

В.Г. Матвеева, А.С. Головкин, М.Н. Чернова, Д.Л. Шукевич, Е.В. Григорьев

ДИНАМИКА ПОВЕРХНОСТНОЙ ЭКСПРЕССИИ ТРИГГЕРНОГО РЕЦЕПТОРА, ЭКСПРЕССИРУЕМОГО МИЕЛОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ-1 (TREM-1) НА РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЯХ МОНОЦИТОВ В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ ПРЯМОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН (Кемерово)

Исследована поверхностная экспрессия триггерного рецептора, экспрессируемого миелоидными клетками-1 (TREM-1) на различных популяциях моноцитов до проведения операции прямой реваскуляризации миокарда в условиях искусственного кровообращения (ИК) и в раннем послеоперационном периоде. Нами зарегистрировано, что субпопуляциям моноцитов соответствует различная экспрессия TREM-1 на поверхности, при этом наибольший уровень обнаружен на моноцитах CD14^{hi}CD16⁺. К 1-м суткам послеоперационного периода происходит повышение поверхностной экспрессии TREM-1 на всех субпопуляциях моноцитов, свидетельствуя об увеличении их провоспалительного потенциала.

Ключевые слова: TREM-1, субпопуляции моноцитов, СВО

DYNAMICS OF SURFACE EXPRESSION OF TRIGGER RECEPTOR, EXPRESSED BY MYELOID CELLS-1 (TREM-1) ON VARIOUS SUBPOPULATIONS OF MONOCYTES IN EARLY POSTOPERATIVE PERIOD OF DIRECT REVASCULARIZATION OF MYOCARDIUM

V.G. Matveyeva, A.S. Golovkin, M.N. Chernova, D.L. Shukevich, E.V. Grigoryev

Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases SB RAMS, Kemerovo

We studied surface expression of trigger receptor, expressed by myeloid cells-1 (TREM-1) on various subpopulations of monocytes before direct revascularization of myocardium with artificial blood flow and in early postoperative period. We registered that various expression of TREM-1 on the surface corresponds to subpopulations of monocytes, and the highest level is observed on CD14^{hi}CD16⁺ monocytes. By the 1st day of postoperative period elevation of surface expression of TREM-1 occurs on all subpopulations of monocytes, testifying to enlargement of their proinflammatory potential.

Key words: TREM-1, subpopulations of monocytes, systemic inflammatory response

Моноциты составляют 5–10 % от общего количества лейкоцитов крови человека и выполняют ряд важных функций в запуске, поддержании и контроле иммунного ответа.

Популяция моноцитов не однородна. По уровню экспрессии на поверхности низкоаффинного рецептора Fcγ CD16 и корецептора липополисахарида CD14 принято выделять три субпопуляции CD14^{hi}CD16⁻, CD14^{hi}CD16⁺, CD14^{dim}CD16⁺ [11, 16]. Субпопуляции моноцитов выполняют различные функции в организме и соответственно отличаются по функциональной активности, спектру и выраженности экспрессии поверхностных рецепторов и секретируемых при активации цитокинов.

В норме приблизительно 90–95 % моноцитов крови являются CD14^{hi}CD16⁻. Они характеризуются выраженной фагоцитарной и микробицидной активностью, способностью к продукции хемокинов IL-8, CCL2, CCL3 [11]. В литературе клетки с данным фенотипом получили название «классических» моноцитов.

Минорная субпопуляция CD14^{hi}CD16⁺ моноцитов обладает сниженной фагоцитарной активностью и ограниченной способностью к респираторному «взрыву», синтезу хемокинов по сравнению CD14⁺CD16⁻, но активно продуцирует

провоспалительные цитокины (TNF, IL-1, IL-6) [11]. Моноциты CD14^{hi}CD16⁺ вовлечены в процессы, связанные с системной воспалительной реакцией, что позволяет рассматривать данную популяцию клеток как «провоспалительную» [17]. Показано ее значительное увеличение у пациентов с сепсисом, ревматоидным артритом, СПИДом, атеросклерозом [17].

