مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ٥٦، شماره ٥
آذر- دی ٩٢ ، صفحه ٢٦٧-٢٧٤

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 56, No. 5 P: 267-274
Nov-Dec 2013

مقاله اصلی

بررسی مقایسه ای میزان بیان ژنهای TLR-2 و TLR-4 خون در دو گروه بیماران با سپسیس باکتریال باکشت خون منفی و افراد سالم

تاریخ دریافت: ٩٢/٢/١٠- تاریخ پذیرش: ٩٢/٦/١٦

[1] حمیدرضا نادری*
[2] هما وثوقی
[3] مریم راستین
[4] مهدی جباری نوقابی

١-*دانشیار بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران*
٢-*دستیار تخصصی بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران*
٣-*استادیار ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران*
٤-*استادیار آمار، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران*

*مشهد- بیمارستان امام رضا، دفتر گروه عفونی، مشهد، ایران
تلفن: ٨٥٤٣٠٣١-٥١١-٩٨+
email: naderihr@mums.ac.ir

خلاصه

مقدمه

تشخیص به هنگام سپسیس باکتریال از اهمیت بسزائی برخوردار است، که نظر به موارد نتایج منفی کشت، هدفی دشوار به نظر می رسد. اما بررسی عواملی از جمله مولکولهای بیان کننده TLR ممکن است تا حدی کمک کننده باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان ژنهای TLR2و TLR4در سلولهای تک هسته ای خون بیماران سپسیس باکتریال با کشت خون منفی در مقایسه با جمعیت سالم جهت افتراق سپسیس باکتریال کشت منفی گرم مثبت از گرم منفی می باشد.

روش کار

مطالعه در سال ١٣٩١ به صورت مورد شاهدی در دو گروه ٣٠ نفری از افراد سالم و بیماران سپسیس باکتریال کشت منفی بستری در بیمارستان امام رضا (ع) انجام شد. نتایج با نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد و میزان کات آف بیان ژنهای مذکور نیز با نرم افزار R محاسبه گردید.

نتایج

در مقایسه بیان TLR2 وTLR4 بیماران کشت منفی با افراد سالم ارتباط معنی دار وجود نداشت (p=TLR2:٠/٥٢) و (p=TLR4:٠/٠٩٩)

در مقایسه بیان TLR2 بیماران کشت منفی با اسمیر کوکسی گرم مثبت غیر شعله شمعی و غیر انتروکوک ارتباط معنی دار وجود نداشت (p=٠/٠٩٢٨) ولی در بیان TLR4 ارتباط معنی دار مشاهده شد (p=٠/٠٠٤).

نتیجه گیری

بیان TLR4در بیماران سپسیس باکتریال با0-3 SOFA SCORE در مقایسه با افراد سالم با کات آف ٩/٥٤ و حساسیت ٧٦٪ و ویژگی ٧١٪ تفاوت داشت، و نیز در سپسیس باکتریال کشت منفی احتمالا استافیلوکوکی با کات آف ٤٦/١٩ با حساسیت ٨٧٪و ویژگی٧٨٪ تفاوت داشت. بنابراین شاید بتوان از بررسی بیان TLR4 در تصمیم گیری جهت شروع آنتی بیوتیک ضد استافیلوکوک در سپسیس باکتریال کشت منفی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: سپسیس، TLR، SOFA score

مقدمه

بیماری های عفونی علت مهم بیماری زائی و مرگ و میر به ویژه در کشورهای در حال توسعه می باشند، لذا شناسایی و تشخیص به موقع آنها از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

یکی از معضلات مهم در شناسایی بیماری های عفونی، علایم و نشانه های مشترک با یکدیگر ـ از جمله تب و لرز ـ و همچنین با سایر بیماری های التهابی است، به طوری که گاهی اوقات حتی افتراق رده عوامل بیماری زا از یکدیگر ممکن است به راحتی امکان پذیر نباشد. در این موارد به نظر می رسد بررسی عواملی که بتواند به تمایز این مهم بپردازد و به افتراق دقیق تر کمک نماید، مهم است.

یکی از این عوامل TLR[1] ها می باشند که پروتئین های رسپتوری هستند که بسته به نوع عامل بیماری زا گونه مختلفی از آنها در سطح سلول میزبان بیان می شوند. به عنوان مثال TLR 2 عمدتا در پاسخ به لیگاند واقع شده در باکتری های گرم مثبت و قارچ ها و TLR3 در پاسخ به عوامل ویروسي و TLR4 عمدتا در پاسخ به LPS باکتری های گرم منفی و TLR6 در پاسخ به مایکو پلاسما و TLR11 در پاسخ به توکسوپلاسما بیان می شود (۱).

