

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РОССИЙСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И.ПИРОГОВА» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Огурцова Анастасия Дмитриевна

Анализ экспрессии и функциональной активности Toll-подобных рецепторов у
больных бронхиальной астмой

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук,

доцент М.В.Хорева

доктор медицинских наук,

профессор Т.В. Латышева

Москва – 2018

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Характеристика Toll-подобных рецепторов.....	13
1.1.1 Характеристика и функции Toll-подобного рецептора 2	17
1.1.2 Характеристика и функции Toll-подобного рецептора 4	19
1.1.3 Сигнальные пути TLR2 и TLR4.....	20
1.2 Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе аллергических заболеваний	21
1.2.1 Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе бронхиальной астмы.....	24
1.3 Роль цитокинов в патогенезе бронхиальной астмы	31
1.3.1 Роль цитокинов адаптивного иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы	31
1.3.2 Роль цитокинов врожденного иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы	34
1.4 Современные представления о роли механизмов врожденного иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
2.1. Объекты исследования	47
2.2 Разработка дизайна исследования	50
2.3. Реактивы.....	53
2.4. Анализ экспрессии TLR2 и TLR4 на поверхности моноцитов методом проточной цитофлюориметрии.....	54
2.5. Выделение моноклеарных клеток из периферической крови человека.....	55
2.6. Культивирование МНК периферической крови человека.....	56

2.7. Определение концентрации цитокинов в культуральных супернатантах методом иммуноферментного анализа	56
2.8. Оценка экспрессии генов TLR2, TLR4 в мононуклеарных клетках периферической крови человека	58
2.8.1 Выделение РНК из мононуклеарных клеток периферической крови человека	58
2.8.2 Проведение реакции обратной транскрипции	59
2.8.3 Постановка полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени.....	60
2.9. Статистическая обработка результатов	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	63
3.1 Анализ экспрессии генов TLR2, TLR4 в мононуклеарных клетках периферической крови больных бронхиальной астмой.....	63
3.2 Определение экспрессии TLR2, TLR4 на поверхности моноцитов периферической крови больных бронхиальной астмой.....	67
3.3 Анализ функциональной активности TLR2 и TLR4 по индуцированной лигандами продукции TNF α МНК периферической крови больных бронхиальной астмой	73
3.4.1 Анализ спонтанной и TLR2- и TLR4-индуцированной продукции IL-18 МНК периферической крови больных бронхиальной астмой.....	80
3.4.2 Анализ спонтанной и TLR2- и TLR4-индуцированной продукции IL-33 МНК периферической крови больных бронхиальной астмой	83
3.4.3 Анализ спонтанной и TLR2- и TLR4-индуцированной продукции IL-10 МНК периферической крови больных бронхиальной астмой.....	86
3.4.4 Анализ спонтанной и TLR2- и TLR4-индуцированной продукции IL-4 МНК периферической крови больных бронхиальной астмой	90

3.4.5 Анализ спонтанной и TLR2- и TLR4-индуцированной продукции IL-13 МНК периферической крови больных бронхиальной астмой.....	91
3.5 Исследование влияния Der p и комбинации Der p с ЛПС на продукцию TNF α , IL-4, IL-13 у больных аллергической бронхиальной астмой.	94
Заключение	101
Выводы	112
Практические рекомендации.....	113
Список сокращений	114
Список литературы	115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

В настоящее время одной из актуальных проблем фундаментальной и клинической иммунологии является изучение механизмов врожденного иммунитета. Ключевой функцией врожденного иммунитета считают 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 гемопоэтических и негемопоэтических клеток человека, таких как моноциты/макрофаги, эпителиальные клетки и пр. [215]. 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 [23, 33, 135]. 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 [230]. Благодаря многочисленным исследованиям в этой области появляются новые данные о патогенезе бронхиальной астмы, характере течения заболевания, новые подходы к классификации и терапии. Современные стандарты лечения и профилактики бронхиальной астмы, включающие применение глюкокортикостероидов и бронходилататоров короткого и пролонгированного действия, позволяют

успешно контролировать течение заболевания [230], но несмотря на это причины и механизм развития заболевания полностью не установлены, и 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 [126]. Агонисты TLR2 рассматривают в качестве терапевтических агентов, однако они могут не только ингибировать каскад внутриклеточных реакций, но и поддерживать развитие воспалительного процесса [61]. 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 [250]. Контаминация аллергенов такими распространенными лигандами TLR, как ЛПС или β -глюканы, может приводить к развитию хронического воспаления и усугублять тяжесть течения заболевания [66]. Взаимодействие лигандов с TLR, таким образом, может приводить к развитию и усугублению воспаления. Дисбаланс между Th1 или Th2 и продукцией противо- и провоспалительных цитокинов является одним из основных звеньев патогенеза бронхиальной астмы [246].

Большинство современных работ по исследованию роли TLR в патогенезе бронхиальной астмы, проведено на животных моделях [79, 151, 177, 245] или основано только на изучении экспрессии генов TLR [82, 117, 136, 239]. TLR2 и TLR4 экспрессируются на клетках врожденного иммунитета, осуществляющих «первую линию» защиты от патогенов [173]. Для данных рецепторов характерен

наиболее широкий спектр лигандов, включая аллергены (например, аллерген клещей домашней пыли, Der p) [207, 213]. 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.

В связи с вышеизложенным были сформулированы цель и задачи исследования.

Цель: 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 астмы 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.

Личный вклад автора

Автор участвовал в выборе направления исследований диссертационной работы, разработке дизайна исследования, подборе когорты исследуемых пациентов (под руководством научных руководителей). Автором лично проведена вся экспериментальная работа, включающая в себя: выделение и культивирование моноклеарных клеток, проведение иммуноферментного анализа, работа на проточном цитофлюориметре, выделение нуклеиновых кислот из клеток и постановка полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. Самостоятельная статистическая обработка полученных данных, анализ результатов исследования. Написание всех глав диссертационной работы, включая формулировку выводов и практических рекомендаций.

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 в практику

Результаты диссертационной работы используются в процессе обучения студентов 2-3 курсов, ординаторов по специальности «Аллергология и иммунология» и аспирантов по специальности «Клиническая иммунология, аллергология», а также внедрены в научный процесс на кафедре иммунологии МБФ (зав. каф.- д.м.н., профессор Л.В. Ганковская) ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Материалы проведенных исследований включены в программу лекций для студентов, используются при проведении практических занятий на кафедре патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета (зав. каф.- д.м.н., профессор Ж.М. Салмаси) ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Результаты работы внедрены в практическую деятельность иммунологической лаборатории ГБУЗ ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского Департамента здравоохранения города Москвы (гл.врач - д.м.н., профессор Корсунский А.А.)

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 источник (4 отечественных и 247 зарубежных). Работа содержит 7 таблиц и 37 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика Toll-подобных рецепторов

В процессе эволюции вида закреплялись гены, кодирующие рецепторы — мембранные или растворимые молекулы, обладающие пространственным сродством к РАРР (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) - паттерн-распознающие рецепторы (*pattern recognition receptors, PRR*). Они выявляются у растений, беспозвоночных (губки), млекопитающих и прочих многоклеточных организмов, включая человека. Эти рецепторы экспрессируются на поверхности клеток организма и в эндосомах, в которые попадают чужеродные агенты при фагоцитозе [100].

В настоящее время известно несколько семейств сигнальных PRRs, локализующихся на мембранах клетки или во внутриклеточных везикулах:

1. Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR),
2. Лектиновые рецепторы С-типа (C-type lectin receptors, CLR),
3. Рецепторы-«мусорщики» или фагоцитарные рецепторы (scavenger receptors, SRs),
4. NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptors, NLRs),
5. RIG-подобные рецепторы (RIG-I-like receptors, RLRs).

PRR, не относящиеся к классу сигнальных рецепторов, преимущественно представлены растворимыми соединениями, функция которых ограничена и сводится к специфической опсонизации антигенов. К ним относят семейство комплемента, пентраксины, коллектины [100]. Обычно в ответ на микроорганизм в клетке активируется одновременно или последовательно несколько разных PRR.

Ключевую роль в защите организма от патогенов играют Toll-подобные рецепторы. Изначально было показано, что ген, кодирующий белок Toll, вовлечен в эмбриональное развитие *Drosophila*. Впоследствии стало известно, что эти белки вовлечены в иммунный ответ у млекопитающих. На сегодняшний день у человека найдено и описано 10 типов TLR и 13 типов TLR у мышей, причём TLR10 описан только для человека, а TLR11-13 — только для мышей [113].

TLR в основном экспрессируются на клетках фагоцитарного ряда (моноцитах или нейтрофилах) и негемопоетических клетках (например, на эпителиальных клетках). TLR играют ключевую роль в индукции первичной иммунной реакции в ответ на попадание патогенных микроорганизмов (вирусов, бактерий, грибов, дрожжей) [216].

Все TLR представляют собой трансмембранные гликопротеиновые рецепторы с молекулярной массой от 90 до 150 кДа. У TLR выделяют внеклеточный участок, богатый повторами лейцина (*LRR – leucine rich repeats*) и цитоплазматический домен (*гомолог цитоплазматического домена IL-1*). LLR-домен формируется β -цепями и α -спиралями, соединенными петлями, вместе формирующими подковообразную структуру. Третичная структура LLR-домена определяет специфичность связывания TLR с определенными лигандами (таблица 1). Внеклеточный домен также принимает участие в образовании гетеродимеров, например, TLR1/TLR2 [25].

Цитоплазматическая часть (С-конец) TLR представлена TIR-доменом (от англ. *Toll/IL-1 receptor and resistance domain*). TIR-домен представляет собой β -складчатый слой (в центре), окруженный пятью α -спиралями. При необходимости он может связаться с адапторным белком и запустить каскад реакций, обеспечивающих передачу сигнала внутрь клетки.

Таблица 1. Примеры экзогенных и эндогенных лигандов Toll-подобных рецепторов.

Член семейства	Активаторы и лиганды	Источник литературы
TLR1	Бактерии: триацетилированные липопептиды, модулин Синтетический лиганд: Pam3Cys-Ser-(Lys) ₄	[133, 148]
TLR2	Бактерии: пептидогликан, липопроtein, липопептиды, атипичные	[14, 81, 133, 200]

	липополисахариды, липотейхоевая кислота, фенол-растворимый модулин, липоарабиноманнан Грибы: зимозан Простейшие: tGPI-mutin Вирусы: гликолипиды, белок гемагглютинирина, оболочечные белки вируса кори, ЦМВ, вируса простого герпеса I типа Эндогенные лиганды: HSP60, гиалуроновая кислота, радикалы кислорода, некротические клетки	
TLR3	Вирусы: двухцепочечная РНК (вирусы) мРНК (хозяин) poly I:C (синтетическая двухцепочечная РНК)	[139, 211]
TLR4	Бактерии: липополисахариды, липотейхоевая кислота Грибы: маннан, глюкуроноксилманнан Простейшие: Глико-инозитол-фосфолипиды Вирусы: гликоинозитол фосфолипиды белковая оболочка вирусов, F-протеин Эндогенные: белки теплового шока 60 и 70, полисахаридные фрагменты гепарина сульфата, гиалуроновая кислота, фибриноген, фибронектин Прочие: таксол, дитерпен, частицы дизельных выхлопных газов, экстракт домашней пыли	[14, 133, 200, 249]

TLR5	Бактерии: флагеллин	[190]
TLR6	Бактерии: диацетилированные липопептиды, модулин, растворимый туберкулезный фактор	[190]
TLR7	Вирусы: одноцепочечная РНК Синтетические аналоги: имидазохинолин (синтетический противовирусный препарат) локсорибин (аналог гуанозина)	[139]
TLR8	Вирусы: одноцепочечная РНК Синтетические аналоги: имидазохинолин (синтетический противовирусный препарат) локсорибин (аналог гуанозина)	[133]
TLR9	Бактерии, простейшие, вирусы: неметилованная ДНК Простейшие: гемозоин Эндогенные: комплекс хроматина и иммуноглобулина G, двухцепочечная ДНК Прочие: Экстракт домашней пыли	[14, 21]
TLR10	Неизвестны	[14]
TLR11	Бактерии: неизвестно Простейшие: профилин-подобные молекулы	[23]
TLR12	Бактерии: профилин	[14]
TLR13	Неизвестны	[14]

Между LRR- и TIR-доменами расположен короткий трансмембранный участок. На цитоплазматической мембране локализуются TLR, которые

распознают поверхностные паттерны грибов, бактерий и простейших. К ним относятся: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и TLR11. TLR, распознающие нуклеиновые кислоты (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), расположены внутри клетки, на мембранах эндосом или лизосом [237]. Схема строения TLR представлена на рисунке 1.

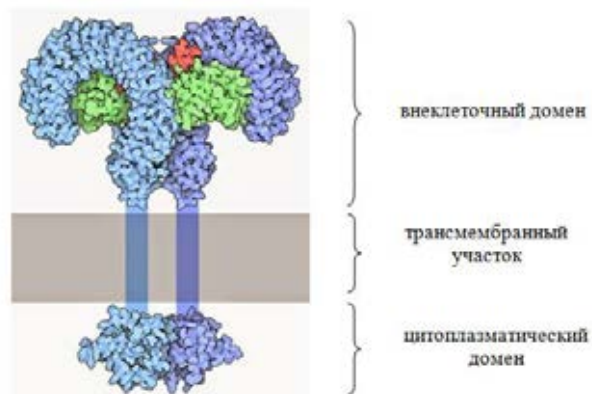


Рисунок 1. Схема строения Toll-подобных рецепторов (*модифицировано из Goodsell D.S., 2011*) [67]

В настоящее время накапливаются данные о том, что дефекты на уровне экспрессии TLR, распознавания лигандов, передачи сигнала, функциональной активности и полиморфизмы генов этих рецепторов играют важную роль в патогенезе различных заболеваний (атеросклероза, инфаркта миокарда, бронхиальной астмы и др.) [33].

1.1.1 Характеристика и функции Toll-подобного рецептора 2

TLR2 (CD282) был впервые описан в 1998 году, как рецептор врожденного иммунитета, вовлеченный в распознавание PAMP, характерных для бактерий, вирусов, паразитов и грибов. Ген данного рецептора локализован на длинном плече 4 хромосомы (4q31.3-32). TLR2, как и TLR1, 6, 10 является членом семейства TLR1. TLR2 экспрессируется АПК, такими как макрофаги, моноциты, дендритные клетки. Известно также, что TLR2 широко представлен на активированных В-лимфоцитах в зародышевых центрах лимфатических узлов [122].

К лигандам TLR2 относят липопептиды бактерий, пептидогликан и липотейхоевую кислоту грамположительных бактерий, липоарабиноманнан микобактерий, зимозан грибов и др. Также известно, в качестве лиганда для TLR2 может выступать ЛПС из *Leptospira interrogans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Helicobacter pylori* [25]. Данные липополисахариды, в отличие от ЛПС грамотрицательных бактерий, отличаются количеством ацильных цепей в липиде А. Также TLR2 распознает эндогенные лиганды, так называемые «сигналы опасности» или DAMP. Например, β -дефенсин-3, фрагменты гиалуроновой кислоты, белки теплового шока.

Особенностью TLR2 является его способность образовывать гетеродимеры с TLR1 и TLR6. Связывание триацилированных липопептидов грамотрицательных бактерий и микоплазмы с гетеродимером TLR1-TLR2 приводит к активации дендритных клеток, NK-клеток, тучных клеток, В-лимфоцитов и кератиноцитов. TLR2-TLR6 гетеродимер распознает диацилированные липопептиды грампозитивных бактерий [155]. TLR2 образует гетеродимеры с его корецепторами, что увеличивает разнообразие распознаваемых молекул. Активация TLR2 лигандами может происходить при помощи вспомогательных молекул и корецепторов. К примеру, при распознавании диацилированных липопептидов происходит связывание с молекулой CD36, которая переносит лиганд на дополнительную молекулу CD14, которая, в свою очередь, загружает лиганд на гетеродимеры TLR2 / TLR6 (FSL-1, MALP-2, LTA) или на гетеродимеры TLR2 / TLR1 (липоманнан) [92]. Доставка лигандов осуществляется в липидных рафтах, где заякорены CD14 и CD36. В дальнейшем может происходить интернализация рецепторов в аппарат Гольджи. Участие CD14 и CD36 в активации TLR2 необязательно, роль этих молекул заключается в усилении сигнализации, снижении порога концентрации лиганда, необходимой для активации рецептора [155].

