

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ТКАНЕВОГО ФАКТОРА НА МОНОЦИТАХ У ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ

Лазанович В.А., Маркелова Е.В., Шуматов В.Б., Постнова В.Е.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Владивосток, Россия

Резюме. Сепсис практически всегда связан с теми или иными нарушениями гемостаза. Факторами, выполняющими основную причинно-значимую роль в патогенезе данных процессов являются провоспалительные цитокины, эндотелий сосудов, тромбоциты, лейкоциты и экспрессированный на данных клетках тканевой фактор (tissue factor – TF), находящийся всегда в активном состоянии. Учитывая потенциальную связь системы коагуляции с патофизиологией сепсиса, TF можно рассматривать в качестве биомаркера для ранней диагностики, стратификации риска и оценки прогноза исхода заболевания при сепсисе. Цель – исследовать количественное содержание (CD14⁺CD142⁺) и уровень экспрессии TF на моноцитах у пациентов с сепсисом, проанализировать зависимость данных показателей от степени выраженности полиорганной дисфункции по шкале SOFA, исходов заболевания.

Было обследовано 67 пациентов с сепсисом. Степень тяжести полиорганной дисфункции/недостаточности оценивали по шкале – SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessments Score Sequential Organ Failure Assessment). Все пациенты были распределены на 2 группы с учетом тяжести состояния и выраженности органной недостаточности. 1-я группа (n = 30) – пациенты с диагнозом «сепсис» со степенью тяжести органной дисфункции < 6 баллов по шкале SOFA, 2-я группа (n = 37) – пациенты с диагнозом «сепсис» со степенью тяжести органной дисфункции > 6 баллов по шкале SOFA. Забор крови у пациентов проводился в первые 48 ч после поступления и установки диагноза. Исследовали количественное содержание (CD14⁺CD142⁺) и уровень экспрессии тканевого фактора на моноцитах методом проточной цитометрии.

Выявили, что содержание (CD14⁺CD142⁺) было существенно выше у пациентов сепсисом, чем у здоровых лиц (6,03±1,05%, против 0,24±0,02%, p = 0,001), с более тяжелой степенью органной дисфункции (SOFA) по сравнению с менее тяжелой (SOFA) (6,50±0,98% против 4,42±0,36%, p = 0,05). Высокий уровень экспрессии тканевого фактора на моноцитах прямо коррелировал r > 0,71 (p = 0,05) с тяжестью органной дисфункции (SOFA) и был сопряжен (p = 0,004) с летальным исходом заболевания. Данные результаты позволяют предположить, что экспрессия тканевого фактора на моноцитах может служить биомаркером, отражающим степень системного воспаления при сепсисе, быть критерием в прогнозе тяжести течения и исхода заболевания у пациентов с сепсисом.

Ключевые слова: тканевой фактор, биомаркер, моноциты, гемокоагуляция, сепсис

Адрес для переписки:

Лазанович Владимир Анатольевич
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
690062, Россия, г. Владивосток, пр. 100 лет
Владивостоку, 14, кв. 49.
Тел.: 8 (914) 703-45-09.
E-mail: immuno2003@mail.ru

Address for correspondence:

Lazanovich Vladimir A.
Pacific State Medical University
690062, Russian Federation, Vladivostok,
100 let Vladivostoku ave., 14, apt 49.
Phone: 7 (914) 703-45-09.
E-mail: immuno2003@mail.ru

Образец цитирования:

В.А. Лазанович, Е.В. Маркелова, В.Б. Шуматов,
В.Е. Постнова «Анализ экспрессии тканевого фактора
на моноцитах у пациентов с сепсисом» // Российский
иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 4. С. 501-506.
doi: 10.46235/1028-7221-1071-EOT
© Лазанович В.А. и соавт., 2021

For citation:

V.A. Lazanovich, E.V. Markelova, V.B. Shumatov,
V.E. Postnova "Evaluation of tissue factor expression on
monocytes in the patients with sepsis", Russian Journal of
Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021,
Vol. 24, no. 4, pp. 501-506.
doi: 10.46235/1028-7221-1071-EOT
DOI: 10.46235/1028-7221-1071-EOT

EVALUATION OF TISSUE FACTOR EXPRESSION ON MONOCYTES IN THE PATIENTS WITH SEPSIS

Lazanovich V.A., Markelova E.V., Shumatov V.B., Postnova B.E.

