

О.В. Войтович
О.М. Камишиний

Запорізький державний медичний
університет

МУКОЗАЛЬНИЙ ІМУНІТЕТ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ НОСА В УМОВАХ ТЕХНОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ

Ключові слова: мукозальний імунітет, мікробіота, техногенне навантаження.

Резюме. Робота присвячена дослідженню особливостей експресії регуляторів адаптивного імунітету клітин слизової оболонки носа практично здорових мешканців м. Запоріжжя в умовах техногенного навантаження. Досліджувались зразки біологічних матеріалів, отриманих зі слизової оболонки дистального відділу нижньої носової раковини 100 практично здорових мешканців м. Запоріжжя, юнацького віку. Аналізували склад мікробіоти слизової оболонки носа, а також експресію антигенних маркерів LMP-2 і Nf-κB клітинами слизової оболонки. В роботі встановлено посилення продукції імунних протеасом та експресії Nf-κB клітинами слизової оболонки носа внаслідок посилення антигенного навантаження на них. В умовах більш інтенсивного техногенного навантаження були виявлені ознаки напруження мукозального імунітету у вигляді дисбалансу регуляторних механізмів адаптивного імунітету.

Вступ

Посилення антигенного навантаження на людину в умовах техногенного забруднення навколишнього середовища – важлива проблема промислових міст. Контакт слизової оболонки (СО) носа людини з надмірною кількістю різноманітних антигенів може призводити до дисбалансу у функціонуванні багатьох імунних механізмів СО [2]. Відомо, що нормальне співіснування індигенної мікробіоти в складі біоценозу макроорганізму, що ґрунтується на ареактивності імунної системи макроорганізму, може піддаватися значному негативному впливу з боку техногенного навантаження [1, 2]. Особливість місцевого імунітету СО полягає в здатності диференціювати антигени відповідно до їх потенційної патогенності. Здатність ця забезпечується складовими мукозального імунітету, до яких належать епітелій, структурована і дифузна лімфоїдна тканини, дендритні клітини, макрофаги, гранулоцити, а також регулятори процесингу антигенів [2, 5]. Важливими регуляторами процесингу антигенів в епітеліальних клітинах є імунні протеасоми. Низькомолекулярні білки протеасом LMP-2 та LMP-7 кодуються генами, що відносяться до генів МНС II класу, поряд з процесингом і деградацією антигенів беруть участь у активації Nf-κB шляхом часткового протеолізу, а також у деградації інгібітора цього нуклеарного фактора транскрипції [3, 6, 7]. Nf-κB – один із головних факторів транскрипції, що контролює адаптивні ре-

акції клітин. Фактор активується різними фізичними, хімічними та мікробними агентами і впливає на різні гени імунної відповіді, в тому числі – і на гени МНС I та II класів [4, 8, 9].

Мета дослідження

Вивчити особливості функціонування регуляторів адаптивного імунітету слизової оболонки носа мешканців м. Запоріжжя в умовах техногенного навантаження.

Матеріал і методи

Матеріалом дослідження були зразки біологічних матеріалів, отриманих зі СО дистального відділу нижньої носової раковини 100 практично здорових мешканців м. Запоріжжя, юнацького віку. Зразки було поділено на дві групи: перша – матеріал, отриманий від 36 мешканців умовно чистих районів, друга – матеріал, отриманий від 64 мешканців умовно брудних районів м. Запоріжжя.

Мікробіоту СО носа виділяли на поживних середовищах фірми «BioMerieux», Франція. Після вирощування мікроорганізмів проводили їх ідентифікацію з використанням діагностичних наборів для біохімічної ідентифікації API Staph, API 20 Strep, API Candida, API NH (BioMerieux, Франція).

