

ОГУРЦОВА Анастасия Дмитриевна

**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ TOLL-
ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент

Хорева Марина Викторовна

доктор медицинских наук, профессор

Латышева Татьяна Васильевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Калюжин Олег Витальевич

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра клинической иммунологии и аллергологии лечебного факультета, профессор кафедры

доктор медицинских наук, профессор РАН

Зыков Кирилл Алексеевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства», заместитель директора по научной и инновационной работе

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2019 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.05 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: г. Москва 117997, ул. Островитянова, дом 1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России по адресу: г. Москва 117997, ул. Островитянова, дом 1

Автореферат разослан «___» _____ 201__ года.

Ученый секретарь диссертационного совета:

кандидат медицинских наук, доцент

Кузнецова Татьяна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время одной из актуальных проблем фундаментальной и клинической иммунологии является изучение механизмов врожденного иммунитета. Одна из ключевых функций врожденного иммунитета - способность к распознаванию патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) паттерн-распознающими рецепторами (PRR). К ним, в частности, относят Toll-подобные рецепторы (TLR), которые играют решающую роль в ранней защите организма от патогенов. TLR представлены на поверхности и в эндосомах различных гемопозитических и негемопозитических клеток человека, таких как моноциты/макрофаги, эпителиальные клетки и пр. [Vaure C., 2014]. При распознавании лигандов TLR происходит запуск каскада сигнальных молекул, в результате которого экспрессируются гены про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, костимуляторных молекул.

В связи с тем, что TLR экспрессируются на многих клетках организма и распознают широкий спектр лигандов, они вовлечены в патогенез многих заболеваний. Полиморфизм генов TLR, нарушения экспрессии данных рецепторов на клетке, распознавания лигандов или трансдукции сигнала могут способствовать развитию инфаркта миокарда, острого деструктивного панкреатита, различных аллергических заболеваний, в том числе бронхиальной астмы, и др. заболеваний [Bezemer G.F., 2012; Chen C., 2014]. Астма является хроническим, широко распространенным заболеванием, характеризуется обструкцией дыхательных путей и воспалением. В настоящее время заболеваемость бронхиальной астмой составляет более 334 миллионов человек по всему миру. Благодаря многочисленным исследованиям в этой области появляются новые данные о патогенезе бронхиальной астмы, характере течения заболевания, новые подходы к классификации и терапии, но несмотря на это причины и механизм развития заболевания полностью не установлены, продолжается поиск новых мишеней для эффективного лечения больных. Одним из перспективных направлений современной клинической иммунологии является применение агонистов и антагонистов TLR в терапии аллергических заболеваний. Известны экспериментальные работы на животных моделях, показывающие эффективность использования антагониста TLR4 для уменьшения воспаления в дыхательных путях [Li M., 2017]. Агонисты TLR2 рассматривают в качестве терапевтических агентов, однако они могут не только ингибировать каскад внутриклеточных реакций, но и поддерживать развитие воспалительного процесса [Fuchs B., 2008]. Роль TLR в иммунопатогенезе бронхиальной астмы до конца не выяснена. Известно, что TLR участвуют в поляризации иммунного

ответа в сторону Т-хелперов 1-го типа (Th1) или Т-хелперов 2-го типа (Th2), например действие лигандов TLR в раннем детском возрасте может индуцировать созревание Th1. С другой стороны бытовые аллергены (в частности, аллерген клещей домашней пыли) способны индуцировать TLR-зависимый сигнальный путь и способствовать поляризации иммунного ответа в сторону Th2 типа [Zuo L., 2015]. Контаминация аллергенов такими распространенными лигандами TLR, как ЛПС или β -глюканы, может приводить к развитию хронического воспаления и усугублять тяжесть течения заболевания [Gómez-Casado C., 2016].

Большинство современных работ по исследованию роли TLR в патогенезе бронхиальной астмы, проведено на животных моделях [He M., 2017; Nadeem A., 2016; Zeyer F., 2016] или основано только на изучении экспрессии генов TLR [Hirschberg A., 2016; Lee H., 2016]. TLR2 и TLR4 экспрессируются на клетках врожденного иммунитета, осуществляющих «первую линию» защиты от патогенов [Rock F.L., 1998]. Для данных рецепторов характерен наиболее широкий спектр лигандов, включая аллергены (например, аллерген клещей домашней пыли, Der p) [Thomas W.R., 2009]. Исследование механизмов врожденного иммунитета и, в частности, TLR в развитии БА может расширить наши представления об иммунопатогенезе этого заболевания, возможных подходах к коррекции выявленных изменений. Таким образом, изучение роли TLR2 и TLR4 в патогенезе бронхиальной астмы является актуальной задачей современной фундаментальной и клинической иммунологии.

Цель исследования: изучить экспрессию и функциональную активность TLR2 и TLR4 на мононуклеарных клетках периферической крови больных контролируемой бронхиальной астмой разных форм (аллергической, смешанной и неаллергической) легкого и среднетяжелого течения заболевания.

Задачи исследования

1. Изучить экспрессию генов *TLR2* и *TLR4* в мононуклеарных клетках периферической крови больных контролируемой бронхиальной астмой и здоровых доноров.
2. Определить экспрессию молекул TLR2 и TLR4 на моноцитах периферической крови больных контролируемой бронхиальной астмой по сравнению с группой здоровых доноров.
3. Оценить функциональную активность TLR2 и TLR4 по индуцированной продукции TNF α мононуклеарными клетками периферической крови больных контролируемой бронхиальной астмой.

4. Оценить спонтанную, TLR2- и TLR4- индуцированную выработку про- и противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-4, IL-13, IL-18, IL-33) мононуклеарными клетками периферической крови больных контролируемой бронхиальной астмой.
5. Изучить влияние аллергена клещей домашней пыли Der p и комбинации Der p с ЛПС на продукцию цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови здоровых доноров и больных контролируемой аллергической бронхиальной астмой среднетяжелого течения.
6. Провести сравнительный анализ экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 в МНК периферической крови у больных контролируемой бронхиальной астмой разных форм и степени тяжести.

Научная новизна работы

Впервые у больных контролируемой бронхиальной астмой проведено комплексное исследование показателей врожденного иммунитета (экспрессия и функциональная активность TLR2 и TLR4) в зависимости от формы заболевания (аллергическая, смешанная и неаллергическая) и степени тяжести (легкое и среднетяжелое течение) как по сравнению с группой здоровых доноров, так и между группами больных.

Впервые в исследуемой когорте пациентов было установлено увеличение экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 по сравнению со здоровыми донорами: увеличение уровня экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в МНК периферической крови, процента $CD14^{+}TLR2^{+}$ - и $CD14^{+}TLR4^{+}$ - моноцитов, и средней интенсивности экспрессии (СИФ) TLR2 и TLR4 на $CD14^{+}$ моноцитах, а также TLR2- и TLR4-индуцированной продукции цитокинов (TNF α , IL-10) МНК периферической крови. Подтверждено, что в зависимости от тяжести заболевания наблюдаются изменения функциональной активности TLR: у пациентов со среднетяжелым течением заболевания достоверно увеличена TLR2- и TLR4-индуцированная продукция TNF α МНК периферической крови.