Благодаря особенностям экспрессии на поверхности хемокиновых рецепторов и рецепторов адгезии, моноциты CD14^{dim}CD16⁺ обладают повышенной тропностью к эндотелию и высокой миграционной активностью, [11]. В циркулирующей крови содержится всего лишь до 25 % от общего количества моноцитов с фенотипом CD14^{dim}CD16⁺ [15]. Предполагается, что, в случае ишемического повреждения миокарда эти клетки принимают участие в репарации тканей, привлекая в очаг фибробласты, стимулируя ангиогенез и отложение коллагена [13]. Активированные моноциты CD14^{dim}CD16⁺ проявляют проатеросклеротическую активность, поддерживая хроническое воспаление и способствуя прогрессированию ИБС [6, 11].

Триггерный рецептор, экспрессируемого миелоидными клетками-1 (TREM-1) является активирующим рецептором нейтрофилов, моно-

цитов и тканевых макрофагов [4]. Он участвует в антимикробной защите, регулируя эффекторные функции врожденного иммунитета и индуцируя адаптивный иммунный ответ [2, 10]. TREM-1 способен амплифицировать воспалительный ответ гранулоцитов и моноцитов, инициированный Toll и NOD-подобными рецепторами [2, 4, 14]. Так активация TREM-1 на моноцитах анти-TREM-1 антителами в присутствии лиганда TLR или NLR, усиливает продукцию цитокинов в 10–20 раз [4, 14]. Такая совместная стимуляция может вызывать как компенсаторную, так и чрезмерную воспалительную реакцию, приводящую к повреждению. Действительно, экспериментальные данные подтверждают положительный эффект блокирования этого рецептора при патологических состояниях, связанных с избыточностью системного воспалительного ответа [8, 9].

У пациентов, перенесших операцию прямой реваскуляризации миокарда в условиях искусственного кровообращения (ИК), ранний послеоперационный период сопровождается проявлениями системного воспалительного ответа (СВО). Важным патогенетическим звеном в развитии СВО является активация ранних воспалительных реакций с сопутствующей гиперцитокинемией, появлением в кровотоке большого количества протеиназ, активных форм кислорода и т.д. Основными факторами осуществляют моноциты, нейтрофилы, тканевые и сосудистые макрофаги [1].

Принимая во внимание участие TREM-1 в реализации СВО и функциональное различие субпопуляций моноцитов, представляется важным изучение поверхностной экспрессии TREM-1 на субпопуляциях моноцитов и ее динамика в раннем послеоперационном периоде прямой реваскуляризации миокарда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 35 пациентов с ишемической болезнью сердца стенокардией II–III ФК, хронической сердечной недостаточностью (ХСН) I–IIА (функциональный класс по NYHA II–III) в возрасте от 47 до 70 лет. Критерии

исключения: сочетанная патология коронарных сосудов и клапанов сердца, острая инфекция и обострение хронической инфекции, наличие злокачественных новообразований, хирургические осложнения в послеоперационном периоде. Всем пациентам была выполнена операция прямой реваскуляризации миокарда при стандартизированном виде кардиopleгии и непуглирующем режиме ИК. Использовалась внутривенная тотальная анестезия, на основе фентанила и мидазолама. ИК проводилось однотипным гипертоническим, гиперонкотическим перфузатом, одинаковым объемом первичного заполнения аппарата искусственного кровообращения. Использовали кровяную холодовую кардиopleгию, пассаж кардиopleгии проводился антеградно. Время ИК составило 88 мин (75–105 мин), время пережатия аорты 57 мин (48–61 мин). СВО у всех пациентов был оценен по четырем критериям, принятым на согласительной конференции в Чикаго [3].

