

ЭКСПРЕССИЯ мРНК НЕКОТОРЫХ ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ НОСОГЛОТКИ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Бибкова А.А.¹, Сысоев К.А.¹, Семенов А.В.²,
Любимова Н.Е.², Арсентьева Н.А.², Трофимов В.И.¹,
Тотолян Арег А.²

¹Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

²Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Резюме. Хемокины являются одним из ключевых факторов, обеспечивающих участие различных типов клеток в иммунологической защите слизистых. В нашей работе были выбраны некоторые хемокины, обеспечивающие преимущественно хемотаксис нейтрофилов (CXCL8/IL-8), эозинофилов (CCL11/эотаксин, CCL24/эотаксин-2), моноцитов и Т-лимфоцитов (CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β), а также их рецепторы (CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2). В нашем исследовании у практически здоровых лиц определяли мРНК хемокинов и их рецепторов в браш-биоптате слизистой оболочки носоглотки методом ОТ-ПЦР, а также уровень тех же хемокинов в сыворотке крови методом мультиплексного хемилюминисцентного анализа также в зависимости от табакокурения. В подгруппе курящих по сравнению с подгруппой некурящих достоверно были снижены уровни мРНК IL-8 ($p < 0,001$) и RANTES ($p < 0,001$) в браш-биоптатах носоглотки и уровень IL-8 ($p < 0,0001$) в сыворотке крови. При проведении корреляционного анализа была установлена зависимость синтеза некоторых хемокинов от фактора табакокурения: индекс курящего человека (пачка/лет) отрицательно коррелировал с уровнем мРНК IL-8 ($r = -0,67$, $p = 0,003$) и RANTES ($r = -0,58$, $p = 0,015$) в браш-биоптатах носоглотки и с концентрацией IL-8 в сыворотке крови ($r = -0,89$, $p = 0,0000002$). Таким образом, на фоне табакокурения развивается дефект местного синтеза RANTES и IL-8 в слизистой оболочке носоглотки в сочетании с системным дефектом продукции IL-8 в периферической крови, что может вести как к хронизации острой бактериальной инфекции, так и к длительной персистенции при вирусной инфекции.

Ключевые слова: хемокины, хемокиновые рецепторы, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, эотаксин, эотаксин-2, IL-8, табакокурение.

Bibkova A.A., Sysoyev K.A., Semenov A.V., Lyubimova N.E., Arsentieva N.A., Trofimov V.I., Totolian Areg A.
mRNA EXPRESSION OF SOME CHEMOKINES AND THEIR RECEPTORS IN NASAL MUCOSA OF HEALTHY PERSONS

Адрес для переписки:

Бибкова Анна Андреевна,
Кафедра госпитальной терапии
им. акад. М.В. Чернурузкого
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8,
корпус 10.
Тел.: (812) 499-71-89, 234-54-51.
E-mail: annabibkova@hotmail.ru

Abstract. Chemokines are a key factor that ensures the participation of different cell types in the immunological protection of mucosa. In our study we chose some chemokines that ensured the chemotaxis of neutrophils (CXCL8/IL-8), eosinophils (CCL11/eotaxin, CCL24/eotaxin-2), monocytes and T-lymphocytes (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES), as well as their receptors (CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2). mRNA expression of chemokines and their receptors in nasopharyngeal

mucosa brush-biopsy specimens determined by RT-PCR in healthy persons, the level of the same chemokines in serum determined by multiplex chemiluminescent assay were analyzed according to smoking. The level of mRNA expression of IL-8 ($p < 0.001$) and RANTES ($p < 0.001$) in nasopharynx brush-biopsy specimens and serum levels of IL-8 ($p < 0.0001$) of smokers were significantly lower as compared with nonsmokers. Correlation analysis showed the dependence of the chemokine synthesis on the factor of smoking: the index of smoking (pack/years) is negatively correlated with mRNA levels of IL-8 ($r = -0,67$ $p = 0,003$) and RANTES ($r = -0,58$, $p = 0,015$) in nasopharynx brush-biopsy specimens and serum concentration of IL-8 ($r = -0,89$, $p = 0,000002$). Thus, these data offer that smokers manifested a defect of the local synthesis of RANTES and IL-8 in nasopharyngeal mucosa in combination with systemic defect of IL-8 production in peripheral blood, that can lead to chronization of bacterial infection and prolonged persistence of viral infection. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 6, pp 617-622)

Keywords: chemokines, chemokine receptors, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, eotaxin, eotaxin-2, IL-8, smoking.

