

УДК 616-078:577.2
©Коллектив авторов

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И ФАКТОРОВ АПОПТОЗА В КРОВИ И ТКАНЯХ ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ МЕТОДОМ ПЦР РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

А.Г. Глоба, О.Н. Дикова, В.С. Демидова, А.А. Карелин

ГУ Институт хирургии им. А. В. Вишневского РАМН, Москва,
Большая Серпуховская, 27, тел.: (495)236-20-52; эл. почта: aggloba@mail.ru

Методом обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции реального времени исследовали экспрессию генов цитокинов и маркеров апоптоза у 10 доноров в цельной периферической крови. Эти же показатели были исследованы в крови и тканях очага воспаления и тканях уровня ампутации у 17 пациентов с местной хирургической инфекцией. Было установлено, что в крови доноров экспрессия исследованных факторов не наблюдается. У пациентов с хирургической инфекцией гены цитокинов и маркеров апоптоза экспрессировались в различной степени в лимфоцитах цельной крови. Эта экспрессия в меньшей степени наблюдалась в тканях на уровне ампутации и практически не наблюдалась в очаге воспаления, кроме гена каспазы-8. На основании исследований можно сделать вывод, что при формировании синдрома системного воспалительного ответа экспрессируется ряд генов про- и противовоспалительных цитокинов и факторов апоптоза как в лимфоцитах периферической крови, так и в тканевых лимфоцитах.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, обратная транскрипция, цитокины, апоптоз, лимфоциты, воспаление.

ВВЕДЕНИЕ. Цитокины, как известно, играют ключевую роль в развитии системного воспалительного ответа. Количественное определение цитокинов в крови необходимо для мониторинга воспалительного процесса и проведения адекватной иммунокоррекции. В настоящее время всё чаще применяется метод определения не ключевых регуляторных белков, а матричных РНК (мРНК), кодирующих синтез этих белков. В этом случае речь идёт о количественном определении уровня экспрессии генов данных факторов. Кроме цитокинов, в регуляции иммунного ответа принимают участие проапоптотические и антиапоптотические факторы, а также белки общего контроля. Эти факторы, которые чрезвычайно важны для правильного функционирования клеток иммунной системы, являются внутриклеточными и в сыворотке крови не обнаруживаются. Тем не менее, их количественное определение позволяет судить о функциональном состоянии иммунокомпетентных клеток, а, следовательно, и об иммунном статусе организма.

В данной работе в качестве факторов экспрессии мы выбрали провоспалительные цитокины $\text{TNF}\alpha$ и IL-6 и противовоспалительный цитокин IL-10 . По данным литературы, цитокиновый баланс при воспалительных процессах и сепсисе изменяется в зависимости от стадии заболевания. Показано, например, что при септическом шоке в моноцитах крови крыс резко повышается уровень экспрессии гена $\text{TNF}\alpha$ [1]. В моноцитах периферической крови пациентов

с сепсисом резко возрастала экспрессия генов целого ряда провоспалительных цитокинов, и эта экспрессия ещё в большей степени наблюдалась при сепсисе, осложнённом острым респираторным синдромом [2].

В качестве маркёров апоптоза нами исследована экспрессия генов следующих факторов: каспазы 8, p53, Bcl-2 и Bax. По данным литературы, гены этих факторов так же, как и гены цитокинов, экспрессируются при воспалениях. Так, при сепсисе в клетках эндотелия аорты крысы резко падает уровень экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2 и возрастает уровень проапоптотического фактора Bax [3], уровень Bcl-2 снижается также при сепсисе в эндотелии лёгких мыши [4]. Найдено, что экспрессия белка p53 ингибирует воспалительный ответ в моноцитах мыши [5]. Установлено также, что при стимуляции моноцитов человека одним из основных токсических бактериальных факторов - липополисахаридом, в них наблюдается экспрессия не только ряда цитокинов, но и таких ядерных факторов, как *c-fos*, *jun-D*, NF- κ B. Это подтверждает, что в регуляции ответа моноцитов на инфекционные агенты играют роль эти факторы даун-регуляции [6].

МЕТОДИКА.