1.1.2 Характеристика и функции Toll-подобного рецептора 4

TLR4 (CD284) впервые был охарактеризован у млекопитающих в 1998 году. Он локализован на коротком плече 9 хромосомы (9q32-33). TLR4 экспрессируется на моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, плазматоидных ДК, тучных клетках. TLR4 экспрессируется не только клетками иммунной системы, но гладкомышечными клетками, фибробластами сосудов, кардиомиоцитами, а также эпителиальными клетками кишечника и дыхательных путей [25].

TLR4 вовлечен в распознавание белков слияния некоторых вирусов, вызывающих респираторные инфекции, оболочечных белков вируса, вызывающего рак молочной железы у мышей, пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*, а также цитостатика растительного происхождения paclitaxel. Однако основным лигандом TLR4 является ЛПС грамотрицательных бактерий. ЛПС представляет собой семейство амфипатических макромолекул, состоящих из гидрофобного липида А, олигосахарида и дистальных цепей полисахарида [2]. Контакт с лигандами TLR4 (особенно с ЛПС), приводит к увеличению экспрессии данного рецептора на клетках.

В отличие от большинства TLR (в том числе, TLR2) TLR4 для полноценного функционирования требуется наличие корецептора MD2 (*myeloid differentiation protein 2*). MD2 относится к семейству липид-связывающих белков, имеет β -складчатую структуру, включающую в себя гидрофобное ядро. Таким образом формируется гидрофобный карман с крупной площадью поверхности для связывания лигандов. Структурный анализ показал, что после освобождения из состава клеточной стенки бактерий, ЛПС формирует комплекс с липополисахарид-связывающим белком LBP (*LPS-binding protein*) [37]. LBP обладает высоким сродством к CD14, и этот комплекс связывается с гидрофобной поверхностью MD2. Происходит димеризация двух соседних рецепторов с привлечением их положительно заряженных фосфатных групп, что переводит рецептор в активное функциональное состояние [37].

1.1.3 Сигнальные пути TLR2 и TLR4

Активация клетки через TLR связана с пятью различными адаптерными белками: MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing interferon-beta*), TIRAP / MAL (*toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein/ MyD88 adapter-like*) или TRAM (*TIR domain-containing adaptor molecule 1*) и SARM [100].

Классический путь трансдукции сигнала внутрь клетки для TLR – через MyD88-белок (рис. 2).

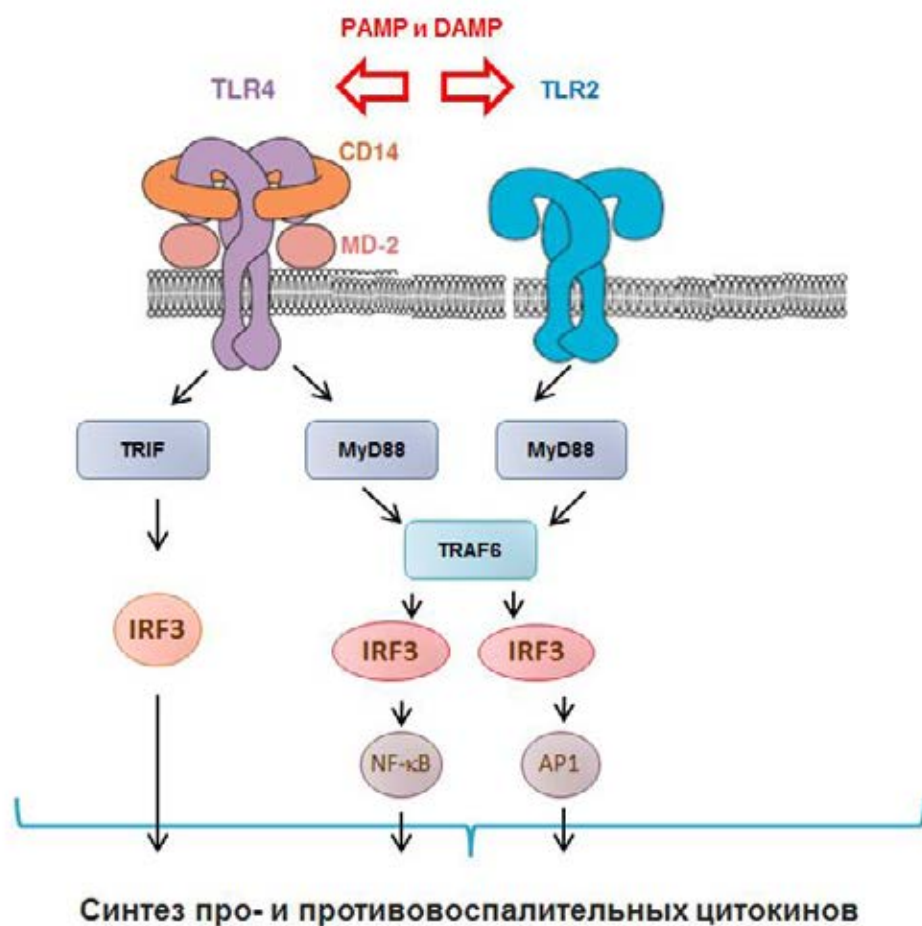


Рисунок 2. Сигнальные пути, активируемые при связывании лигандов с TLR2 и TLR4 (модифицировано из Akira S., 2009) [8]

Молекула MyD88 состоит из трех доменов, и С-конец представлен TIR-доменом, который взаимодействует с TIR-доменом TLR. N-конец формирует

«домен смерти» DD (*death domain*), с помощью которого MyD88 связывает DD серин-треониновую IL-1 рецептор-связанную киназу (*interleukin-1 receptor associated kinase, IRAK*) и активирует её. В дальнейшем происходит связывание с TRAF6 (*TNF receptor associated factor*). Рекрутинг TRAF6 приводит к запуску киназного каскада, включающего IKK, TAK1 и TAB2 в результате чего активируются молекул семейства MAPK и деградируют NF-κB-ингибирующие белки (*IκB*) [125]. В дальнейшем свободный транскрипционный фактор NF-κB переносится в ядро и обеспечивает транскрипцию генов про- и противовоспалительных цитокинов, NO-синтазы, катионных противомикробных пептидов и пр. В качестве адапторного белка в MyD88-зависимом пути также может выступать Mal/TIRAP [91].

В случае MyD88-независимого пути передачи сигнала в качестве адапторного белка выступает TRIF. Альтернативный способ передачи сигнала характерен для TLR3 и TLR4. TRIF взаимодействует с TRAF6 и TRAF3. TRAF6 рекрутирует киназу RIP-1, которая, в свою очередь, взаимодействует с TAK1-комплексом и активирует его, приводя к активации NF-κB и MAPKs и индукции генов воспалительных цитокинов [100]. TRAF3 активирует киназы IKKs, TBK1 и IKKi, которые запускают транскрипционные факторы IRF3, IRF7 и в результате синтезируются интерфероны I типа (INFα и INFβ) [157].

1.2 Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе аллергических заболеваний

В последние десятилетия накапливается все больше данных, свидетельствующих о вовлечении механизмов врожденного иммунитета в патогенез самых разнообразных заболеваний: инфаркта миокарда, острого деструктивного панкреатита, различных аллергических заболеваний [123, 205].

Известно, что TLR играют существенную роль в патогенезе аллергических заболеваний, однако механизмы влияния изучены не до конца и во многом носят двойственный характер. С одной стороны, в исследовании 2002 года *PASTURE* (*Protection against Allergy: Study in Rural Environments*) оценивали влияние

животноводческой среды и питья сырого молока в первые годы жизни детей на риски развития аллергических заболеваний и на экспрессию генов PRR. По итогам было установлено повышение уровня экспрессии генов PRR и снижение рисков развития аллергических заболеваний в исследуемой когорте [130, 174]. Данное исследование согласуется с «гигиенической гипотезой» развития аллергопатологии.

Однако на экспериментальных моделях показано, что TLR могут способствовать развитию аллергических заболеваний. Известно, что аллергены могут содержать в своем составе такие широко распространенные лиганды TLR, как ЛПС или β -глюканы, кроме того, некоторые аллергены (например, аллергены клещей домашней пыли) способны непосредственно индуцировать TLR-зависимый сигнальный путь. Взаимодействие TLR4 с аэроаллергенами, такими как Der p2, Der p7, приводит к активации данного рецептора, развитию соответствующих эффекторных реакций [178, 203, 208]. Также показано, что сигаретный дым и вирусы могут усиливать экспрессию TLR4, что может частично объяснить предрасположенность детей, часто контактирующих с вирусными инфекциями в раннем детском возрасте, к развитию аллергической сенсibilизации.

Решающее значение может иметь генетическая предрасположенность к атопии, сроки, доза и интенсивность воздействия различных факторов окружающей среды.

Согласно литературным данным, изменения в экспрессии TLR играют существенную роль в пищевой аллергии. Известно, что на эпителиальных клетках кишечника экспрессируются TLR. На экспериментальной мышинной модели было показано, что у TLR9-мутантных особей повышалась проницаемость кишечника [195]. Данный рецептор распознает CpG-мотивы, широко представленные у *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* Таким образом, активация TLR9 важна для поддержания гомеостаза в кишечнике и может играть решающую роль в предотвращении развития воспаления кишечника [99, 118]. В работе Kivit *и соавт.* было показано, что агонисты TLR9 способствуют подавлению Th2-

иммунного ответа и формированию толерантности [104]. Таким образом, TLR9 играет протективную роль в патогензе пищевой аллергии. При этом, в работе *Westerholm-Ormio и соавт.* было показано, что у детей с пищевой аллергией увеличивается количество клеток, экспрессирующих TLR4 [225]. В работе *Li и соавт.* выявлено, что активация TLR4 приводит к продукции эпителиальными клетками провоспалительных цитокинов и усилению воспаления [124].

Не совсем ясна роль TLR в иммунопатогенезе атопического дерматита. TLR экспрессируются на эпителиальных клетках кожи человека, являющихся первой линией защиты от патогенов. Известно, что атопический дерматит может усугубляться после контакта пациента с различными инфекциями и микробными продуктами. Бактерии, в составе которых содержатся PAMP, распознаваемые TLR2 и TLR4, часто колонизируют кожу в том числе и больных атопическим дерматитом [98, 156]. Считают, что изменение экспрессии TLR может играть определенную роль в усилении иммунного ответа при обострении атопического дерматита. Связывание лиганда с TLR2 приводит к усилению продукции клетками IL-4 и подавлению IL-10 [95]. А Der p2 при связывании с TLR4 увеличивает экспрессию транскрипционного фактора GATA Binding Protein 3, что приводит к увеличению продукции Th2-цитокинов [213]. В исследовании *Tsybikov и соавт.* было показано, что на CD14⁺HLA-DR⁺ моноцитах периферической крови больных атопическим дерматитом повышена экспрессия TLR2 и TLR4. При этом наблюдалась положительная корреляция между уровнем экспрессии TLR2 и сывороточными уровнями IL-17A и IL-4 [214].

Существуют работы по исследованию ассоциации полиморфизмов генов TLR с атопическим дерматитом. Например, полиморфизм R753Q в гене TLR2 приводит к увеличению продукции моноцитами IL-6 и IL-12 и связан со снижением функциональной активности данного рецептора в ответ на действие пептидогликана или липотейховой кислоты [153].

Согласно литературным данным, TLR экспрессируются эпителиальными клетками слизистой оболочки носа и носоглотки. Эти рецепторы влияют на защиту дыхательных путей и местный иммунитет слизистой оболочки. В

исследовании *Renkonen и соавт.* было показано, что в эпителии дыхательных путей в наибольшей степени экспрессируются TLR2 и TLR4 [168]. Работа *Månsson Kvarnhamm и соавт.* продемонстрировала, что действие агонистов этих рецепторов на клетки эпителия может приводить к усиленной продукции цитокинов (IL-6, IL-8) [133].

Особенности экспрессии и функциональной активности TLR могут определять состоятельность противовирусной защиты, возможно, играть роль в развитии обострения такого заболевания, как аллергический ринит [134]. Известно, что терапия агонистом TLR7 (R848) на экспериментальной мышинной модели снижала, а агонистом TLR9 (CpG) увеличивала воспаление дыхательных путей [6, 22].

Таким образом, в настоящее время накоплены результаты научных исследований, в которых показано участие сигнальных путей TLR в развитии аллергии. TLR представлены на многих клетках человека, клетках эпителия, базофилах, тучных клетках, участвующих в реализации аллергических реакций. Совместное воздействие аллергенов и PAMP может приводить к синергизму, и, как следствие, усилению воспалительной реакции.

1.2.1 Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе бронхиальной астмы

В настоящее время растет количество данных, подтверждающих связь дефектов в системе TLR с развитием бронхиальной астмы, однако данные носят противоречивый характер [34, 61, 141].

В исследовании на экспериментальных моделях *Sly и соавт.* было выявлено, что респираторные вирусные инфекции и наличие атопии, синергично повышают риск развития бронхиальной астмы при наличии аллергенной нагрузки (*allergen exposure*) [193]. В исследовании *Ferreira и соавт.* показано, что у больных тяжелой БА повышена экспрессия TLR2 эпителиальными клетками дыхательных путей по сравнению со здоровыми донорами. При этом в данной

группе пациентов на клетках слизистых оболочек верхних дыхательных путей была повышена экспрессия TLR3, а на клетках слизистых оболочек нижних дыхательных путей - TLR4 [58].

Различные вирусные инфекции – наиболее частая причина обострения бронхиальной астмы. Известно, что многие вирусы и бактерии содержат в себе компоненты лигандов TLR: *respiratory syncytial virus* и *Hemophilaiin influenza* (TLR4), *influenza virus* (TLR 7/8), *Streptococcus pneumoniae* (TLR1/2) и др. Под воздействием этих агонистов запускается TLR-индуцированная продукция цитокинов, принимающих участие в развитии обострения бронхиальной астмы [150, 209, 235].

Выявлены генетические полиморфизмы TLR2, которые связаны с аллергическими заболеваниями. В частности, полиморфизмы в гене TLR2 могут увеличивать риск развития БА (например, TLR2/1596C, TLR2/-24438 и rs2289318). Полиморфизм Arg753Gln (+2408G>A) в генах TLR2 ассоциирован с увеличением уровня IgE у больных атопическим дерматитом [89]. Полиморфизм Arg677Trp в гене TLR2 может являться протективными факторами, направленными против репликативной активности CMV [26]. С другой стороны, полиморфизм Arg753Gln в гене TLR2 может способствовать усилению вирусной репликации, что может приводить к обострению воспаления [101]. Хроническое воспаление может провоцировать обострение БА, определять развитие осложнений или тяжесть течения, оказывать влияние на ремоделирование дыхательных путей. Известно, что стимуляция пептидогликаном базофилов, экспрессирующих на своей поверхности TLR2, приводит к увеличению продукции IL-4, IL-13 [24]. Эти данные показывают, что стимуляция TLR2 во время начальной фазы иммунной активации определяет направление дифференцировки Th в сторону Th2, и может играть роль патогенезе астмы. С другой стороны, в исследовании *Lluis и соавт.* взаимодействие TLR2 с лигандами увеличивало количество Treg клеток, что приводило к супрессии иммунных реакций и уменьшало обострение бронхиальной астмы [129].

Известно, что активация TLR3 индуцирует продукцию клетками провоспалительных цитокинов и эотаксина, обуславливая развитие эозинофильного воспаления в дыхательных путях. Это в свою очередь, по механизму положительной обратной связи, усиливает экспрессию TLR3 на эпителиальных клетках трахеи. Так как агонистами TLR3 являются двухцепочечная РНК (дцРК), то различные риновирусы также увеличивают экспрессию TLR3 на эпителиальных клетках, способствуя развитию обострения БА. При этом, длительная активация данного рецептора может привести к развитию воспаления в дыхательных путях и легких [133].

TLR4 локализуется на цитоплазматической мембране различных клеток, его основным лигандом является липополисахарид (ЛПС) грамотрицательных бактерий. Известно, что аэроаллергены обладают мимикрией с лигандами для TLR4. *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) или аллергены домашней пыли, наиболее распространены в окружающей среде [207]. В домашней пыли обнаруживают более 50 видов клещей, из которых основную долю составляют *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae*. Выделяют более 30 групп аллергенов, выделенных из клещей домашней пыли, из которых ключевое значение отводят Der p1, Der p2 и Der p 23 [208]. Der p1 представляет собой протеолитический фермент и относится к цистеиновым протеазам [208]. Der p2 обладает липидсвязывающей активностью и по строению гомологичен молекуле MD2, которая обеспечивает передачу сигнала с TLR4 после взаимодействия с ЛПС [179, 207].