همچنین به نظر می رسد یکی از کاربردهای TLR ها ردیابی عوامل بیماری زا در مواردی است که دسترسی مستقیم به آن وجود ندارد. به عنوان مثال، در موارد مننژیت آسپتیک که علت باکتریال و غیر باکتریال قابل افتراق نمی باشند، با بررسی میزان بیان ژنهای TLR2 و TLR4 شاید بتوان به افتراق این دو پرداخت. یا در بیمار آندوکاردیت با کشت خون منفی، در صورت افزایش بیان قابل ملاحظه TLR2 نسبت به میزان طبیعی آن در جامعه در مقایسه با این میزان در مورد TLR4 ($TLR_2/TLR_2(N) > TLR_4/TLR_4(N)$) به تشخیص علت باکتریال آندوکاردیت با ارگانیسم های گرم مثبت پرداخت (۱). بنابراین، با عنایت به اینکه باکتری های گرم منفی معمولا باعث افزایش بیان بیشتر TLR4 در مقابل TLR2، و باکتری های گرم مثبت باعث افزایش بیان بیشتر TLR2 در مقابل TLR4 می شوند، به بررسی میزان بیان ژنهای مذکور در بیماران سپسیس با کشت خون منفی پرداخته می شود. لازم به ذکر است که در تحقیقات گذشته هرچند که افزایش بیان ژنهای مذکور به کرات گزارش شده، ولیکن اشاره ای به نتایج کشت خون بیماران نشده است. لذا فرضیات این تحقیق می تواند شامل موارد زیر باشد: در صورت بیان ژن TLR-4 در محدوده طبیعی، اگر ژن TLR-2 افراد سپتیک بیش از ژن TLR-4 آنان بیان شود، احتمال عفونت با ارگانیسم گرم مثبت مطرح خواهد بود. در صورت بیان ژن TLR-2 در محدوده طبیعی، اگر ژن TLR-4 افراد سپتیک بیش از ژن TLR-2 آنان بیان شود، احتمال عفونت با ارگانیسم گرم منفی مطرح خواهد گردید.

اما در صورتی که هر دو ژن افزایش بیان داشته باشند، افزایش بیان ژن TLR-4 افراد سپتیک بیش از TLR-2 سپسیس با اجرام گرم منفی را مطرح خواهد نمود و در صورتی که این ژن افزایش بیان کمتری نسبت به TLR-2 نشان دهد، نمی توان در این خصوص قضاوت دقیقی ارائه داد، هرچند که اگر افزایش بیان ژن TLR-2 به میزان چشمگیری بیشتر باشد، باید عفونت با اجرام گرم مثبت را با احتمال بالاتری در نظر گرفت.

در نهایت، با مروری بر مطالعات انجام شده در مورد بیان ژنهای مذکور در پاسخ به ارگانیسم های مختلف گرم مثبت و منفی، به نظر می رسد بیان ژنهای مذکور در پاسخ به ارگانیسم هایی که به طور معمول باعث سپسیس در بیماران بستری می شوند (به عنوان مثال آنترو باکتریاسه ها، آسینتوباکتر، E-coli، سالمونلا، کلسبیلا، سودومونا) افزایش می یابد.

روش کار

این مطالعه مورد شاهدی در سال ۱۳۹۱ در بیمارستان امام رضا (ع) مشهدانجام پذیرفت، دو گروه افراد شامل گروه بیماران و گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند.

در این گروه ۳۰ بیمار بالای ۱۶ سال مبتلا به عفونت باکتریال SIRS[2] مثبت با SOFA SCORE[3] صفر تا سه که به اورژانس حاد بیمارستان امام رضا (ع) مراجعه نموده بودند (شامل عفونت

