

# ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Бибкова А.А.<sup>1</sup>, Сысоев К.А.<sup>1</sup>, Семенов А.В.<sup>2</sup>,  
Любимова Н.С.<sup>2</sup>, Арсентьева Н.А.<sup>2</sup>, Трофимов В.И.<sup>1</sup>,  
Тотолян Арег А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,  
Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

**Резюме.** Нами обследованы больные БА, у которых в зависимости от активности заболевания и факторов, обуславливающих развитие обострения, были изучены экспрессия мРНК хемокинов и их рецепторов в слизистой оболочке носоглотки ( $n = 70$ ) и содержание этих же хемокинов в сыворотке крови ( $n = 59$ ). У группы больных БА, у которых обострение возникало после перенесенного ОРЗ, наблюдалось повышение экспрессии мРНК эотаксина, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , CXCR1 и снижение мРНК CCR3 по сравнению с контрольной группой, а в сыворотке крови снижалось содержание эотаксина и MIP-1 $\beta$  и повышалось — MIP-1 $\alpha$  и эотаксина-2. У больных БА, у которых обострение возникло после контакта с аллергенами, наблюдались повышенные экспрессии мРНК эотаксина, эотаксина-2, MIP-1 $\beta$ , CXCR1 и сниженная экспрессия мРНК CCR1, а в сыворотке крови достоверно сниженное содержание эотаксина и MIP-1 $\beta$  сочеталось с повышенным содержанием MIP-1 $\alpha$ , RANTES и эотаксина-2. У больных БА, обследованных в фазу ремиссии, наблюдали сниженную экспрессию мРНК эотаксина, CCR1 и CXCR2, а в сыворотке крови повышенное содержание MIP-1 $\alpha$ , RANTES и эотаксина-2. Таким образом, выявленные изменения в системе хемокинов при БА могут рассматриваться не только как маркеры обострения заболевания, зависящие от природы обострения, но также как потенциальные биомаркеры самого заболевания.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, хемокины, рецепторы хемокинов, мРНК, биомаркеры.

*Bibkova A.A., Syssoev K.A., Semenov A.V., Lubimova N.S., Arsentieva N.A., Trofimov V.I., Totolian Areg A.*

## EVALUATION AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF CHEMOKINES AND THEIR SPECIFIC RECEPTORS IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

**Abstract.** A group of patients with bronchial asthma (BA) was under investigation, being classified according to their disease activity, and exacerbation risk factors. We studied expression of specific mRNAs for chemokines and their receptors in nasopharyngeal mucosa ( $n = 70$ ) and amounts of those chemokines in blood serum ( $n = 59$ ). In the patients with BA exacerbations after acute respiratory infections, an increased expression of eotaxin, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , CXCR1 mRNAs was observed, along with decreased CCR3 mRNA, as compared to a control group. In blood serum of these patients, a decreased levels of eotaxin and MIP-1 $\beta$  mRNA was accompanied by increase of MIP-1 $\beta$  and eotaxin-2 amounts. For the patients with allergen-provoked BA attacks, an increased expression of eotaxin, eotaxin-2, MIP-1 $\beta$ , CXCR1, CXCR1 was revealed, as well as decreased CCR1 mRNA expression, whereas serum samples showed significantly decreased contents of eotaxin and MIP-1 $\beta$ , along with increase in MIP-1 $\alpha$ , RANTES and eotaxin-2 mRNAs. In BA remission

### Адрес для переписки:

Бибкова Анна Андреевна,  
заочный аспирант, Кафедра госпитальной терапии  
им. акад. М.В. Чернуцкого  
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова  
Тел.: 8 (909) 588-20-72.  
E-mail: annabibkova@hotmail.ru

state, a decreased mRNA expression was found for eotaxin, CCR1 and CXCR2 was observed, with increased serum contents of MIP-1 $\alpha$ , RANTES and eotaxin-2. Hence, the changes of chemokine system detected in BA may be sought as markers of the disease exacerbation, depending on its primary origin, as well as potential biomarkers of the disease itself. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 1-2, pp 109-118)

*Keywords: bronchial asthma, chemokines, chemokine receptors, mRNA, biomarkers.*

## Введение

На протяжении многих лет бронхиальная астма (БА) является серьезной проблемой для здравоохранения. В структуре патологии легких на долю БА приходится от 5 до 10% хронических неспецифических заболеваний легких, при этом отмечается общая тенденция к росту заболеваемости [11]. Обращают на себя внимание и другие неблагоприятные тенденции, а именно: увеличение процента труднокурабельной БА и связанный с этим рост летальности. Это происходит несмотря на то, что в последнем десятилетии появилось много новых и весьма эффективных лекарственных препаратов.

За последнее десятилетие существенно изменилось и представление о БА. Прежде всего уточнена роль воспаления в патогенезе БА. Одним из доказательств важной роли воспаления в патогенезе БА служит корреляция тяжести клинической картины с количественной оценкой воспалительного процесса в бронхах [9]. В настоящее время в иммунопатогенезе БА значительная роль отводится цитокинам, хемокинам и их рецепторам. В связи с этим, огромный интерес вызывают клетки-мишени, на которые воздействуют хемокины.