Способность TLR4 связывать аллерген клещей домашней пыли находит подтверждение в экспериментах на лабораторных животных. Сенсибилизация мышей Der p2 совместно с пикограммовыми дозами ЛПС приводила к развитию Th2-зависимого воспаления с эозинофильной инфильтрацией легких, лимфоцитозом и увеличением концентрации IgE в плазме крови. При этом эффект наблюдался только у мышей дикого типа и отсутствовал у TLR4-/- мышей. Кроме того, у MD2-/- мышей введение Der p2 также вызывало Th2-ответ [203]. Таким образом, введение Der p2 совместно с низкими дозами ЛПС приводит к активации

TLR4 и направляет иммунный ответ в сторону Th2 [240]. В исследованиях, проводимых на экспериментальных мышинных моделях, совместное введение низких доз ЛПС и аллергенов (OVA, овальбумина) индуцирует развитие Th2-зависимого иммунного ответа, опосредованное TLR4. Наблюдалось усиление эозинофильного воспаления в легких, повышались концентрации IL-4, IL-5, IL-13. При этом под воздействием высоких доз ЛПС происходила дифференцировка CD4⁺ клетки в Th1 типа. Была выдвинута теория, что доза ЛПС определяет тип иммунного ответа (Th1 или Th2) [49, 186, 203].

Некоторые микробные продукты могут инициировать развитие аллергического воспаления, активируя TLR5. В исследовании *Wilson и соавт.* показано, что на экспериментальной модели БА флагеллин бактерий способствует поляризации иммунного ответа в сторону Th2 и Th17 [228]. За счет этого у экспериментальных животных наблюдалось развитие эозинофильного воспаления, гиперплазия бокаловидных клеток, гиперсекреция слизи, формирование обструкции и гиперреактивности дыхательных путей. Также авторы выявили, что флагеллин входит в состав домашней пыли, являясь основным ее адьювантом [228].

Другую роль в поддержании воспаления при БА играет активация TLR6 [145]. Лигандами для TLR6 выступают липопептиды, зимозан, грибы и др. Выявлен ряд полиморфизмов (rs5743789, Ser249Pro) указывающих на протективную роль TLR6 в развитии атопии и БА. Также показано, что нарушение функции TLR6 приводит к развитию воспаления и ремоделированию дыхательных путей [83]. Предполагается, что агонисты TLR6 могут быть использованы в качестве терапевтических средств для ослабления симптомов астмы, вызванной сенсibilизацией организма к грибам [223].

В ряде литературных источников также рассматривается TLR7, как возможный протективный фактор для развития воспаления при БА. Этот рецептор экспрессируется на эпителиальных клетках гладкой мускулатуры дыхательных путей, эозинофилах и В-лимфоцитах [14, 55]. Стимулированный TLR7 подавляет Th2 тип иммунного ответа, индуцирует выработку цитокинов

Th1, в частности, IL-12 и IFN γ [51]. Показано, что активация клетки через TLR7 приводит к снижению сывороточного уровня IgE [139], способствует уменьшению эозинофильного воспаления и ремоделированию дыхательных путей при хроническом воспалении при аллергической астме [59, 144]. *Ekman и соавт.* на экспериментальной животной модели определили, что дефекты в функциональной активности TLR7 могут способствовать восприимчивости больных БА к вирусным инфекциям, определять более тяжелое течение обострения [55].

TLR8 высоко гомологичен TLR7, локализован в эндосомах. Некоторые исследования показывают, что он регулирует активность TLR7 [212]. Синтетические лиганды TLR8 препятствуют развитию аллергической астмы, ингибируя развитие воспалительных реакций в дыхательных путях при воздействии аллергена [186, 189].

TLR9 является белком, локализованным в эндосомах, распознает CpG-участки вирусной и бактериальной ДНК, а также синтетические олигодезоксинуклеотиды (ОДН). TLR9 конститутивно экспрессируется, в частности, нейтрофилами. В ряде исследований было показано, что активация сигнальных путей TLR9 CpG ОДН предотвращает аллергическое воспаление дыхательных путей, их гиперчувствительность при астме. Агонисты TLR9 влияют на восстановление баланса Th2/Th1 в иммунном ответе. Также активация TLR9 способствует переключению синтеза В-лимфоцитами с IgE на IgA [14].

В исследовании методом «случай-контроль» оценивались полиморфизмы генов TLR1-10 и их ассоциация с астмой у детей. Найдены однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в генах TLR1 (интрон и кодирующую область, приводящая к изменению аминокислоты), TLR6 (область промотора, приводящая к изменениям в транскрипции), TLR10 (кодирующая область, изменяющая последовательности аминокислот). Эти SNPs коррелировали со сниженным риском развития аллергической бронхиальной астмы почти вдвое. Примечательно, что все эти рецепторы способны образовывать гетеродимеры с TLR2. Защитные эффекты SNPs в TLR1, 6, 10 объясняли усилением их функции,

как результат повышения экспрессии генов TLR и самого белка, с уровнем которого коррелировали увеличение продукции провоспалительного Th1 цитокина IFN γ и снижение выработки Th2 цитокина IL-4 после *ex vivo* стимуляции с соответствующими лигандами TLR. Таким образом, активация некоторых TLR вызывает сенсibilизацию и срыв толерантности [111], в то время как активация некоторых других членов этого семейства, особенно в раннем возрасте, может способствовать развитию невосприимчивости к некоторым аэроаллергенам.

Предполагаемая роль TLR в иммунопатогенезе бронхиальной астмы представлена на рисунке 3.

Таким образом, TLR вносят непосредственный вклад в иммунопатогенез бронхиальной астмы. Однако механизмы их влияния еще не до конца изучены, для ряда TLR показана двойственная функция в развитии аллергического воспаления.

Комплексный подход к оценке экспрессии и функциональной активности данных молекул у больных разных форм бронхиальной астмы несомненно играет важнейшую роль в уточнении иммунных механизмов развития воспаления при астме, разработке новых подходов к лечению и прогнозированию развития осложнений.

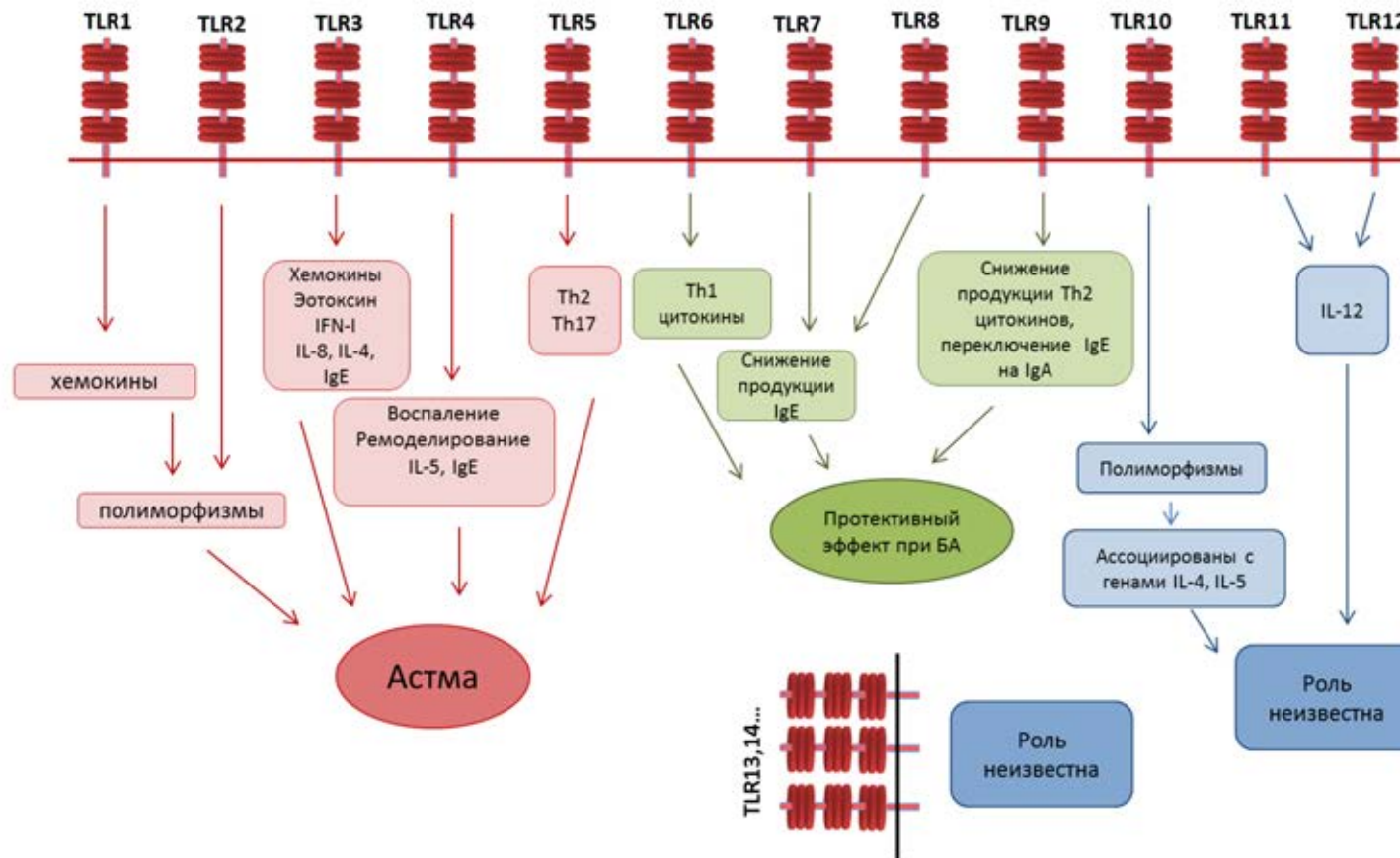


Рисунок 3. Роль TLR в развитии бронхиальной астмы (модифицировано из Athari S.S., 2016) [14].

1.3 Роль цитокинов в патогенезе бронхиальной астмы

Многие клетки гемопоэтического и негемопоэтического происхождения вовлечены в иммунопатогенез бронхиальной астмы. Во многом их роль в поддержании воспаления на уровне дыхательных путей определяется за счет формирования цитокинового микроокружения (рис. 4).

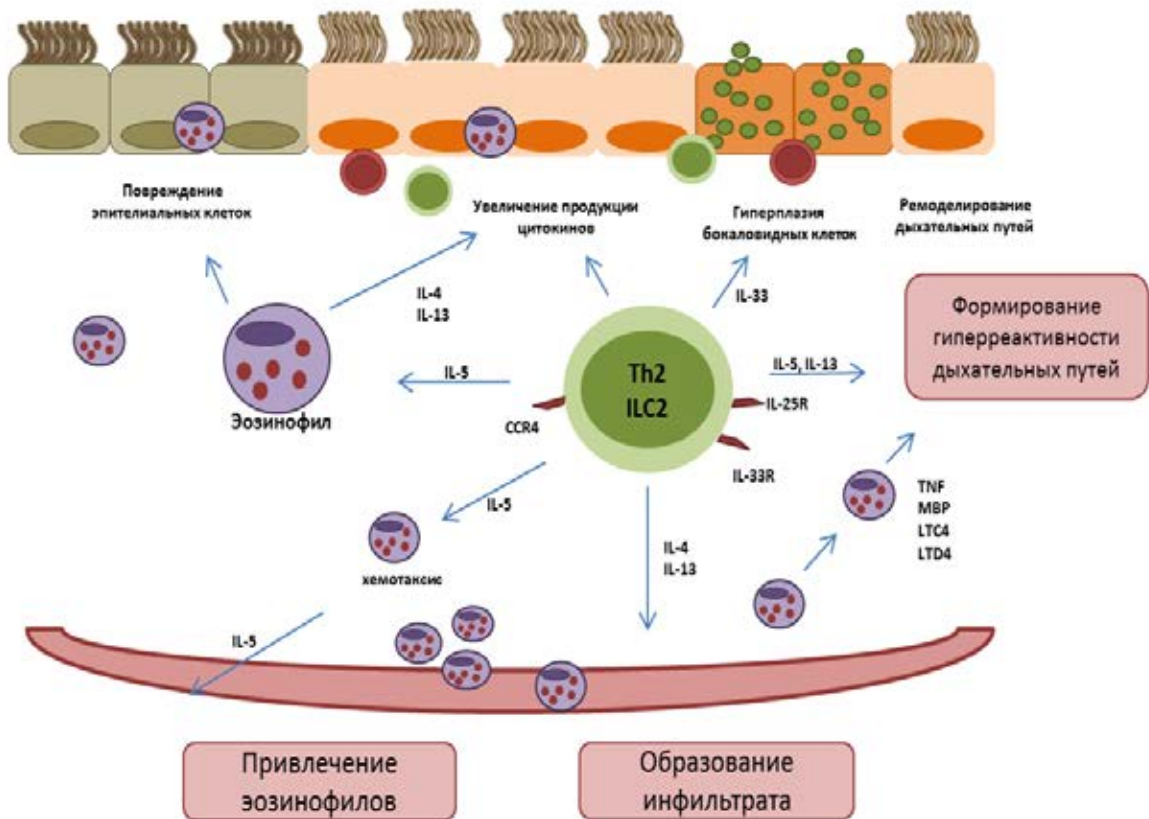


Рисунок 4. Роль цитокинов в патогенезе бронхиальной астмы
(модифицировано из Lambrecht .B., 2015) [115].

1.3.1 Роль цитокинов адаптивного иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы

Цитокины играют ключевую роль в поддержании воспаления при бронхиальной астме. Известно более чем о 50 цитокинах, вовлеченных в иммунопатогенез этого заболевания, при этом роль каждого из них изучена не до конца. У больных бронхиальной астмой во время приступа можно обнаружить

в сыворотке значительно более высокие уровни таких цитокинов, как GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-8, IL-18 и TNF- α [115].

Основным продуцентом цитокинов при БА считаются Th2 типа. Эти клетки вырабатывают IL-13, IL-4, IL-5 и IL-9, играющие важную роль в иммунопатогенезе БА [19]. IL-4 является аутокринным фактором роста для Th2 типа, фактором роста для базофилов, тучных клеток и эозинофилов. Этот цитокин играет существенную роль в развитии аллергических реакций, так как усиливает экспрессию на мембране тучных клеток Fc ϵ RI, а также переключает синтез изотипов иммуноглобулинов с IgM на IgE и IgG4, аутокринно повышает продукцию тучными клетками TSLP [106, 161]. IL-13 связывается с гетеродимерным рецептором для IL-4 (IL-4R α) и специфической IL-13-связывающей цепью (IL-13R α) [63]. За счет общей с IL-4 рецепторной цепью, IL-13 обладает схожими биологическими эффектами. Известно, что уровень IL-13 сильно коррелирует с концентрацией IgE в сыворотке [220]. На экспериментальных животных моделях было показано, что IL-13 способствует формированию гиперреактивности дыхательных путей, гиперплазии бокаловидных клеток и гиперсекреции слизи эпителиальными клетками дыхательных путей [188]. Этот цитокин играет важную роль в поддержании воспаления, так как увеличивает продукцию клетками различных хемокинов (например, CCL11/эотаксин) [19, 62, 147]

Известно, что Th2 типа продуцируют IL-5, который играет ключевую роль в привлечении эозинофилов в очаг воспаления, является их фактором роста. На экспериментальных животных моделях было показано, что введение анти-IL-5-антител приводит к уменьшению количества эозинофилов в дыхательных путях, что ингибирует аллергическую реакцию [56]. Тем не менее, в исследованиях с пациентами, введение меполизумаба (гуманизированное анти-IL-5-антитело) заметно снижает количество эозинофилов в периферической крови и мокроте, но не влияет на гиперреактивность дыхательных путей [60].

У больных БА повышена экспрессия IL-9 и рецепторов к IL-9 в эпителиальных клетках дыхательных путей. Согласно проведенным на мышах

исследованиям, этот цитокин индуцирует воспаление, эозинофилию, гиперреактивность дыхательных путей и продукцию других Th2-цитокинов. Также известно, что IL-9 играет важную роль в дифференцировке и пролиферации тучных клеток [19].