[1] Toll Like Receptor

[2] Systemic Inflammatory Response

[3] Sequential Organ Failure Assessment Score

ادراری، پنومونی، آپاندیسیت، کلانژیت و کله سیستیت، پای دیابتی، تجمع چرکی، آرتریت) انتخاب شدند، که تایید این عفونت ها به ترتیب بر اساس مشاهده مستقیم اسمیر ادراری، خلط، پی گیری بعد از جراحی و نتایج سونوگرافی، اسمیر ترشحات پای دیابتی، و اسمیر آسپیراسیون تجمع های چرکی، مایع مفصل و نیز آزمایشات انجام شده بر نمونه های مذکور و پی گیری پاسخ بیمار به آنتی بیوتیک تراپی بعد از بستری، صورت گرفت. باتوجه به مثبت شدن نتایج کشت خون ۶ بیمار و نیز عدم داشتن کیفیت ۲ نمونه و همچنین تشخیص غیر عفونی یک نمونه، ۹ نمونه دیگر نیز از بیماران با شرایط ذکر شده تهیه و اقدامات مشابه انجام پذیرفت. سپس از هر یک از بیماران ۱۰cc خون وریدی به طریق استریل جهت کشت در محیط تجاری بکتک اخذ شد و طی ۸ ساعت به انکوباتور منتقل گردید. ۶cc نمونه خون وریدی جهت جداسازی بافی کوت خون محیطی در لوله استریل حاوی EDTA به پژوهشکده بوعلی منتقل شد. نمونه های کشت خون تا ۵ روز در انکوباتور آزمایشگاه میکروب شناسی بیمارستان امام رضا (ع) نگهداری شد، و در صورت مثبت شدن نمونه کشت خون، آنتی بیوگرام روی نمونه مذکور به طریق روتین انجام گردید.

گروه شاهد شامل ۳۰ نفر افراد بالای ۱۶ سال بودند. از کلیه بیماران و گروه شاهد جهت اخذ نمونه فرم رضایت نامه شرکت در طرح تحقیقاتی گرفته شد.

معیارهای ورود به مطالعه عبارتند از: نمونه خون با کشت منفی بیماران با عفونت باکتریال اثبات شده و SIRS مثبت و نمونه خون افراد سالم جهت گروه کنترل. معیارهای خروج: افراد زیر ۱۶سال در هر ۲ گروه، در مورد افراد گروه شاهد در صورت هر بیماری عفونی اخیر، مصرف داروهایی نظیر متادون، NSAID، سرکوبگر ایمنی، افراد مبتلا به نقائص ایمنی، سابقه مصرف آنتی بیوتیک تزریقی جهت بیماری کنونی، سابقه مصرف آنتی بیوتیک خوراکی جهت بیماری کنونی طی ۵ روز گذشته. اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدو میزان کات آف با نرم افزار R محاسبه شد.

نتایج

مقایسه بیان ژنهای TLR2 و TLR4 در کل بیماران (n=۳۵) با افراد طبیعی: در مورد TLR2 اختلاف معنی داری بین ۲ گروه وجود نداشت: (P=۰/۸۲۸) (PPV:۰/۶۱۵ ، npv:۰/۶۷۶، ۱۷/۸ +-mean TLR2=۹/۳۶)، درمورد TLR4 اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وجود داشت و افزایش میزان بیان ژن مذکور در گروه بیماران در مقایسه با افراد طبیعی مشاهده شد:

(P=۰/۰۲۸) (PPV:۰/۶۶۶، NPV:۰/۷۱۴، ۸۶/۱۶+ - mean TLR4=۵۷/۳۵)، در افراد سالم: mean ۲۰/۵-+۲۷/۶ TLR4= ۱۰/۹-+۱۶/۳ ، mean TLR2= .

همچنین میزان کات آف TLR4 و TLR2در تبدیل کل بیماران به سالم برآورد شد: TLR2 cut off ۱۳/۳۵ با Sensitivity:٪۲۶ وSpecificity:٪۸۶ وAUC: ۰/۵۱۶

TLR4 CUT OFF:۹/۵۴ با Specificity:٪۷۱ ٪۶۷ Sensitivity: AUC:۰/۶۵۹ .

در مقایسه بیان ژنهای TLR2 و TLR4 در سپسیس باکتریال گرم مثبت کشت مثبت با گرم مثبت کشت منفی تفاوتی در بیان ژنهای TLR4 و TLR2 وجود نداشت: TLR2 P=۰/۵۰۹ و TLR4 P=۰/۱۵۶. در مقایسه بیان ژن TLR2 و TLR4 در گروه های بیماران کشت منفی: گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی: اختلاف معنی داری وجود نداشت: TLR2 P=۰/۵۹۱ و TLR4 P =۰/۵۹۱. گرم مثبت با مجموع میکروبیال و گرم منفی، اختلاف معنی داری وجود نداشت: TLR4 P=۰/۵۵ و TLR2 P =۰/۸۳. در مقایسه بیان ژنها در بیماران با سپسیس باکتریال کشت مثبت (n=۵) در مقایسه با افراد با کشت منفی(N=۳۰) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت: P=۰/۰۶۹ TLR4 وTLR2 P=۰/۰۸۶

در مقایسه بیان ژنهای مذکور در بیماران با سپسیس باکتریال گرم مثبت براساس نتایج اسمیر (N=۱۷) (کشت مثبت یا منفی) با: ارگانیسمهای گرم منفی اختلاف معنی داری وجود نداشت: PTLR2=۰/۲۸۳ و P TLR4=۰/۵۹۵. مجموع پلی میکروبیال و گرم منفی اختلاف معنی داری نداشت: PTLR2 =۰/۷۶۶ و PTLR4=۰/۳۳۱. افراد سالم اختلاف معنی‌داری در مورد بیان

TLR4 وجود داشت، اما در مورد TLR2 اختلاف معنی داری وجود نداشت: P TLR4 =۰/۰۳۴ و P TLR2= ۰/۹۰۳.