Общепринято считать, что в развитии воспаления при БА ведущую роль играют эозинофилы, концентрирующиеся в бронхиальном секрете и стенке бронхов больных лиц [4, 9]. Хемоаттрактантами для эозинофилов являются высокоспецифичные хемокины: эотаксин/CCL11, эотаксин-2/CCL24, эотаксин-3/CCL26, действующие через общий рецептор CCR3, находящийся на мембранах этих клеток. Кроме того, учитывая большое значение инфекционного фактора, как в развитии обострений, так и в этиопатогенезе БА, уделяется внимание и другим клеткам воспаления, в частности, нейтрофилам. По данным зарубежных [13] и отечественных авторов [3] нейтрофильное воспаление может быть ведущим у части больных БА. Наиболее известным хемоаттрактантом для нейтрофилов является интерлейкин-8 (IL-8), который осуществляет свое действие через рецепторы CXCR1 и CXCR2. Вопрос об участии нейтрофилов в формировании гиперреактивности дыхательных путей в настоящее время остается открытым.

MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$  (Macrophage inflammatory protein-1) — факторы хемотаксиса и активации

для базофилов, эозинофилов, моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов — все они играют важную роль при воспалении. MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$  участвуют в привлечении мононуклеаров в очаг воспаления. MIP-1 $\alpha$  является более мощным аттрактантом, чем MIP-1 $\beta$ , потому что MIP-1 $\alpha$  связывается с рецепторами CCR1 и CCR5, а MIP-1 $\beta$  — только с CCR5. Такое соответствие рецепторам и обуславливает участие MIP-1 $\beta$  только в клеточно-опосредованном иммунном ответе, а MIP-1 $\alpha$  — и в клеточно-опосредованном и в гуморальном иммунном ответе [17].

RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted) привлекает преимущественно Т-клетки памяти и обладает мощным хемотаксическим воздействием через интерлейкин-2 на Т-клетки, эозинофилы, базофилы, а также вызывает высвобождение гистамина. Свое действие осуществляет путем связывания с рецепторами CCR1, CCR3 и CCR5, что обуславливает участие как в инфекционном, так и в аллергическом воспалении [18]. Среди всех перечисленных хемокинов RANTES наиболее изучен в активации иммунного ответа при вирусной инфекции. По данным Mahalingam S. et al. (2003), персистенция РС-вируса в эпителиальных клетках бронхов приводит к повышению экспрессии RANTES. Наличие аденовирусной инфекции в клетках также стимулирует экспрессию RANTES.

По данным литературы, известно около 50 хемокинов и 20 рецепторов к ним [16]. **Целью нашей работы** явилось изучение роли некоторых СС- и СХС-хемокинов в развитии аллергического и инфекционного воспаления у больных БА.

## Материалы и методы

В исследование было включено 70 пациентов, из них 39 женщин и 31 мужчина в возрасте от 17 до 68 лет с различными клинико-патогенетическими вариантами БА (атопической, инфекционно-зависимой, аспириновой и их сочетанием), легкой и средней степени тяжести. Экспрессия мРНК хемокинов и их рецепторов в слизистой оболочке носоглотки изучалась у всех 70 больных БА, в то время как определение содержания хемокинов в сыворотке крови проводилось спустя некоторое время у 59 (84%) из 70 больных БА.

На момент взятия браш-биоптата для определения экспрессии мРНК хемокинов и их ре-

цепторов 66 (94%) из 70 больных БА находились в фазе обострения заболевания и всего 4 (6%) пациента — в фазе ремиссии. На момент определения содержания хемокинов в сыворотке крови 47 (80%) из 59 больных БА находились в фазе ремиссии заболевания и только 12 (20%) пациентов — в фазе обострения. У 6 (50%) из 12 больных БА обострение возникло после перенесенного ОРЗ, а у остальных 6 (50%) пациентов — после контакта с аллергенами.

У 4 больных БА, обследованных в фазу ремиссии, также имелся сезонный аллергический риноконъюнктивит (поллиноз) в фазу ремиссии. У 12 (18%) из 66 больных обострение развивалось после контакта с аллергенами, из которых у 4 (33%) пациентов БА сочеталась с аллергическим интермиттирующим ринитом, у 1 (8,7%) — с аллергическим персистирующим ринитом, у 1 (8,7%) — с аллергическим персистирующим ринитом и атопическим дерматитом, у 5 (41%) — с сезонным аллергическим риноконъюнктивитом и у 1 (8,7%) — с круглогодичным аллергическим риноконъюнктивитом и атопическим дерматитом.

Из 66 пациентов у 54 (82%) обострение развивалось после перенесенного острого респираторного заболевания (ОРЗ), причем у 42 (78%) из них имели место такие симптомы как: малопродуктивный кашель со слизисто-гнойной мокротой у 27 (64%) пациентов, першение в горле — у 6 (14%), субфебрильная температура у — 4 (10%), явления ринита — у 2 (5%), сочетание малопродуктивного кашля со слизисто-гнойной мокротой с субфебрильной лихорадкой — у 3 (7%), у остальных 12 (22%) больных подобных явлений не наблюдалось. Однако, у 20 (37%) из 54 больных имелся аллергический интермиттирующий ринит в фазу ремиссии. Пациенты с легким течением БА вне обострения обследовались амбулаторно. Пациенты с обострением среднетяжелого течения БА были обследованы в условиях клиники госпитальной терапии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

До поступления в стационар большинству обследованных (66 пациентов — 94%) проводилось лечение ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГКС) в сочетании с  $\beta_2$ -агонистами короткого или пролонгированного действия или комбинацией ИГКС и  $\beta_2$ -агонистов пролонгированного действия и только 4 (6%) пациента с легкой степенью тяжести БА, вне обострения получали монотерапию бронхолитиками. В условиях стационара всем больным с обострением БА средней степени тяжести проводилась терапия системными ГКС парентерально.