Известно, что синергичное действие TNF α , IL-4, IL-13 повышает синтез TARC/CCL17 (*Thymus- and activation-regulated chemokine*), TSLP и эотаксина эпителиальными клетками дыхательных путей. В результате происходит дополнительная инфильтрация тканей Th2 типа, эозинофилами и дифференцировка дендритных клеток. Кроме того, триптазы и химазы, вырабатываемые тучными клетками, приводят к продукции GM-CSF [162].

На экспериментальных животных моделях и у больных БА в бронхоальвеолярном лаваже и в легочной ткани было обнаружено увеличение содержания IFN γ , который продуцируется Th1 под действием IL-12. Согласно литературным данным, у больных БА повышен сывороточный уровень IL-4, IL-5 и IFN- γ [19], что коррелирует с тяжестью заболевания. IFN γ может синергично действовать с IL-4, IL-5 и IL-13 при развитии воспалительного процесса в тканях.

В иммунопатогнезе БА также вовлечены Treg, продуценты противовоспалительного цитокина IL-10. IL-10 усиливает дифференцировку Th0 в Th2 типа за счет ингибирования пролиферации Th1 или активации Th2 [251]. IL-10 является многофункциональным цитокином, который играет двойственную роль в воспалении. С одной стороны, показан его протективный эффект при бронхиальной астме, так как он обладает противовоспалительной активностью. Этот цитокин ингибирует синтез провоспалительных цитокинов (TNF α , GM-CSF, IL-5 и нескольких хемокинов), уровень которых повышается при аллергически заболеваниях. Снижение концентрации IL-10 может приводить к хроническому воспалению и ремоделированию дыхательных путей. С другой стороны, было выявлено, что у пациентов с БА и в экспериментальной мышинной модели астмы, взаимодействие между MDSC (*myeloid-derived suppressor cell*) и макрофагами приводит к значительному увеличению уровней IL-10 и снижению уровней IL-12,

что способствуют развитию хронического воспаления, наблюдаемого при астме [247].

Известно, что одним из основных звеньев патогенеза БА может являться дисбаланс между Т-хелперами 1-го типа (Th1) и Т-хелперами 2-го типа (Th2), а также дисбаланс между противо- и провоспалительными цитокинами. Согласно классическим представлениям о патогенезе БА наибольшую роль в поддержании воспаления будут играть цитокины, продуцируемые Th2 типа, однако согласно современным литературным источникам, в дальнейшем в поддержании воспаления и формировании различных клинических симптомов могут играть роль и цитокины Th1 типа [1].

1.3.2 Роль цитокинов врожденного иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы

Описано несколько молекулярных механизмов развития различных форм БА, и не все они связаны с адаптивными реакциями, как считалось прежде. Клетками врожденного иммунитета продуцируются различные цитокины, способствующие развитию гиперчувствительности дыхательных путей [102].

Тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP) является цитокином семейства IL-7. У человека ген TSLP локализован на хромосоме 5q22.1. Самые высокие уровни TSLP обнаружены в эпителиальных клетках кожи и легких. Он также вырабатывается фибробластами, эндотелиальными и тучными клетками, макрофагами/моноцитами и дендритными клетками [222]. TSLPR экспрессируется на многих типах клеток, в том числе на миелоидных дендритных клетках (MDCs), CD4+, CD8+ клетках, Treg, В-клетках, тучных клетках, NKT клетках, моноцитах, эозинофилах, базофилах, на гладкой мускулатуре дыхательных путей [222]. Установлено, что у пациентов, страдающих БА, повышена экспрессия генов TSLP в нейтрофилах и макрофагах. Также известно, что экспрессия генов TSLP коррелирует с тяжестью заболевания [241].

У экспериментальных мышей с дефицитом рецептора TSLP значительно ослабевает аллерген-индуцированная гиперчувствительность дыхательных путей

[248]. Выявлено увеличение в периферической крови экспрессии IL-7R α на предшественниках эозинофилов (*eosinophil-lineage committed progenitor*) и TSLPR на базофилах у пациентов с астмой легкой степени тяжести при ингаляции аллергеном [194]. Существует отрицательная корреляция между уровнем экспрессии TSLP и изменением функций легких у больных БА [142].

Показано, что TSLP продуцируется эпителиальными клетками человека в ответ на некоторые лиганды TLR (такие как пептидогликан, липотейхоевая кислота), физическое воздействие или провоспалительные цитокины (IL-1, TNF α) [10]. TSLP непосредственно влияет на NKT клетки человека, индуцируя синтез Th2 типа IL-4 и IL-13 [187, 231, 182].

Показана связь полиморфизмов гена TSLP и аллергической астмы у больных БА [75]. Кроме того, полиморфизмы гена TSLP по-видимому способствуют поляризации иммунного ответа в сторону Th2 типа за счет увеличения экспрессии TSLP эпителиальными клетками бронхов в ответ на вирусные инфекции дыхательных путей [75]. Таким образом, TSLP играет важную роль в инициации аллергического воспаления за счет формирования адаптивного иммунного ответа через активацию врожденного иммунитета.

В патогенезе бронхиальной астмы также играет роль IL-25, являющийся членом семейства IL-17. IL-25 конститутивно экспрессируется эпителиальными клетками, хранится в ядре, и продуцируется под воздействием протеаз (трипсин, папаин, протеазы, входящие в состав аллергенов, например, экстракте HDM) [110]. Также IL-25 синтезируется активированными эозинофилами, тучными клетками, альвеолярными макрофагами, NK клетками, Th2 типа. На различных экспериментальных моделях показано, что IL-25 играет важную роль в патогенезе таких заболеваний, как астма, легочный фиброз, атопический дерматит [13]. Свои эффекты IL-25 опосредует при связывании с гетеродимерным комплексом, состоящим из IL-17RA и IL-17RB. Описано, что IL-25R экспрессируется на АПК, гладкомышечных и эпителиальных клетках дыхательных путей, фибробластах, эозинофилах и NKT клетках. При проведении провокационных тестов у больных бронхиальной астмой с аллергией на клещей домашней пыли (HDM), пыльцу или

кошачью перхоть, установлено увеличение экспрессии IL-25R на тучных клетках, эозинофилах, в слизистой оболочке бронхов и дерме кожи у атопиков [41]. На животных моделях показано, что избыточная экспрессия IL-25 способствует развитию спленомегалии, эозинофилии, повышению уровня IgE, IL-4, IL-5. IL-25 влияет на активацию ILC2 клеток, которые в свою очередь секретируют IL-5, IL-13 [17, 18, 218].

Также у больных БА в мокроте наблюдался высокий уровень IL-17. IL-17 является одним из шести членов семейства IL-17 цитокинов (IL-17A-IL17F). IL-17 экспрессируется не только Th17 типа, но и $\gamma\delta$ T клетками, NKT клетками, нейтрофилами и макрофагами. На некоторых экспериментальных моделях аллергической астмы показано, что IL-17 способствует OVA-индуцированному развитию гиперчувствительности дыхательных путей. У IL-17A дефицитных мышей или мышей с дефицитом рецептора IL-17 нарушается Th2 аллергическое воспаление дыхательных путей. Нейтрализация IL-17 приводит к снижению концентрации воспалительных медиаторов в БАЛе. Был проведен скрининг полиморфизмов в гене IL-17RB на 954 больных БА и 265 здоровых донорах. Авторы пришли к выводу, что редкий аллель IL-17RB может иметь защитную роль в патогенезе бронхиальной астмы [93]. В другом исследовании анализировались 15 SNPs гена IL17RA у 825 здоровых доноров, 143 пациентов с аспирином-индуцированными респираторными заболеваниями и 411 пациентов с аспириновой астмой. Было показано, что минорные аллели трех полиморфизмов уменьшают риск развития аспирином-индуцированных респираторных заболеваний, ослабляя экспрессию гена IL17RA [160].

Важным цитокином врожденного иммунитета, оказывающим влияние на иммунопатогнез БА является IL-33. Ген IL-33 человека находится на хромосоме 9p24. Впервые этот цитокин был описан как ядерный фактор венул высокого эндотелия (NF-HEV), а уже позже – как член семейства IL-1 и лиганд рецептора ST2. IL-33 продуцируется разнообразными клетками организма человека и обладает плеiotропной активностью [31]. Данный цитокин считается важным регулятором защиты слизистых оболочек, так как его высокая экспрессия была

установлена в эпителии и гладкомышечных клетках бронхов и дыхательных путей [175].

IL-33 существует по крайней мере в двух формах – в незрелой форме про-IL-33 (30 кДА) и зрелой форме (18 кДА). В зрелой форме IL-33 биологически активен и действует в качестве «сигнала опасности». Он высвобождается во внеклеточное пространство при повреждении клеток патогенными микроорганизмами или под воздействием другого стимулирующего сигнала, и действует на различные клетки иммунной системы [32].

IL-33 реализует свои эффекты через гетеродимерный рецепторный комплекс, входящий в семейство рецепторов IL-1, рецептор ST2 и белок IL1-RAcP (*the interleukin-1 receptor-accessory protein*). Известны две формы ST2: трансмембранная (ST2L) и растворимая форма sST2. Трансмембранный рецептор к IL-33 экспрессируется на различных клетках иммунной системы, включая ILC клетки, В-лимфоциты и Th2. Действие IL-33 непосредственно на Т-лимфоциты или ILC2 клетки приводит к продукции этими клетками различных цитокинов (IL-5, IL-10, IL-4 и др.), которые способствуют поляризации иммунного ответа в сторону Th2-типа [112]. Вклад IL-33/ST2 взаимодействия в активацию и пролиферацию Th2 также был показан в исследованиях с рекомбинантным белком IL-33 [108].

В настоящее время находят все больше свидетельств тому, что IL-33 играет важную роль в иммунопатогенезе аллергических заболеваний, в частности, бронхиальной астмы. Участие IL-33 в развитии индуцированного овалбумным и папаином воспаления было показано в экспериментальных работах с дефектными по IL-33 мышинными моделями. В дальнейшем стало известно, что IL-33 непосредственно стимулирует ILC2 легких, что приводит к развитию воспаления дыхательных путей [72].

На данный момент известно множество полиморфизмов в генах IL-33 и ST2/IL1RL1, ассоциированных с развитием бронхиальной астмы [143]. Предполагают, что наибольшую роль данный цитокин играет при развитии ремоделирования дыхательных путей у резистентных к терапии больных с

тяжелым течением аллергической БА. При этом известно, что классические противовоспалительные лекарственные средства и глюкокортикостероиды не влияют на экспрессию IL-33 в легочной ткани [180]. Также установлена связь уровня IL-33 с тяжестью течения аллергических заболеваний в работе *Kamekura R. и соавт.*, согласно которой сывороточные уровни IL-33 у больных с перемежающимся ринитом и бронхиальной астмой коррелировали с тяжестью заболевания [97].

Таким образом, согласно последним литературным данным, цитокины, продуцируемые как клетками адаптивного, так и клетками врожденного иммунитета во многом определяют развитие воспаления при бронхиальной астме, а также тяжесть течения заболевания, особенности ремоделирования дыхательных путей, развитие обострений. Цитокиновый дисбаланс в организме человека может определить исход заболевания и прогноз осложнений.

1.4 Современные представления о роли механизмов врожденного иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы

Бронхиальная астма – это хроническое воспалительное заболевание бронхов, сопровождающееся обструкцией дыхательных путей. В клинический синдром входят эпизодические хрипы, одышка, кашель, мокрота и бронхоспазм. В основном заболевание дебютирует в раннем детском возрасте.

По данным ВОЗ астма является самым распространенным хроническим заболеванием среди детей. В настоящее время от астмы страдает около 334 миллионов человек [65]. Стандарты лечения и профилактики бронхиальной астмы позволяют успешно контролировать течение заболевания и включают применение глюкокортикостероидов и бронходилататоров короткого и пролонгированного действия. Несмотря на это, заболеваемость бронхиальной астмой увеличивается с каждым годом. Патогенез бронхиальной астмы достаточно сложен и включает множество различных механизмов. До сих пор меняются взгляды на особенности развития воспалительного процесса при БА, терапию, рассматриваются новые подходы к классификации заболевания.

В отдельных руководствах предложено выделять различные формы астмы в соответствии с причинно-значимым триггером:

- Вирус-индуцированная.
- Вызванная физической нагрузкой.
- Вызванная аллергеном.
- Неизвестного происхождения.

Выделяют астму по клиническим формам в зависимости от сопутствующей патологии (например, астма ожирения); по характеру воспалительного процесса – нейтрофильная и эозинофильная.

В России применяют классификацию по клинико-патогенетическим критериям заболевания [3]:

- Аллергическая БА
- Неаллергическая БА
- Смешанная форма БА

Возможность единой классификации астмы, учитывающей все особенности ее патогенеза, продолжает оставаться предметом дискуссии и требует дальнейшего исследования.

В настоящий момент в клинических руководствах представлена классификация БА согласно с принятой 43-ей Всемирной Ассамблеей Здравоохранения Международной классификацией болезней десятого пересмотра (МКБ-10):

Астма (J45)

- J45.0 Астма с преобладанием аллергического компонента
- J45.1 Неаллергическая астма
- J45.8 Смешанная астма
- J45.9 Астма неуточненная

Аллергическая БА характеризуется более ранним началом заболевания, наличием сенсибилизации к различным аллергенам и повышенным уровнем сывороточного IgE, больше характерна для мужчин [232]. Для этого типа БА характерно локальное воспаление с преимущественной продукцией Th2-

цитокинов (IL-5, IL-4, IL-13), с преобладанием эозинофильной инфильтрации, развитием бронхоспазма как реакции на попадание аэроаллергенов. При постоянном контакте с аэроаллергенами, и под воздействием цитокинового каскада на слизистую оболочку дыхательных путей, формируется гиперреактивность бронхов. Начинаются процессы ремоделирования слизистой оболочки, что в дальнейшем связывают с ослаблением барьерных функций бронхов, из-за чего на более поздних стадиях возможно присоединение инфекции.

Неаллергическая БА характеризуется, как правило, поздним дебютом заболевания, чаще встречается у женщин. Неаллергическая БА обычно требует более высоких доз кортикостероидов для достижения контроля, имеет более тяжелое течение. Неаллергическая БА чаще начинается после тяжелой инфекции верхних и нижних дыхательных путей (например, вируса гриппа). Характеризуется отрицательными кожными пробами и нормальным уровнем сывороточного IgE. При неаллергической БА аллергены не играют очевидной роли в индукции воспалительного процесса в дыхательных путях, механизмы развития данной астмы, в которой, пока не до конца определены [163]. Некоторые источники связывают неаллергическую БА с развитием аутоиммунного воспаления [70].

Смешанная бронхиальная астма сочетает в себе признаки как аллергической, так и неаллергической бронхиальной астмы.

В развитии аллергических заболеваний основную роль отводят адаптивному иммунитету. При первичном контакте с аллергенами происходит фаза сенсибилизации и дифференцировка Th0 в Th2 типа. Th2 типа продуцируют IL-4, IL-5, IL-13. IL-4 играет важнейшую роль в переключении синтеза плазматическими клетками изотипа Ig на IgE, является аутокринным фактором роста тучных клеток. IL-5 является главным фактором привлечения эозинофилов. IL-13 обуславливает ремоделирование слизистых оболочек, усиливает секрецию слизи, поддерживает повышенную активность гладких мышц бронхов, привлекая в эту зону моноциты и нейтрофилы [54, 201].

Продуцируемый под действием цитокинов IgE связывается с FcεRI тучных клеток и базофилов. При повторном воздействии одного и того же аллергена происходит формирование комплекса FcεRI-IgE-аллерген. Это приводит к дегрануляции тучных клеток и базофилов, и выбросу различных медиаторов воспаления (гистамина, лейкотриенов, простагландинов и др.). Индуцируется сокращение гладких мышц бронхов, повышается секреция слизи и увеличивается проницаемость сосудов, что способствует проявлению бронхообструкции [202].