Введение

Известно, что верхние дыхательные пути контактируют с внешней средой и являются входными воротами для поступления в организм инфекционных агентов и аллергенов (пылевых, эпидермальных, пыльцевых, лекарственных). Под влиянием различных чужеродных веществ, содержащихся во вдыхаемом воздухе, в легких происходят патоморфологические изменения с участием факторов клеточного и гуморального иммунитета, в присутствии большого количества биологически активных веществ, цитокинов, в том числе хемокинов, обеспечивающих миграцию клеток в очаг воспаления [5].

Для нормального функционирования бронхолегочной системы большое значение имеет защитная функция носа, состоящая в нейтрализации вредных свойств вдыхаемого воздуха: в его согревании, увлажнении, обеспыливании, обеззараживании, устранении раздражителей путем рефлекторных актов (чихание, слезотечение) и отчасти в нейтрализации вредных газообразных веществ.

Попавшие в слои слизи частицы, благодаря деятельности ресничек мерцательного эпителия, могут перемещаться с током слизи к глотке и удаляться таким путем из организма. Почти 85% частиц размером 4,5 мкм удаляются из организма еще в полости носа. Лишь 5% мельчайших частиц размером до 1 мкм не задерживаются защитными механизмами носа.

Одним из важнейших физиологических механизмов, служащих для предотвращения попадания пылевых частиц и микроорганизмов в бронхи, является система мукоцилиарного клиренса верхних дыхательных путей, состоящая из клеток мерцательного эпителия и покрывающего их слоя слизи. Мерцательные клетки составляют главный тип клеток эпителия, выстилающего дыхательные пути. На поверхности каждой клетки располагается 12-20 ресничек, колеблющихся метахронно. Каждая ресничка опирается на базальное тельце в поверхностном слое цитоплаз-

мы, которое участвует в осуществлении ее двигательного акта.

Клеточный состав носоглотки, основная функция которого барьерная, достаточно разнообразный. Присутствие форменных элементов обеспечивается различными цитокинами, в том числе хемокинами. Мы в своей работе остановились на некоторых из них, обеспечивающих преимущественно хемотаксис нейтрофилов (CXCL8/IL-8), эозинофилов (CCL11/эотаксин, CCL24/эотаксин-2), моноцитов и Т-лимфоцитов (CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β), а также их рецепторов (CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2).

Семейство эотаксинов входит в группу аллергенных провоспалительных хемокинов, кодируются на 17 человеческой хромосоме. Эотаксин и эотаксин-2 участвуют в привлечении и активации эозинофилов и базофилов. Специфическим рецептором, находящийся на мембранах эозинофилов и базофилов, для них является CCR3 [9].

MIP-1 α – фактор хемотаксиса и активации для базофилов, эозинофилов, моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов, играющих важную роль при воспалении. MIP-1 α и MIP-1 β участвуют в привлечении мононуклеаров в очаг воспаления. MIP-1 α связывается с рецепторами CCR1 и CCR5, а MIP-1 β – только с CCR5. Такое соответствие рецепторам и обуславливает участие MIP-1 β только в инфекционном иммунном ответе, а MIP-1 α – и в инфекционном и в аллергическом [9, 10].

RANTES привлекает преимущественно Т-клетки памяти и обладает мощным хемотаксическим воздействием через интерлейкин-2 на Т-клетки, эозинофилы, базофилы и вызывает высвобождение гистамина. Свое действие осуществляет путем связывания с рецепторами CCR1, CCR3, CCR5, что обуславливает участие как в инфекционном, так и в аллергическом иммунном ответах.