Із факторів адаптивного імунітету досліджували імунопротеасоми і нуклеарний фактор транскрипції на основі даних імуноцитофлуоресцентного виявлення експресії антигенних маркерів

LMP-2 і Nf-кВ клітинами СО. Клітини фарбували первинними кролячими моноклональними антитілами до субоднини р50 та її прекурсора р105 Nf-кВ або імунної субоднини протеасоми LMP-2 (SantaCruzBiotechnology, США). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зіскоби інкубували 60 хвилин ($T = 37^{\circ}\text{C}$) з вторинними антитілами до повної молекули IgG кролика, кон'югованими з FITC. Імунопозитивні клітини вивчали за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (NIH, США). Зображення, що отримується на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (FITC) негайно вводилося в комп'ютер за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) і аналізували за допомогою пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина). При цьому в автоматичному режимі визначалися ділянки зі статистично значущою флуоресценцією, характерною для клітин, що експресують LMP-2 і Nf-кВ. Обчислювали морфометричні і денситометричні характеристики імунопозитивних клітин.

Отримані в роботі дані оброблялися методами непараметричної статистики, за допомогою програми статистичної обробки "Statistica-6,1". Статистичні дані представлені у вигляді: медіана (25 %-й – 75 %-й перцентилі). Достовірність різниці між показниками в групах оцінювали за допомогою критерію U-Мана-Уїтні.

Обговорення результатів дослідження

Отримані нами дані щодо експресії LMP-2 і Nf-кВ представлені в табл. Зразки матеріалів, отриманих від практично здорових мешканців м. Запоріжжя, що взяли участь у дослідженні, були розділені на 4 групи залежно від наявності КНС, КПС, *S. albicans* та *Streptococcus spp.* Усі дані порівнювали з 1-ю групою. Як видно з представлених даних у 2-й групі кількість LMP-2⁺ гранулоцитів та експресія гранулоцитами LMP-2 була більшою в 1,26 та 1,27 раза ($p < 0,05$). Аналогічні показники для епітеліальних клітин були в 1,41 рази та 1,37 рази відповідно більшими ($p < 0,05$), ніж у 1-й групі. Кількість Nf-кВ⁺ гранулоцитів та експресія гранулоцитами цього маркера в 2-й групі була більшою в 1,25 та 1,36 раза ($p < 0,05$), а кількість Nf-кВ⁺ епітеліоцитів та експресія епітеліальними клітинами цього маркера – в 1,41 рази ($p < 0,05$). У 3-й групі кількість LMP-2⁺ гранулоцитів та експресія ними LMP-2 мали тільки недостовірну тенденцію до збільшення, тоді як аналогічні показники для епітеліальних клітин були достовірно більшими порівняно з 1-ю групою в 1,35 та 1,21 рази ($p < 0,05$). Експресія гранулоцитами Nf-кВ, а також кількість Nf-кВ⁺ епітеліоцитів та експресія епітеліальними клітинами цього маркера в 3-й групі були більшими в 1,27 рази, 1,22 та 1,42 рази відповідно ($p < 0,05$). Кількість LMP-2⁺ гранулоцитів в 4-й групі мала недостовірну тенденцію до збільшення, тоді як експресія ними LMP-2, а також кількість LMP-2⁺ епітеліоцитів та експресія LMP-2 епітеліальними клітинами в 4-й групі були більшими в 1,27, 1,26 та 1,21 рази відповідно ($p < 0,05$).

Таблиця

Імунологічні показники СО носа залежно від наявності мікроорганізмів у складі мікробіоти