Для исследования моноцитов кровь из периферической вены забиралась в пробирки с K_3EDTA до операции и на 1-е сутки после операции. После проведения Fc-блока в нее были добавлены моноклональные антитела CD16-FITC, CD45-PC5, CD14-APC (производства Beckman Coulter, США) и anti-human TREM-1-PE (R&D) в объеме указанном производителем. Контролем служило внесение равного объема антител соответствующего изотипического контроля. Клетки с антителами инкубировали при температуре 4 °C в течение 30 минут в защищенном от света месте. Лизис эритроцитов проводили лизирующим буфером BD FACS lysing solution (производства BD Bioscience, США). После 10-минутной инкубации клетки однократно отмывали избытком фосфатно-солевого буфера (PBS). Полученный осадок ресуспендировали в PBS.

Цитофлуориметрический анализ был выполнен на проточном лазерном цитометре FACSCalibure (Becton Dickenson, США). Использовалась программа CellQuestPro и единые настройки прибора для всех проб. В каждом из образцов анализировали не менее 3000 моноцитов. Для исключения дребиса, порог устанавливали по FS и CD45PC5. Популя-

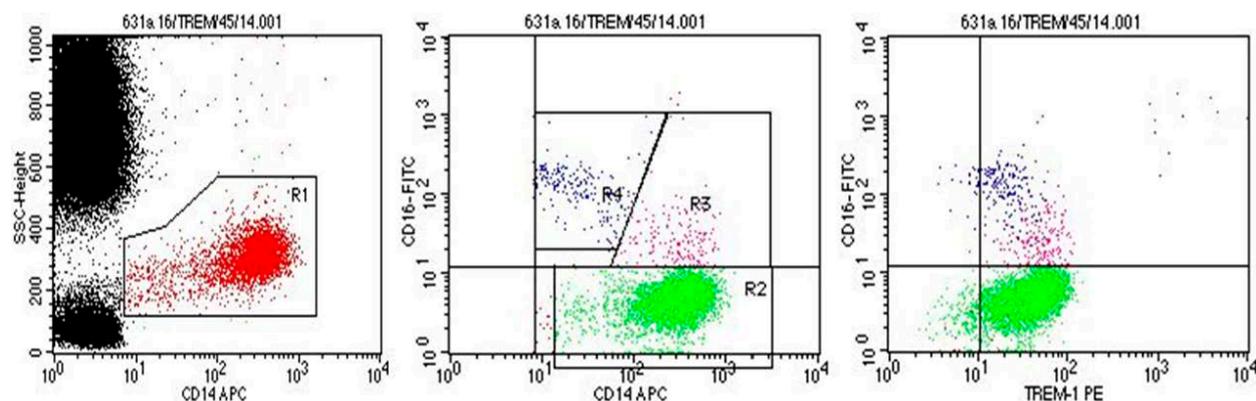


Рис. 1. Процедура разделения моноцитов на субпопуляции и определения уровня поверхностной экспрессии TREM-1.

цию моноцитов выделяли по CD14 в комбинации с боковым светорассеянием (SSC). По уровню экспрессии рецепторов CD14 и CD16, моноциты были разделены на три субпопуляции — CD14^{hi}CD16⁻, CD14^{hi}CD16⁺ и CD14^{dim}CD16⁺ (рис. 1). Отдельно для каждой субпопуляции проводилась оценка уровня поверхностной экспрессии рецепторов TREM-1 по средней интенсивности флюорисценции — MIF (mean intensity of fluorescence) с использованием значений Geom. Mean.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы «Statistica 6.0». Оценка значимости различий проводилась с использованием t-критерия Стьюдента. Данные представлены как средняя и стандартная ошибка средней.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выяснено, что имеются достоверные отличия ($p < 0,001$) в уровне экспрессии TREM-1 на поверхности субпопуляций моноцитов (рис. 2). На дооперационном этапе средняя интенсивность флюорисценции TREM-1 на моноцитах CD14^{hi}CD16⁺ (MIF 33,64±2,07) была выше, чем на субпопуляциях CD14^{hi}CD16⁻ (MIF 23,52±1,25) и CD14^{dim}CD16⁺ (MIF 17,56±0,85). Уровень поверхностной экспрессии TREM-1 моноцитов CD14^{hi}CD16⁻ и CD14^{dim}CD16⁺ так же значимо различался.