Среди всех хемокинов RANTES наиболее изучен в активации иммунного ответа при вирусной инфекции. По данным ряда зарубежных авторов

персистенция РС-вируса в эпителиальных клетках бронхов приводит к повышению экспрессии RANTES. Наличие аденовирусной инфекции в клетках так же стимулирует экспрессию RANTES [9].

Специфическим хемоаттрактантом для нейтрофилов является IL-8, который осуществляет свое действие через рецепторы CXCR1 и CXCR2. IL-8, являющийся наиболее мощным хемоаттрактантом для нейтрофилов, экспрессируется при многих вирусных инфекциях, в частности при РС-вирусной инфекции. Фактически нейтрофилы играют непосредственную роль в иммунной защите, требующей их раннего прибытия в очаг воспаления, создавая идеальные условия для контроля над привлечением других клеток в очаг [11; 12].

Задачей нашего исследования явилось рассмотрение минимального спектра мРНК хемокинов и их рецепторов, который позволит характеризовать иммунное воспаление в верхних дыхательных путях, в частности носоглотки, у практически здоровых лиц и определить уровни этих хемокинов в сыворотке.

Материалы и методы

В исследование было включено 17 практически здоровых лиц, у которых определяли мРНК хемокинов и их рецепторов в слизистой оболочке носоглотки и 20 практически здоровых лиц, у которых количественно определяли тот же спектр хемокинов в сыворотке крови. Все обследованные находились в возрасте 24–28 лет, не имели признаков ОРЗ (лихорадки, катаральных явлений), аллергических и хронических заболеваний верхних дыхательных путей в анамнезе. Учитывался фактор хронической интоксикации – табакокурение. Среди 17 добровольцев, у которых анализировался браш-биоптат, 7 были курящими и 10 некурящими, а из 20 практически здоровых лиц, у которых проводили анализ сыворотки крови: 9 – курящие и 11 – некурящие. Стаж курения составлял 3–5 лет, где индекс курящего человека (пачка/лет) – от 1,5 до 5.

В нашем исследовании у 17 практически здоровых лиц с помощью браш-биопсии брали образцы слизистой оболочки носоглотки, в которых методом ОТ-ПЦР определяли мРНК хемокинов (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL11/эотаксин, CCL24/эотаксин-2, CXCL8/IL-8) и соответствующие им рецепторы (CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2). Такой выбор хемокинов и их рецепторов был сделан для оценки системы хемокинов в комплексе.

Биоптат получали по общепринятой методике. Вращательными движениями по нижнему носовому ходу поочередно в обе ноздри вводили

цитощетку «Юнона» в носоглотку. Одновременно крылья носа прижимали к цитощетке и носовой перегородке для более плотного контакта со слизистой оболочкой [6, 7].

В пластиковую пробирку типа «Эппендорф», содержащую 0,1 м раствор 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 °С, 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, осадок высушивали при t 65 °С в течение 5 мин и растворяли его в ДЭПК-Н₂O. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора «Реверта» («Амплиценс», Москва, Россия) согласно инструкции производителя. Следующим этапом являлась постановка ПЦР со специфическими праймерами. Режим ПЦР: денатурация ДНК при 95 °С – 4 мин, 30 циклов амплификации (95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с), элонгация 72 °С – 7 мин. В качестве референс-гена использовали β -актин. Визуализацию полученных ПЦР-продуктов осуществляли в 1,5% агарозном геле, окрашенным бромистым этидием, при УФ освещении на трансиллюминаторе «Волна» (Россия). Полуколичественную

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ мРНК ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В БИОПТАТАХ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСОГЛОТКИ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Показатель	Уровень мРНК хемокинов в %% Ме (Q ₁ -Q ₂)
Хемокины	
CCL3/MIP-1 α	0,5 (0-36)
CCL4/MIP-1 β	0,2 (0-20)
CCL5/RANTES	6,0 (0-98)
CXCL8/IL-8	9,0 (0-52)
CCL11/эотаксин	0,4 (0-6)
CCL24/эотаксин-2	0,4 (0-20)
Хемокиновые рецепторы	
CCR1	126 (80-225)
CCR3	103 (36-122)
CCR5	97 (18-211)
CXCR1	36 (18-177)
CXCR2	90 (41-144)

Примечание. Ме – медиана, Q₁ – нижний квартиль, Q₂ – верхний квартиль.