Показники		Групи розподілу			
		1 група (КНС), n=60	2 група (КПС), n=21	3 група (<i>S. alb.</i>), n=17	4 група (Strep.) n=15
LMP-2 - гранулоцити	%	49,0 (42,0-55,0)	62,0* (58,0-68,0)	58,0 (55,0-61,0)	57,0 (52,0-65,0)
	Щільність, ум.од	0,11 (0,10-0,12)	0,14* (0,13-0,16)	0,13 (0,12-0,15)	0,14* (0,13-0,15)
LMP-2 – епітеліоцити	%	46,0 (40,0-52,0)	65,0* (50,0-73,0)	62,0* (52,0-68,0)	58,0* (52,0-62,0)
	Щільність, ум.од	1,07 (1,00-1,14)	1,47* (1,31-1,49)	1,30* (1,14-1,47)	1,30* (1,00-1,39)
Nf-кВ – гранулоцити	%	42,5 (39,0-52,0)	53,0* (45,0-55,0)	48,0 (40,0-57,0)	52,0* (47,0-55,0)
	Щільність, ум.од	0,11 (0,10-0,12)	0,15* (0,14-0,17)	0,14* (0,13-0,16)	0,14* (0,12-0,16)
Nf-кВ – епітеліоцити	%	55,5 (50,0-62,0)	78,5* (62,0-85,0)	68,0* (62,0-80,0)	75,0* (62,0-80,0)
	Щільність, ум.од	1,07 (1,00-1,18)	1,50* (1,40-1,70)	1,52* (1,22-1,61)	1,48* (1,23-1,59)

Примітка. * – різниця з 1-ю групою достовірна при $p < 0,05$.

Кількість Nf-кВ⁺ гранулоцитів та експресія гранулоцитами цього маркера в 4-й групі були вищими в 1,22 та 1,27 раза ($p < 0,05$), а кількість Nf-кВ⁺ епітеліоцитів та експресія епітеліальними клітинами цього маркера – в 1,35 та 1,38 раза ($p < 0,05$).

Як видно, посилення антигенного навантаження на СО внаслідок появи в складі мікробіоти КПС і *S. albicans* призводить до суттєвого посилення продукції імунних протеасом, що знаходить своє підтвердження в роботах інших авторів [7]. Експресія Nf-кВ при цьому також посилюється, вказуючи на існуючий зв'язок між LMP-2 і активацією нуклеарного фактора транскрипції [3, 7].

Проведений аналіз досліджених показників залежно від проживання практично здорових мешканців м. Запоріжжя в умовно чистих і умовно брудних районах міста дозволив встановити певні відмінності, обумовлені інтенсивністю техногенного навантаження організму.

Так, у 1-й групі (КНС) у матеріалі, отриманому від мешканців «брудних» районів, порівняно з «чистими», кількість LMP-2⁺ гранулоцитів та експресія гранулоцитами LMP-2 була, відповідно, в 1,34 меншою та в 1,20 раза більшою ($p < 0,05$), кількість LMP-2⁺ епітеліальних клітин та експресія нами даного маркера достовірно не відрізнялися. Кількість Nf-кВ⁺ гранулоцитів була статистично значимо нижчою (в 1,41 раза), а кількість Nf-кВ⁺ епітеліоцитів – в 1,25 раза більшою. Експресія Nf-кВ гранулоцитами і епітеліоцитами при цьому статистично не відрізнялися.

У 2-й групі (КПС) в матеріалі, отриманому від мешканців «брудних» районів, кількість LMP-2 гранулоцитів не мала статистично значимих відмінностей порівняно з «чистими» районами, тоді як кількість LMP-2 епітеліоцитів була в 1,46 раза більшою ($p < 0,05$). Експресія LMP-2 гранулоцитами була в 1,23 раза вищою ($p < 0,05$), а експресія LMP-2 епітеліоцитами не мала статистичних відмінностей порівняно з «чистими» районами. Кількість Nf-кВ⁺ гранулоцитів і епітеліальних клітин була в 1,22 і 1,37 раза більшою ($p < 0,05$); при тому, що експресія Nf-кВ гранулоцитами була в 1,21 раза більшою ($p < 0,05$), експресія Nf-кВ епітеліоцитами статистично не відрізнялась від «чистих» районів.

У 3-й групі в «брудних» районах кількість LMP-2⁺ гранулоцитів була в 1,32 раза меншою, а LMP-2⁺ епітеліальних клітин – в 1,30 раза більшою, ніж у «чистих» районах. При цьому експресія LMP-2 гранулоцитами і епітеліоцитами не мала статистичних відмінностей порівняно з «чистими» районами. Кількість Nf-кВ⁺ гранулоцитів і експресія Nf-кВ гранулоцитами і епітелі-

оцитами також не мали статистичних відмінностей порівняно з «чистими» районами, тоді як кількість Nf-кВ⁺ епітеліоцитів була в 1,20 раза більшою ($p < 0,05$).