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Sepsis is nearly always associated with some type of haemostatic disorder. The factors that play main causal role in pathogenesis of these processes are pro-inflammatory cytokines, vascular endothelium, platelets, leukocytes, and tissue factor (TF) expressed on these cells, which is always in an active state. Given a potential relationship between the blood clotting and pathophysiology of sepsis, TF may be considered a biomarker for early diagnosis, risk stratification, and prognosis of disease outcome in sepsis. Objective – to study quantitative content (CD14⁺CD142⁺) and the levels of TF expression on monocytes in the patients with sepsis, to analyze the dependence of these parameters on the severity of multiple organ dysfunction according to the SOFA scale, and disease outcomes.

67 patients with sepsis were examined. The severity of multiple organ dysfunction/failure was assessed by means of the SOFA score (Sepsis-related Organ Failure Assessments, Sequential Organ Failure Assessment). All the patients were divided in 2 groups based on the severity of their condition and extent of organ failure. Group 1 (n = 30) included the patients diagnosed with sepsis and severe organ dysfunction of < 6 points on the SOFA scale; Group 2 (n = 37) consisted of the patients with sepsis and organ dysfunction of > 6 points according to the SOFA scores. Blood sampling from patients was made within initial 48 hours after admission and diagnosis. Quantitative content (CD14⁺CD142⁺) and the level of expression of tissue factor on monocytes were investigated by flow cytometry. We have found that the content of (CD14⁺CD142⁺) cells was significantly higher in patients with sepsis than in healthy individuals ($6.03 \pm 1.05\%$ vs $0.24 \pm 0.02\%$, $p = 0.001$), being higher in more severe organ dysfunction (SOFA) vs less severe cases (SOFA) ($6.50 \pm 0.98\%$ versus $4.42 \pm 0.36\%$, $p = 0.05$). High level of TF expression on monocytes showed a direct correlation ($r > 0.71$; $p = 0.05$) with severity of organ dysfunction (SOFA), and it was associated ($p = 0.004$) with lethal outcome of the disorder. These results suggest that expression of tissue factor on monocytes can serve as a biomarker reflecting the degree of systemic inflammation in sepsis, thus being a criterion for predicting clinical severity and outcome of the disease in patients with sepsis.

Keywords: tissue factor, biomarker, monocytes, hemocoagulation, sepsis

Введение

В настоящее время концептуально сепсис определен как жизнеугрожающая органная дисфункция, вызванная неадекватной или дисрегулируемой реакцией хозяина на инфекцию [10]. В последние годы появляется все больше данных, подтверждающих, что чрезмерное системное воспаление и коагуляционная реакция на инфекционные патогены приводят к микрососудистому тромбозу, который и является основной причиной развития синдрома полиорганной дисфункции (MODS – multiple organ dysfunction syndrome) при сепсисе. Сепсис практически всегда связан с теми или иными нарушениями гемостаза и характеризуются тромбоэмболическими осложнениями, клиникой ДВС-синдрома, сочетанием тромбозов и кровотечений одновременно, на фоне потребления и истощения фак-

торов свертывания крови и тромбоцитов [6]. Клинически значимые нарушения гемокоагуляции наблюдаются от 50 до 70% пациентов с хирургическим сепсисом, у 35% диагностируется ДВС-синдром [8]. Активация каскада свертывания и тромбообразования при сепсисе обычно рассматривают как неблагоприятный процесс. Установлена не только связь между воспалением и нарушениями гемокоагуляции при сепсисе, но растет понимание того, что эти события оказывают взаимное влияние друг на друга. Воспаление индуцирует активацию свертывания крови, а коагуляции заметно влияет на противовоспалительную активность [7]. Факторами, выполняющими основную причинно-значимую роль в патогенезе данных процессов, являются провоспалительные цитокины, эндотелий сосудов, тромбоциты, лейкоциты и экспрессированный на данных клетках

тканевой фактор (tissue factor – TF), находящийся всегда в активном состоянии [2].