در مقایسه بیان ژنها در بیماران با سپسیس باکتریال گرم منفی با افراد سالم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت: P TLR4=۰/۲۳۷ و PTLR2=۰/۲۹۹.

در مقایسه بیان ژنها در بیماران با سپس پلی میکروبیال و سالم اختلاف معنی داری وجود نداشت: PTLR2=۰/۵۶۹ وPTLR4=۰/۳۰۱. در بررسی ارتباط بیان ژنها با لکوسیتوز ارتباط معنی داری بین این دو متغیر یافت نشد: PTLR2=۰/۶۶۵ و PTLR4=۰/۳۲۳. در بررسی ارتباط بیان ژن با Sofa score (۰-۳) ارتباط معنی داری یافت نشد: PTLR2=۰/۱۷۸ وPTLR4=۰/۲۲. در بررسی ارتباط بیان ژنها با سن درگروه بیماران ارتباط معنی داری یافت نشد و لیکن بیان دو رسپتور TLR2و TLR4 ارتباط مستقیمی با یکدیگر نشان دادند (ضریب همبستگی ۰/۳۵۶). همچنین میانگین سنی در گروه بیماران ۱۹/۷۵+- ۵۶ بود. P TLR2=۰/۸۵۱ و P =۰/۵۴ TLR4.در بررسی ارتباط بیان ژنها با سن در گروه افراد سالم ارتباط معنی داری یافت نشد: P TLR2=۰/۱۶۷ وPTLR4=۰/۱۵۷ ولیکن در این گروه نیز بیان دو رسپتور TLR2 و TLR4 ارتباط مستقیمی با یکدیگر نشان دادند (با ضریب همبستگی ۰/۴۹۷ و ۰/۰۰۵ = p).همچنین میانگین سنی در گروه افراد سالم ۱۴/۳ +- ۴۷/۸ بود.در بررسی ارتباط ژنها با جنس در گروه بیماران ارتباط معنی داری یافت نشد: (۳۷/۱٪زن و ۶۲/۱۹٪ مرد)، PTLR4=۰/۹۳۳ وP TLR2=۰/۰۹۱. در بررسی ارتباط بیان ژنها با جنس در گروه افراد سالم ارتباط معنی داری یافت نشد: (۴۰٪ زن و ۶۰٪ مرد). P TLR4=۰/۴۱۵ وP TLR2=۰/۶۹۲.

در بررسی مقایسه ای بیان ژنها در بیماران با کشت خون منفی با افراد سالم: در مقایسه کل بیماران کشت منفی با افراد سا لم اختلاف معنی داری یافت نشد:

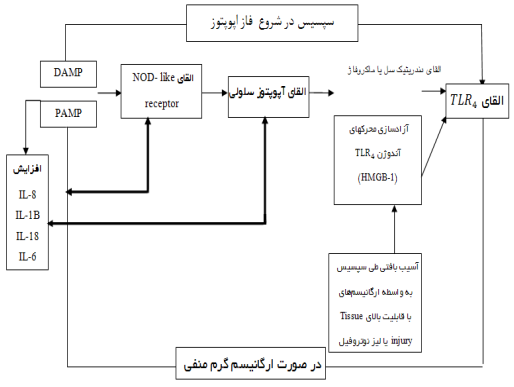
P TLR4=۰/۵۲ و PTLR2=۰/۰۹۹، mean ۸/۸ -+۱۸/۸ TLR4= ، mean TLR4= ۴۳/۵-+۷۲/۸. در مقایسه بیماران کشت منفی با اسمیر گرم مثبت با افراد سالم اختلاف معنی داری یافت نشد: PTLR4=۰/۱۳۱ وPTLR2=۰/۷۱۵

mean TLR4 =۶۴/۱-+۱۰۱/۷، در مقایسه بیماران کشت منفی با اسمیر گرم منفی با افراد سا لم اختلاف معنی داری یافت نشد: P TLR4=۰/۷۴۵ وPTLR2=۰/۷۹۱

mean TLR4=۱۶/۰۴-+۱۰/۰۴، -+۴/۳ meanTLR2=۶/۹ . د) در مقایسه مجموع بیماران کشت منفی گرم منفی و پلی میکروبیال با افراد سا لم اختلاف معنی داری یافت نشد: =۰/۳۰۰ وPTLR2=۰/۷۲۴، mean -+۲۴/۹ TLR4=در مقایسه مجموع بیماران با اسمیر دیپلوکوک شعله شمعی و انتروکوک با افراد سالم اختلاف معنی داری وجود نداشت (n=۸): P TLR4=۰/۶۸۶ وPTLR2=۰/۳۸۶.