Впервые показано, что в группе больных контролируемой неаллергической БА повышен процент $CD14^{+}$ -моноцитов, экспрессирующих TLR4 (по сравнению с больными смешанной и аллергической БА), а также СИФ TLR4 на $CD14^{+}$ моноцитах (по сравнению с больными аллергической БА). Впервые было определено, что функциональная активность TLR4 на МНК периферической крови выше у больных неаллергической БА по сравнению с больными смешанной и аллергической БА. У больных контролируемой аллергической БА впервые

установлено, что TLR2- и TLR4-индуцированная продукция IL-10 МНК периферической крови выше, чем у больных смешанной формой БА.

Впервые была проведена оценка влияния аллергена клещей домашней пыли Der p и комбинации Der p с ЛПС на выработку TNF α , IL-4 и IL-13 МНК периферической крови больных контролируемой аллергической БА среднетяжелого течения заболевания по сравнению со здоровыми донорами. Показано активирующее влияние Der p и комбинации Der p с ЛПС на продукцию TNF α МНК периферической крови как у здоровых доноров, так и в группе исследуемых больных.

Практическая значимость

Впервые выявлены изменения экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 у больных контролируемой бронхиальной астмой разных форм (аллергической, смешанной и неаллергической) легкого и среднетяжелого течения, что дает возможность ставить новые задачи фундаментальных исследований механизмов развития данного заболевания. Выявленные изменения экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 могут служить потенциальными маркерами степени тяжести и прогноза заболевания, в перспективе могут выступать в качестве критериев направленного поиска путей коррекции при терапии бронхиальной астмы разных форм, оценки эффективности проводимой терапии.

Положения, выносимые на защиту

1. Изменения экспрессии TLR2 и TLR4 в МНК периферической крови у больных контролируемой бронхиальной астмой характеризуются повышением экспрессии генов *TLR2* и *TLR4*, процента CD14⁺TLR2⁺ и CD14⁺TLR4⁺ моноцитов, средней интенсивности флюоресценции этих рецепторов на поверхности CD14⁺моноцитов по сравнению со здоровыми донорами.
2. У больных контролируемой бронхиальной астмой повышена функциональная активность TLR2 и TLR4 в МНК периферической крови по сравнению со здоровыми донорами. Увеличение функциональной активности TLR2 и TLR4 в МНК периферической крови сопровождается усилением тяжести течения аллергической БА.
3. Аллерген клещей домашней пыли Der p и совместное действие аллергена клещей домашней пыли Der p с ЛПС приводит к увеличению продукции TNF α МНК периферической крови у здоровых доноров и больных контролируемой аллергической БА среднетяжелого течения.

4. У больных контролируемой неаллергической БА процент CD14⁺TLR4⁺ моноцитов, средняя интенсивность флюоресценции TLR4 и TLR4-опосредованная продукция TNF α МНК периферической крови выше по сравнению с больными аллергической и смешанной БА. У больных контролируемой аллергической БА повышена TLR2- и TLR4-индуцированная продукция IL-10 МНК периферической крови по сравнению с больными смешанной БА.

Апробация результатов диссертационной работы

Диссертация апробирована на заседании кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России 24 апреля 2018 года, протокол № 19. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на научных заседаниях кафедры иммунологии, и представлены на Межрегиональном форуме с международным участием «Клиническая аллергология и иммунология – междисциплинарные проблемы», Общероссийском научно-практическом мероприятии «Эстафета Вузовской науки-2017» в рамках Международного медицинского форума «Вузовская наука. Инновации», на XII Международной/XXI Всероссийской Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 7 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

Внедрение результатов работы в практику

Основные результаты работы используются в учебном и научном процессе на кафедре иммунологии МБФ; в учебном процессе на кафедре патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Результаты работы внедрены в практическую деятельность иммунологической лаборатории ГБУЗ ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 251 источников (4 отечественных и 247 зарубежных). Работа содержит 7 таблиц и 37 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования. В настоящей работе исследовали периферическую кровь здоровых доноров и больных контролируемой БА разных форм (аллергической, смешанной и неаллергической) легкого и среднетяжелого течения.

Критериями включения в исследование являлся установленный диагноз аллергической, смешанной или неаллергической бронхиальной астмы, контролируемое течение заболевания (медикаментозный контроль или период ремиссии заболевания – вне сезона цветения), ингаляционная базисная терапия, отказ от приема глюкокортикостероидов системного действия минимум за 4 недели до забора крови для проведения исследования, отсутствие хронических заболеваний в анамнезе.

Критериями исключения из исследования являлись: хронические воспалительные заболевания; сахарный диабет; болезни щитовидной железы; дыхательная недостаточность II–III степени; хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ); хроническая сердечная недостаточности (ХСН); прием системных ГКС минимум за 4 недели до забора крови.

Всем больным бронхиальной астмой диагноз был поставлен в отделении иммунопатологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России на основании анамнеза заболевания и клинико-лабораторного обследования в соответствии с принятой МКБ-10 (рис. 1).



Рисунок 1. Обследуемые группы больных контролируемой БА

У пациентов I группы диагноз аллергической БА устанавливался при наличии у пациентов подтвержденной атопии (на основании клиники и повышения уровня специфического IgE в сыворотке крови к одному или нескольким аллергенам или положительных результатов кожных тестов с аллергеном). Группу составили больные контролируемой аллергической бронхиальной астмой легкого и среднетяжелого течения заболевания (n= 49) в

возрасте 19-53 лет. В группу входили пациенты с установленным диагнозом аллергической БА легкой степени тяжести (n=21) в возрасте 19-53 лет, среди них 10 мужчин и 11 женщин и пациенты с установленным диагнозом аллергической БА среднетяжелого течения (n=28) в возрасте 19-44 лет, среди них 11 мужчин, 17 женщин.

У пациентов II группы была подтверждена атопия (на основании клиники и повышения уровня специфического IgE в сыворотке крови к одному или нескольким аллергенам или положительных результатов кожных тестов с аллергеном). Круглогодичный характер течения заболевания наблюдался за счет присоединения инфекционного компонента и сопровождался наиболее тяжелыми обострениями в осенне-зимний период на фоне развития ОРВИ или другого инфекционного процесса. В группу входили больные контролируемой смешанной бронхиальной астмой среднетяжелого течения заболевания (n=17) в возрасте 28-61 года, среди них 4 мужчины и 13 женщин.

У пациентов III группы отсутствовали данные о наличии атопии (отрицательные кожные пробы/отсутствие специфического сывороточного IgE), обострения в зимне-осенний период на фоне инфекционных заболеваний. Из группы исключены такие диагнозы как астматическая триада, астма физической нагрузки. В группу входили больные контролируемой неаллергической бронхиальной астмой среднетяжелого течения заболевания (n=11) в возрасте 20-65 лет, среди них 1 мужчина и 10 женщин.