Провоспалительные цитокины, в частности IL-1 β , TNF α активно продуцируются в области первичного внедрения патогенов, что влечет развитие воспалительной реакции, синтез белков острой фазы воспаления, взаимодействие белков системы комплемента, активируя различные типы клеток, в том числе эндотелиальные. Данная функция реализуется через продукцию эндотелиальными клетками провоспалительных хемокинов, главным образом IL-8, повышая их адгезивные свойства, за счет экспрессии на поверхности P- и E-селектинов, интегринов ICAM-1 и ICAM-2, MCP-1 (macrophage chemotactic protein-1) [4]. Все это приводит к привлечению лейкоцитов в очаг воспаления, последние, продуцируя в большом количестве протеазы (трипсин, эластазу, коллагеназу, катепсин) и активные формы кислорода, повреждают эндотелиоциты и межклеточный матрикс, что влечет за собой освобождение TF и запуск коагуляционного каскада. По мнению de Jong и соавт. (2010), при тяжелых септических состояниях именно данный механизм запуска ДВС синдрома является ключевым [3]. Установлено, что избыточная экспрессия TF или дисбаланс между ним и еще одним из наиболее важных регуляторных белков в системе свертывания, ингибитором пути тканевого фактора (TFPI Tissue factor pathway inhibitor) тесно связаны с механизмом, приводящим к патологическому расстройству гемокоагуляции у пациентов с сепсисом [9].

Учитывая потенциальную связь системы коагуляции с патофизиологией сепсиса, роль TF как важного инициатора системы свертывания, который экспрессируется в частности активированными моноцитами, позволяет рассматривать его в качестве потенциального биомаркера для ранней диагностики, стратификации риска и оценки прогноза исхода заболевания при сепсисе.

Цель – исследовать количественное содержание (CD14⁺CD142⁺) и уровень экспрессии TF на моноцитах у пациентов с сепсисом, проанализировать зависимость данных показателей от степени выраженности полиорганной дисфункции по шкале SOFA, исходов заболевания.

Материалы и методы

В рамках данного проспективного исследования нами на базе ГБУЗ Приморской краевой клинической больницы № 1 г. Владивостока, были включены 67 пациентов хирургического профиля, от 19 до 72 лет, с диагнозом сепсис (инфекция + органная недостаточность SOFA на ≥ 2

балла). Данный диагноз был установлен в первые 48 часов после поступления в отделение. Степень тяжести полиорганной дисфункции/недостаточности оценивали по шкале – SOFA (Sepsis-related organ failure assessment). Критериями исключения являлись терминальное состояние (прогнозируемая гибель в течение 48 часов), риск летального исхода, не связанного с сепсисом (тромбоэмболия, инфаркт миокарда, нарушения мозгового кровообращения), онкологические, ВИЧ-инфицированные, пациенты, получавшие иммуносупрессивную терапию, пациенты с тяжелыми и декомпенсированными заболеваниями. Все пациенты были распределены на 2 группы с учетом тяжести состояния и выраженности органной недостаточности. 1-я группа (n = 30) – пациенты с диагнозом «сепсис» со степенью тяжести органной дисфункции < 6 баллов по шкале SOFA, 2-я группа (n = 37) – пациенты с диагнозом «сепсис» со степенью тяжести органной дисфункции > 6 баллов по шкале SOFA. Забор крови у пациентов проводился в первые 48 ч после поступления и установки диагноза «сепсис». В контрольную группу вошли 24 клинически здоровых добровольца, сопоставимых по полу, возрасту и расовой принадлежности. Исследования выполнены с информированного согласия всех включенных в исследование. Цитофлюориметрический анализ популяции моноцитов, экспрессии активационных маркеров выполняли в течение 2 часов после забора крови из периферической вены, в пробирки с добавлением K₃ЭДТА, на проточном цитометре FACS Calibur BD, по стандартному протоколу в программе CellQuestPro. Для количественного анализа и уровня экспрессии TF на моноцитах использовали моноклональные антитела к молекулам CD142-APC (производства BioLegend, Inc., США). Оценка уровня экспрессии исследуемого поверхностного рецептора проводили по средней интенсивности флуоресценции (MFI – mean fluorescence intensity).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы StatPlus 2018. Для сравнения непараметрических показателей в сравниваемых группах использовали U-критерий Манна–Уитни, для оценки взаимосвязей – метод ранговой корреляции Спирмена, сопряженность уровня экспрессии тканевого фактора и исходом заболевания, учитывая 28 дневную летальность оценивали с использованием критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение

В ходе исследования было выявлено, что количество клеток (CD14⁺CD142⁺) у пациентов