В настоящее время неуклонно растет количество данных, подтверждающих вовлечение врожденного иммунитета в патогенез бронхиальной астмы. Врожденный иммунитет – «первая линия» защиты организма от патогенов экзо- и эндогенного происхождения. Ключевыми рецепторами врожденного иммунитета являются TLR, которые распознают PAMP (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) и DAMP (эндогенные сигналы опасности). Согласно литературным данным, TLR широко экспрессируются на эпителиальных клетках слизистой оболочки дыхательных путей [250]. У TLR двойственная роль в иммунопатогенезе аллергических заболеваний. С одной стороны, действие лигандов в раннем детском возрасте может способствовать дифференцировке CD4⁺ лимфоцитов в Th1 типа и таким образом играть протективную роль. С другой стороны, активация TLR на эпителиальных клетках слизистых оболочек дыхательных путей аллергеном может приводить к продукции клетками TSLP (*Thymic stromal lymphopoietin*), GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), IL-1α, IL-1β, IL-25, IL-33 [49]. В опытах на культурах эпителиальных клеток было установлено, что активация TLR4 приводит к продукции IL-1α, который, в свою очередь, индуцирует выработку GM-CSF и IL-33 [227]. Цитокины, продуцируемые эпителиальными клетками в ответ на активацию TLR обладают плеiotропными эффектами, и их роль в патогенезе аллергических заболеваний продолжает исследоваться. Известно, что TSLP увеличивает экспрессию OX40L, что обеспечивает пролиферацию CD4⁺ лимфоцитов и их дифференцировку в Th2 типа, влияет на продукцию базофилами IL-4, IL-25, IL-13 и выброс медиаторов воспаления, таких как гистамин и

лейкотриен C4 [187]. У больных с первично установленным диагнозом «бронхиальная астма» и отсутствием в анамнезе терапии стероидами в периферической крови, мокроте, БАЛ, в биоптате бронхов, оценивали экспрессию мРНК IL-25. Разделяли пациентов на группу с высокой и низкой экспрессией (IL-25^{high} и IL-25^{low}). В группе больных с IL-25^{high} на основании кожных тестов, уровней IgE в сыворотке и Th2^{high} фенотипа отмечалась более выраженная аллергия с признаками активации эозинофилов и высоким уровнем IL-13 по сравнению с группой IL-25^{low} и здоровыми донорами [35]. Было выявлено, что эндотелиальные клетки сосудов экспрессируют IL-25, а *in vitro* IL-25 способствует пролиферации эндотелиальных клеток и росту микрососудов. Таким образом, предполагают, что IL-25 играет важную роль в ремоделировании дыхательных путей и ангиогенезе [42]. Также в регуляции защиты слизистых оболочек дыхательных путей существенную роль играет IL-33. При повреждении эпителиальных клеток происходит высвобождение IL-33 во внеклеточное пространство, где он играет роль эндогенного «сигнала опасности», в том числе для клеток иммунной системы, в частности ILC2 клеток – врожденных лимфоидных клеток [32].

По последним данным ILC2 являются непосредственными участниками развития аллергического воспаления. Врожденные лимфоидные клетки были открыты около десяти лет назад. По своему строению ILCs клетки морфологически похожи на Т-клетки, однако на их мембране не экспрессируются маркеры, характерные для НК-клеток, В- и Т-лимфоцитов. ILCs впервые были обнаружены в барьерных тканях, однако сейчас известно, что эти лимфоциты повсеместно распространены в организме. ILCs, как и обычные лимфоциты, происходит от общего лимфоидного предшественника (CLP). Для созревания ILCs требуются такие же факторы транскрипции, как и для Th. В частности, T-bet для ILC1 и Th1, GATA-3 для ILC2 и Th2 и ROR γ для ILC3 и Th17 [197]. Однако по мере созревания и под воздействием факторов микроокружения, пути «обычных» лимфоцитов системы адаптивного иммунитета и ILC-клеток расходятся. ILC-клетки являются важным источником Th1-, Th2-, Th17-

цитокинов, и названы соответственно ILC1 (IFN γ и TNF α), ILC2 (IL-5, IL-9 и IL-13), ILC3 (IL-17A, IL-22, GM-CSF и TNF α) [196].

Огромный вклад в изучение роли ILCs в иммунопатогенезе БА внесли работы на экспериментальной модели астмы у мышей. Было показано, что при индукции аллергии на HDM или OVA, ILC2 продуцируют IL-5 и IL-13 [105]. После стимуляции папаином или гельминтозной инфекцией, легочные ILC2 мышей продуцируют IL-9 [17, 105, 218]. IL-9 в свою очередь способствует поддержанию популяции ILC2, а также способствует накоплению тучных клеток, эозинофилов в дыхательных путях и гиперпродукции слизи бокаловидными клетками. Было показано, что ILC2 экспрессируют на своей поверхности IL17RB, рецептор для IL-25, и ST2 (IL1RL1), рецептор IL-33 [152]. Интраназальное применение IL-25 или IL-33 у мышей приводит к активации и пролиферации ILC2. В результате наблюдается развитие гиперреактивности дыхательных путей и гиперплазия бокаловидных клеток без участия механизмов адаптивного иммунитета [18, 105].

У человека ILC2 идентифицированы в различных тканях, включая ткань легких, носовых пазухах больных риносинуситом, а также в периферической крови. При этом показано, что концентрация ILC2 в крови больных бронхиальной астмой выше, чем у здоровых доноров. В присутствии IL-25 и IL-33, ILC2 исследуемых пациентов с бронхиальной астмой продуцировали большее количество IL-5, IL-13 по сравнению с контрольной группой [20].

Интересно также, что ILC2, экспрессирующие цистеин-лейкотриеновый рецептор (CysLT1R), продуцируют не только IL-5, IL-13, но и IL-4 при стимуляции лейкотриеном D4 (LTD4) [48]. Известно, что лейкотриены важные медиаторы воспаления при астме [192], и таким образом, ILC2 являются дополнительным участником их деятельности. В исследованиях, сосредоточенных на роли ILC2 в иммунопатогенезе бронхиальной астмы с использованием экспериментальных животных моделей и кратковременным воздействием аллергенов, речь идет о так называемом «врожденном типе астмы».

Роль ILC2 в хронической астме и рецидивирующем воспалении дыхательных путей не до конца изучена.

Непосредственное участие в воспалительных процессах при бронхиальной астме играют макрофаги и моноциты периферической крови. Известно, что моноциты и макрофаги широко экспрессируют на своей поверхности TLR. Более того, с TLR4 функционально связан один из основных маркеров моноцитов и макрофагов – молекула CD14. В опытах на мышинных моделях было показано, что при развитии HDM-индуцированной бронхиальной астмы отмечалась активация альвеолярных макрофагов, выражающаяся в усилении экспрессии костимулирующих молекул, CD40 и CD86. Была установлена сильная корреляция между усилением экспрессии CD40 и CD86 и активацией TLR4 [44, 84].

Макрофаги легких представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, в которую входят альвеолярные и интерстициальные макрофаги. Легочные макрофаги выполняют несколько функций, например поддержание стерильности дыхательных путей [28].

Альвеолярные макрофаги происходят либо из циркулирующих моноцитов периферической крови, либо из интерстициальных макрофагов. После контакта с патогеном в зависимости от цитокинового микроокружения альвеолярные макрофаги могут пойти по классическому пути дифференцировки, M1 тип, или по альтернативному пути, M2 тип [91]. M1 макрофаги играют большую роль при неаллергической бронхиальной астме, а M2 макрофаги – при аллергической бронхиальной астме [170].

M1 макрофаги являются провоспалительными. Индукция M1 макрофагов IFN γ и ЛПС приводит к продукции оксида азота, TNF α , TNF- β , IL-1 β , IL-6 и IL-12 [91]. При этом все больше данных, что M1 макрофаги, продуцируя IL-1 β и IL-6, усугубляют Th2-воспаление, способствуют активации фибробластов [206]. На экспериментальной животной модели показано, что продукция M1 макрофагами IL-1 β , IL-6 и TNF α индуцирует продукцию Th2 цитокинов [80]. При этом, у больных тяжелой бронхиальной астмой, резистентных к лечению глюкокортикостероидами, популяции макрофагов смещены в сторону M1 [103].

Эти клетки продуцируют $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ и оксид азота (NO), таким образом усугубляя повреждение легких и ускоряя ремоделирование дыхательных путей.

Альтернативно активированные M2 макрофаги, под воздействием IL-4, IL-13, вырабатываемых Th2 клетками, продуцируют IL-10 и $\text{TGF-}\beta$ [68]. Среди M2 макрофагов выделяют несколько подтипов, среди которых принципиальную роль в развитии аллергического воспаления могут играть M2a макрофаги. Данный тип клеток принимает участие в поляризации Th2 иммунного ответа и ремоделировании тканей, за счет высокой продукции IL-4 и IL-13. Помимо этого, CCL-17, CCL-18, CCL-22 и эотаксин-2, которые также вырабатываются M2 клетками, усиливают привлечение Th2-лимфоцитов и эозинофилов в легкие [203].

Показана более существенная роль циркулирующих моноцитов, чем альвеолярных макрофагов, в поддержании аллергического воспаления [203]. Согласно экспериментальному исследованию, при удалении циркулирующих моноцитов, в БАЛе существенно снижался уровень $\text{TGF-}\beta$. Циркулирующие моноциты периферической крови являются продуцентами IL-5, являющегося хемоаттрактантом для эозинофилов [244]. Также, в эксперименте на мышах было установлено, что именно циркулирующие моноциты, привлеченные в ткани легкого в ответ на аллергены клещей домашней пыли, в больших количествах вырабатывают IL-33 [203].

Таким образом, согласно современным представлениям о патогенезе бронхиальной астмы, в развитии и поддержании воспаления дыхательных путей играет множество клеточных и гуморальных факторов врожденного иммунитета. Индукция механизмов врожденного иммунитета с одной стороны вносит собственный вклад в поддержание воспаления, а с другой – активирует клетки адаптивного иммунитета (рис. 5).

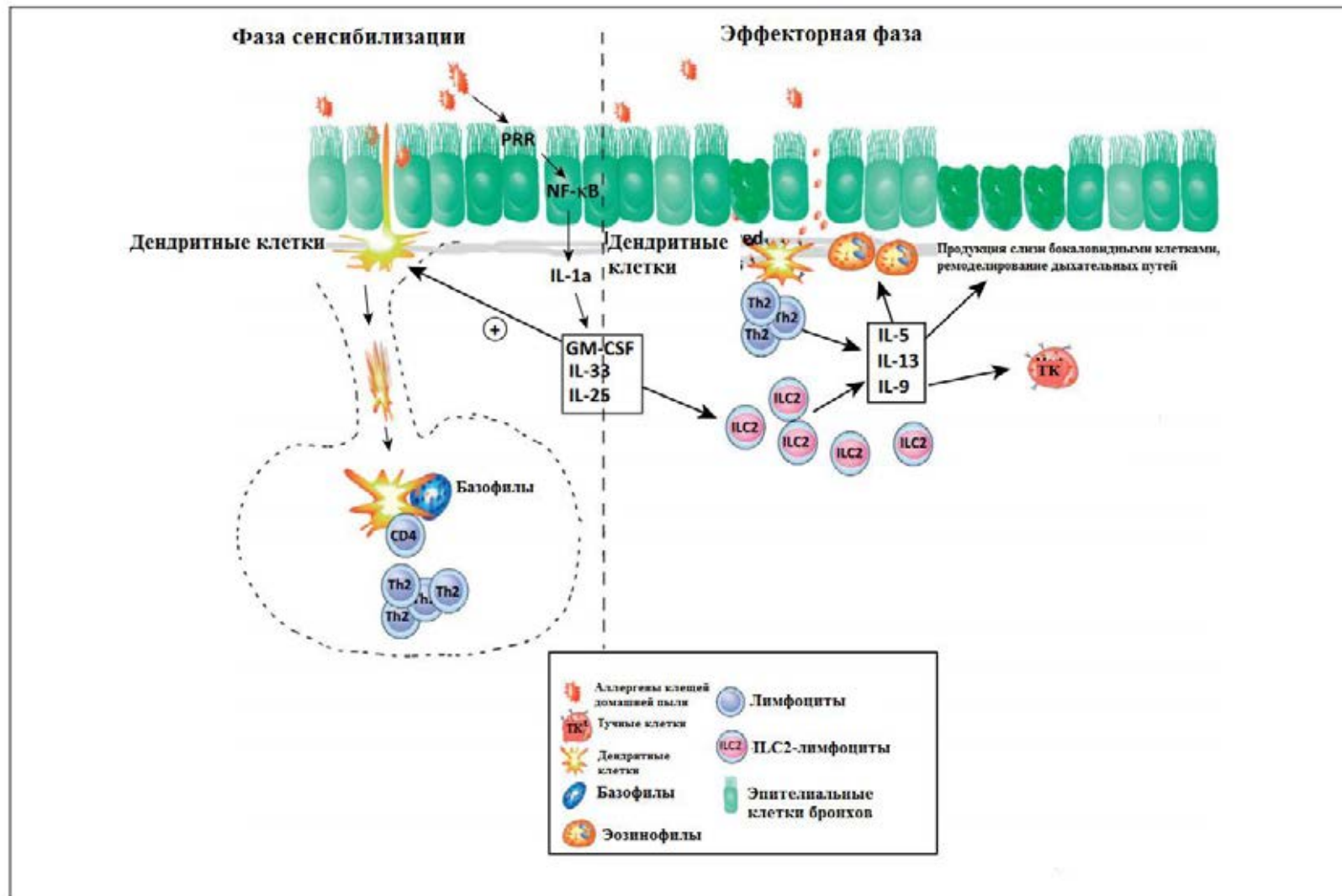


Рисунок 5. Роль факторов врожденного иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы (модифицировано из Deckers J., 2013) [47].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

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

Группа здоровых доноров составила 30 человек от 18 до 45 лет, среди них 14 мужчин и 16 женщин. Кровь была предоставлена отделением переливания крови и гравитационной хирургии РДКБ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Группа больных контролируемой БА легкого и среднетяжелого течения составила 77 человек.

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 отделение иммунопатологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России в соответствии с принятой Международной классификацией болезней десятого пересмотра (МКБ-10). Все пациенты получали базисную терапию, предусмотренную протоколом ведения больных БА, в соответствии с

верифицированным диагнозом и степенью тяжести заболевания (GINA 2015) [64].

В соответствии с выбранными критериями были отобраны больные контролируемой БА легкого и среднетяжелого течения заболевания. Учитывалась клиническая картина пациентов, жалобы и анамнестические данные; проводилось клинико-функциональное обследование с целью оценки обратимости обструкции дыхательных путей, специфическое аллергологическое обследование (определение уровня специфического IgE и результаты кожных тестов с аллергеном). Дифференциальная диагностика проводилась в соответствии с действующими клиническими рекомендациями (2016 г, РААКИ). Пациентов разделяли на 3 группы с учетом МКБ-10.

I 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.

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).

В данную группу входили пациенты с поливалентной сенсibilизацией к аллергенам пыльцы деревьев и сорных трав (n=17), пациенты с поливалентной сенсibilизацией к аллергенам деревьев, сорных трав и бытовым аллергенам (n=16), а также группа пациентов с сенсibilизацией только к бытовым аллергенам, имеющих круглогодичный характер заболевания (n=16).

II группу составили больные контролируемой смешанной бронхиальной астмой среднетяжелого течения заболевания (n=17) в возрасте 28-61 года, среди них 4 мужчины и 13 женщин.

У пациентов в данной группе 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). Все 17 пациентов имели поливалентную сенсibilизацию к аллергенам деревьев и сорных трав. 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.

III группу больных составили больные контролируемой неаллергической бронхиальной астмой среднетяжелого течения заболевания (n=11) в возрасте 20-65 лет, среди них 1 мужчина и 10 женщин.

У пациентов данной группы отсутствовали данные о наличии атопии (отрицательные кожные пробы/отсутствие специфического сывороточного IgE). Ведущий компонент воспаления – инфекция (обострения в зимне-осенний период на фоне инфекционных заболеваний). Из данной группы исключены такие диагнозы как астматическая триада, астма физической нагрузки.

Кровь забирали из кубитальной вены в гепаринизированные пробирки, (гепарин, из расчета 25 ед. на 1 мл крови). Забор крови осуществлялся утром, натощак.

Все обследуемые, включенные в исследование, подписывали информированное согласие. Исследование одобрено Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

2.2 Разработка дизайна исследования

На кафедре иммунологии медико-биологического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова ведутся исследования роли TLR при различных иммуноопосредованных заболеваниях. Был разработан метод оценки функциональной активности TLR по индуцированной лигандами соответствующих рецепторов выработке $\text{TNF}\alpha$ МНК периферической крови [2]. Для оценки вклада TLR в иммунопатогенез бронхиальной астмы исследование проводилось на трех группах больных контролируемой БА:

I группа – больные аллергической БА (АБА) легкого и среднетяжелого течения заболевания;

II группа - больные смешанной БА (СБА) среднетяжелого течения заболевания;

III группа - больные неаллергической БА (НБА) среднетяжелого течения заболевания.