Лигирование TREM-1 на моноцитах значительно повышает продукцию провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-1β, IL-6, M-CSF), хемокинов (IL-8, MCP-1, MCP-3, MIP-1α), снижает секрецию противовоспалительного IL-10 и умеренно усиливает фагоцитарную активность [7, 11]. Кроме того, при совместной стимуляции рецептора с TLR или NLR воспалительный ответ многократно усиливается [4, 14]. Следовательно, уровень экспрессии этого рецептора на поверхности моноцитов свидетель-

ствует о потенциальной способности к продукции провоспалительных цитокинов.

Наши результаты согласуются с литературными данными и показывают, что наибольшая плотность рецепторов TREM-1 определяется на субпопуляции CD14^{hi}CD16⁺, которая обладает провоспалительными свойствами и высокой цитокин-продуцирующей активностью [6, 11, 17]

Активированные моноциты CD14^{dim}CD16⁺ синтезируют самое низкое количество IL-6, IL-1β, IL-8 по сравнению с другими субпопуляциями, в нашем исследовании им соответствует наименьшая экспрессия TREM-1 на поверхности [6].

У пациентов в 1-е сутки после операции развился СВО различной степени тяжести и включал от 1 до 3 критериев, принятых на согласительной конференции [3]. В этот период нами зарегистрировано достоверное увеличение уровня поверхностной экспрессии TREM-1 на всех субпопуляциях моноцитов по сравнению с дооперационными значениями, что указывает на повышение их провоспалительного потенциала (рис. 3). Так в 1-е сутки после операции средняя интенсивность флюорисценции TREM-1 на моноцитах CD14^{hi}CD16⁻ составила 27,18 ± 1,31, а на субпопуляциях CD14^{hi}CD16⁺ и CD14^{dim}CD16⁺ 48,11 ± 2,67 и 31,07 ± 2,18 соответственно.

Результаты клинических исследований показывают, что повышение экспрессии TREM-1 на поверхности моноцитов наблюдается во время инфекций, вызванных бактериями, вирусами и грибами, а значительное увеличение происходит при сепсисе и септическом шоке [2, 5]. Механизмы повышения экспрессии TREM-1 связывают с воздействием лигандов TLRs и NLRs на моноциты. Наиболее изучены механизмы экспрессии TREM-1 под воздействием лигандов TLRs, для которых необходимым условием является присутствие TLR