Группа здоровых доноров составила 30 человек в возрасте 18-45 лет. Кровь была предоставлена отделением переливания крови и гравитационной хирургии РДКБ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

В настоящей работе использован трехэтапный подход для оценки TLR2 и TLR4 на МНК периферической крови у больных контролируемой бронхиальной астмой различных форм (аллергическая, смешанная и неаллергическая) и тяжести течения заболевания (легкая и среднетяжелая).

Оценка экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*. Экспрессию генов *TLR2* и *TLR4* в МНК периферической крови оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для выделения РНК из МНК периферической крови человека использовали коммерческие наборы “RNeasy Plus Mini Kit” (QIAGEN, США). Для проведения реакции обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) использовали «Набор для проведения реакции обратной транскрипции» (Синтол, РФ). На следующем этапе использовали «Набор

реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии «SYBR Green I» и праймеры, синтезированные на фирме «Синтол», РФ. Реакцию проводили в амплификаторе ДТ-96. Уровни экспрессии TLR стандартизировали по гену GAPDH. Экспрессию генов *TLR* оценивали по методу $\Delta\Delta C_t$ [Schmittgen, Livak, 2008].

Оценка экспрессии молекул TLR2, TLR4 на моноцитах. Методом проточной цитофлюорометрии оценивали количество CD14⁺ моноцитов периферической крови, экспрессирующих TLR2 и TLR4, а также среднюю интенсивность экспрессии TLR2, TLR4 на CD14⁺ моноцитах. Для идентификации клеток использовали следующие моноклональные антитела: анти-CD14, меченые APC («e-Bioscience»), анти-CD45, меченые ECD («e-Bioscience»), анти-CD282 (TLR2) и анти-CD284 (TLR4), меченые Alexa Fluor 488 («e-Bioscience»), изотипический контроль Mouse IgG2a, меченые Alexa Fluor 488 («e-Bioscience»). Среднюю интенсивность флуоресценции рассчитывали, разделив полученную интенсивность флуоресценции образца, меченного CD14⁺TLR2⁺/CD14⁺TLR4⁺, на интенсивность флуоресценции изотипического контроля. Анализ образцов проводили на проточном цитометре «Navios» (Beckman coulter, Inc.).

Выделение мононуклеарных клеток. МНК выделяли из периферической крови человека в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/см³). **Культивирование клеток.** МНК, выделенные из периферической крови, культивировали в полной среде RPMI 1640 («HyClone», США), содержащей антибиотик – гентамицин (ОАО «Дальхимфарм», Россия), 5% эмбриональную телячью сыворотку («Sigma», США) и L-глутамин (НПП «ПанЭко», Россия) в присутствии лигандов TLR. В качестве лигандов TLR2 и TLR4 использовали пептидогликан (*Staphylococcus aureus*, «InvivoGen», США) в концентрации 2,5 мкг/мл; липополисахарид (*E.coli* 0111:B4, «Sigma», США) в концентрации 0,1 мкг/мл, Der p («Биомед им. Н.И. Мечникова», Россия) в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл, а также комбинацию ЛПС (0,1 мкг/мл) и Der p (10 мкг/мл и 1 мкг/мл). В качестве контроля использовали МНК, культивированные только в полной среде RPMI 1640. Рабочая концентрация клеток составляла 1x10⁶/мл. После стимуляции клетки культивировали в течение 24 часов в CO₂-инкубаторе (t=37°C, CO₂ 5%). Полученные супернатанты хранили не более 3 месяцев при -70°C.

Концентрацию цитокинов (TNF α , IL-18, IL-33, IL-4, IL-13, IL-10) в супернатантах культивируемых клеток определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Использовались коммерческие наборы для ИФА фирмы «e-Biosciences» (США). Результаты анализа учитывались

спектрофотометрически при длине волны 450 нм на приборе Anthos 2020 (BCA, Lowry, Bradford).

Статистические методы обработки полученных данных. Обработка полученных данных проводилась в программном пакете StatSoft Statistica 6.0 и GraphPad Prism 5. Использовался критерий хи-квадрат для оценки нормального распределения. Для описания данных использовали медиану, а также 25-й и 75-й процентиля ($Me(0,25; 0,75)$). Для оценки достоверности различий применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Различие средних показателей считалось достоверным при уровне значимости менее 0,05 ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено комплексное исследование экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 на мононуклеарных клетках периферической крови у 77 больных контролируемой БА (аллергической, смешанной и неаллергической) легкого и среднетяжелого течения по сравнению со здоровыми донорами и между группами больных.

Анализ экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в мононуклеарных клетках больных бронхиальной астмой

На первом этапе исследования определяли экспрессию генов *TLR2* и *TLR4* в МНК периферической крови больных контролируемой БА и здоровых доноров (рис. 2).

Выявили, что у больных БА экспрессия гена *TLR2* статистически достоверно выше, чем у здоровых доноров: у больных аллергической БА в 2,3 раза, у больных смешанной БА – в 2,8 раза, а у больных неаллергической БА – в 2,5 раза ($p < 0,05$).

У больных аллергической БА увеличение экспрессии *TLR2* наблюдалось вне зависимости от степени тяжести заболевания (при легком течении в 2 раза, а при среднетяжелом в 2,4 раза, $p < 0,05$). Экспрессия гена *TLR4* по сравнению со здоровыми донорами была статистически достоверно выше у больных смешанной БА (в 3,4 раза) и неаллергической БА (в 2,5 раза) и у больных аллергической БА со среднетяжелым течением заболевания (в 5 раз), $p < 0,05$.

В нашем исследовании экспрессия генов *TLR2* и *TLR4* была наиболее выражена у больных со среднетяжелым течением заболевания. Увеличение уровня экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* может свидетельствовать о вовлечении данных рецепторов в патогенез бронхиальной астмы.

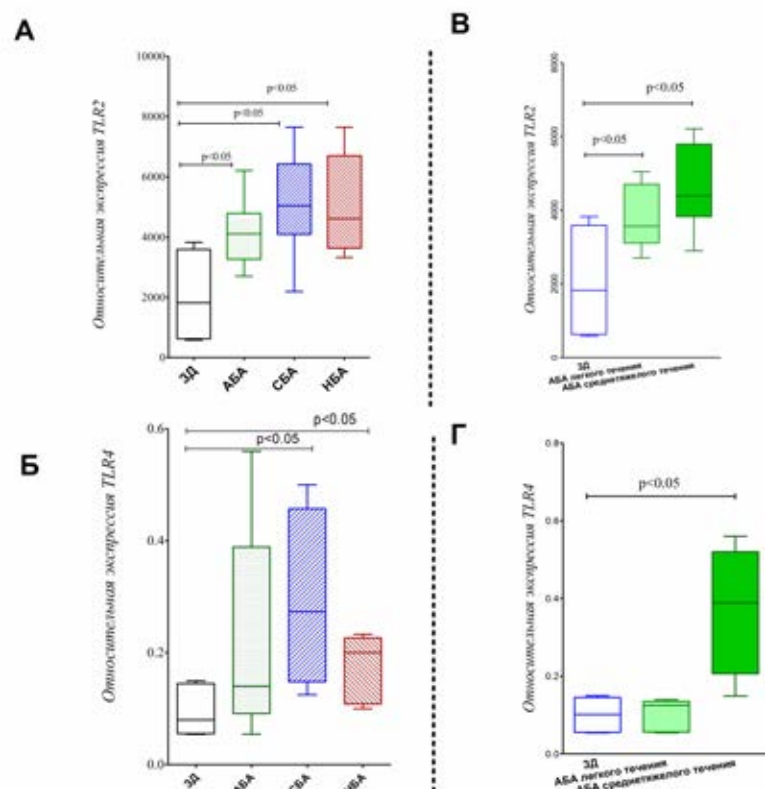


Рисунок 2. Экспрессия генов TLR2 (А) и TLR4 (Б) в МНК периферической крови здоровых доноров и больных БА разных форм; экспрессия генов TLR2 (В) и TLR4 (Г) в МНК периферической крови больных аллергической БА в зависимости от степени тяжести заболевания.