Согласно литературе, TLR2 и TLR4 в наибольшей степени вовлечены в патогенез бронхиальной астмы [14], однако данные носят противоречивый и разрозненный характер [23, 36]. TLR экспрессируются на большинстве клеток врожденного иммунитета, осуществляющих «первую линию» защиты от патогенов [173]. У данных рецепторов наиболее широкий спектр лигандов, включая аллергены (например, аллерген клещей домашней пыли, Der p) [207, 213].

Для оценки вклада TLR2 и TLR4 в иммунопатогенез бронхиальной астмы был разработан дизайн эксперимента (рис. 6), включающий три основных этапа.

На первом этапе работы изучалась экспрессия генов *TLR2* и *TLR4* в мононуклеарных клетках методом ПЦР-РВ.

На втором этапе оценивалась экспрессия выбранных рецепторов на CD14^+ моноцитах. Определялся процент CD14^+ моноцитов, экспрессирующих TLR2 или TLR4, а также средняя интенсивность флюоресценции (СИФ) данных

рецепторов на выбранной популяции клеток методом проточной цитофлюорометрии.

На третьем этапе оценивалась функциональная активность TLR2 и TLR4 по лиганд-индуцированной продукции $\text{TNF}\alpha$ МНК периферической крови.

Для этой цели МНК у больных БА и здоровых доноров стимулировали агонистами TLR2 и TLR4, пептидогликаном, липополисахаридом и Der p, соответственно. Пептидогликан – это основной компонент клеточной стенки грамположительных бактерий, а липополисахарид - это важный компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Der p - аллерген клещей домашней пыли, обладающий мимикрией к молекуле MD2. Выбранные для стимуляции TLR2 и TLR4 лиганды наиболее показательны, являются ключевыми лигандами соответствующих TLR, повсеместно встречаются в окружающей среде.

Также изучалась спонтанная и TLR2-, TLR4-индуцированная продукция про- и противовоспалительных цитокинов (IL-18, IL-33, IL-10, IL-4, IL-13) мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных бронхиальной астмой.

Данный подход позволил расширить наши представления о роли механизмов врожденного иммунитета в иммунопатогенезе контролируемой бронхиальной астмы разных форм легкого и среднетяжелого течения.

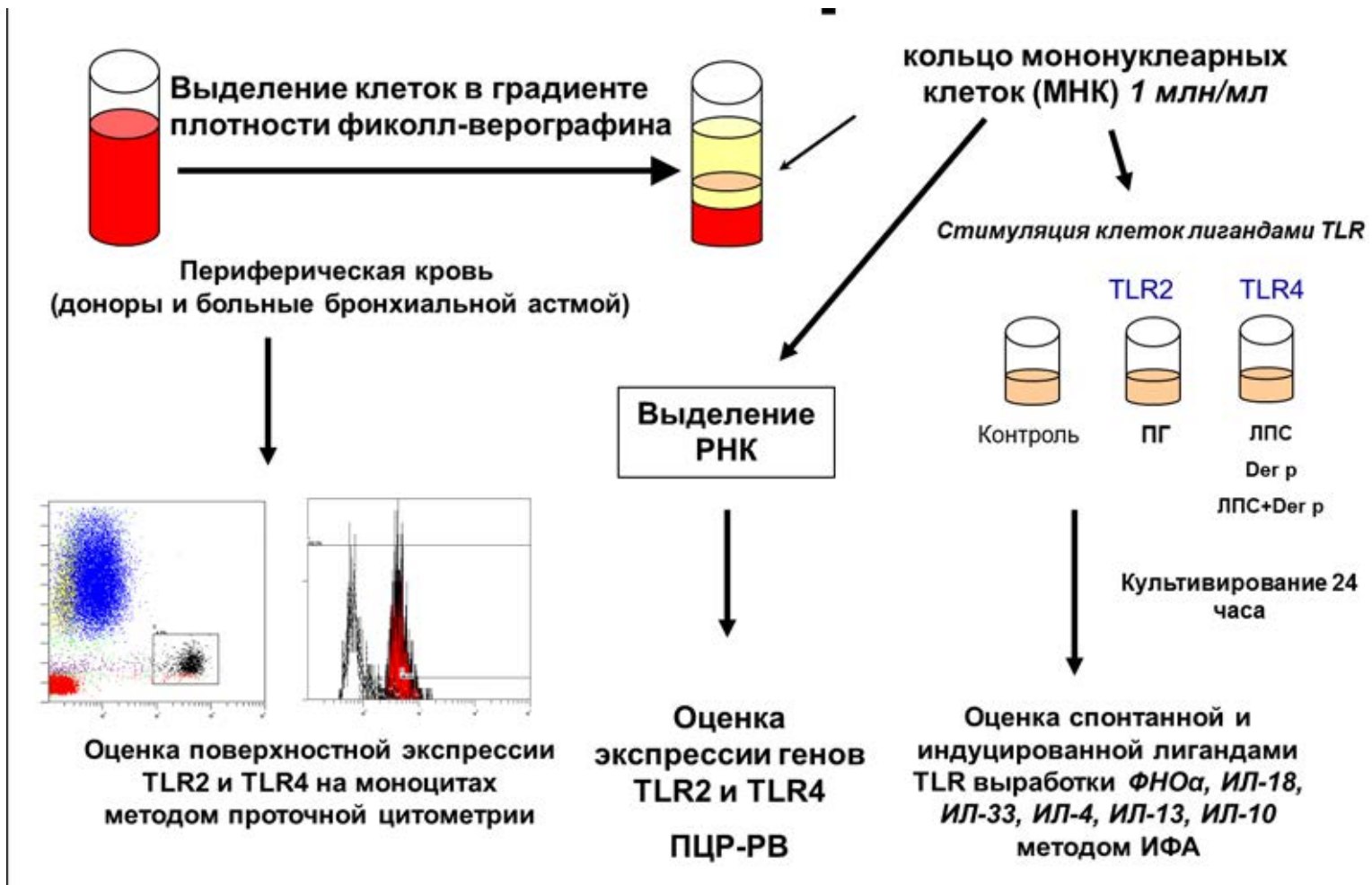


Рисунок 6. Дизайн эксперимента

2.3. Реактивы

1. Среда RPMI 1640 (HyClone, U.S.)
2. L-глутамин (НПП «ПанЭко», Россия)
3. Эмбриональная телячья сыворотка (Sigma, США)
4. Гентамицина сульфат (ОАО «Дальхимфарм», г. Хабаровск)
5. Пептидогликан; *Staphylococcus aureus* (InvivoGen, США)
6. Липополисахарид; *E.coli* 0111:B4 (Sigma, США)
7. Аллерген из клеща *Dermatophagoides pteronissinus* для диагностики и лечения («Биомед им. Н.И. Мечникова», Россия)
8. Наборы для иммуноферментного анализа (e-Biosciences, США)
9. Лизирующий раствор IOtest 3 LysingSolution (BeckmanCoulter, США)
10. Моноклональные антитела к CD45, конъюгированные с флуоресцентной меткой с ECD, («e-Biosciences», США)
11. Моноклональные антитела к CD14, конъюгированные с флуоресцентной меткой APC («e-Biosciences», США)
12. Моноклональные антитела к CD284 (TLR4), конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa Flour 488, («e-Biosciences», США)
13. Мышиный IgG2a, меченный Alex Flour 488 (Изотипический контроль), («e-Biosciences», США)
14. Раствор Хенкса (НПП «ПанЭко», Россия)
15. Раствор для стабилизации РНК –RNAlater RNA stabilization reagent”, (QIAGEN)
16. Набор для выделения РНК RNeasy Protect Cell Reagent (QIAGEN)
17. Набор для проведения реакции обратной транскрипции (Синтол, РФ)
18. Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии «SYBR Green I» и праймеров (Синтол, РФ).

2.4. Анализ экспрессии TLR2 и TLR4 на поверхности моноцитов методом проточной цитофлуориметрии

Изучение экспрессии TLR2 и TLR4 на CD14⁺ моноцитах периферической крови проводили методом проточной цитофлуориметрии. Для этого 100 мкл цельной крови инкубировали в течение 10 минут с мечеными моноклональными антителами (МАТ), затем осуществляли лизис эритроцитов с помощью лизирующего раствора IOTest 3 Lysing Solution (Beckman Coulter, США), после чего клетки дважды отмывали при 1000 об/мин в растворе Хенкса. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter «Navios» (Beckman Coulter, Inc. США). В каждом образце было проанализировано не менее 100000 событий. 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»). Оценивали процент CD14⁺-моноцитов, экспрессирующих TLR2 или TLR4 (рис. 7), а также среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) этих рецепторов на CD14⁺-моноцитах периферической крови у больных бронхиальной астмой и здоровых доноров (рис. 8). Среднюю интенсивность флуоресценции рассчитывали как отношение интенсивности флуоресценции образца, TLR2⁺ или TLR4⁺, к интенсивности флуоресценции изотипического контроля.

Показатель средней интенсивности флуоресценции клеток отражает количество исследуемых рецепторов, с которыми связались моноклональные антитела с соответствующей флуоресцентной меткой. Таким образом, СИФ прямо пропорционален экспрессии рецепторов на поверхности клеток.

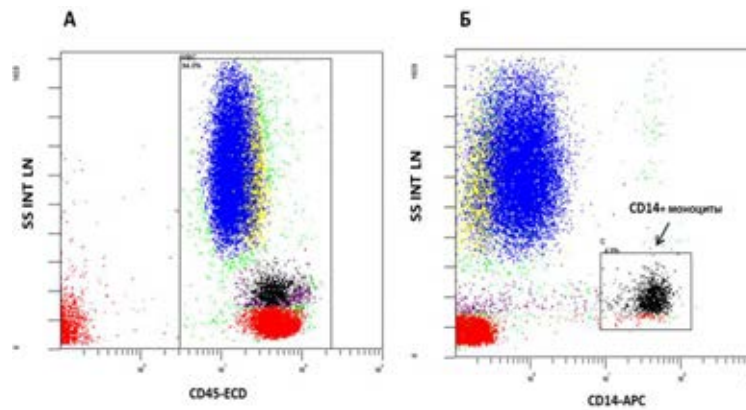


Рисунок 7. Типичные диаграммы Dot Plot: А. *Dot Plot* с выделенным гейтом WBC. Б. *Dot Plot* с выделенным гейтом CD14⁺ моноцитов.

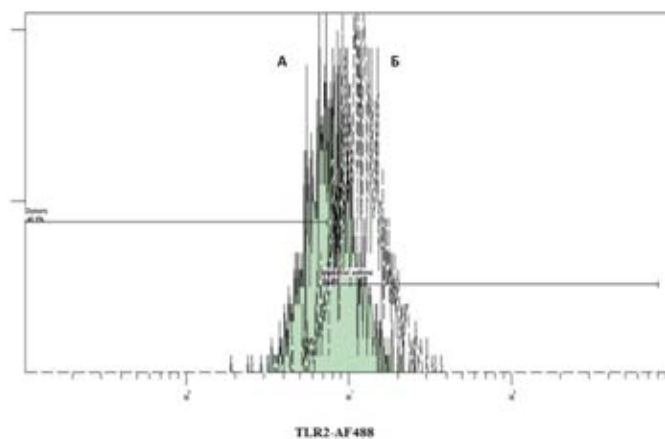


Рисунок 8. Типичная гистограмма свечения TLR2 на CD14⁺ моноцитах периферической крови здоровых доноров (А) по сравнению больными БА (Б).

2.5. Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови человека

Мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови человека в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина (метод Воум).

В стерильных условиях 10 мл гепаринизированной крови разводили в 3 раза культуральной средой PRMI-1640 при комнатной температуре. Разведенную кровь тщательно перемешивали и наслаивали на раствор фиколл-урографина (1,077 г/см³), в соотношении 1:3, после чего центрифугировали в течение 45 минут при 1700 об/мин. После центрифугирования собирали интерфазное кольцо, содержащее кольцо мононуклеарных клеток. Трижды отмывали МНК в среде

RPMI 1640 при 1500 об/мин. в течение 15 минут. Выделенные МНК ресуспендировали в 1 мл среды RPMI 1640. Для подсчета выделенных из периферической крови моноклеарных клеток использовали камеру Горяева. Жизнеспособность клеток оценивали путем окрашивания клеток 0,1% раствором трипанового синего. Жизнеспособность клеток после выделения и культивирования была выше 95%.

2.6. Культивирование МНК периферической крови человека

Для дальнейшей работы использовали МНК периферической крови в концентрации 1×10^6 /мл. Клетки стимулировали лигандами TLR2 и TLR4. В качестве лиганда TLR2 использовали пептидогликан (*Staphylococcus aureus*, «InvivoGen») в концентрации 2,5 мкг/мл; в качестве лигандов TLR4 использовали липополисахарид (*E.coli* 0111:B4, «Sigma») 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). МНК культивировали в полной среде RPMI 1640, содержащей антибиотик – гентамицин (100 мкг/мл), 5% эмбриональную телячью сыворотку и L-глутамин. После стимуляции клетки культивировали в течение 24 часов в CO₂-инкубаторе (t=37°C, CO₂ 5%). В качестве контроля использовали МНК, культивированные только в полной среде RPMI 1640. По окончании культивирования стимулированные лигандами TLR2 и TLR4 МНК осаждали центрифугированием (15 минут, 1000 об/мин). Полученные супернатанты хранили не более 3 месяцев при -70°C.

2.7. Определение концентрации цитокинов в культуральных супернатантах методом иммуноферментного анализа

Для определения концентрации цитокинов (TNF α , IL-18, IL-33, IL-4, IL-13, IL-10) в полученных супернатантах МНК периферической крови использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа (коммерческие наборы для иммуноферментного анализа фирмы e-Biosciences (США)). **Принцип метода** основывается на связывании исследуемых веществ (цитокинов) со

специфическими антителами, сорбированными в ячейках планшета. Добавляемый конъюгат - биотинилированные поликлональные антицитокиновые антитела, связывают цитокин, захваченный первыми антителами. После инкубации и промывки из ячеек удаляется несвязавшийся биотиновый конъюгат, и в ячейки добавляется конъюгат стрептавидин-пероксидазы, связывающий биотин, конъюгированный с антителами к цитокинам. После второй инкубации и промывки из ячеек удаляется несвязавшийся стрептавидиновый конъюгат, и в ячейки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора.

Анализ проводился согласно методике, описанной в инструкции.

Результаты учитывали на микропланшетном фотометре Anthos 2020 (BCA, Lowry, Bradford) при длине волны 450 нм. На основании данных полученных для стандартных образцов автоматически строилась калибровочная кривая, по которой затем определяли концентрацию цитокинов в образцах.

Примеры калибровочных кривых, полученных в ходе исследования, представлены на рисунках 9, 10.

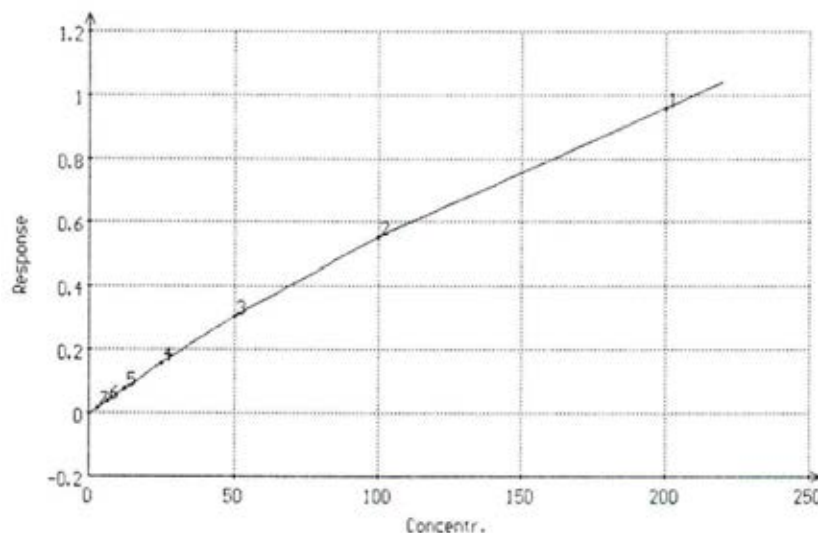


Рисунок 9. Типичный вид калибровочной кривой: ось абсцисс - концентрация цитокина (IL-10 (пг/мл)) в известных стандартах, ось ординат - оптическая плотность исследуемого образца с неизвестной концентрацией.