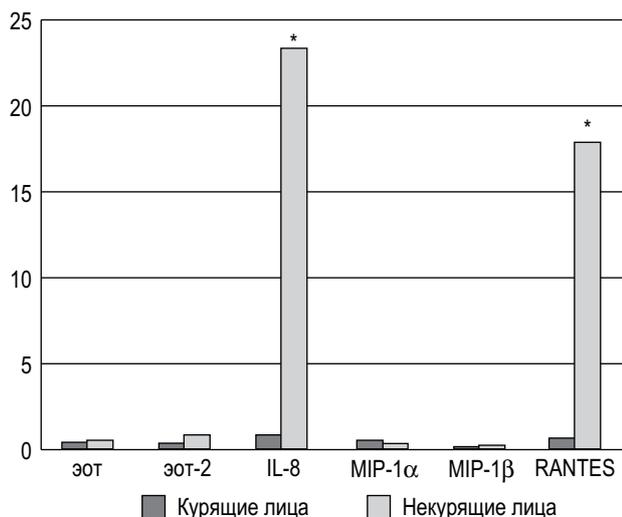


Рисунок 1. Уровень мРНК хемокинов (Me) в биоптатах слизистой оболочки носоглотки у курящих и некурящих лиц

Примечание. * – наличие статистически значимых различий между сравниваемыми группами ($p < 0,05$), критерий Вилкоксона–Манна–Уитни (U).

оценку проводили с помощью программы Gel-Pro, принимая за 100% интенсивность флуоресценции β -актина.

У 20 здоровых лиц хемокины (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL11/эотаксин, CCL24/эотаксин-2, CXCL8/IL-8) определяли в сыворотке крови количественным методом мультиплексного анализа белков на анализаторе «MagPlex» (Luminex, США) с использованием наборов серии «Milliplex mag» (Millipore, США). Анализ проводили согласно инструкции фирмы-производителя.

Статистическая обработка осуществлялась с помощью пакета SPSS (версия 13.0). Использовали следующие статистические методы: непараметрический анализ двух переменных (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни), графическое представление данных (гистограммы). Достоверными считались различия между группами при $p < 0,05$.

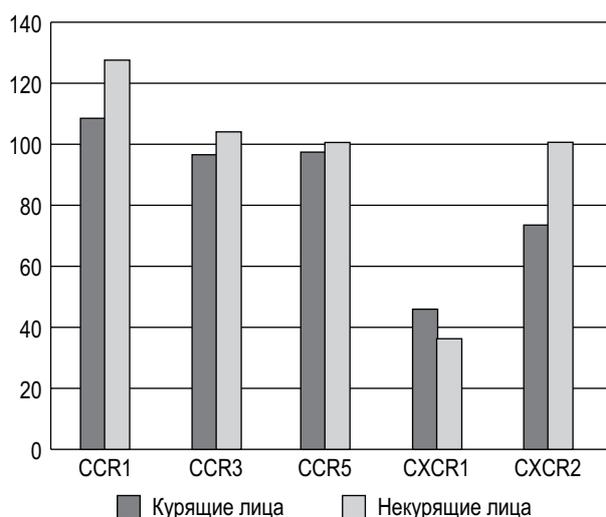


Рисунок 2. Уровень мРНК рецепторов (Me) в биоптатах слизистой оболочки носоглотки у курящих и некурящих лиц

Результаты

В ходе исследования было показано, что в слизистой оболочке носоглотки у здоровых добровольцев экспрессируются все гены хемокинов и их рецепторов, включенные в исследование. Уровни мРНК для эотаксина, эотаксина-2, MIP-1 α , MIP-1 β были минимальны и составляли до 0,5%, а для IL-8 и RANTES – до 9% (табл. 1). Наоборот, уровни мРНК для рецепторов CCR1, CCR3, CCR5, и CXCR2 за исключением CXCR1 были максимальны и составляли 100% (рис. 2).