mean TLR4=۱۹/۱-+۱۸/۶ ، mean TLR2=-+۷/۲ . در مقایسه بیماران با اسمیر کوکسی گرم مثبت غیر شعله شمعی کشت منفی و غیر انتروکوک (احتمالا استافیلوکوکی) با افراد سالم در مورد بیانTLR2 اختلاف معنی داری وجود نداشت، ولیکن در مورد بیان TLR4 اختلاف معنی دار وجود داشت:

mean TLR4=۱۴۲/۵-+۱۳۱/۴ PTLR4= ۰/۰۰۴ ۱۹/۲-+۳۲/۴ PTLR2=۰/۵۲۲ ، ppv:۰/۹۲۸ ، npv=۰/۶۳۶ mean TLR4 ، ppv: ۰/۹ npv:۰/۲۸۵ .همچنین میزان کات آف TLR4و TLR2در تبدیل این دسته بیماران به سالم برآورد شد: TLR2 cut off=۲/۲۳ با Sensitivity=٪۳۳ و Specificity=٪۸۹ وAUC=۰/۵۷۴ ، TLR2 cut ۴۶/۱۹ off= با: Specificity=٪۷۸ ، Sensitivity+٪۸۷ ، ۰/۸۱۳ =AUC. می توان مدل القای TLR4 را در سپسیس باکتریال به شکل زیر فرض نمود.



نمودار ۱- مدل القای TLR4 در سپسیس باکتریال

بحث

همان طور که در قسمت روش کار ذکر شد، نمونه۳۹ بیمار مبتلا به عفونت باکتریال و ۳۰ فرد سالم شاهد گرفته شد. از ۳۹ نمونه مذکور ۲ نمونه لیز بوده و از مطالعه خارج شد و ۶ نمونه نیز جواب B/C مثبت داشته که یک نمونه از بیماران با B/C مثبت مبتلا به کلانژیت (B/C : آنتروباکتری آگلومرانس) نیز به علت لیز شدن نمونه و یک نمونه نیز به علت تشخیص غیر عفونی از مطالعه حذف گردید، و در نهایت به بررسی بیان ژنهای TLR2و TLR4 در ۳۵ نمونه بیمار (۵ نمونه B/C(+)) و ۳۰ نمونه با B/Cمنفی و ۳۰ فرد سالم شاهد پرداخته شد.

با توجه به نتایج مطالعه همان طوری که در قسمت نتایج و نتیجه شماره ۱ ذکر شده است، اختلاف بیان TLR2 در دو گروه بیماران (کشت مثبت و منفی) در مقایسه با افراد سالم وجود نداشت. p=۰/۸۲۸ و این در حالی بود که در مورد بیان ژن TLR4 اختلاف معنی داری بین دو گروه بیماران و افراد سالم وجود داشت، به عبارتی افزایش میزان بیان ژن مذکور در گروه بیماران رخ داد (p=۰/۰۲۸).

با توجه به این نتایج از سه فرضیه مطرح شده در بخش مقدمه، فرضیه اول و سوم در مورد این مطالعه مصداق نخواهد داشت و در مورد فرضیه دوم که احتمال عفونت با ارگانیسم گرم منفی، در صورت بیان بیشتر TLR4نسبت به TLR2 مطرح شد بحث و بررسی شد. با توجه به اینکه مقایسه ارتباط بیان ژن TLR4در بیماران با سپسیس گرم مثبت با سه گروه سپسیس گرم منفی و افراد سالم و مجموع پلی میکروبیال و گرم منفی مقایسه و پرداخته شده است بیان TLR4 در گروه سپسیس گرم مثبت در مقایسه با افراد سالم ارتباط معنی داری داشت، و این در حالی بود که در بررسی مقایسه ای ارتباط بیان ژنها در بیماران سپسیس گرم منفی و یا پلی میکروبیال (نتیجه ۶ و ۷) با افراد سالم ارتباط معنی داری وجود نداشت.