На основании анамнеза, клинических данных, показателей спирографии устанавливали

диагноз и степень тяжести БА по общепринятым критериям [3].

Всем пациентам в осенне-зимне-весенний период дополнительно выполнялся анализ браш-биоптата слизистой носоглотки на наличие инфекционных агентов (вируса парагриппа, РС-вируса, аденовируса, *M. pneumoniae*, *Ch. Psitaci*). Исследование проводилось в лаборатории НМЦ по молекулярной медицине СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

В браш-биоптатах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле определяли содержание мРНК хемокинов (CCL11/эотаксина, CCL24/эотаксина-2, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ ) и мРНК хемокиновых рецепторов (CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2). Браш-биоптат получали по общепринятой методике [7, 8]. В пластиковую пробирку типа «Эппендорф», содержащую 0,1м р-р ЭДТА 0,5 мл, вносили браш-биоптат слизистой носоглотки, добавляли 300 мкл лизирующего раствора D и оставляли на 5 мин в термостате при t 65 °C, затем добавляли 400 мкл изопропилового спирта и центрифугировали пробирку при 13000 об/мин в течение 5 мин. Затем убирали надосадочную жидкость, добавляли к осадку 500 мкл этанола и снова при тех же условиях центрифугировали. Удаляли надосадок, после чего добавляли ацетон 500 мкл, и центрифугировали пробирку при 13000 об/мин в течение 5 мин. Затем убирали надосадочную жидкость. После удаления надосадочной жидкости, осадок высушивался при t 65 °C в течение 5 мин и растворяли его в ДЭПК-Н<sub>2</sub>O. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора «Реверта» («Амплисенс», Москва, Россия) согласно инструкции производителя. Следующим этапом являлась постановка ПЦР со специфическими праймерами [1]. Режим ПЦР: денатурация ДНК при 95 °C — 4 мин, 30 циклов амплификации (95 °C — 30 с, 60 °C — 30 с, 72 °C — 30 с), элонгация 72 °C — 7 мин. В качестве референс-гена использовали  $\beta$ -актин. Визуализацию полученных ПЦР-продуктов осуществляли в 1,5% агарозном геле, окрашенным бромистым этидием, при УФ освещении на трансиллюминаторе «Волна» (Россия). Полуколичественную оценку проводили с помощью программы Gel-Pro, принимая за 100% интенсивность флуоресценции  $\beta$ -актина.

У 59 (84%) из 70 больных бронхиальной астмой хемокины (CCL11/эотаксин, CCL24/эотаксин-2, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ ) определяли в сыворотке крови с помощью x-MAP технологии на наборах с использованием магнитных частиц «Milliplex

Mag» (фирма «Millipore», США) и анализаторе «MagPlex» (фирма «Millipore», США).

Контрольную группу составили 17 практически здоровых лиц, у которых определяли экспрессию мРНК хемокинов и их рецепторов в слизистой оболочке носоглотки и 20 практически здоровых лиц, у которых определяли содержание хемокинов в сыворотке крови. Обе группы не имели признаков ОРЗ (лихорадки, катаральных явлений) и аллергических заболеваний в анамнезе [2].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS (версия 13.0) с применением непараметрического анализа двух переменных для критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Результаты представляли в виде медианы (Me), нижнего ( $Q_1$ ) и верхнего ( $Q_2$ ) квартилей.

## Результаты

Полученные результаты экспрессии мРНК хемокинов и их рецепторов и уровней этих же хемокинов в сыворотке крови у группы практически здоровых лиц были опубликованы нами ранее [2].

В ходе настоящего исследования было показано, что в группе больных БА в целом ( $n = 70$  человек) по сравнению с контрольной группой в слизистой оболочке носоглотки выявлялись повышенные уровни мРНК эотаксина, эотаксина-2, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  и CXCR1 ( $p = 0,041$ ;  $0,034$ ;  $0,0005$ ;  $0,002$ ;  $0,004$  соответственно) (рис. 1), а также повышенное содержание в сыворотке крови этих же больных следующих хемокинов: RANTES в 3 раза ( $p = 0,0001$ ), IL-8 в 5 раз ( $p = 0,002$ ) и эотаксин-2 в 7 раз ( $p = 0,0001$ ) и сниженное содержание эотаксина ( $p = 0,0001$ ) (табл. 1).

С учетом фазы заболевания и факторов, вызывавших обострение БА, все больные были разделены на три подгруппы, у которых определяли экспрессию мРНК хемокинов и их рецепторов в слизистой оболочке носоглотки (табл. 2).

Первую подгруппу составили 54 (77%) больных БА, у которых обострение обуславливалось перенесенным ОРЗ. В этой подгруппе мРНК эотаксина-2 был достоверно ( $p = 0,02$ ) ниже по сравнению с подгруппой больных, где обострение обуславливалось контактом с аллергенами; достоверно высокая экспрессия мРНК эотаксина по сравнению с подгруппой больных, в фазу ремиссии БА ( $p = 0,04$ ); повышенные уровни экспрессии мРНК эотаксина, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , CXCR1 ( $p = 0,04$ ;  $0,001$ ;  $0,001$ ;  $0,03$  соответственно), сниженный уровень мРНК CCR3 ( $p = 0,007$ ) и CCR5 ( $p = 0,03$ ) по сравнению с контрольной группой.