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЫРАЖЕННОСТИ ОРГАННОЙ ДИСФУНКЦИИ И ГРУППЫ КОНТРОЛЯ, М±Σ

TABLE 1. AVERAGE VALUES OF THE STUDIED PARAMETERS IN PATIENTS WITH SEPSIS, DEPENDING ON THE SEVERITY OF ORGAN DYSFUNCTION AND THE CONTROL GROUP, M±Σ

Показатель Indicator	1-я группа (SOFA < 6 баллов) Group 1 (SOFA < 6 points) n = 30	2-я группа (SOFA > 6 баллов) Group 2 (SOFA > 6 points) n = 37	Группа контроля Control group n = 24	Уровень значимости (p) p-value
CD14⁺CD142⁺, %	4,42±0,36	6,50±0,98	0,24±0,02	p ₁ – p ₂ = 0,05 p ₁ – p ₃ = 0,009 p ₂ – p ₃ = 0,001
CD14⁺CD142⁺, × 10⁹/л	0,015±0,003	0,021±0,003	0,002±0,001	p ₁ – p ₂ = 0,04 p ₁ – p ₃ = 0,02 p ₂ – p ₃ = 0,01
MFI CD14⁺CD142⁺	42,92±5,39	77,75±4,77	3,80±0,12	p ₁ – p ₂ = 0,05 p ₁ – p ₃ = 0,02 p ₂ – p ₃ = 0,002

с сепсисом было значительно выше в 25 раз, по сравнению со здоровыми добровольцами (6,03±1,05%, против 0,24±0,02%, p = 0,001).

Далее был проведен анализ показателей, количественная оценка, уровень экспрессии тканевого фактора (MFI) на моноцитах пациентов, в зависимости от выраженности органной дисфункции и группы контроля, полученные данные в ходе исследования представлены в таблице 1.

У пациентов с сепсисом удельный вес клеток (CD14⁺CD142⁺) в зависимости от степени выраженности органной дисфункции имел существенные, достоверные отличия как между собой, так и с контрольной группой. В группе с менее выраженной органной дисфункцией (SOFA < 6 баллов) их количество превышало в 18,4 раза, а в группе (SOFA < 6 баллов) в 27 раз по сравнению с контролем.

Оценку степени экспрессии TF непосредственно на моноцитах проводили по средней интенсивности флуоресценции (MFI). Так же как количественное соотношение субпопуляций моноцитов (CD14⁺CD142⁺), так и уровень экспрессии на данных клетках тканевого фактора существенно был выше у пациентов с сепсисом. В группе с менее выраженной органной дисфункцией (SOFA < 6 баллов) уровень экспрессии (MFI) тканевого фактора на моноцитах составил 42,92±5,39%, в группе (SOFA < 6 баллов) – 77,75±4,77% и, соответственно, превышал в 11,3 раза и 20,4 раза по сравнению с контролем.

При оценке взаимосвязей экспрессии тканевого фактора (CD142⁺) на моноцитах и степени выраженности полиорганной дисфункции по шкале SOFA (в баллах) была выявлена сильная (по шкале Чеддока) положительная корреляционная связь $r > 0,71$ (p = 0,05), чем выше уровень экспрессии тканевого фактора, тем более тяжелое течение септического процесса.

Далее был проведен анализ, сопряженности уровня содержания моноцитов (CD14⁺CD142⁺) с исходом заболевания, используя критерий χ^2 . Проведенный анализ установил, что высокий уровень моноцитов (CD14⁺CD142⁺) более 4% сопряжен (p = 0,004) с летальным исходом заболевания.

Тканевой фактор (CD142⁺) представляет собой 263-аминокислотный трансмембранный гликопротеин (46 кДа), член семейства рецепторов цитокинов II класса, в котором различают 3 домена. Основной расположен на поверхности клеточной мембраны, трансмембранный и цитоплазматический. В присутствии ионов Ca⁺⁺, тканевой фактор образует стехиометрический комплекс с фактором VII, вызывая его конформационные изменения и превращая последний в сериновую протеиназу VIIa. Комплекс тканевой фактор-фактор VIIa способен активировать как фактор X, так и фактор IX, что в конечном итоге способствует генерации тромбина [1].