بنابراین به نظر می رسد این اختلاف معنی دار به دست آمده در بیان ژن TLR4 در گروه بیماران (به طور کلی) با افرادسالم عمدتا برخلاف تصور قبلی که در فرضیه دوم مطالعه ذکر شده است، ناشی از عفونت با ارگانیسم‌های گرم مثبت باشد. همانطورکه این اختلاف با مراجعه به نتایج مطالعه آشکارتر خواهد شد که اختلاف بیان ژن TLR4 در گروه بیماران با سپسیس گرم مثبت حتی در نبود کشت مثبت (البته با اسمیر غیر شعله شمعی) با افراد سالم معنی دار بود.

یک مولکول ضد التهابی که فاکتور ترجمه ای به نام جعبه گروهی شماره ۱ بسیار متحرک (HMGB-1) نام دارد، چندین ساعت بعد از شروع عفونت در خون ظاهر می شود و در بروز مرگ در مدل موشی که با آندوتوکسین باکتریال القا شده اند نقش دارد (۱). با توجه به اینکه مولکول اخیر یک مولکول درون زاد محرک TLR ها می باشد، این احتمال وجود دارد که طی سپسیس با ارگانیسم‌های گرم منفی افزایش بیان TLR4 نه تنها به دلیل تحریک مستقیم این رسپتور به واسطه LPS بلکه به علت تحریک آزادسازی HMGB-1[1] از سلولهای آسیب دیده که به عنوان یک DAMP[2] عمل می‌نماید باشد. بنابراین این احتمال نیز وجود دارد که در سپسیس با ارگانیسم‌های گرم مثبت به ویژه ارگانیسم‌هایی که قابلیت بیشتر آسیب بافتی را دارند افزایش میزان HMGB-1 و به طبع آن افزایش بیان TLR ها به واسطه مولکول مذکور نیز وجود داشته باشند.

در مطالعه ای از مولن[3] ، از HMGB-1 به عنوان تریگر آندوژن TLR4 نام برده است (۲). همچنین مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ نیز به نقش محوری TLR4 در پاسخ به DAMP ها اشاره دارد (۳). بنابراین با استناد به مجموع این مطالعات شاید این احتمال وجود داشته باشد که در سپسیس با ارگانیسم‌های گرم مثبت با آسیب بافتی قابل توجه برخلاف انتظار افزایش بیان بیشتر TLR4 رخ دهد. همان طور که به نحو دیگری پیرامون آبشار سایتوکاینی و TLR به این پدیده اشاره کرده و متذکر شده است که TLR4هم توسط LPS وهم heat shock protein70 تحریک می شود (۱). با وجودی که مطالعه هادلی[4] و همکاران بعد از ایجاد عفونت تجربی با استافیلوکوک اورئوس، افزایش بیان TLR2 (۵ برابر) و TLR4 (۲ برابر) را نشان داده‌است، شاید این امر به علت ایجاد عفونت تجربی و نه طبیعی با ارگانیسم

[1] High Mobility Group Box
[2] Damage Associated Molecular Patterns
[3] Mollen
[4] Hadley

مذکور باشد و آن چه در عمل در عفونت Non experimental با این ارگانیسم در انسان رخ می دهد به واسطه آسیب بافتی ایجاد شده و آزاد نمودن مواد آندوژن TLR4 برخلاف انتظار معمول بوده و بیان بیشتر TLR4 را درمقابل TLR2 سبب شود (۴). هر چند که در موضع عفونت (سلولهای بافتی محل عفونت) افزایش بیان بیشتر TLR2 در برابر پاسخ بافتی به این ارگانیسم مورد انتظار خواهد بود.

مطالعه هاچکیس[1] و همکاران به آپوپتوز وسیع لنفوسیت‌های CD4، دندرتیک سل، و B سل‌ها در طحال و سلولهای روده در بیماران با سپسیس شدید اشاره دارد (۱). بنابراین احتمال القای TLR4 به واسطه آپوپتوز سلولی وجود دارد. باید ذکر شود صحت این گفته با اشاره به مقاله ای که در مجله بیوشیمی ۲۰۱۲ منتشر شده می تواند بیشتر شود، چرا که در این مقاله بیان شده لنفوسیت های آپوپتوز شده باعث القای و فعال سازی سلول های دندریتیک از طریق TLR4و بتا اینتگرین و ...می شود (۵).

همچنین شاهدی دیگر بر القای TLR4 در جریان اپوپتوز نوتروفیل میتواند مقاله ای باشد که در سال ۲۰۱۳ در مجله خون منتشر شده و بیان شده که هموستاز نوتروفیل توسط لوپ فیدبکی که بین خون و مغز استخوان وجود دارد کنترل می شود، و این فیدبک در in-vivo در حیواناتی که -/-TLR4 و -/-TLR2 می باشند مختل میشود و در نهایت بیان شده که هموستاز نوتروفیل وابسته به GCSF است و از طریق pattern recognition رسپتور ها تنظیم می شود (۶).