В подгруппе курящих по сравнению с подгруппой некурящих (рис. 1) достоверно были снижены уровни мРНК IL-8 ($p < 0,001$) и RANTES ($p < 0,001$). По остальным показателям достоверных отличий получено не было (рис. 2).

При проведении корреляционного анализа была установлена зависимость синтеза некоторых хемокинов от фактора табакокурения. Ин-

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ХЕМОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КУРЯЩИХ И НЕКУРЯЩИХ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Хемокины	Практически здоровые лица		p (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни)
	некурящие Me (Q ₁ -Q ₂)	курящие Me (Q ₁ -Q ₂)	
CCL3/MIP-1 α	0 (0-1,7)	0 (0-0)	> 0,05
CCL4/MIP-1 β	89,1 (81,2-91,2)	81,6 (80,0-81,6)	> 0,05
CCL5/RANTES	81819 (73968-93127)	91803 (76746-124521)	> 0,05
CCL24/эотаксин-2	169,8 (168-177,3)	174,5 (166,3-189,1)	> 0,05
CCL11/эотаксин	200,0 (190,9-208,2)	192,8 (188,2-193,6)	> 0,05
CXCL8/IL-8	16,4 (14,9-20,9)	7,4 (6,6-9,0)	0,0001

Примечание. Me – медиана, Q₁ – нижний квартиль, Q₂ – верхний квартиль.

декс курящего человека (пачка/лет) отрицательно коррелировал с уровнем мРНК IL-8 ($r = -0,67$ $p = 0,003$) и мРНК RANTES ($r = -0,58$ $p = 0,015$).

При анализе содержания хемокинов в сыворотке крови в зависимости от фактора табакокурения был выявлен достоверно сниженный уровень IL-8 ($p < 0,0001$) в группе курящих по сравнению с некурящими лицами (табл. 2). Причем индекс курящего человека (пачка/лет) отрицательно коррелировал с концентрацией IL-8 в сыворотке крови ($r = -0,89$ $p = 0,000002$).

Обсуждение

Несомненным фактом является вредоносное воздействие табакокурения на все системы органов, а особенно на органы дыхания. И.П. Данилов и А.Э. Макаревич получили данные, что 60% мужчин и 16% женщин с хроническими болезнями органов дыхания являются курильщиками [2, 3]. Считается, что курение является причиной хронических заболеваний органов дыхания в 80-90% случаев, рака легких – в 85%. Согласно оценке ВОЗ, табачная зависимость являются самыми распространенными заболеваниями в мире. Россия – страна, где постоянно курят 40-45 млн человек [3, 4]. Согласно российским и международным данным, высокая и увеличивающаяся распространенность курения – одна из ключевых причин чрезвычайно высокого уровня смертности и низкой продолжительности жизни населения России, особенно среди мужчин. До 20-30% населения страдает пристрастием к никотину [1]. В табачном дыме найдено 4000 различных химических соединений, но табачная зависимость формируется под влиянием никотина.

При исследовании хемокинов было установлено, что это класс цитокинов, которые являются центральным регулятором лейкоцитарной миграции, а также способствуют активации этих клеток, в частности участвуют в высвобождении гранул с биологически активными веществами. В зависимости от природы антигенов (аллергены или инфекционный фактор), проникающих в организм любым путем, хемокины дифференцируют аллергический или инфекционный иммунный ответ, который будет соответствовать данному антигену [8]. В связи с этическими и методическими сложностями, которые возникают на пути исследования экспрессии хемокинов у человека, большинство литературных данных посвящено результатам экспериментальных работ [11, 12].

В нашем исследовании мы рассмотрели хемокины: участвующие в аллергическом (эотаксин, эотаксин-2) и в инфекционном воспалении (IL-8, MIP-1 β), а также хемокины, которые в равной степени могут поддерживать как аллергиче-

ское, так и инфекционное воспаление – RANTES и MIP-1 α , и соответствующие им рецепторы.