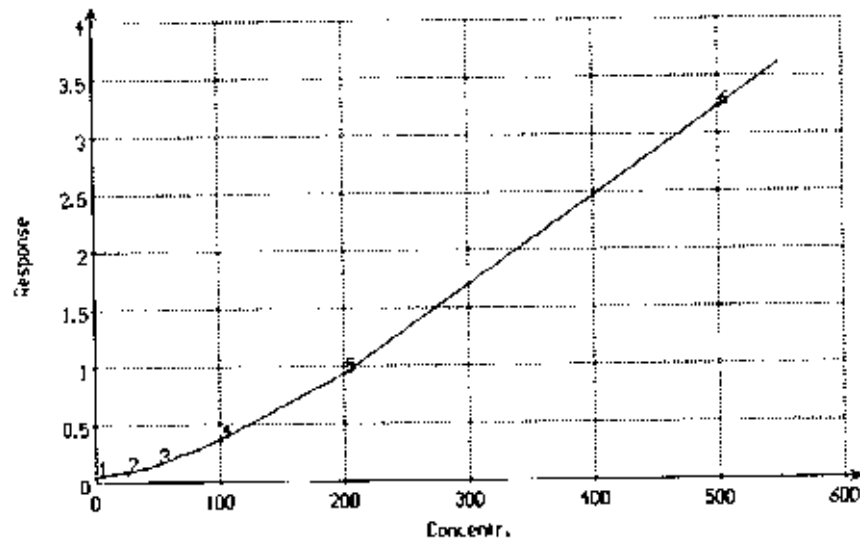


Рисунок 10. Типичный вид калибровочной кривой: ось абсцисс - концентрация цитокина (IL-33 (пг/мл)) в известных стандартах, ось ординат - оптическая плотность исследуемого образца с неизвестной концентрацией.

2.8. Оценка экспрессии генов TLR2, TLR4 в мононуклеарных клетках периферической крови человека

2.8.1 Выделение РНК из мононуклеарных клеток периферической крови человека

Выделенные мононуклеарные клетки периферической крови стабилизировали с помощью реагента RNeasy Protect Cell Reagent (QIAGEN). Реагент RNeasy Protect Cell Reagent добавляли к мононуклеарным клеткам периферической крови, находящимся в среде, сразу после их получения. Для выделения РНК использовали по 1 млн клеток от каждого исследуемого образца. Клетки, смешанные с реагентом RNeasy Protect Cell Reagent, хранили при температуре -70°C .

Выделение РНК из мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров и больных бронхиальной астмой проводили с использованием наборов для выделения РНК на колонках "RNeasy Plus Mini Kit" (QIAGEN) строго в соответствии с инструкцией производителя. Для обеспечения сохранности РНК на каждый 1 мл буфера RT plus было добавлено 10 мкл β -МЭ (β – меркаптоэтанол). Рабочий раствор из концентрированного буфера RPE был

получен путем добавления 4 объемов 96-100% этанола. На первом этапе выделения РНК моноклеарные клетки, смешанные с RNeasy Protect Cell Reagent, осаждали центрифугированием (5 минут, 5000g), после чего к клеткам добавляли лизирующий буфер (350 мкл RLT Plus). На втором этапе к полученному элюанту добавляли 1 объем 70% этанола, ресуспендировали и согласно инструкции фирмы-производителя проводили очистку от геномной ДНК на колонках (RNeasy). На третьем этапе проводили элюцию РНК в раствор (центрифугированием образца на колонке RNeasy в 50 мкл воды без РНКаз в течение 1 минуты при $\geq 10\,000$ об/мин).

Концентрацию выделенной РНК измеряли при помощи спектрофотометра (NanoDrop 2000, «Thermo Fisher Scientific»). Концентрация образцов доноров и больных была в пределах от 120 до 380 нг/мкл.

2.8.2 Проведение реакции обратной транскрипции

Для проведения реакции обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) использовали «Набор для проведения реакции обратной транскрипции» (Синтол, РФ). Постановка реакции ОТ проводится в два последовательных этапа с приготовлением смеси №1 и смеси №2. Реактивы для реакции добавляли по стандартной схеме (таб.2, 3).

Таблица 2 . Расход реагентов для приготовления реакционной смеси №1 при проведении реакции ОТ.

Реагент	мкл
Праймер Random-6, 15 ОЕ/мл (шестичленные олигонуклеотиды со случайной последовательностью)	1
Праймер Oligo(dT)15, 15 ОЕ/мл	1
ddH ₂ O	3
мРНК	5
ddH ₂ O (отрицательный контроль)	5
Итоговый объем	10

Таблица 3. Расход реагентов для приготовления реакционной смеси №2 при проведении реакции ОТ.

реагент	количество (мкл)
MMLV-RT, 50 ед/мкл	1
2,5X Реакционная смесь	10
ddH ₂ O	4
Итоговый объем	15

После внесения образцов пробирку со смесью №1 инкубировались в течение 3 минут при 75°C (Step 1), в дальнейшем пробирки охлаждали до 4°C и при 4°C в них вносили по 15 мкл смеси №2 (Step2, Step3). В таблице 4 представлен режим обратной транскрипции.

Таблица 4. Температурно-временной режим обратной транскрипции.

	Step1	Step2	Step3
Temperature (° C)	75	37	95
Time (min)	3	40	10

2.8.3 Постановка полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени

Для определения экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* использовали метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Реакцию проводили с применением «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» и праймеров, синтезированных на фирме «Синтол», РФ. Детекцию результатов проводили с помощью амплификатора ДТ—96 (ДНК-технологии, Россия). Системы для определения экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* были отработаны ранее на кафедре иммунологии МБФ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Объемы реактивов для проведения ПЦР-РВ представлены в таблице 5, температурно-временной режим программы для проведения ПЦР-РВ представлен в таблице 6.

Таблица 5. Объемы реактивов для приготовления реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ

Приготовление смеси для ПЦР-РВ	Объем, мкл
Прямой праймер (TLR2/TLR4/ GAPDH), 10 пкмоль/мкл	1
Обратный праймер (TLR2/TLR4/ GAPDH), 10 пкмоль/мкл	1
Taq ДНК-полимераза, 5Е/мкл	0,3
dNTP, 2,5 мМ	2,5
10 х буфер SYBR Green I	2,5
MgCl ₂ , 25 мМ	2,5
dd H ₂ O	2,5
Общий объем смеси на 1 пробу	12

Уровни экспрессии TLR контролировали (стандартизировали) по гену GAPDH за счет сходной экспрессии этого гена в мононуклеарных клетках человека.

Таблица 6. Температурно-временной режим программы для проведения ПЦР-РВ

Температура	Время	Циклы
95,0°C	4 мин	-
94,0°C	20 сек	} 40 циклов
Tm	40 сек	

Экспрессию генов TLR оценивали в относительных единицах (OE) по методу $\Delta\Delta C_t$ относительно эндогенного контроля (ген GAPDH) [128, 184].

2.9. Статистическая обработка результатов

Обработка полученных данных проводилась в программном пакете StatSoft Statistica 6.0 и GraphPad Prism 5. При обработке результатов пользовались стандартными статистическими методами.

Использовался критерий хи-квадрат для оценки нормального распределения. Оценивалась равенность дисперсий в исследуемых выборках. Поскольку соответствие нормальному распределению и равенность дисперсий выполнялась не во всех группах, то 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 ($p < 0,05$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ экспрессии генов *TLR2*, *TLR4* в мононуклеарных клетках периферической крови больных бронхиальной астмой

На первом этапе исследования определяли экспрессию генов *TLR2* и *TLR4* в 3-х группах больных контролируемой бронхиальной астмой легкого и среднетяжелого течения по сравнению со здоровыми донорами.

Выявили, что у больных аллергической бронхиальной астмой экспрессия гена *TLR2* в 2,3 раза превышает уровень экспрессии этого рецептора у здоровых доноров ($p < 0,05$). В группе пациентов со смешанной бронхиальной астмой в мононуклеарных клетках периферической крови экспрессия гена *TLR2* в 2,8 раза выше по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). У пациентов, страдающих неаллергической БА, экспрессия гена *TLR2* в 2,5 раз выше по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). Данные представлены на рисунке 11.

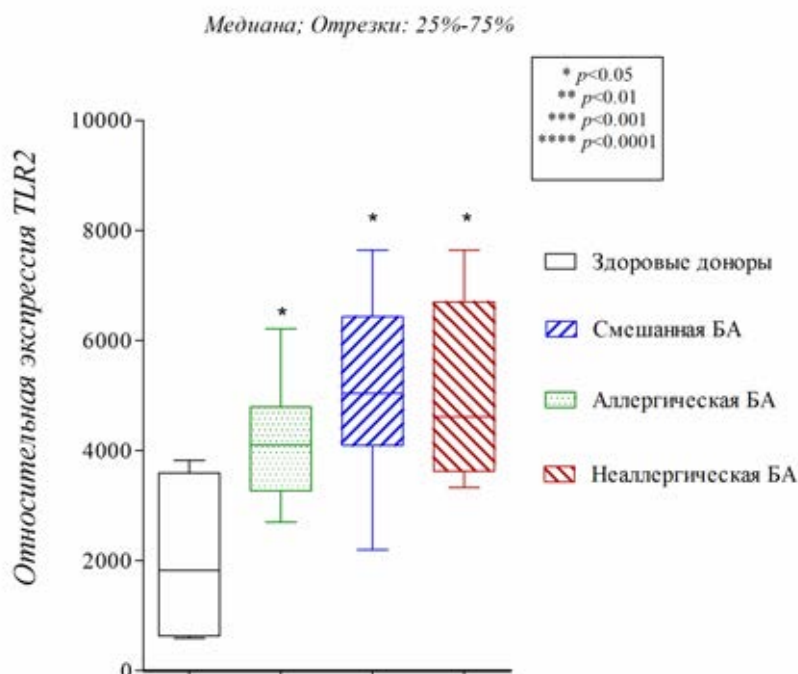


Рисунок 11. Экспрессия гена *TLR2* в мононуклеарных клетках здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

Достоверное увеличение экспрессии гена *TLR2* в мононуклеарных клетках периферической крови было установлено как для больных аллергической БА легкой степени тяжести (в 2 раза), так и для больных аллергической БА среднетяжелого течения заболевания (в 2,4 раз) (рис. 12).



Рисунок 12. Экспрессия гена *TLR2* в мононуклеарных клетках здоровых доноров, больных легкой и среднетяжелой аллергической бронхиальной астмой.

Экспрессия гена *TLR4* в МНК периферической крови больных аллергической БА превышала показатели в группе здоровых доноров в 1,9 раз. В группе пациентов со смешанной бронхиальной астмой в мононуклеарных клетках периферической крови экспрессия гена *TLR4* в 3,4 раза выше по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$), у больных неаллергической БА - в 2,5 раза ($p < 0,05$, рис. 13).

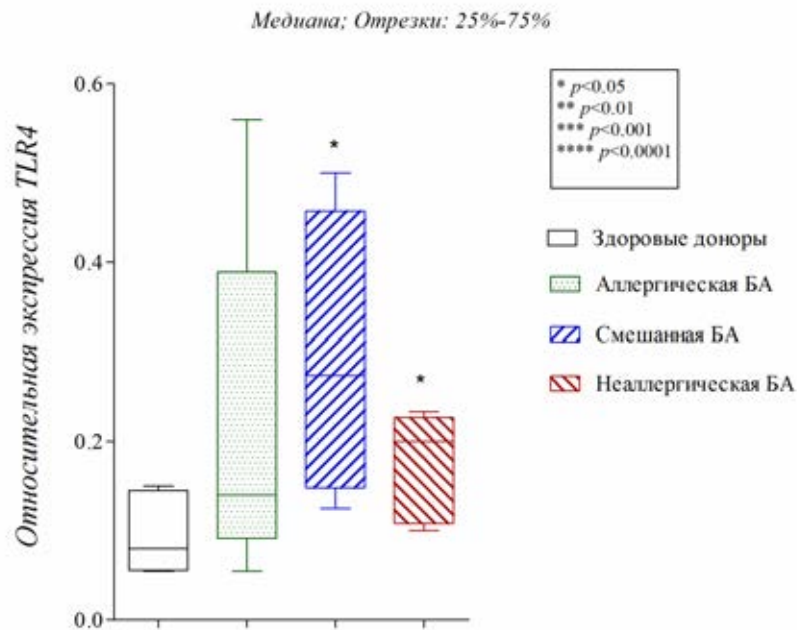


Рисунок 13. Экспрессия гена *TLR4* в мононуклеарных клетках здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

В дальнейшем изучали уровень экспрессия гена *TLR4* в МНК периферической крови у больных контролируемой аллергической БА в зависимости от степени тяжести заболевания по сравнению с группой здоровых доноров.

Было выявлено, что у пациентов со среднетяжелым течением заболевания уровень экспрессии гена *TLR4* в МНК периферической крови в 5 раз выше по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$, рис 14). Таким образом, было установлено, что при аллергической бронхиальной астме среднетяжелого течения заболевания уровень экспрессии гена *TLR4* в МНК наиболее высокий.

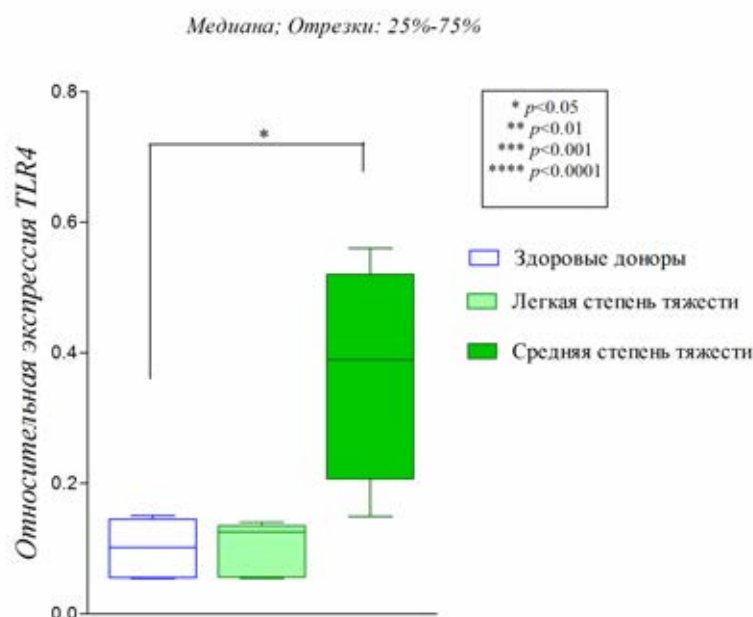


Рисунок 14. Экспрессия гена *TLR4* в мононуклеарных клетках здоровых доноров, больных легкой и среднетяжелой аллергической бронхиальной астмой.

Известно, что *TLR2* и *TLR4* хорошо представлены на различных гемопоэтических и негемопоэтических клетках, таких как моноциты/макрофаги, эпителиальные клетки и пр. Эти клетки первыми взаимодействуют с патогенами, как бактериальной/вирусной природы, так и различными аллергенами (например, аллергены клещей домашней пыли, *Der p*) [208]. Высокий уровень экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* может свидетельствовать о вовлечении данных рецепторов в патогенез заболевания, активации механизмов врожденного иммунитета при развитии бронхиальной астмы. Повышение экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в МНК периферической крови больных БА может быть обусловлено различными факторами. У больных неаллергической и смешанной астмой повышение экспрессии генов данных рецепторов может быть связано с распознаванием лигандов различных патогенов. У больных аллергической БА – с постоянным контактом с аллергенами.

3.2 Определение экспрессии TLR2, TLR4 на поверхности моноцитов периферической крови больных бронхиальной астмой

Анализ экспрессии TLR на CD14⁺ моноцитах периферической крови проводили методом проточной цитофлуориметрии (рис. 15).