همچنین درمطالعاتی که در مورد آپوپتوز واسطه به التهاب[2] انجام شده از گلوکوکورتیکوئید به عنوان محرک مهم آپوپتوز یاد شده است، هرچند که Hyper activation فعالیت سمپاتیک طحالی نیز می تواند در این امر نقش داشته باشد.(۱)

همچنین یکی از دلایلی که در مورد بیان معنی دار TLR4 در سپسیس باکتریال با ارگانیسم‌های گرم مثبت در مقایسه با گروه کنترل و نبودن اختلاف معنی‌دار در سپسیس گرم منفی یاپلی میکروبیال با افراد سالم شاید بتوان مطرح نمود، این است که در پاسخ به سپسیس با ارگانیسم های گرم منفی، به واسطه مکانیسم های خنثی کننده آندوتوکسین و افزایش سطح سرمی BPI ـ یک پروتئین خنثی کننده آندوتوکسین مشتق از نوتروفیل ها ـ این باکتری های در نبود باکتریمی پایدار از توانائی کمتری در القای TLR4 در مقایسه با باکتری های گرم مثبت مهاجم تر و با آسیب بافتی بالاتر برخوردار می باشند (۱). لازم به ذکر است که این گفته احتمالا تنها در مورد بیان TLRها در سطح سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی به واسطه وجود BPI در خون محیطی صحت داشته و در مورد بیان موضعی TLR در بافت حاوی ارگانیسم همان افزایش بیان بیشتر TLR4 در مقابل TLR2 مورد انتظار خواهد بود. همان طور که در اکثر بیمارانی که در آنها سپسیس شدید به واسطه گرم منفی‌های تولید کننده LPS که توسط MD2-TLR4 سنس می شود بروز می کند، سایت عمده عملکرد تحریکی آندوتوکسین باکتری‌های گرم منفی ممکن است بافت خارج عروقی باشد و نه خون در گردش (۱).

لازم به ذکر است که در مطالعه فیزور[3] و همکاران در بحث تریگرهای میکروبی در سپسیس نشان داده شده که در سپسیس گرم مثبت افزایش بیشتر سطح IL18 و IL1B و IL6 در مقایسه با سپسیس گرم منفی وجود دارد (۷). درمطالعه دیگری افزایش بیان TNFα درسپسیس شدید با ارگانیسم های گرم منفی در مقایسه با گرم مثبت ذکر شده است (۸).

همچنین مجددا باید متذکر شد که طی روند سپسیس، PAMP[4] ها و به عبارتی همان ارگانیسم های عوامل سپسیس و احتمالا DAMPها (فاکتورهایی که طی استرس از سلول آسیب دیده آزاد می شوند) باعث القای رسپتورهایی به نام Nod like rec می شوند (لیگاند این رسپتورها PAMPو DAMP می باشد) و تحریک این رسپتورها باعث القای آپوپتوز سلولی و در نتیجه القای TLR4 در سطح دندریتیک سل ها خواهد شد. بنابراین احتمالا در جریان سپسیس فعال شدن TLRها به واسطه محرک های آندوژن توسط مسیر آسیب بافتی ناشی از اثر مستقیم ارگانیسم و نیز مسیر آپوپتوز سلولی خواهد بود. همان طور که قبلا ذکر شد DAMP ها محرک های بالقوه TLR4 می باشند،

[1] Hotchkiss
[2] Inflammation-associated apoptosis
[3] Feezor
[4] Pathogen Associated Molecular Patterns

بنابراین به نظر می رسد ارگانیسمی که قابلیت ایجاد آسیب بافتی بیشتر را داشته باشد، بالطبع باعث افزایش بیشتر بیان TLR4 خواهد شد و این موضوع می‌تواند درمورد استافیلوکوک اورئوس که حاوی توکسین‌های آلفا و بتا و گاما و دلتا توکسین می باشد که باعث آسیب غشای سلولی می شوند و نیز استافیلوکوک اپیدرمیدیس که حاوی توکسین دلتا و نیز اتولیزین بوده که عامل لیز سلولی است، صحت داشته باشد.