Вторую подгруппу составили 12 (17%) больных, у которых обострение возникало после контакта с аллергенами. Наблюдали достоверно высокие уровни экспрессии мРНК эотаксина ( $p = 0,02$ ) по сравнению с подгруппой больных БА в фазу ремиссии; повышенные мРНК эотаксина, эотаксина-2, MIP-1 $\beta$ , CXCR1 ( $p = 0,005$ ;  $0,0004$ ;  $0,005$ ;  $0,006$  соответственно) и сниженный уровень мРНК CCR1 ( $p = 0,0004$ ) по сравнению с контрольной группой.

В третьей подгруппе, состоящей из 4 (6%) больных в фазу ремиссии БА, наблюдали достоверно сниженный уровень мРНК для эотаксина, CCR1, CXCR2 ( $p = 0,02$ ;  $0,004$ ;  $0,03$  соответственно) по сравнению с контрольной подгруппой.

На момент определения содержания хемокинов в сыворотке крови все 59 из 70 больных БА были также распределены на подгруппы в зависимости от фазы заболевания. Содержание хемо-

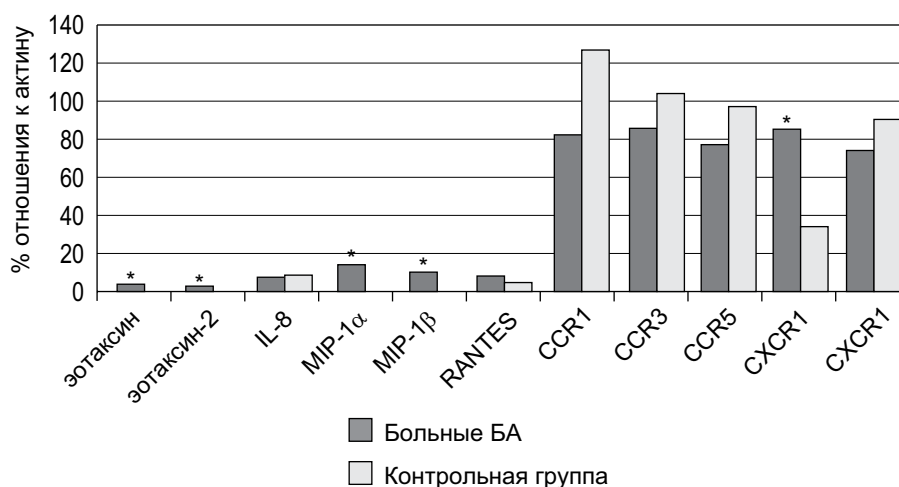


Рисунок 1. Экспрессия мРНК хемокинов и их рецепторов у больных БА и у практически здоровых лиц в слизистой оболочке носоглотки

Примечание. \* – достоверность отличий при  $p < 0,05$ .

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ХЕМОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БА ПО СРАВНЕНИЮ С КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППОЙ, Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>2</sub>)

Хемокины (пкг/мл)	Здоровые лица	Больные БА
CCL3/MIP-1 $\alpha$	0	9 (0-88)
CCL4/MIP-1 $\beta$	81,6 (80,1-89,8)	93 (0-193)
CCL5/RANTES	91515,4 (75783-116310,1)	269099 (0-698849)*
CCL11/эотаксина	193,6 (190-206,4)	145 (24-284)*
CCL24/эотаксина-2	172,8 (165,3-180,9)	1265 (141-3381)*
CXCL8/IL-8	12,4 (8,4-17,7)	56 (2-423)*

Примечание. \* – достоверность отличий при  $p < 0,05$ .

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ мРНК ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ НОСОГЛОТКИ БОЛЬНЫХ БА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АКТИВНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ, Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>2</sub>)