Праймеры для проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР реального времени были изготовлены фирмой "СИНТОЛ" (Россия).

Клинический материал. В работе использованы образцы капиллярной крови 10 доноров и 17 пациентов обоих полов с различными формами хирургической инфекции нижних конечностей. Пациентам была показана ампутация нижних конечностей на различных уровнях. Кроме капиллярной крови у пациентов при выполнении ампутации или при хирургической обработке брали образцы мышечных тканей из уровня ампутации и из очага воспаления. У некоторых пациентов определение уровня экспрессии генов различных факторов проводили в динамике.

Выделение суммарного пула РНК. 250 мкл крови из пальца забирали автопипеткой с пластмассовым наконечником и немедленно вносили в пробирку Эппендорф, содержащую 750 мкл триреагента LS фирмы "Sigma" (США). Образцы тканей того же объёма также помещали в триреагент. После перемешивания образцы хранили при -21°C в течение 1-20 суток. После размораживания из образцов удаляли остатки ткани. В пробы вносили по 200 мкл хлороформа, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 15 минут. Для разделения фаз пробы центрифугировали при 12000 g 15 минут при 4°C . Затем отбирали 500 мкл верхней водной фазы, которую переносили в чистые пробирки Эппендорф. Для осаждения РНК в пробирки добавляли по 500 мкл изопропанола, перемешивали и оставляли на 10 минут при комнатной температуре, после чего центрифугировали при 12000 g 8 минут при 4°C . После удаления супернатанта осадок промывали 1 мл 75% этанола, используя тот же режим центрифугирования. Конечный осадок подсушивали на воздухе в ламинарном шкафу при комнатной температуре и растворяли в 30 мкл деионизированной воды, обработанной пирофосфатом (DEPC) с добавлением ингибитора РНКаз в конечной концентрации 0,5 ед/мкл.

Проведение реакции обратной транскрипции осуществляли, как описано ранее [7] с некоторыми модификациями. В пробирках для ПЦР объёмом 200 мкл смешивали следующие компоненты: 10 мкл исходного раствора РНК, 10 мкл раствора случайных гексапраймеров (0,5 мкг/мл), 10 мкл олиго(дТ)₁₆-праймеров (0,5 мкг/мл) и 4 мкл деионизированной воды. Смесь инкубировали при 70°C в течение 5 минут и переносили на лёд. После этого в пробирки добавляли следующие компоненты: 10 мкл 5-кратного буфера для обратной транскрипции, 5 мкл 2,5 мМ смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) и 1 мкл обратной транскриптазы M-MLV (50 ед/мкл). Пробирки помещали в реакционное отделение прибора для ПЦР реального времени и инкубировали по следующей схеме: 10 мин при 25°C , 60 мин при 37°C и 10 мин при 70°C . После охлаждения на льду синтезированная комплементарная ДНК (кДНК) использовалась для проведения ПЦР в реальном времени.

ПЦР реального времени. Реакцию осуществляли, пользуясь рекомендациями фирмы "СИНТОЛ" (Россия) с нашей оптимизацией протокола. Подбор праймеров и зондов для цитокинов осуществлялся с использованием сообщения [8], для маркёров апоптоза использовалась база данных сайта [9]. Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов приведена в таблице 1. Для проведения реакции готовили основную смесь, содержащую следующие компоненты: 50 мкл 2,5 мМ смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), 50 мкл 10-кратного буфера для ПЦР (500 мМ KCl, 150 мМ трис-HCl, pH 8,8, 0,5% глицерин, 0,1% Tween-20 и интеркалирующий краситель SYBR Green I), 50 мкл 25 мМ MgCl₂, 5 мкл Taq ДНК-полимеразы 5 Ед/мкл с ингибирующими активностью антителами, по 20 мкл праймеров и зондов и 265 мкл деионизированной воды. Конечная концентрация праймеров - 500 нМ для каждого, концентрация зонда TaqMan - 100 нМ. В пробирки для ПЦР объёмом 200 мкл помещали по 2 мкл образцов кДНК и 23 мкл основной смеси. Для того чтобы учесть возможное присутствие в образцах геномной ДНК, в контрольные пробы вместо кДНК вносили 2 мкл раствора исходной РНК, не подвергшейся реакции обратной транскрипции. ПЦР РВ осуществляли в приборе АНК-16К-4Ц (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) в следующих условиях: плавление ДНК - 95°C, 90 сек - 1 цикл; (отжиг праймеров и элонгация цепей ДНК - 61°C, 50 сек + плавление - 95°C, 15 сек) - 40 циклов. Критический цикл и исходное количество копий кДНК определяли с помощью компьютерной программы, поставляемой вместе с прибором. Полученные результаты нормировались по экспрессии референтного гена β-актина в виде процентного соотношения количества копий кДНК данного фактора к количеству копий кДНК β-актина.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности зондов и праймеров, использованных в работе.