در مطالعه حاضر افزایش بیان TLR4 در گروه بیماران با سپسیس گرم منفی و پلی میکروبیال در مقایسه با افراد طبیعی وجود نداشت، و این پدیده شاید به علت این باشد که بیماران مورد مطالعه همه در SOFA score ۳-۰ قرار دارند که میزان آپوپتوز و آسیب بافتی در این scoreکمتر قابل انتظار است، در حالی که ارگانیسمهایی که ذاتا قابلیت ایجاد آسیب بافتی را دارند در SOFA Score کمتر می‌توانند باعث افزایش بیان TLR4 شوند.همچنین با استناد به مقاله ای که در سمینار ایمونوپاتولوژی ۲۰۱۲ تحت عنوان نقش نوتروفیل ها در دفاع ذاتی علیه استافیلوکوک اورئوس ارایه شده، شاید بتوان این آسیب بافتی را به لیز نوتروفیل ها طی عفونت استافیلوکوکی نسبت داد، به طوری که در مقاله مذکور بیان شده که پاسخ میزبان در برابر عفونت استافیلوکوکی به دو حالت غلبه بر عفونت و مهار آن و یا ایجاد بیماری می باشد. در روند مهار بیماری استافیلوکوک توسط نوتروفیل بلعیده و نوتروفیل تحت آپوپتوز قرار میگیرد و توسط ماکروفاژ بلعیده می شود،که این امر موجب مهار فعالیت التهابی می شود. ولی در روند ایجاد بیماری بلع ارگانیسم توسط نوتروفیل منجر به لیز نوتروفیل می شود . باتوجه به اینکه در هر دو روند مذکور افزایش بیان TLR4 مورد انتظار است (بلع نوتروفیل توسط ماکروفاژ و نیز لیز نوتروفیل و آزاد سازی DAMP ها) بنابر این روند مذکور نیز می تواند توجیه گر افزایش بیان TLR4 در عفونت استافیلوکوک اورئوس باSOFA SCORE پایین باشد (۹).

نتیجه گیری

به هرحال از نتایج این مطالعه چنین به نظر می رسد که قدرت القاگری TLR4توسط عفونت استافیلوکوکی به واسطه مکانیسم آسیب بافتی، بر این اثر به واسطه LPS گرم منفی ها غلبه داشته باشد، چرا که در دو بیمار با کشت خون مثبت استافیلوکوک بیان TLR4 بیشتر از ۲۰۰ بود، در حالی که در دو بیمار با کشت خون مثبت گرم منفی به ترتیب در E-Coli برابر ۱۵ و در کلبسیلا ۱۵۰ بود و همچنین در اکثر بیماران سپسیس با اسمیر کوکسی گرم مثبت غیر شعله شمعی کشت منفی هم این میزان بیشتر از عفونت های کشت منفی با اسمیر منطبق بر ارگانیسم گرم منفی یا پلی میکروبیال بود. همچنین به نظر می رسد در عفونت های گرم منفی نیز میزان بیان TLR4 متفاوت است، و این موضوع می تواند به فاکتورهای میزبانی و نوع ارگانیسم و لود ارگانیسم وابسته باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه نویسنده دوم جهت اخذ دکترای تخصصی در رشته بیماری های عفونی و گرمسیری می باشد. همچنین از زحمات بی شائبه سرکار خانم دکتر راستین و پرسنل محترم پژوهشکده بوعلی قدردانی می شود.

References:

1. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Churchill Livingstone; 2010.Vol 1.p.42-44, 993-997.
2. Mollen KP, Levy RM, Prince JM, Hoffman RA, Scott MJ, Kaczorowski DJ, *et al*. Systemic inflammation and end organ damage following trauma involves functional TLR4 signaling in both bone marrow-derived cells and parenchymal cells. J Leukoc Biol 2008; 83:80-88.
3. Lee KM, Seong SY. Partial role of TLR4 as a receptor responding to damage-associated molecular pattern. Immunol Lett 2009; 125:31-39.
4. Hadley JS, Wang JE, Foster SJ, Thiemermann C, Hinds CJ. Peptidoglycan of Staphylococcus aureus upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling .Infect Immun 2005; 73:7613-7619.
5. Pathak SK, Sköld AE, Mohanram V, Persson C, Johansson U, Spetz AL. Activated apoptotic cells induce dendritic cell maturation via engagement of Toll-like receptor 4 (TLR4), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), and β2 integrins. J Biol Chem 2012; 287:13731-13742.
6. Bugl S, Wirths S, Radsak MP, Schild H, Stein P. Steady-state neutrophil homeostasis is dependent on TLR4/TRIF signaling. Blood 2013; 121:723-733.
7. Feezor RJ, Oberholzer C, Baker HV, Novick D, Rubinstein M, Moldawer LL, *et al*. Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. Infect Immun 2003; 71:5803-5813.
8. Cohen J, Abraham E. Microbiologic findings and correlations with serum tumor necrosis factor-alpha in patients with severe sepsis and septic shock. . J Infect Dis 1999; 180:116-121.
9. Rigby KM, DeLeo FR. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infection. Semin Immunopathol 2012; 34:237–259.