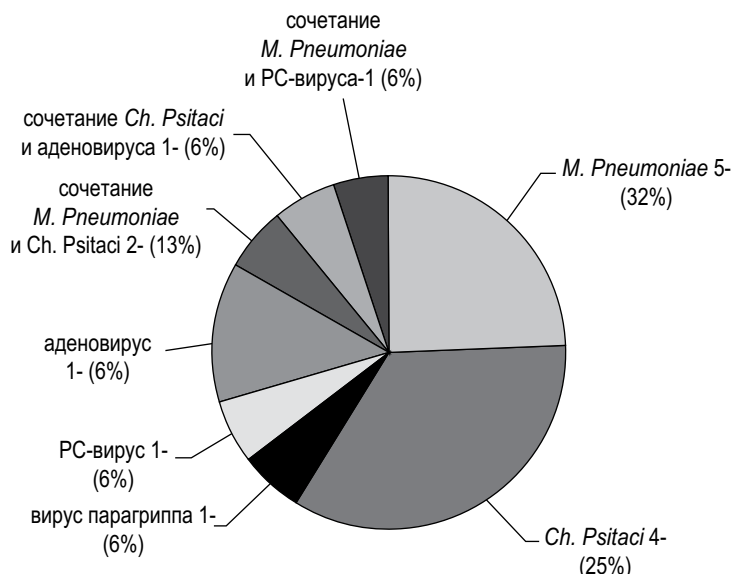
мРНК хемокинов и их рецепторов	Больные БА в фазу:			Контрольная группа	P
	обострения		ремиссии		
	после ОРЗ	после контакта с аллергенами			
	1	2			
CCL3/MIP-1 $\alpha$	15,5 (0-54)	13,5 (3-73)	7,5 (0-21)	9 (0-52)	P (1-4) = 0,001;
CCL4/MIP-1 $\beta$	10 (0-49)	20,5 (0-58)	2,5 (0-10)	0,2 (0-20)	P (1-4) = 0,001; P (2-4) = 0,005
CCL5/RANTES	7,5 (0-71)	19 (0-61)	0 (0-16)	6 (0-98)	–
CCL11/эотаксин	6 (0-63)	8,5 (0-67)	0 (0-0,3)	0,4 (0-6)	P (1-3) = 0,04; P (1-4) = 0,04; P (2-3) = 0,02; P (2-4) = 0,005; P (3-4) = 0,02
CCL24/эотаксин-2	3 (0-98)	10,5 (0-130)	1,75 (0-18)	0,4 (0-20)	P (1-2) = 0,02; P (2-4) = 0,0004
CXCL8/IL-8	7 (0-105)	9,5 (0-113)	22,5 (0-48)	9 (0-52)	–
CCR1	80,5 (50-167)	86 (48-126)	81 (77-85)	126 (80-225)	P (2-4) = 0,0004; P (3-4) = 0,0004
CCR3	82 (50-162)	94 (35-118)	108,5 (35-121)	103 (36-122)	P (1-4) = 0,007
CCR5	78,5 (60-137)	71,5 (22-122)	89 (68-129)	97 (18-211)	P (1-4) = 0,03;
CXCR1	83,5 (68-200)	86 (78-118)	105 (86-127)	36 (18-177)	P (1-4) = 0,03; P (2-4) = 0,006;
CXCR2	78 (31-240)	75,5 (30-131)	69 (33-72)	90 (41-144)	P (3-4) = 0,03

кинов в сыворотке крови больных БА перечисленных трех подгрупп представлены в таблице 3.

Первую подгруппу составили 6 из 59 больных БА, у которых заболевание было в фазе обострения, развившегося после перенесенного ОРЗ. Достоверно повышенными в сыворотке крови этих больных были MIP-1 $\alpha$  и эотаксин-2 ( $p = 0,01$ ; 0,01 соответственно) и сниженными –

MIP-1 $\beta$  и эотаксин ( $p = 0,01$ ; 0,01 соответственно) по сравнению с контрольной группой. Достоверно сниженным оказался уровень MIP-1 $\beta$  ( $p = 0,01$ ) по сравнению с подгруппой больных БА, у которых заболевание было в фазе ремиссии.

Вторую подгруппу составили тоже 6 из 59 больных БА, у которых заболевание было в фазе обострения, возникшего после контакта с аллер-



**Рисунок 2. Инфекционные агенты, выявленные в браш-биоптатах слизистой носоглотки больных БА**

генами. Достоверно повышенным в сыворотке крови этих больных по сравнению с контрольной группой было содержание MIP-1 $\alpha$ , RANTES и эотаксина-2 ( $p = 0,001$ ; 0,04; 0,0001 соответственно) и сниженным – содержание MIP-1 $\beta$  ( $p = 0,001$ ) и эотаксина ( $p = 0,001$ ). Достоверно сниженным также был уровень MIP-1 $\beta$  ( $p = 0,03$ ) по сравнению с подгруппой больных БА, у которых заболевание было в фазе ремиссии.

Третью подгруппу составили 47 из 59 пациентов с БА, у которых заболевание было в фазе ремиссии. По сравнению с контрольной группой достоверно повышенными в сыворотке крови этих больных были уровни MIP-1 $\alpha$ , RANTES и эотаксина-2 ( $p = 0,005$ ; 0,0001; 0,0001 соответственно), а сниженным только уровень эотаксина ( $p = 0,005$ ).

По результатам исследования биоптатов слизистой оболочки носоглотки на наличие инфек-

**ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ХЕМОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ БА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АКТИВНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ, Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>2</sub>)**

Хемокины (пкг/мл)	Больные БА в фазу:			Контрольная группа	P
	обострения		ремиссии		
	после ОРЗ	после контакта с аллергенами			
CCL3/MIP-1 $\alpha$	15 (0-37)	32 (0-88)	15 (0-50)	0 (0-0)	P (1-4) = 0,01; P (2-4) = 0,0001; P (3-4) = 0,005
CCL4/MIP-1 $\beta$	29 (63-144)	28 (87-170)	40 (0-193)	81,6 (80,1-89,8)	P (1-3) = 0,01; P (2-3) = 0,03; P (1-4) = 0,01; P (2-4) = 0,001
CCL5/RANTES	278592 (0-698849)	179714 (0-437-495)	1611942 (0-610976)	91515 (75783-116310,1)	P (3-4) = 0,0001; P (2-4) = 0,04
CCL11/эотаксин	55 (76-221)	25 (97-165)	69 (0-284)	193,6 (190-206,4)	P (1-4) = 0,01; P (2-4) = 0,0001; P (3-4) = 0,005
CCL24/эотаксин-2	1151 (152-2629)	666 (288-2149)	829 (141-3381)	172,8 (165,3-180,9)	P (1-4) = 0,01; P (2-4) = 0,0001; P (3-4) = 0,0001
CXCL8/IL-8	47 (2-109)	69 (3-177)	93 (0-423)	12,4 (8,4-17,7)	—