Определение экспрессии TLR2, TLR4 на поверхности моноцитов больных бронхиальной астмой

На следующем этапе исследования оценивали процент $CD14^{+}TLR2^{+}$ - и $CD14^{+}TLR4^{+}$ -моноцитов, а также среднюю интенсивность флюоресценции TLR2 и TLR4 на $CD14^{+}$ -моноцитах периферической крови методом проточной цитофлюорометрии. Было выявлено, что во всех группах обследуемых больных статистически достоверно увеличен процент $CD14^{+}TLR2^{+}$ - и $CD14^{+}TLR4^{+}$ -моноцитов, а также их средняя интенсивность флюоресценции по сравнению со здоровыми донорами (рис. 3). У здоровых доноров процент $CD14^{+}TLR2^{+}$ моноцитов – 78,2 (47,4-87,6)%, СИФ TLR2 – 6,8 (4,6-7,8). Процент $CD14^{+}TLR2^{+}$ моноцитов у больных аллергической БА (99,9 (99,6-100)%), смешанной БА (99,8 (99,7-100)%) и неаллергической БА (99,9 (99,7-100)%) был сопоставим. СИФ TLR2 на $CD14^{+}$ -моноцитах периферической крови у больных аллергической БА

(13,2 (9,7-15,9)) смешанной БА (14,1 (10,7-20,7)) и неаллергической БА (15 (11,1-17,8)) также не различались между группами. Во всех группах больных БА процент $CD14^+ TLR4^+$ -моноцитов статистически достоверно выше по сравнению с группой здоровых доноров (2,4 (1,3-14,6)%), $p < 0.05$. У больных неаллергической БА процент $CD14^+ TLR4^+$ -моноцитов (52,5 (43,4-67)%) достоверно выше, чем у больных смешанной БА (29,15 (13,8-35,3)%) и аллергической БА (30,8 (7-50,5)%), $p < 0.05$. Также у больных неаллергической БА значения СИФ TLR4 на $CD14^+$ моноцитах (2,4 (2,17-3,2)) достоверно выше по сравнению с больными аллергической БА (2,0 (1,47-2,2)), $p < 0.05$.

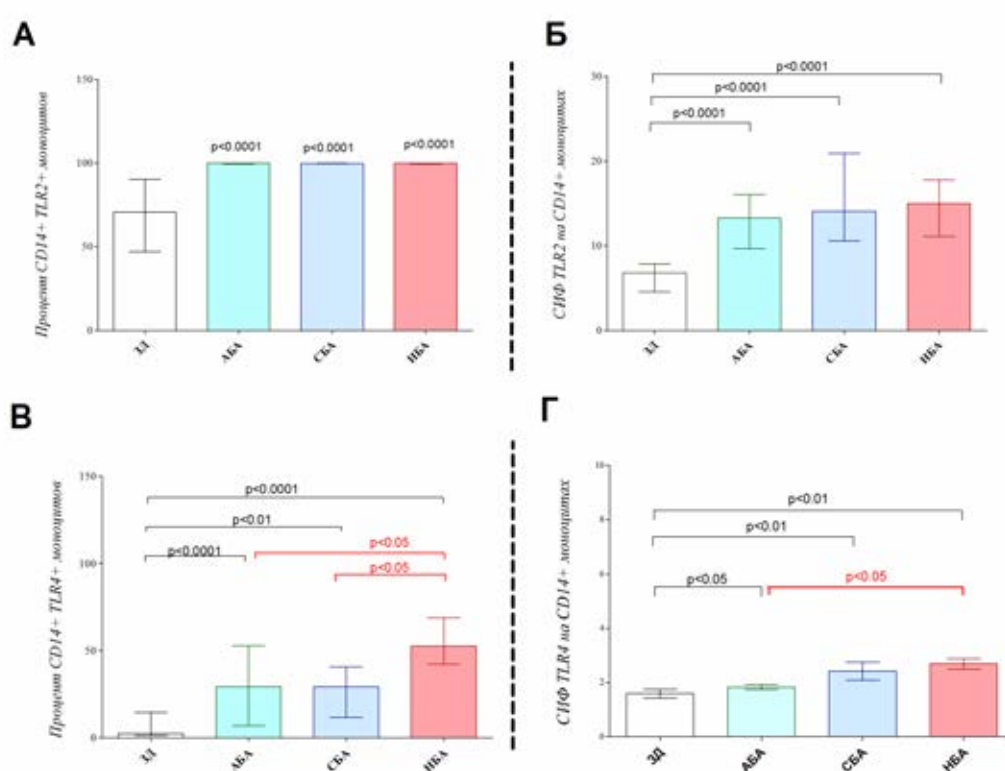


Рисунок 3. Процент $CD14^+ TLR2^+$ - моноцитов (А) и СИФ TLR2(Б); процент $CD14^+ TLR4^+$ - моноцитов (В) и СИФ TLR4 (Г) здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм .

Таким образом, у больных контролируемой БА установлено увеличение количества моноцитов периферической крови, экспрессирующих TLR2 и TLR4, а также средняя интенсивность флюоресценции рецепторов по сравнению со здоровыми донорами.

Определение функциональной активности TLR2 и TLR4

На следующем этапе исследования оценивали функциональную активность TLR2 и TLR4 по индуцированной соответствующими лигандами продукции TNF α МНК периферической крови [Ковальчук Л.В., 2008]. Связывание TLR2 и TLR4 со своими лигандами (ПГ и ЛПС, соответственно) приводит к активации NF- κ B, способствует индукции синтеза TNF α и других провоспалительных цитокинов. Выявили, что спонтанная, TLR2- и TLR4-индуцированная продукция TNF α МНК периферической крови больных БА в обследуемых группах статистически достоверно выше, чем у здоровых доноров (рис. 4).

Значения спонтанной продукции TNF α МНК периферической крови больных бронхиальной астмой были сопоставимы во всех трех обследуемых группах. При этом у больных смешанной БА ЛПС-индуцированная продукция TNF α МНК периферической крови выше, чем у больных аллергической БА (2079 (1883-2353,6) пг/мл и 1457,2 (1111,4-1912) пг/мл, соответственно; $p < 0.05$). Наибольшая ЛПС-индуцированная продукция TNF α МНК периферической крови характерна для больных неаллергической БА (3541 (2946-3863) пг/мл) по сравнению со значениями у больных как с аллергической ($p < 0.001$), так и со смешанной формой БА ($p < 0.05$).