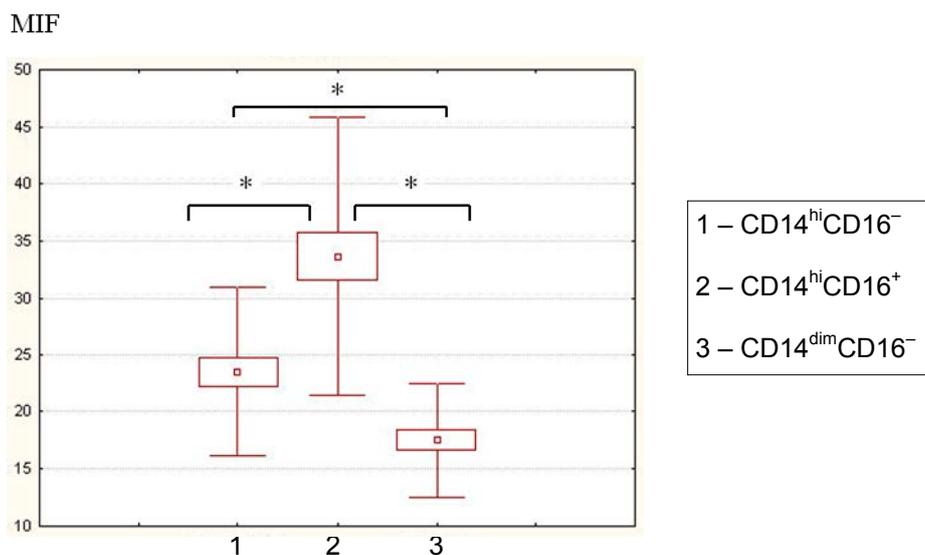


Рис. 2. Распределение экспрессии TREM-1 на субпопуляциях моноцитов. * – достоверность различий $p < 0,001$; 1 – CD14^{hi}CD16⁻, 2 – CD14^{hi}CD16⁺, 3 – CD14^{dim}CD16⁻.

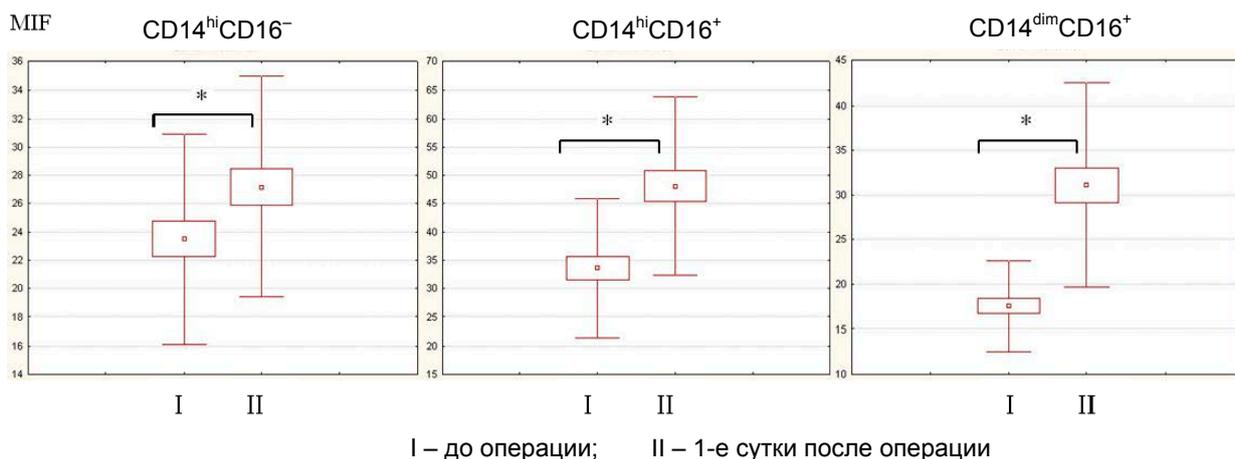


Рис. 3. Динамика уровня экспрессии TREM-1 на субпопуляциях моноцитов в 1-е сутки после операции. * – достоверность различий $p < 0,001$. I – до операции, II – 1-е сутки после операции.

[2, 14]. Однако экспрессию TREM-1 регулируют не только патогены микроорганизмов, но и алармины (эндогенные молекулы, образующиеся при повреждении) [12].

СВО в 1-е сутки послеоперационного периода у пациентов после прямой реваскуляризации миокарда чаще всего не имеет связи с инфекцией. Он развивается при воздействии на органы и ткани ишемии-реперфузии, искусственного кровообращения, кардиоopleгии, механического повреждения и т.д., приводя к различным реакциям, в том числе к массивному выбросу аларминов. Дальнейшее течение процесса не исключает транслокации бактерий и эндотоксинов из желудочно-кишечного тракта вследствие гипоксического повреждения слизистой оболочки. Поскольку у таких пациентов в 1-е сутки послеоперационного периода доминирующее влияние на врожденный иммунный ответ оказывают алармины, можно предполагать их участие в зафиксированном нами повышении экспрессии TREM-1 на моноцитах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, субпопуляциям моноцитов соответствует различный уровень поверхностной экспрессии TREM-1, соответствующий потенциальной способности клеток к продукции провоспалительных цитокинов. В раннем послеоперационном периоде повышается экспрессия TREM-1 на всех субпопуляциях моноцитов, свидетельствуя об увеличении их провоспалительного потенциала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Юрченко Л.Н. Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, Вып. 4. – С. 9–21.
2. Bleharski J.R., Kiessler V., Buonsanti C. 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, N 7. – P. 3812–3818.

3. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine // Chest. – 1992. – Vol. 101, N 6. – P. 1644–1655.

4. 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, N 10. – P. 4991–4995.

5. Bouchon A., Facchetti F., Weigand M.A., Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock // Nature. – 2001. – Vol. 410. – P. 1103–1107.

6. Cros J., Cagnard N., Woollard K. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors // Immunity. – 2010. – Vol. 33, N 3. – P. 375–386.

7. Dower K., Ellis D.K., Saraf K. Innate Immune Responses to TREM-1 Activation: Overlap, Divergence, and Positive and Negative Cross-Talk with Bacterial Lipopolysaccharide // J. Immunol. – 2008. – Vol. 180. – P. 3520–3534.

8. Gibot S., Massin F., Alauzet C., Montemont C. et al. Effects of the TREM-1 pathway modulation during mesenteric ischemia-reperfusion in rats // Crit. Care Med. – 2008. – Vol. 36, N 2. – P. 504–510.

9. Gibot S., Massin F., Marcou M. TREM-1 promotes survival during septic shock in mice // Eur. J. Immunol. – 2007. – Vol. 37. – P. 456–466.

10. Markus P., Radsak, Helmut R., Salih Hans-Georg, Rammensee, Hansjörg Schild Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 in Neutrophil Inflammatory Responses: Differential Regulation of Activation and Survival // J. Immunol. – 2004. – Vol. 172. – P. 4956-4963.

11. Merino A., Buendia P., Martin-Malo A. Senescent CD14⁺ CD16⁺ Monocytes Exhibit Proinflammatory and Proatherosclerotic Activity // J. Immunol. – 2010. – Vol. 186. – P. 1809–1815.

12. Murakami Y., Akahoshi T., Hayashi I., Endo H. et al. Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in murine resident peritoneal macrophages by monosodium urate monohydrate crystals // *Arthritis Rheum.* – 2006. – Vol. 54. – P. 455–462.

13. Nahrendorf M., Swirski F.K., Aikawa E. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 204. – P. 3037–3047.

14. Netea M.G., Azam T., Ferwerda G. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR

(NLR) pattern recognition receptors // *J. Leuk. Biol.* – 2006. – Vol. 80. – P. 1454–1461.

15. Steppich B., Dayyani F., Gruber R. Selective mobilization of CD14+CD16+ monocytes by exercise // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2000. – Vol. 279. – P. 578–586.

16. Tallone T., Turconi G., Soldati G. Heterogeneity of Human Monocytes: An Optimized Four-Color Flow Cytometry Protocol for Analysis of Monocyte Subsets // *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* – 2011. – Vol. 4. – P. 211–219.

17. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation // *J. Leukocyte Biol.* – 2007. – Vol. 81, N 3. – P. 584–592.

Сведения об авторах

Матвеева Вера Геннадьевна – научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; тел.: 8-908-947-49-16; e-mail: matveeva_vg@mail.ru)

Головкин Алексей Сергеевич – заведующий отделом экспериментальной и клинической кардиологии, заведующий лабораторией клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, кандидат медицинских наук (e-mail: golovkin_a@mail.ru)

Чернова Мария Николаевна – лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН (e-mail: chernova.maria.n@mail.ru)

Шукевич Дмитрий Леонидович – заведующий лабораторией критических состояний ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, доктор медицинских наук

Григорьев Евгений Валерьевич – заместитель директора по научной и лечебной работе ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (e-mail: grigoriev@mail.ru)