кафедры хирургии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова; e-mail: getinfo911@mail.ru
3. Хорева Марина Викторовна – к.м.н., доц. кафедры иммунологии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова; e-mail: getinfo911@mail.ru
4. Леоненко Игорь Валентинович-доцент кафедры общей патологии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова; e-mail: getinfo911@mail.ru