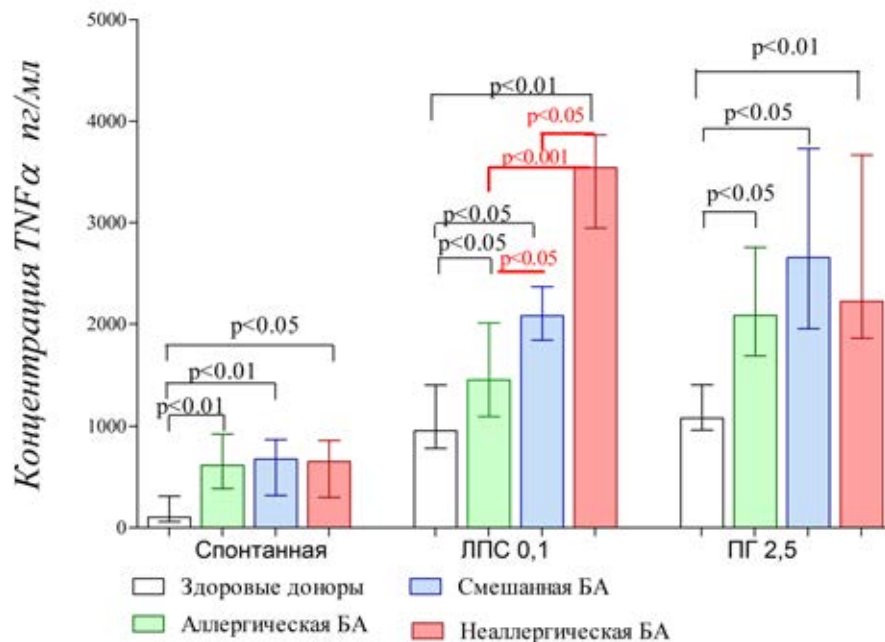


Рисунок 4. Спонтанная, ЛПС (TLR4) - и ПГ (TLR2)-индуцированная продукция TNF α МНК периферической крови здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

ПГ-индуцированная продукция TNF α МНК периферической крови была также статистически достоверно выше во всех исследуемых группах по

сравнению со здоровыми донорами (1081,43 (967,14-1198) пг/мл; $p<0.05$). У больных аллергической БА (2084,5 (1729,71-2747,9) пг/мл), смешанной БА (2654,14 (1982-3730,14) пг/мл) и неаллергической БА (2222,5 (1870-3666) пг/мл). ПГ-индуцированная продукция $TNF\alpha$ МНК периферической крови была сопоставима и статистически достоверно не отличалась между группами.

Постоянный контакт с патогеном или причинно-значимым аллергеном поддерживает активацию TLR, а их высокая функциональная активность может способствовать гиперпродукции клетками $TNF\alpha$. Известно, что данный цитокин в большом количестве присутствует в дыхательных путях у больных БА [Kalinina E.P., 2016; Huang A.X., 2016]. Высокий уровень $TNF\alpha$ может приводить к усилению синтеза провоспалительных цитокинов и хемокинов, увеличению экспрессии молекул адгезии, привлечению нейтрофилов и эозинофилов [Jiang X.G, 2018; Yin B.J., 2007]. Это может способствовать стойкому воспалительному процессу в дыхательных путях и определять развитие обострения БА. В ходе проведенного исследования, мы выявили, что у больных аллергической БА увеличение функциональной активности TLR2 и TLR4 в МНК периферической крови сопровождается усилением тяжести течения заболевания (рис. 5).

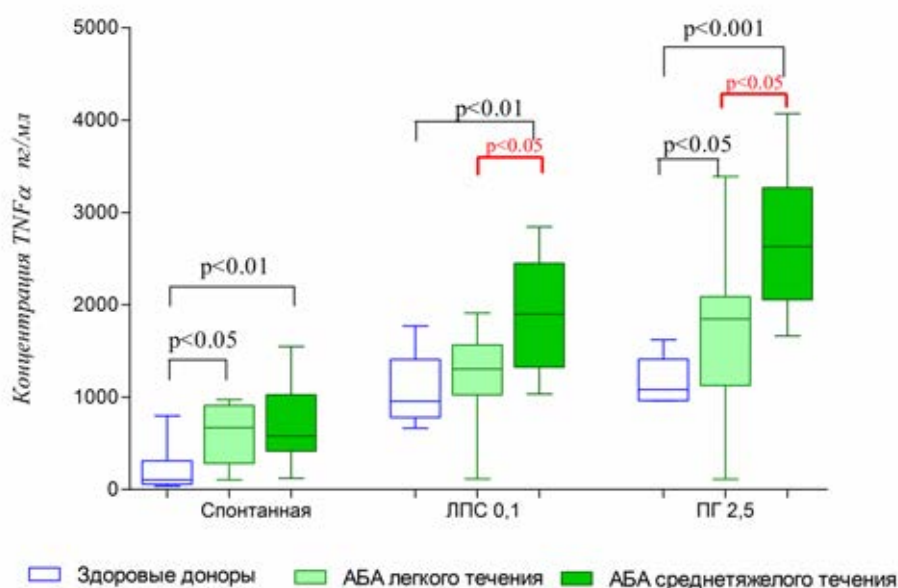


Рисунок 5. Спонтанная, ЛПС (TLR4)- и ПГ (TLR2)- индуцированная продукция $TNF\alpha$ МНК здоровых доноров и больных легкой и среднетяжелой аллергической БА.

Полученные нами данные о повышении экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 могут свидетельствовать о вовлечении данных рецепторов в патогенез и поддержание воспаления при бронхиальной астме

разных форм. Наиболее выражены изменения экспрессии и функциональной активности TLR4 у больных неаллергической БА, патогенез которой до сих пор остается предметом дискуссии.

Анализ TLR2- и TLR4-индуцированной продукции цитокинов

На следующем этапе, в работе оценивалась спонтанная и индуцированная лигандами TLR2 и TLR4 продукция МНК периферической крови про- и противовоспалительных цитокинов, участвующих в иммунопатогенезе БА (IL-18, IL-33, IL-10, IL-4, IL-13) [Allakhverdi Z., 2007; Kamekura R. 2012; Yosri H., 2017; Cayrol C., 2014; Huang A.X., 2016].

Выявили, что во всех трех обследуемых группах больных спонтанная продукция IL-10 статистически достоверно выше, чем у здоровых доноров (рис. 6).