Бактериальные компоненты активируют TLRs (Toll-like receptor), на миелоидных клетках, вызывая высвобождение провоспалительных цито-

кинов TNF α и IL-1, IL-6, компонентов системы комплимента (C5a и др.), которые обладают прокоагулянтной активностью. Кроме того, DAMPs (Damage-associated molecular-pattern) распознаются рецепторами PRRs (Pathogen associated molecular patterns) имеют сходные эффекты, часто усиливая коагуляционные нарушения, повышая экспрессию TF и высвобождения цитокинов моноцитами, нейтрофилами и эндотелиальными клетками [5].

Учитывая потенциальную связь системы коагуляции с патофизиологией сепсиса, в частности роль тканевого фактора как важного инициатора системы свертывания, который экспрессируется, в частности, активированными моноцитами, позволяет рассматривать его в качестве биомаркера для ранней диагностики генерализованного воспаления и прогноза исхода заболевания при сепсисе. Выявленные нами значительные изменения содержания позитивных моноцитов (CD14⁺CD142⁺) и высокий уровень экспрессии тканевого фактора на данных клетках у пациентов с сепсисом, в отличие от здоровых доброволь-

цев, подтверждают патогенетический механизм развития органной дисфункции при сепсисе.

Заключение

Полученные данные о наличии взаимосвязей экспрессии тканевого фактора (CD142⁺) на моноцитах и степени выраженностью полиорганной дисфункции по шкале SOFA (в баллах), сопряженности данных показателей с исходом заболевания, позволяет его использовать в качестве биомаркера для ранней диагностики, стратификации риска и оценки прогноза исхода заболевания при сепсисе.

Представленные данные, конечно, не отражают сложный единый патофизиологический процесс генерализованного воспаления и расстройства гемокоагуляции при сепсисе. Тем не менее они подчеркивают важность дальнейшего изучения не только с целью фундаментальных аспектов патогенеза при данной патологии, но и могут быть уже сегодня рекомендованы к применению в практическом здравоохранении, безусловно с учетом дальнейшего продолжения исследований в данной области.

Список литературы / References

1. Butenas S.T., Mann K.G. Tissue factor activity and function in blood coagulation. *Thromb. Res.*, 2008, Vol. 122, Suppl. 1, pp. S42-S46.
2. Butenas S.T., Mann K.G. Active tissue factor in blood? *Nat. Med.*, 2004, Vol. 10, no. 11, pp. 1155-1156.
3. de Jong H.K., van der Poll T., Wiersinga W.J. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J. Innate Immun.*, 2010, Vol. 2, no. 5, pp. 422-430.
4. Ekdahl K.N., Teramura Y., Hamad O.A., Asif S., Duehrkop C., Fromell K. Dangerous liaisons: complement, coagulation, and kallikrein/kinin cross-talk act as a linchpin in the events leading to thromboinflammation. *Immunol. Rev.*, 2016, Vol. 274, no. 1, pp. 245-269.
5. Esmon C.T. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb. Res.*, 2004, Vol. 114, no. 5-6, pp. 321-327.
6. Gando S., Shiraishi A., Yamakawa K. Role of disseminated intravascular coagulation in severe sepsis. *Thromb. Res.*, 2019, Vol. 178, pp. 182-188.
7. Han P., Hanlon D., Arshad N., Lee J.S. Platelet P-selectin initiates cross-presentation and dendritic cell differentiation in blood monocytes. *Sci. Adv.*, 2020, Vol. 11, no. 6, 1580. doi: 0.1126/sciadv.aaz1580.
8. Levi M. Disseminated intravascular coagulation. *Crit. Med.*, 2007, Vol. 35, pp. 2191-2195.
9. Levi M., van der Poll T. Thrombomodulin in sepsis. *Minerva Anesthesiol.*, 2013, Vol. 79, pp. 294-298.
10. Singer M., Deutschman S., Seymour C.W. The Third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016, Vol. 315, no. 8, pp. 801-810.

Авторы:

Лазанович В.А. — к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Маркелова Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Authors:

Lazanovich V.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Markelova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Шуматов В.Б. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой реанимации, анестезиологии, интенсивной терапии и скорой медицинской помощи ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Shumatov V.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Resuscitation, Anesthesiology, Intensive Care and Emergency Medicine, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Постнова В.Е. — студентка лечебного факультета ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Postnova V.E., Student, Faculty of General Medicine, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 28.07.2021
Принята к печати 20.08.2021

Received 28.07.2021
Accepted 20.08.2021