ТАБЛИЦА 4. ЭКСПРЕССИЯ мРНК ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ У БОЛЬНЫХ БА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЫЯВЛЕННОЙ ИНФЕКЦИИ, Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>2</sub>)

Хемокины (пкг/мл)	Больные БА		Контрольная группа	Р
	без инфекции	с выявленной инфекцией		
	1	2	3	
CCL3/MIP-1 $\alpha$	14,5 (0-73)	12,5 (0-31)	0,5 (0-36)	P (2-3) = 0,02
CCL4/MIP-1 $\beta$	10 (0-58)	5,5 (0-34)	0,2 (0-20)	–
CCL5/RANTES	10 (0-61)	3,5 (0-71)	6 (0-98)	–
CCL11/эотаксин	6 (0-59)	3,5 (0-67)	0,4 (0-6)	–
CCL24/эотаксин-2	3 (0-130)	4 (0-77)	0,4 (0-20)	–
CXCL8/IL-8	6 (0-113)	11 (0-48)	9 (0-52)	–
CCR1	81,5 (13-167)	80 (0-134)	126 (80-225)	P (2-3) = 0,003
CCR3	80,5 (50-162)	99,5 (16-125)	103 (36-122)	–
CCR5	73,5 (20-137)	85 (26-129)	97 (18-211)	–
CXCR1	77,5 (30-200)	93 (35-127)	36 (18-177)	P (2-3) = 0,003
CXCR2	75,5 (30-240)	72,5 (31-114)	90 (41-144)	–

ционных агентов методом ОТ-ПЦР все пациенты были разделены на 2 подгруппы. Первую подгруппу составили 16 (23%) больных с выявленной инфекцией (*M. Pneumoniae* встречалась у 5 пациентов, *Ch. Psitaci* – у 4, вирус парагриппа – у 1, РС-вирус – у 1, аденовирус – у 1, сочетание *M. Pneumoniae* и *Ch. Psitaci* – у 2, сочетание *Ch. Psitaci* и аденовируса – у 1, сочетание *M. Pneumoniae* и РС-вируса – у 1) (рис. 2). Во вторую подгруппу вошли 54 (77%) пациента с невыявленной инфекцией. Достоверных различий показателей между подгруппами получено не было. Однако у пациентов с верифицированной инфекцией по сравнению с контрольной группой были выявлены достоверно повышенная экспрессия мРНК MIP-1 $\alpha$  и CXCR1 ( $p = 0,02$ ;  $0,003$  соответственно) и сниженная мРНК CCR1 ( $p = 0,003$ ) (табл. 4).

В сыворотке крови пациентов с верифицированной инфекцией и больных без инфекции по сравнению с группой контроля (табл. 5) были выявлены однонаправленные изменения: достоверно повышенное содержание MIP-1 $\alpha$ , RANTES и эотаксина-2 ( $p = 0,03$ ;  $0,0001$ ;  $0,0001$  соответственно) и достоверно сниженное содержание эотаксина ( $p = 0,002$ ). Что касается IL-8,

то его содержание было достоверно повышенным ( $p = 0,02$ ) только в группе больных БА без инфекции. В группе, где инфекция не обнаруживалась также было установлено достоверно сниженное в 1,8 раза содержание эотаксина ( $p = 0,01$ ) и повышенное содержание MIP-1 $\alpha$  в 8 раз ( $p = 0,001$ ), RANTES – в 3 раза ( $p = 0,001$ ) и эотаксина-2 – в 6 раз ( $p = 0,0001$ ).

Достоверных различий между подгруппами больных выявлено не было.

## Обсуждение

Хемокины представляют собой группу биологически активных пептидов, которые регулируют миграцию лейкоцитов, а также способствуют активации этих клеток, в частности участвуют в высвобождении гранул с биологически активными веществами [6]. Хемокины участвуют в формировании иммунного ответа как при внедрении инфекции, в частности внутриклеточной, так и при воздействии аллергенов.

Эпителий носоглотки является, по нашему мнению, маркером состояния нижних дыхательных путей, что позволяет оценить систему хемокинов у пациентов с бронхиальной астмой мало-

ТАБЛИЦА 5. СОДЕРЖАНИЕ ХЕМОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ БА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ИНФЕКЦИИ, Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>2</sub>)

Хемокины (пкг/мл)	Больные БА		Контрольная группа	Р
	без инфекции	с выявленной инфекцией		
	1	2		
CCL3/MIP-1 $\alpha$	9,8 (0-25,4)	8 (0-29)	0 (0-0)	P (1-3) = 0,001; P (2-3) = 0,03
CCL4/MIP-1 $\beta$	90,5 (70,6-116,6)	89,4 (82-132)	81,6 (80,1-89,8)	–
CCL5/RANTES	236226 (91476-387018)	288149 (169349-411912)	91515 (75783-116310)	P (1-3) = 0,001; P (2-3) = 0,0001
CCL11/эотаксин	149 (102,6-197,1)	108,1 (95,4-159,8)	193,6 (190-206,4)	P (1-3) = 0,01; P (2-3) = 0,002
CCL24/эотаксин-2	1245,4 (582,9-1938,8)	1077,8 (296,6-1353,5)	172,8 (165,3-180,9)	P (1-3) = 0,0001; P (2-3) = 0,0001
CXCL8/IL-8	18,8 (11,9-47,4)	12,9 (7-86,4)	12,4 (8,4-17,7)	P (1-3) = 0,02

инвазивным способом. Изучение экспрессии мРНК хемокинов и хемокиновых рецепторов в слизистой оболочке носоглотки важно ввиду необходимости оценки местных иммунных механизмов и при минимальном травматическом воздействии при взятии материала.