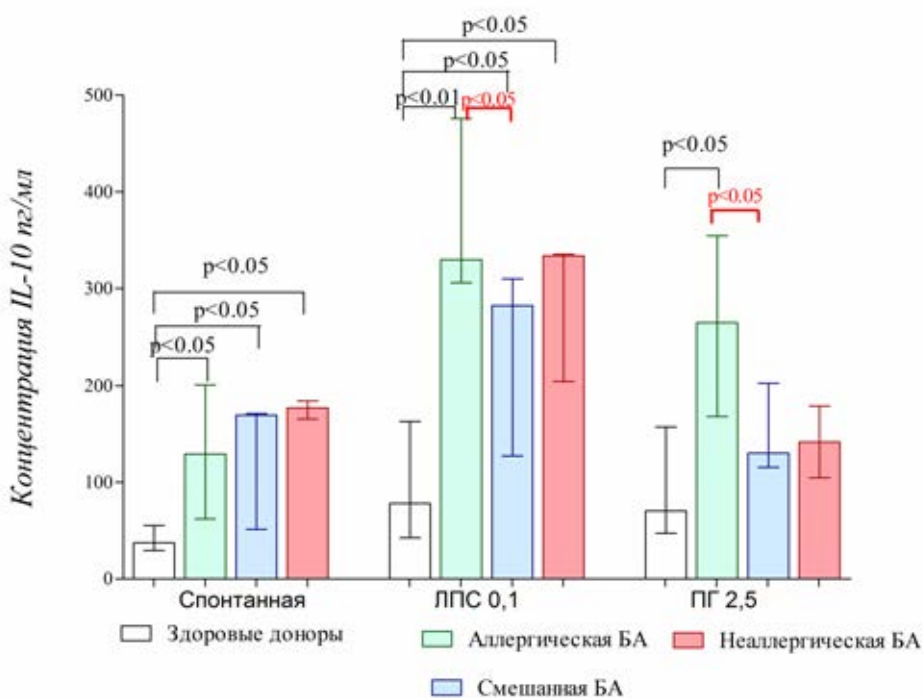


Рисунок 6. Спонтанная, ЛПС (TLR4) - и ПГ (TLR2)-индуцированная продукция IL-10 МНК периферической крови здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

ЛПС-индуцированная продукция IL-10 МНК периферической крови статистически достоверно выше у больных БА по сравнению со здоровыми донорами. У больных аллергической БА ЛПС-индуцированная продукция IL-10 МНК периферической крови статистически достоверно выше по сравнению с группой больных смешанной БА (329,7 (305,8-475,9) пг/мл и 282,2 (127,4-309,8) пг/мл, соответственно; $p < 0.05$). Достоверное увеличение ПГ-индуцированной

продукции IL-10 по сравнению со здоровыми донорами выявили только у больных аллергической БА (70,2 (47,3-157,4) пг/мл и 274,9 (192,5-366,6) пг/мл, соответственно; $p < 0.05$). В этой группе больных ПГ-индуцированная продукция IL-10 также была выше по сравнению с больными смешанной БА ($p < 0.05$). Наиболее высокий уровень IL-10 у больных аллергической БА может быть связан с формированием Th2-фенотипа иммунного ответа у пациентов с atopическими заболеваниями [Mosmann T.R., 1995; Singh M. 2017].

В работе было впервые проведено исследование влияния лигандов TLR2 и TLR4 на продукцию IL-18, IL-4, IL-13 и IL-33 МНК больных БА разных форм (рис. 7). Выявили, что у всех больных контролируемой БА уровень спонтанной продукции IL-18 МНК периферической крови достоверно выше, чем у здоровых доноров, что сопоставимо с данными литературы [Ando M., 2007; Xu M.H., 2017]. Согласно проведенному исследованию, спонтанная продукция IL-4 была статистически достоверно выше только у больных аллергической и смешанной бронхиальной астмой, а уровень спонтанной продукции IL-13 снижен у больных неаллергической БА по сравнению со здоровыми донорами.

Нами было выявлено, что ЛПС и ПГ не влияют на продукцию IL-18, IL-4 или IL-13 МНК периферической крови. IL-18 преимущественно продуцируется в ответ на активацию PRR, среди которых не только TLR, но RIG-1, NOD1, NOD2. Возможно, что активация транскрипции генов IL-18 в большей степени связана с активацией NODR, чем TLR [Lee T.H., 2014]. Основными продуцентами IL-4 и IL-13 являются лимфоциты периферической крови, на которых TLR представлены в меньшей степени, чем на моноцитах, с чем может быть связано отсутствие значимых изменений продукции выбранных цитокинов при культивировании клеток с ЛПС или ПГ.

В проведенном нами исследовании было выявлено, что продукция IL-33 МНК периферической крови сопоставима у больных разных форм БА со здоровыми донорами. *In vitro* на экспериментальной модели аллергического риноконъюнктивита была показана связь активации TLR4 и продукции IL-33 эпителиальными клетками роговицы [Li J., 2016]. Тем не менее мы показали, что ЛПС и ПГ не влияют на продукцию МНК периферической крови IL-33. В периферической крови IL-33 может связываться с растворимым рецептором-ловушкой sST2, уровень которого повышается у больных БА [Weir R.A., 2010; Hayakawa H., 2007].