По данным нашего исследования, в подгруппе курящих в слизистой оболочке носоглотки достоверно снижались уровни мРНК IL-8 в 29 раз и мРНК RANTES в 30 раз по сравнению с подгруппой некурящих.

В сыворотке крови уровень IL-8 достоверно снижился в подгруппе курящих по сравнению с некурящими лицами в 2 раза.

Нами предположено, что табакокурение вызывает либо дефект синтеза, либо истощение функционального резерва по хемокинам RANTES и IL-8. При наличии дефекта синтеза, соответствующие хемокины воспроизводятся в сниженном количестве и табакокурение рассматривается в качестве блокатора их синтеза, а при истощении функционального резерва в начале табакокурения, возможно, имело место как компенсаторная реакция – напряжение по соответствующим хемокинам, затем как проявление декомпенсации – снижение синтеза. Несмотря на это, и в том и в другом случаях имеет место дефицит соответствующих хемокинов. А с учетом того, что мРНК IL-8 и RANTES экспрессируются в ответ на инфекцию и вносят свой вклад в формирование иммунного ответа для элиминации возбудителя, то при недостаточности этих хемокинов – как одних из звеньев, формирующие иммунный ответ, вполне вероятно, хронизация инфекционного процесса или длительное персистирование, если речь идет о вирусной инфекции. Участие дефицита мРНК RANTES в Th2-типе иммунологических реакций, возможно, может положить начало аллергическому воспалению.

Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что иммунологические процессы, протекающие в ответ на внедрение любого раздражителя, например, рассмотренный нами фактор табакокурения, очень сложны, мало изучены и, вероятнее всего, не предсказуемы. Остаются вопросы о взаимодействии хемокинов между собой при наличии определенного вида антигена. В нашем исследовании показано, что на фоне табакокурения возникает дефицит по мРНК RANTES и IL-8 в слизистой оболочке носоглотки и дефицит содержания IL-8 в сыворотке крови, что может вести как к хронизации острой бактериальной инфекции, так и к длительной персистенции вирусной инфекции.

Список литературы

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э. Геном человека и «гены предрасположенности». – СПб.: Интермедика, 2000. – 272 с.
2. Биттун Р. Бросить курить в ваших силах. – СПб.: Норинт, 2000. – 90 с.

3. Бобырев В.М., Почерняева В.Ф., Стародубцев С.Г. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов – основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1994. – Т. 57, № 1. – С. 47-54.
4. Герасименко Н.Ф., Демин А.К. Формирование политики в отношении табака в России и роль гражданского общества. – М.: Издание Российской ассоциации общественного здоровья, 2001. – 74 с.
5. Резник И.Б. Введение в общую иммунологию для врачей // Аллергология. – 1999. – № 5. – С. 44-50.
6. Рогачева Н.Н., Ямщикова Т.Ю. О гомогенизации мокроты для цитологического исследования // Лабораторное дело. – М.: Медицина, 1985. – № 2. – С. 65-129.
7. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории // Методические указания. МУ 4.2.203905 (утв. главным государственным санитарным врачом РФ 23.12.2005).
8. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Иммунологические механизмы аллергических реакций // Аллергология. – СПб.: Нордмед-издат, 2001. – Т. 2. – С. 169-382.
9. Bernhard Moser, Marlen Wolf. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control // TRENDS in immunology. – 2004. – Vol. 25, N 2.
10. Federica Sallusto, Charles R. Mackay and Antonio Lanzavecchi. The role of chemokine receptors in primary, effector and memory immune responses // Annu. Rev. Immunol. – 2000. – P. 593-620.
11. Surendran Mahalingam, Jon S. Friendland, Mark T. Heise. Chemokines and viruses: friends or foes? // <http://timi.trends.com>. 2003.
12. Louise N. Sorensen, Soren R. Paludan. Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function // Journal of Leukocyte Biology. – 2003. – P. 331-343.

поступила в редакцию 27.05.2011

отправлена на доработку 10.06.2011

принята к печати 04.07.2011