У всех больных БА, участвующих в нашем исследовании были повышены уровни экспрессии мРНК хемокинов эотаксина, эотаксина-2, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  в слизистой оболочке носоглотки в среднем в 2-20 раз, а экспрессия мРНК изученных рецепторов была снижена в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой. В сыворотке крови больных БА достоверно повышенным было содержание RANTES в 3 раза, IL-8 в 5 раз и эотаксина-2 в 7 раз и сниженным – содержание эотаксина по сравнению со здоровыми лицами. Полученные данные закономерны, так как при бронхиальной астме основными типами иммунологических реакций являются I, III и IV. Сниженная экспрессия мРНК рецепторов у больных БА, по нашему мнению, обусловлена сдерживающим механизмом для клеток воспаления, которые мигрируют в очаг активного воспаления, в данном случае в дыхательные пути. Таким образом, рецепторы CCR1, CCR3, CCR5 и CXCR2 блокируют развитие воспаления, что, на наш взгляд, может являться компенсаторной иммунологической реакцией при БА. Исключение составляет рецептор CXCR1, мРНК которого, наоборот, активно экспрессируется при БА.

У пациентов с выявленной инфекцией по сравнению с контрольной группой были выявлены достоверно повышенные уровни мРНК для MIP-1 $\alpha$  и CXCR1, поддерживающие клеточно-опосредованное иммунное воспаление,

и сниженный уровень мРНК для CCR1. По данным Federica S. et al. (2000) CCR1 играет защитную роль от вирусных агентов. На наш взгляд полученные данные могут свидетельствовать, что персистенция внутриклеточной инфекции может быть обусловлена дефицитом CCR1 при БА.

Исследуя уровни хемокинов в сыворотке крови больных БА, разделенных на подгруппы в зависимости от выявленной инфекции значительных отличий между подгруппами выявлено не было. Однако достоверно повышенными были уровни MIP-1 $\alpha$ , RANTES и эотаксина-2 в обеих подгруппах по сравнению с группой контроля, а уровень IL-8 был достоверно повышен только в подгруппе, где инфекция не выявлялась. В подгруппе с верифицированной инфекцией уровень IL-8 достоверно не отличался. По данным литературы содержание IL-8 изменяется в мокроте, а не в крови в зависимости от фазы заболевания, что отражает паракринное действие IL-8 в очаге воспаления и свидетельствует о большей значимости этого цитокина именно для местных воспалительных реакций при бронхиальной астме [13]. Что же касается повышения уровней MIP-1 $\alpha$ , RANTES и эотаксина-2 в обеих подгруппах, то существенных изменений от наличия инфекционного фактора при бронхиальной астме нами выявлено не было. Достоверно сниженным в обеих подгруппах оказался уровень эотаксина. Нами предположено, что эотаксин играет наибольшую роль при локальном иммунном воспалении.

У больных БА были в фазу обострения, возникшего после перенесенного ОРЗ, наблюдалась достоверно высокая экспрессия мРНК эотаксина по сравнению с больными в фазу ремиссии. Наблюдалась повышенная экспрессия мРНК эо-



таксина, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  и CXCR1, и сниженная экспрессия мРНК CCR3 по сравнению с контрольной группой. В данном случае, по нашему мнению, сочетались клеточно-опосредованный и гуморальный типы иммунологического воспаления. В сыворотке крови этой группы больных БА достоверно снижался уровень эотаксина и MIP-1 $\beta$  и повышался — MIP-1 $\alpha$  и эотаксина-2. В данном случае можно предполагать, что повышение синтеза эотаксина характерно для местных реакций, тогда как достоверно повышенные уровни MIP-1 $\alpha$  и эотаксина-2 в сыворотке крови поддерживают гуморальное воспаление, даже несмотря на то, что инициировало это воспаление внутриклеточная инфекция. Наши данные подтверждаются данными литературы [15], показывающими повышение MIP-1 $\alpha$  в ответ на внутриклеточную инфекцию, вероятнее всего, для ее элиминации.