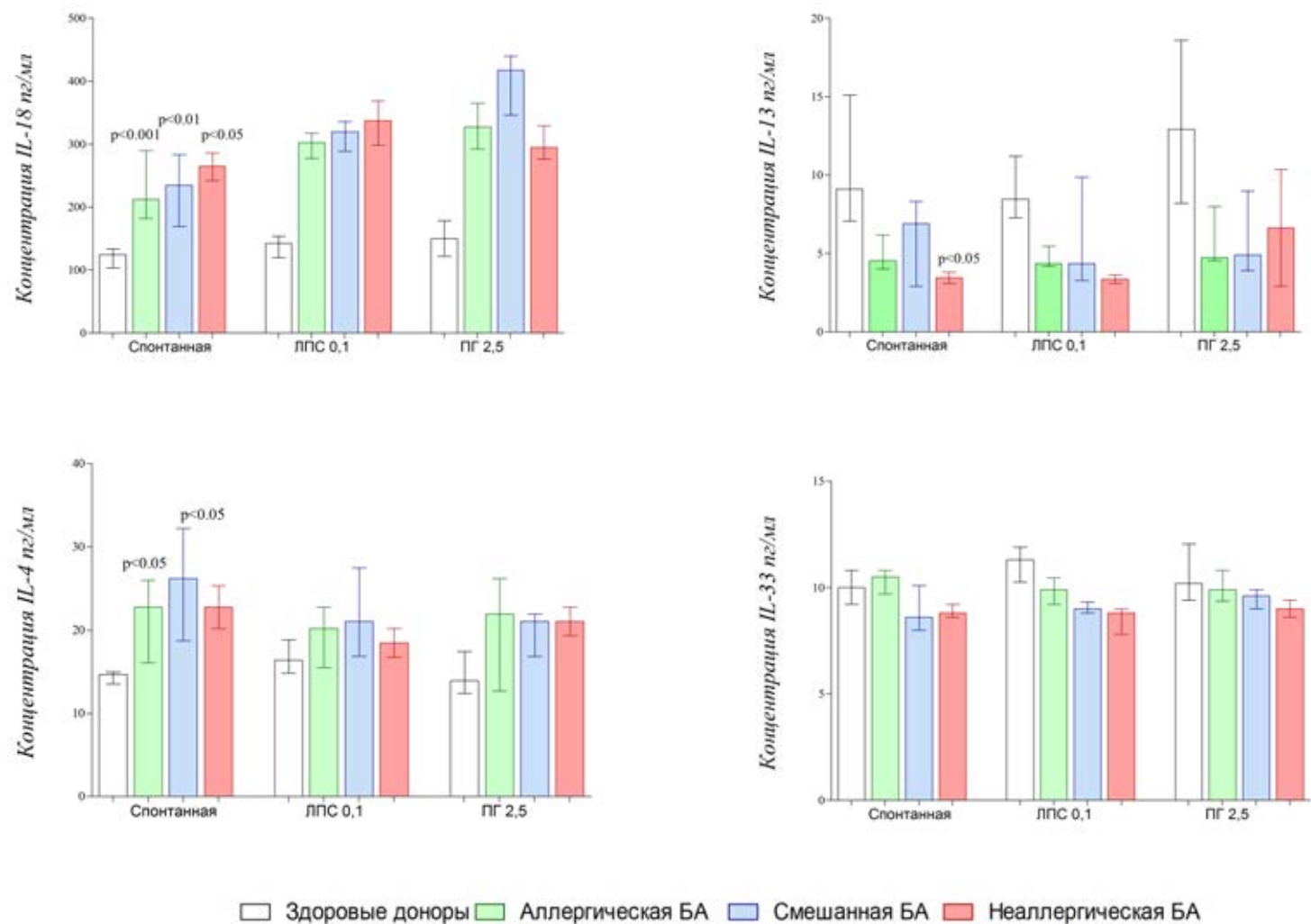


Рисунок 7. Спонтанная, ЛПС (TLR4)- и ПГ (TLR2)- индуцированная продукция цитокинов МНК периферической крови здоровых доноров и больных БА разных форм.

Исследование влияния Der p и комбинации Der p с ЛПС на продукцию TNF α , IL-4, IL-13

Согласно литературным данным, TLR4 может принимать участие в распознавании бытовых аллергенов, в частности Der p [Ryu J.H., 2013; Thomas W.R., 2015]. В связи с тем, что аллерген клещей домашней пыли широко распространен в окружающей среде и часто контаминирован ЛПС [Trompette A., 2009], на следующем этапе нашей работы мы изучали влияние аллергена Der p и его совместное действие с ЛПС на продукцию TNF α МНК периферической крови больных БА и здоровых доноров.

Для исследования были выбраны пациенты, страдающие аллергической БА с сенсibilизацией к бытовым аллергенам. Выявили, что в ответ на аллерген клещей домашней пыли (Der p) в чистом виде и в комбинации с ЛПС происходит увеличение продукции TNF α МНК периферической крови больных аллергической бронхиальной астмой и здоровых доноров, $p < 0.05$ (рис. 7). Однако действие на МНК периферической крови аллергена, а также сочетанное действие аллергена с ЛПС не приводит к увеличению продукции IL-13 и IL-4 у здоровых доноров или больных аллергической БА.

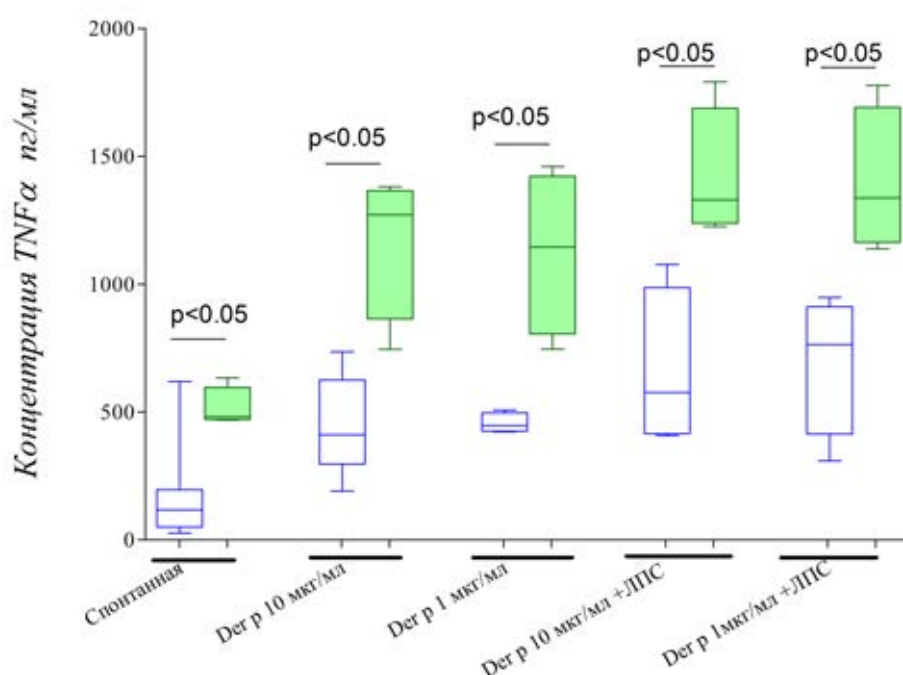


Рисунок 8. Продукция TNF α мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных аллергической БА, стимулированная Der p и комбинацией Der p с ЛПС.

Известно, что Der p может воспроизводить функцию MD2, участвовать в формировании комплекса ЛПС с TLR4 и запускать активацию рецептора [Ryu J.H., 2013; Thomas W.R., 2015]. Учитывая высокий процент пациентов с сенсibilизацией к бытовым аллергенам, активация TLR4 и усиление выработки провоспалительных цитокинов в ответ на аллерген клещей домашней пыли может способствовать поддержанию воспаления дыхательных путей и увеличению тяжести течения бронхиальной астмы.

Бронхиальная астма является системным заболеванием, и полученные в ходе исследования данные могут свидетельствовать о существенном вкладе циркулирующих клеток периферической крови в процесс воспаления. Это согласуется с исследованием *Tashiro и соавт.*, показавшем, что на экспериментальной мышинной модели в HDM-индуцированном воспалении дыхательных путей ключевую роль играют циркулирующие моноциты периферической крови [Tashiro H., 2016]. Миграция циркулирующих моноцитов с высокой экспрессией и повышенной функциональной активностью TLR2 и TLR4 в подслизистую оболочку бронхов у больных БА разных форм (аллергической, смешанной и неаллергической) может приводить к усилению восприимчивости пациентов к аллергенам, инфекционным агентам или лигандам TLR из «окружающей среды». В дальнейшем у больных бронхиальной астмой это может способствовать увеличению гиперреактивности бронхов и развитию осложнений.

Таким образом, выявленные изменения экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 на МНК периферической крови больных бронхиальной астмой могут служить потенциальными маркерами степени тяжести и прогноза течения заболевания, в перспективе могут выступать в качестве критериев направленного поиска путей коррекции при терапии бронхиальной астмы разных форм, а также оценки эффективности проводимой терапии.