ФАКТОР	СТРУКТУРА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
TNF- α forward	5'- TCTTCTCGAACCCCGAGTGA-3'
TNF- α reverse	5'- CCTCTGATGGCACCACCAG -3'
TNF- α probe	5'- R6G-TAGCCCATGTTGTAGCAAACCCCTCAAGCT -3'
IL-6 forward	5'-GCTCTTTGCTGCTTTCACAC-3'
IL-6 reverse	5'- GGTACATCCTCGACGGCATC-3'
IL-6 probe	5'-ROX-AGCCCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGTAACA-BHQ2-3'
IL-10 forward	5'-GTGATGCCCCAAGCTGAGA-3'
IL-10 reverse	5'- CACGGCCTTGCTCTTGTTTT-3'
IL-10 probe	5'-ROX-CCAAGACCCAGACATCAAGGCGCA-BHQ2-3'
CASP8 forward	5'-CCTGGGTGCGTCCACTTT-3'
CASP8 reverse	5'-CAAGGTTCAAGTGACCAACTCAAG-3'
P53 forward	5'-CCCTTCAGATCCGTGGGC-3'
P53 reverse	5'- TGAGTTCCAAGGCCTCATTTCA-3'
P53 probe	5'-ROX- TCTGTCCCCCTTGCCGTCCCA-BHQ2-3'
BCL2 forward	5'-GGCTGGGATGCCTTTGTG-3'
BCL2 reverse	5'-GCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3'
BAX forward	5'-CCTTTTCTACTTTGCCAGCAAAC-3'
BAX reverse	5'-GAGGCCGTCCCAACCAC-3'

Обозначения: forward - прямой (смысловый) праймер; reverse - обратный (антисмысловый) праймер; probe - зонд TaqMan, помеченный флуоресцентными красителями.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы STATISTICA, V6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Нами было установлено, что в крови доноров ни один из исследованных генов цитокинов в заметных количествах не экспрессируется. Отсутствие гиперэкспрессии генов цитокинов у здоровых доноров подтверждено и данными зарубежных авторов [2]. В то же время в литературе имеются сведения, что сама процедура выделения фракции моноцитов из цельной крови способствует их активации. Как следствие, в этом случае в моноцитах обнаруживается экспрессия ряда генов цитокинов, что не является следствием заболевания и может рассматриваться как ложноположительный результат [10]. Поэтому в наших исследованиях мы использовали прямое определение экспрессии генов различных факторов в цельной крови без выделения фракции лейкоцитов.

У пациентов с хирургической инфекцией в большинстве случаев наблюдалась экспрессия исследованных нами генов цитокинов и факторов апоптоза (табл. 2). Максимальное количество пациентов, давших положительный результат, отмечалось при исследовании экспрессии генов в лейкоцитах крови. При исследовании же фрагментов ткани, взятых из очага воспаления, у большинства пациентов не было обнаружено экспрессии исследуемых генов (кроме экспрессии гена каспазы-8).

Таблица 2. Количество случаев экспрессии генов исследуемых факторов у пациентов с хирургической инфекцией (% от общего количества наблюдений).

% от общ. Фактор	Кровь	Ткань уровня ампутации	Очаг воспаления
TNF-α	76	58	0
IL-6	81	58	0
IL-10	81	37	0
каспаза-8	95	100	100
p 53	81	89	0
Bcl-2	86	89	40
Bax	81	79	0

В крови пациентов максимальный уровень экспрессии наблюдался для противовоспалительного цитокина IL-10. Гены провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в крови экспрессировались в меньшей степени, чем IL-10 (табл. 3).