У больных БА были в фазу обострения, возникшего после контакта с аллергенами, наблюдались достоверно высокая экспрессия в слизистой оболочке носоглотки мРНК эотаксина по сравнению с подгруппой больных БА в фазу ремиссии; повышенная экспрессия мРНК эотаксина, эотаксина-2, MIP-1 $\beta$ , CXCR1 и сниженная экспрессия мРНК CCR1 по сравнению с контрольной группой. В данном случае наблюдается выраженная картина гуморального иммунного воспаления. В сыворотке крови этой группы больных БА достоверно снижалось содержание эотаксина и MIP-1 $\beta$  на фоне повышенных уровней MIP-1 $\alpha$ , RANTES и эотаксина-2. По нашему мнению, в данном случае имеет место преобладание гуморального типа иммунологической реакции, что характерно для аллергического воспаления. У больных БА в фазу ремиссии наблюдали достоверно сниженную экспрессию мРНК эотаксина, CCR1, CXCR2 по сравнению с контрольной группой, что соответствует стиханию гуморального воспаления. По литературным данным при снижении активности гуморального воспаления повышается активность клеточно-опосредованного воспаления при БА, то есть происходит поляризация иммунного ответа [10]. В сыворотке крови у этой группы больных БА достоверно повышалось содержание MIP-1 $\alpha$ , RANTES и эотаксина-2, но снижалось содержание эотаксина. Нами предположено, что, несмотря на уменьшение клинических проявлений заболевания в сыворотке крови сохраняется повышенный уровень провоспалительных хемокинов, которые поддерживают гуморальный тип иммунной реакции.

Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что при БА по сравнению со здоровыми лицами повышаются как в носоглотке: эотаксин,

эотаксин-2, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , так и в сыворотке крови: RANTES, IL-8, эотаксин-2. Исключение составил эотаксин, содержание которого в сыворотке крови было снижено у больных БА по сравнению с контрольной группой. При этом в нашем исследовании эотаксин проявлял большую активность при местных иммунологических реакциях в слизистой оболочке носоглотки, тогда как эотаксин-2 в сыворотке крови. Экспрессия мРНК всех рецепторов, кроме CXCR1, в слизистой оболочке носоглотки снижалась, что может являться механизмом, сдерживающим миграцию лейкоцитов в очаг воспаления при БА. В зависимости от фазы БА меняется и тип иммунологической реакции: для обострения ведущим является гуморальный тип, для ремиссии — клеточно-опосредованный тип.

## Список литературы

1. Белькова А.С., Сысоев К.А., Ильина Т.Н., Шемеровская Т.Г., Хобейш М.М., Монахов К.Н., Тотолян Арег А. Экспрессия мРНК хемокинов и хемокиновых рецепторов в коже больных псориазом // Мед. Иммунология. — 2008. — № 4-5. — С. 337-346.
2. Бибкова А.А., Сысоев К.А., Семенов А.В., Любимова Н.С., Арсентьева Н.А., Трофимов В.И., Тотолян Арег А. Экспрессия мРНК хемокинов и их рецепторов в слизистой оболочке носоглотки у практически здоровых лиц // Мед. Иммунология. — 2011. — № 6. — С. 617-622.
3. Волковой Л.И., Будковой А.А., Кустова В.И. Диагностические возможности морфологического и цитологического исследования биоптатов слизистой бронхов при бронхиальной астме и хроническом бронхите // Сибирский медицинский журнал. — 2000. — № 3. — С. 42-47.
4. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA 2008) / Пер. с англ. Перевод 2002 г. — М.: Атмосфера, 2002. — 160 с.
5. Чучалин А.Г. Клинические рекомендации. Бронхиальная астма у взрослых. Атопический дерматит. — М.: Атмосфера, 2002. — 254 с.
6. Коровяков С.А. Влияние инфекционного фактора на течение бронхиальной астмы // Пульмонология. — 2007. — № 5. — С. 33-39.
7. Резник И.Б. Введение в общую иммунологию для врачей // Аллергология. — 1999. — № 5. — С. 44-50.
8. Рогачева Н.Н., Ямщикова Т.Ю. О гомогенизации мокроты для цитологического исследования // Лабораторное дело. — М.: 1985. — № 2. — С. 65-129.
9. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории // Методические указания. МУ 4.2.203905

(утв. главным государственным санитарным врачом РФ 23.12.2005).

10. Трофимов В.И., Шапорова Н.Л., Шири Зиад Али, Сесь Т.П., Малышев М.Е., Дудина О.В. Мониторинг цитокинового профиля у больных бронхиальной астмой — влияние глюкокортикоидной терапии // Медицинская иммунология. — 2001. — № 1. — С. 69-76.

11. Федосеев Г.Б., Трофимов В.И. Бронхиальная астма. — СПб.: Нордмед-Издат, 2006.

12. Федосеева В.Н. Бактериальная аллергия // Аллергология. — 1999. — № 3. — С. 34-40.

13. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Иммунологические механизмы аллергических реакций // Аллергология. — СПб.: Нордмед-Издат, 2001. — Т. 1. — С. 169-382.

14. Чучалин А.Г., Оспельникова Т.О., Осипова Г.Л., Лизогуб Н.В. Роль респираторных инфекций в обострениях бронхиальной астмы // Пульмонология. — 2007. — № 5. — С. 14-18.

15. Mahalingam S., Friendland J. Chemokines and viruses: friends or foes? // [http: timi.trends.com](http://timi.trends.com).2003.

16. Oehling A. Бактериальная инфекция в этиологии бронхиальной астмы / Пер. с англ. В.И. Пыцкого // Пульмонология. — 1999. — № 2. — С. 6-11.

17. Sallusto F., Mackay Ch. The role of chemokine receptors in primary, effector and memory immune responses // Annu. Rev. Immunol. — 2000. — N 18. — P. 593-620.

18. Sorensen L., Paludan S. Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function // J. of Leukocyte Biology. — 2003. — N 4. — P. 331-343.

*поступила в редакцию 18.05.2011*

*отправлена на доработку 28.06.2011*

*принята к печати 15.11.2011*