Выводы

1. У больных контролируемой БА средней степени тяжести выявлено увеличение экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в МНК периферической крови по сравнению со здоровыми донорами: у больных аллергической БА в 2,3 и 5 раз ($p < 0,05$), у больных смешанной БА в 2,8 и 3,4 раза ($p < 0,05$), у больных неаллергической БА в 2,5 и 2,5 раза ($p < 0,05$).
2. В исследуемых группах больных контролируемой БА независимо от формы заболевания и степени тяжести выявлено статистически достоверное увеличение $CD14^+TLR2^+$ и $CD14^+TLR4^+$ моноцитов, средней интенсивности

флюоресценции этих рецепторов на CD14⁺ моноцитах по сравнению со здоровыми донорами. У больных неаллергической БА выявлены наиболее высокие значения экспрессии и средней интенсивности флюоресценции TLR4 на CD14⁺ моноцитах по сравнению с другими обследуемыми группами.

3. Выявлено статистически достоверное увеличение функциональной активности TLR2 и TLR4 на МНК периферической крови больных контролируемой БА независимо от формы заболевания по сравнению со здоровыми донорами. У больных аллергической БА функциональная активность TLR2 и TLR4 увеличивается с усилением степени тяжести заболевания. Значения функциональной активности TLR4 у больных неаллергической БА в 2,4 и 1,7 раза выше, чем у больных аллергической и смешанной БА, соответственно.

4. В исследуемых группах больных БА установлено достоверно значимое повышение спонтанной продукции TNF α , IL-10, IL-18 МНК периферической крови по сравнению со здоровыми донорами. Увеличение спонтанной продукции IL-4 выявлено в группах больных контролируемой аллергической и смешанной БА по сравнению со здоровыми донорами.

5. У больных контролируемой БА независимо от формы заболевания выявлено увеличение TLR4-индуцированной продукции IL-10 МНК периферической крови по сравнению со здоровыми донорами. Статистически достоверное увеличение TLR2-индуцированной продукции IL-10 выявлено только в группе больных контролируемой аллергической БА. Наибольшие значения TLR2- и TLR4-индуцированной продукции IL-10 были выявлены у больных аллергической БА ($p < 0,05$).

6. Установлено, что аллерген клещей домашней пыли Der p и совместное действие аллергена клещей домашней пыли Der p с ЛПС приводит к увеличению выработки TNF α МНК периферической крови здоровых доноров и больных контролируемой аллергической БА среднетяжелого течения ($p < 0,05$).

Практические рекомендации

1. Исследование экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 на МНК периферической крови больных контролируемой бронхиальной астмой разных форм может быть использовано для оценки степени тяжести и прогноза течения заболевания.

2. Увеличение экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 у больных аллергической бронхиальной астмой может служить одним из

механизмов перехода аллергической формы бронхиальной астмы в смешанную, в связи с этим рекомендовано использование данного маркера для определения эндотипа бронхиальной астмы с целью выбора оптимальной терапии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

- 1 Огурцова А.Д. (Смирнова А.Д.) IL33/ST2: новый биомаркер и терапевтическая мишень /М.В. Хорева, Л.В. Ганковская, А.Д. Огурцова (А.Д.Смирнова), Т.В. Латышева, Л.А. Грачева, А.А. Бологов.// **Российский иммунологический журнал** – 2016 – Т. 10(19) – №1 – С.16-24
- 2 Огурцова А.Д. (Смирнова А.Д.) Анализ экспрессии TLR2 и TLR4 на клетках периферической крови больных бронхиальной астмой /М.В. Хорева, Т.В. Латышева, А.Д. Огурцова (А.Д. Смирнова), М.В. Захаров // **Российский аллергологический журнал** – 2016 – 10 (19) – №3 — С. 358-360
- 3 Огурцова А.Д. (Смирнова А.Д.) TLR-опосредованная выработка цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови больных бронхиальной астмой / М.В. Хорева, Т.В. Латышева, А.Д. Огурцова (А.Д. Смирнова), Л.А. Грачева, А.А. Бологов, М.В. Захаров // **Российский аллергологический журнал.** – 2017 – №1 – С.183-186
- 4 Ogurtsova A.D. (Smirnova A.D.) Expression and functional analysis of toll-like receptor 4 on peripheral blood monocytes in asthmatic patients/ M.V. Khoreva, A.D. Ogurtsova (A.D. Smirnova), L.V. Gankovskaya, T.V. Latisheva // **Proceedings Allergy & immunophisiology: innovate technologies** – 2016 – P.43-51
- 5 Огурцова А.Д. (Смирнова А.Д.) Экспрессия TLR2 и TLR4 на клетках периферической крови больных бронхиальной астмой / А.Д. Огурцова (А.Д. Смирнова), М.В. Хорева, Т.В. Латышева// **Материалы межрегионального форума с международным участием «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы» Российский аллергологический журнал.** – 2016 – Т.2 – №3 – С. 149-150
- 6 Огурцова А.Д. (Смирнова А.Д.) Экспрессия и эффекторная функциональная активность TLR4 на моноцитах периферической крови больных бронхиальной астмой /М.В. Хорева, А.Д. Огурцова (А.Д. Смирнова), Л.В. Ганковская, Т.В. Латышева// **Аллергология и иммунология.** – 2016 – Т.17 – №2 – С.129
- 7 Огурцова А.Д. (Смирнова А.Д.) Экспрессия и эффекторная функциональная активность TLR4 на моноцитах периферической крови больных бронхиальной астмой / Т.А. Аноприева, А.Д. Огурцова (А.Д. Смирнова) //Сборник тезисов «XII

Международная (XXI Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых». – 2017 – С.159

8 Огурцова А.Д. Особенности экспрессии Toll-подобного рецептора 2 и Toll-подобного рецептора 4 у детей с бронхиальной астмой/Л.В. Ганковская, Л.С. Намазова-Баранова, М.В. Хорева, Б.Г. Брагвадзе, А.Д. Огурцова, А.А. Алексеева, В.А. Ганковский, О.А. Свитич // **Медицинская иммунология**. – 2017 – Т.19 – №4 – С. 431-440

9 Огурцова А.Д. Влияние аллергена клещей домашней пыли Der p на выработку цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови здоровых доноров и больных бронхиальной астмой /М.В. Хорева, Т.В. Латышева, А.Д. Огурцова, Л.А. Грачева, А.А. Бологов, М.В. Захаров, Т.Г. Федоскова, А.А. Юдин // **Российский аллергологический журнал**. – 2018 – Т.15 – №1 (часть 2) – С. 112-115

Список сокращений

АБА – аллергическая бронхиальная астма

БА – бронхиальная астма;

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж;

МНК – мононуклеарные клетки;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

НБА – неаллергическая бронхиальная астма;

ПГ – пептидогликан;

СБА – смешанная бронхиальная астма;

ЛПС – липополисахарид;

Der p – аллерген клещей домашней пыли из *Dermatophagoides pteronyssinus*;

HDM – клещ домашней пыли;

PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) – молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами;

PRR (Pattern recognition receptor) - паттерн-распознающий рецептор;

TLR (Toll-like receptor) – Toll-подобный рецептор;

МКБ-10 - Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра, принятая 43-ей Всемирной Ассамблеей Здравоохранения.