В 4-й групі (*S. alb.*), у матеріалі, отриманому від мешканців «брудних» районів, кількість LMP-2⁺ і Nf-кВ⁺ гранулоцитів статистично не відрізнялася від такої в матеріалі, отриманому від мешканців «чистих» районів. При цьому кількість LMP-2⁺ і Nf-кВ⁺ епітеліоцитів була в 1,22 і 1,66 раза більшою ($p < 0,05$). Щодо експресії LMP-2, то в гранулоцитах і епітеліальних клітинах вона була в 1,27 і 1,34 раза більшою ($p < 0,05$). Щільність експресії Nf-кВ гранулоцитами і епітеліоцитами була статистично значимо в 1,36 і 1,53 раза більшою, ніж в «чистих» районах.

Регуляторні фактори адаптивного імунітету LMP-2 і Nf-кВ функціонально зв'язані між собою через класичний сигнальний шлях активації Nf-кВ, тому послаблення експресії першого фактора приводить до послаблення експресії іншого фактора. Такі зміни й спостерігалися в матеріалі, отриманому від мешканців «брудних» районів, за наявності КНС у складі мікробіоти порівняно з мешканцями «чистих» районів. Зменшення кількості Nf-кВ⁺ гранулоцитів у 1-й і 3-й групах у СО носа мешканців «брудних» районів може свідчити про посилення їх апоптозу. Адже відомо, що нейтрофіли здатні залучати Nf-кВ при реакції на екзо- і ендogenous фактори активації і регуляції власного апоптозу [3]. Тож деякий дисбаланс у системі LMP-2 - Nf-кВ клітин СО мешканців «брудних» районів можна пояснити впливом факторів техногенного навантаження, а також зміною функцій імунних протеасом клітин СО носа під дією ксенобіотиків та існуванням інших альтернативних шляхів активації Nf-кВ [3, 7].

Висновки

У роботі встановлено зростання продукції імунних протеасом та експресії Nf-кВ клітинами СО носа внаслідок посилення антигенного навантаження на них. В умовах більш інтенсивного техногенного навантаження виявлено ознаки напруження мукозального імунітету у вигляді дисбалансу регуляторних механізмів адаптивного імунітету.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на аналіз впливу одно-, дво- і трикомпонентних асоціацій мікроорганізмів у складі мікробіоти СО носа на регуляторні фактори адаптивного імунітету при техногенному навантаженні різної інтенсивності.

Література. 1. Кірсанова О.В. Вплив забруднення атмосферного повітря на стан здоров'я дітей в умовах промислового міста (на прикладі м. Запоріжжя) / О.В. Кірсанова // Гігієна населених місць. – Київ, 2004. – Вип. 43. – С. 374-379. 2. Матвійчук В. В. Імунокорекція негативних впливів мікрофлори носоглотки на імунорезистентність здорових дітей молодшого віку / В. В. Матвійчук, Л. В. Квашина, В. П. Родіонов // Перинатологія і педіатрія. – 2009. – №3(39). – С. 74-77. 3. Маянский А.Н. Нуклеарный фактор-кВ и воспаление / А.Н. Маянский, Н.А. Маянский, М.И. Заславская // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 3-9. 4. Моисеева Т.Н. Роль протеасом в регуляции транскрипции / Т.Н. Моисеева, А.Г. Миттенберг, Н.А. Барлев // Цитология. – 2010. – №3. – С. 195-203. 5. Стельмахівська В.П. Здоров'я дітей та підлітків і навколишнє середовище В.П. Стельмахівська, В.І. Березань // Проблеми екології та медицини. – 2008. – №1-2. – С. 33-36. 6. Цимоха А.С. Протеасомы: участие в клеточных процессах / А.С. Цимоха // Цитология. – 2010. – №4. – С. 277-300. 7. Роль иммунных протеасом в молекулярных механизмах становления иммунитета Шарова Н.П., Астахова Т.М., Дмитриева С.Б. [и др.] // Известия Национальной Академии Наук Беларуси. Серия медицинских наук. – 2008. – №1. – С. 106-111. 8. Doyle S.L. Toll-like receptors: from the discovery of NF-kappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity / S.L. Doyle, L.A. O'Neill // Biochem. Pharmacol. – 2006. – Vol. 72, №9. – P. 1102-1113. 9. Hayden M.S. NF-kB immunobiology / M.S. Hayden, S. Ghosh // Cell Res. – 2011. – Vol. 21, №2. – P. 223-244.

МУКОЗАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

А.В. Войтович, А.Н. Камышиний

Резюме. Работа посвящена исследованию особенностей экспрессии регуляторов адаптивного иммунитета клеток слизистой оболочки носа практически здоровых жителей г. Запоріжжя в условиях техногенной нагрузки. Исследовались образцы биологических материалов, полученных со слизистой оболочки дистального отдела нижней носовой раковины 100 практически здоровых жителей г. Запоріжжя юношеского возраста. Анализировали состав микробиоты слизистой оболочки носа, а также экспрессию антигенных маркеров LMP-2 и Nf-kB клетками слизистой оболочки. В работе установлено усиление продукции иммунных протеасом и экспрессии Nf-kB клетками слизистой оболочки носа вследствие усиления антигенной нагрузки на них. В условиях более интенсивного техногенного воздействия были обнаружены признаки напряжения мукозального иммунитета в виде дисбаланса регуляторных механизмов адаптивного иммунитета.

Ключевые слова: мукозальный иммунитет, микробиота, техногенная нагрузка.

MUCOSAL IMMUNITY OF THE NASAL MUCOSA IN THE ANTHROPOGENIC IMPACT

O.V. Voitovich, O.M. Kamishniy

The aim of research. The work is devoted to the study of features controls the expression of adaptive immune cells of the nasal mucosa of healthy residents of Zaporizhia in conditions of anthropogenic impact.

Methods. Investigated samples of biological material obtained from the mucosa of the distal inferior turbinate 100 healthy young men residents of Zaporizhia: 36 residents conditionally clean areas and 64 residents conditionally dirty areas Zaporizhye.. Analyzed the composition of the microbiota of the nasal mucosa, and the expression of antigenic markers LMP-2 and Nf-kB mucosal cells. The expression regulators of adaptive immunity cells of the mucous membranes of nose was studied based on immunocytofluorescence identify antigenic markers of LMP-2 and Nf-KB. Cells were stained with primary rabbit monoclonal antibodies to the p50 subunit and its precursor p105 Nf-kB or immune proteasome subunit LMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, USA).

Results. The presence of coagulase positive staphylococci and *C. albicans* in the microbiota of the nasal mucosa has led to increased expression of LMP-2 and Nf-kB on mucosal cells. Number LMP-2⁺ granulocytes and epithelial cells and number Nf-kB⁺ granulocytes and epithelial cells was statistically significant ($p < 0.05$) higher than in the presence of coagulase negative staphylococci. In the materials received from the inhabitants conditionally dirty areas of Zaporizhzhia in the presence of coagulase negative staphylococci and *C. albicans* in the microbiota observed weakening of expression LMP-2 and Nf-KB on granulocytes compared with residents conditionally clean areas.

Conclusion. We found increased production of immune proteasome and expression of Nf-kB of mucosal cells due to increased antigenic load on them. In a more intensive anthropogenic impact were signs of tension mucosal immunity as an imbalance of regulatory mechanisms of adaptive immunity.

Key words: mucosal immunity, microbiota, anthropogenic impact.

Zaporizhzhia State edical University

Clin. and experim. pathol. - 2013. - Vol. 12, №3 (45). - P. 51-54.

Надійшла до редакції 03.09.2013

Рецензент – доц. С.А.Левіцька

© О.В. Войтович, О.М. Камышиний, 2013