Таблица 3. Экспрессия генов цитокинов и маркёров апоптоза у пациентов с хирургической инфекцией.

Уровень экспр., % от β-актина фактор	Кровь		Ткань уровня ампутации		Очаг воспаления	
		P		P		P
TNF-α	0,084±0,009 n = 16	0,0001	0,016±0,002 n = 9	0,002	0 n = 10	—
IL-6	0,106±0,015 n = 17	0,0001	0,078±0,011 n = 11	0,001	0 n = 10	—
IL-10	0,128±0,054 n = 17	0,031	0,023±0,014 n = 7	0,005	0 n = 10	—
каспаза-8	0,083±0,011 n = 20	0,0001	55,441±5,242 n = 19	0,0001	79,387±4,403 n = 10	0,0001
p 53	1,108±0,171 n = 17	0,0001	0,031 ± 0,006 n = 17	0,0001	0 n = 10	—
Bcl-2	0,371±0,029 n = 18	0,0001	0,056 ± 0,007 n = 17	0,0001	0,024 ± 0,009 n = 5	0,061
Bax	0,103±0,012 n = 17	0,0001	0,027 ± 0,005 n = 15	0,001	0 n = 10	—

Примечание: Результаты выражены в виде % экспрессии (± ошибка средней) по отношению к β-актину.

По данным литературы, лимфоциты, находящиеся в тканях, также способны продуцировать цитокины. В частности, исследователи определяли тканевой баланс цитокинов при сепсисе в тканях печени мыши и установили, что повышение уровня противовоспалительных цитокинов снижает смертность животных [11]. По данным, полученным в результате наших экспериментов, в тканях пациентов с хирургической инфекцией в заметных количествах экспрессировался ген цитокина IL-6, гены же остальных цитокинов были экспрессированы слабо. В очаге воспаления ни один из исследованных генов цитокинов не экспрессировался.

В качестве маркёров апоптоза нами исследована экспрессия генов следующих факторов: каспазы-8, p53, Bcl-2 и Bax. Экспрессия генов исследованных нами маркёров апоптоза так же, как и экспрессия генов цитокинов в крови доноров нами не наблюдалась.

При определении уровня тканевой экспрессии генов маркёров апоптоза нами учитывался тот факт, что кроме иммунокомпетентных клеток, эти факторы могут экспрессироваться и клетками мышечных тканей пациента. Следовательно, в данном случае невозможно определить, на каком конкретно этапе воспаления образуются эти факторы. Однако, поскольку они отсутствуют в крови доноров, то это может свидетельствовать о вовлечении их наряду с цитокинами в регуляцию апоптоза иммунокомпетентных клеток у пациентов при хирургической инфекции.

Было установлено, что ген проапоптотического фактора p53 экспрессировался в крови пациентов в значительных количествах, гены остальных факторов в крови у этих пациентов также экспрессировались в различной степени (табл. 2). У пациентов в тканях, изолированных на уровне ампутации, вышеупомянутые факторы экспрессировались в гораздо меньшей степени, чем в периферической крови (кроме каспазы-8). В очаге же воспаления гены p53 и Вах практически не экспрессировались, в небольших количествах экспрессировался только ген Bcl-2. Особое внимание заслуживает экспрессия гена каспазы-8, которая была значительна в ткани пациентов и ещё более значительна в очаге воспаления, тогда как в крови тех же пациентов уровень её экспрессии был невысок (табл. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Полученные нами результаты, показывают, что методом ПЦР реального времени можно обнаруживать экспрессию генов цитокинов и факторов апоптоза в лейкоцитах пациентов с местной хирургической инфекцией. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят установить взаимосвязь между уровнем экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов и степенью тяжести состояния пациентов. Метод ПЦР реального времени оказался особенно эффективным при исследовании состояния лимфоцитов, находящихся в тканях пациентов. При определении уровня тканевой экспрессии генов маркёров апоптоза нами учитывался тот факт, что кроме иммунокомпетентных клеток, эти факторы могут экспрессироваться и клетками мышечных тканей пациента. Следовательно, в данном случае невозможно определить, на каком конкретно этапе воспаления образуются эти факторы. Однако, поскольку они отсутствуют в крови доноров, то это может свидетельствовать о вовлечении их наряду с цитокинами в регуляцию апоптоза иммунокомпетентных клеток у пациентов при хирургической инфекции. По результатам данного исследования можно сделать следующие выводы:

1. В донорской крови экспрессия генов исследованных цитокинов и факторов апоптоза не наблюдается.
2. Иммунокомпетентные клетки, находящиеся в тканях пациентов с хирургической инфекцией, продолжают экспрессировать гены цитокинов, но в меньшей степени, чем в периферической крови.
3. Ген маркёра апоптоза каспазы-8 в максимальной степени экспрессируется не в лимфоцитах периферической крови, а в тканевых лимфоцитах пациентов с хирургической инфекцией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee S.H., Lee S.M. (2005) Shock, **23**, 144-149.
2. Hashimoto S., Kobayashi A., Kooguchi K., Kitamura Y., Onodera H., Nakajima H. (2000) Am. J. Respir. Crit.Care Med., **161**, 237-243.
3. Zhou M., Simms H.H., Wang P. (2004) Ann. Surg., **240**(2), 321-330.
4. Wu R., Song X., Xu Y., Meng X. (2000) Zhonghua Wai Ke Za Zhi., **38**(5), 385-387.
5. Komarova E.A., Krivokrysenko V., Wang K., Neznanov N., Chernov M.V., Komarov P.G., Brennan M.L., Golovkina T.V., Rokhlin O.W., Kuprash D.V., Nedospasov S.A., Hazen S.L., Feinstein E., Gudkov A.V. (2005) FASEB J., **19**(8), 1030-1032.
6. Hashimoto S., Nagai S., Sese J., Suzuki T., Obata A., Sato T., Toyoda N., Dong H.Y., Kurachi M., Nagahata T., Shizuno K., Morishita S., Matsushima K. (2003) Blood, **101**(9), 3509-3513.
7. Teyfik Dorak. REAL-TIME PCR. <http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>
8. Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. (2001) Methods, **25**(4), 386-401.

9. RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database - Homepage.url: <http://medgen.ugent.be/rtpprimerdb>
10. Molina M.A., Gamboa E.M., Tello P.C. Benavides P.Z., Leon L.C., Guerra R.T., Padilla C.R. (2006) *Lymphat. Res. Biol.*, 4(1), 34-40.
11. Ashare A., Powers L.S., Butler N.S., Doerschug K.C., Monick M.M., Hunninghake G.W. (2005) *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **288**(4), 633-640.

Поступила: 14. 06. 2006.

STUDY OF GENE EXPRESSION OF CYTOKINES AND APOPTOTIC FACTORS IN BLOOD AND TISSUES FROM PATIENTS WITH SURGERY INFECTION BY THE METHOD OF REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

A.G. Globa, O.N. Dikova, V.S. Demidova, A.A. Karelin

Vishnevsky Institute of Surgery, Russian Academy of Medicine,
Bolshaya Serpukhovskaya ul., 27, Moscow, Russia; tel.: (495) 236-20-52;
e-mail: aggloba@mail.ru

The expression of cytokines and markers of apoptosis was studied in the whole blood of 10 volunteers by means of reverse transcription method combined with real-time PCR. These factors were also measured in the whole blood, in inflammation nodus tissues and in amputation level nodal tissues taken from 17 patients with local surgical infection. No expression of examined factors in whole blood of volunteers has been observed. However, genes of cytokines and apoptotic markers were expressed in different levels in lymphocytes of whole blood for the case of patients with local surgery infection. This expression was lower in tissues from amputation level and was almost absent in tissues from inflammation nodus, except of the gene, encoding caspase-8. These results suggest that number of pro- and antiinflammatory cytokines and apoptotic factors are expressed in peripheral blood and tissue lymphocytes at the formation of System Inflammation Response Syndrom.

Key words: polymerase chain reaction, reverse transcription, cytokines, apoptosis, lymphocytes, inflammation.