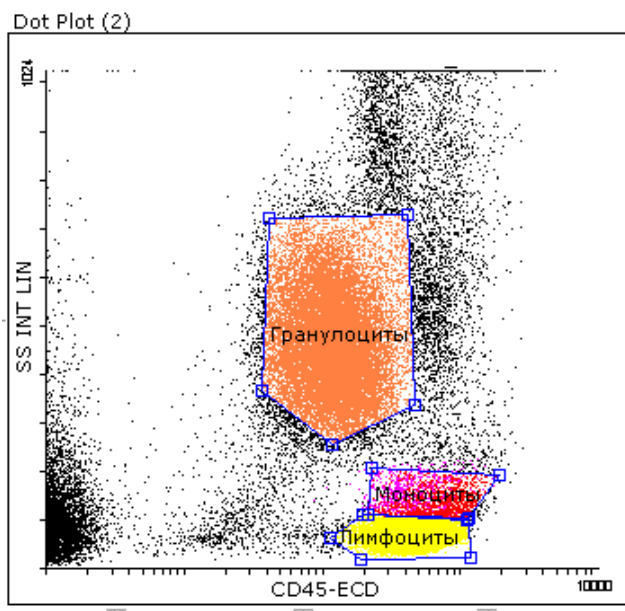


Рисунок 15. Популяции клеток крови: регионы гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов

Оценивали среднюю интенсивность флюоресценции, а также процент CD14⁺ моноцитов периферической крови, экспрессирующих TLR2 или TLR4.

Среднюю интенсивность флюоресценции (СИФ) рассчитывали как отношение интенсивности флюоресценции образца, TLR2⁺ или TLR4⁺, к интенсивности флюоресценции изотипического контроля на CD14⁺ моноцитах периферической крови здоровых доноров (рис. 16) и больных БА (рис. 17).

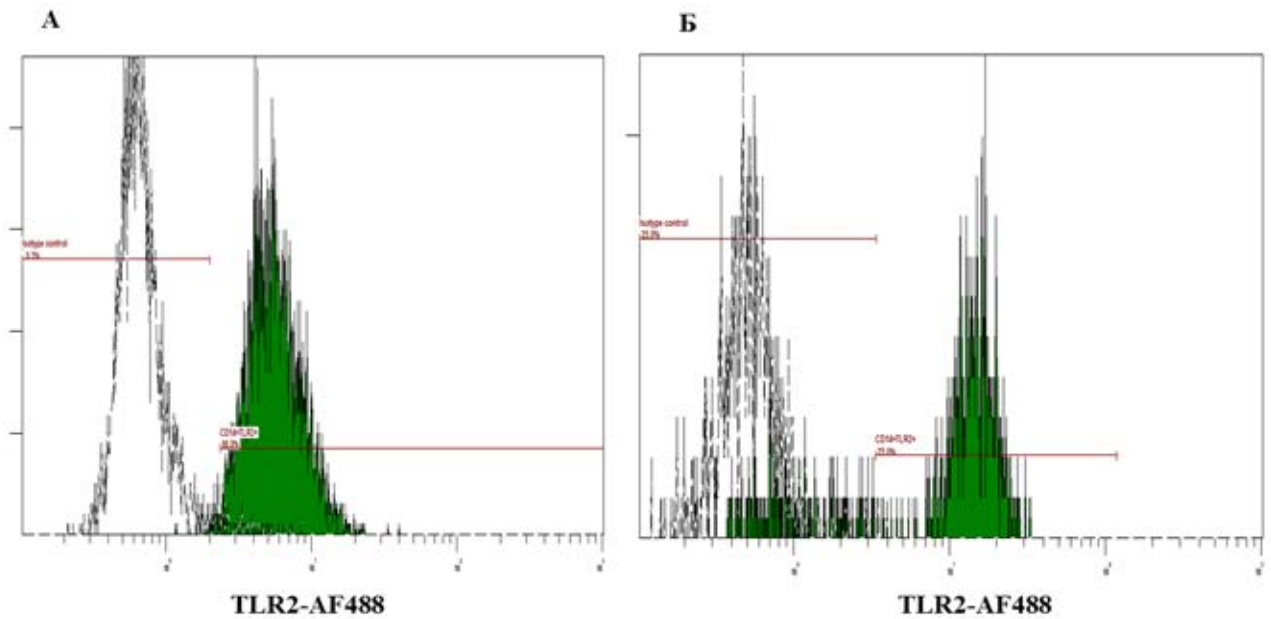


Рисунок 16. Типичные гистограммы свечения изотипического контроля и TLR2 на CD14⁺ моноцитах периферической крови здоровых доноров (А), изотипического контроля и TLR2 на CD14⁺ моноцитах периферической крови больных контролируемой БА (Б).

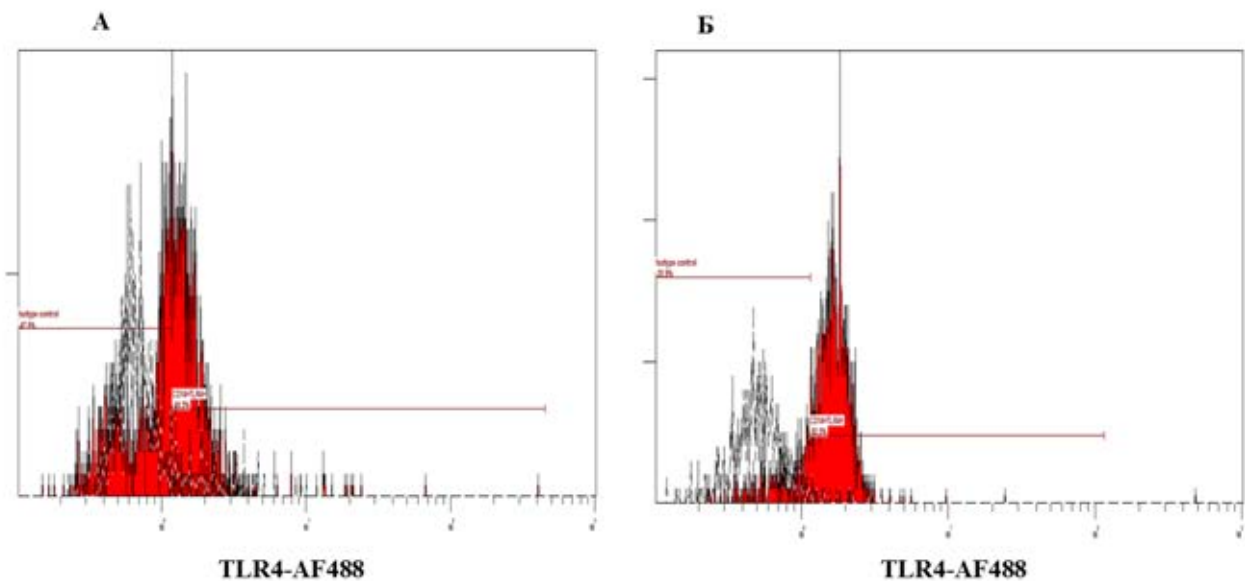


Рисунок 17. Типичные гистограммы свечения изотипического контроля и TLR4 на CD14⁺ моноцитах периферической крови здоровых доноров (А), изотипического контроля и TLR4 на CD14⁺ моноцитах периферической крови больных контролируемой БА (Б).

Во всех группах обследованных больных бронхиальной астмой выявили статистически достоверное увеличение процента $CD14^{+}$ моноцитов периферической крови, экспрессирующих TLR2, по сравнению с группой здоровых доноров (рис 18).

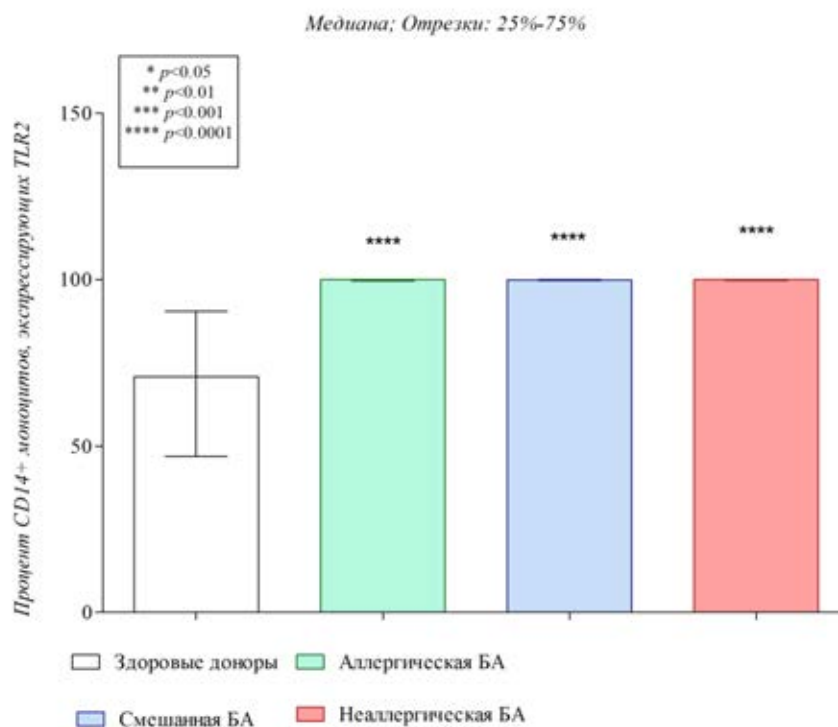


Рисунок 18. Процент $CD14^{+}$ моноцитов периферической крови, экспрессирующих на своей поверхности TLR2, у здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

В дальнейшем оценивалась средняя интенсивность флюоресценции (СИФ) TLR2 на клетках периферической крови больных БА и здоровых доноров. Было выявлено, что у больных бронхиальной астмой в исследуемых группах СИФ TLR2 на $CD14^{+}$ моноцитах статистически достоверно выше по сравнению со значениями у здоровых доноров (рис 19).

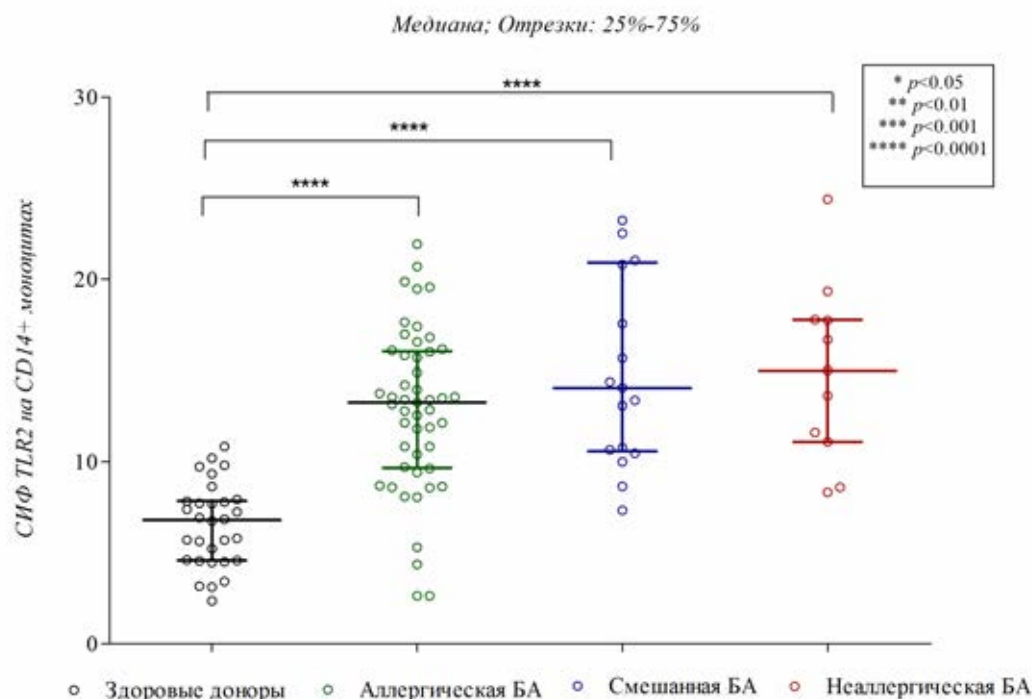


Рисунок 19. Средняя интенсивность флюоресценции TLR2 на CD14⁺ моноцитах периферической крови у здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

Не было выявлено различий СИФ TLR2 на CD14⁺ моноцитах и процента CD14⁺TLR2⁺ моноцитов между разными группами больных бронхиальной астмой. У здоровых доноров процент CD14⁺TLR2⁺ моноцитов – 78,2 (47,4-87,6 %), СИФ – 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.

На следующем этапе исследования, определяли процент CD14⁺моноцитов периферической крови, экспрессирующих TLR4 в исследуемых группах пациентов по сравнению со здоровыми донорами. Во всех группах больных БА процент CD14⁺моноцитов, экспрессирующих TLR4 статистически достоверно выше по сравнению с группой здоровых доноров (2,4 (1,3-14,6) %, рис. 20).

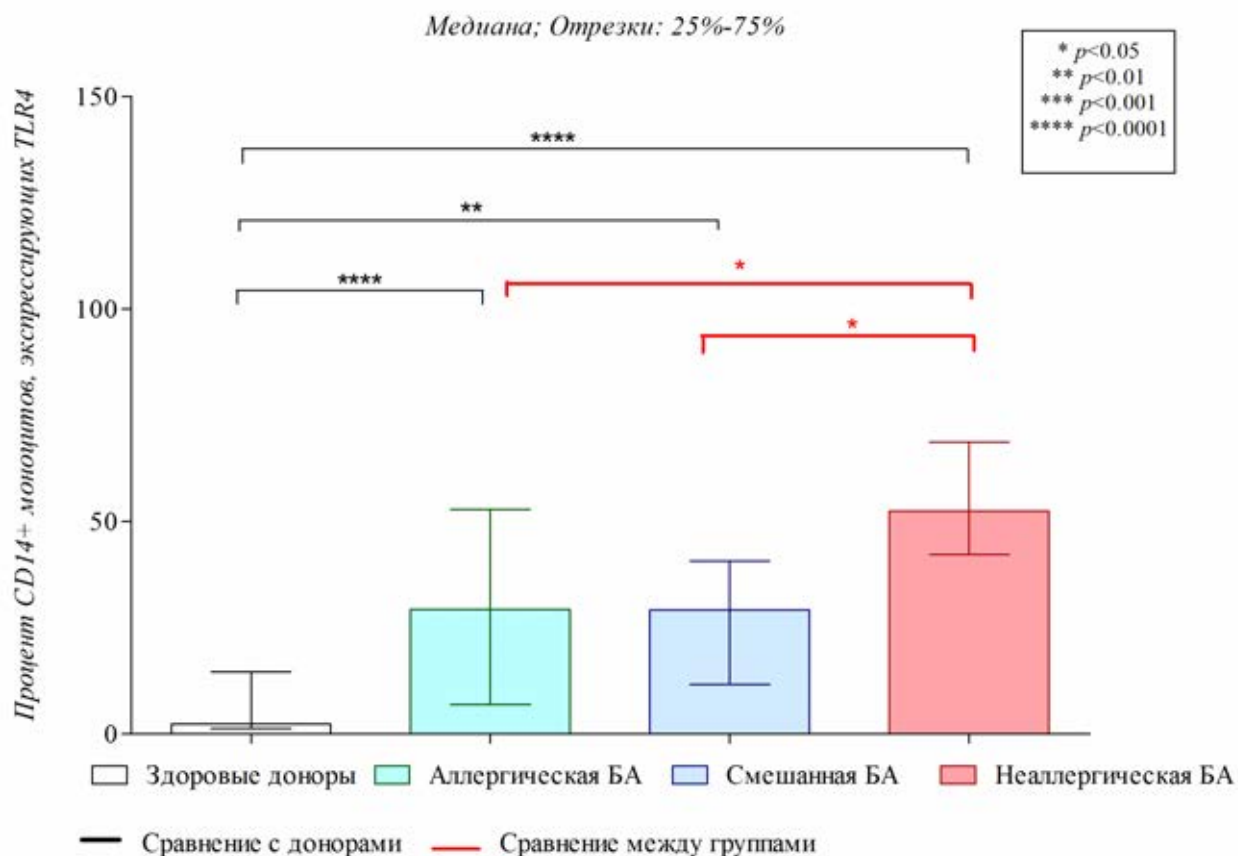


Рисунок 20. Процент CD14⁺ моноцитов периферической крови, экспрессирующих на своей поверхности TLR4, у здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

Процент CD14⁺ моноцитов, на поверхности которых экспрессируется TLR4, достоверно выше у больных неаллергической бронхиальной астмой (52,5 (43,4-67)%) по сравнению с показателями в группе больных смешанной (29,15 (13,8-35,3)%) и аллергической БА (30,8 (7-50,5)%).

СИФ TLR4 на CD14⁺ моноцитах больных БА во всех трех группах также был статистически достоверно выше, чем у здоровых доноров (рис. 21). При этом СИФ TLR4 на CD14⁺ моноцитах больных неаллергической БА составила 2,4 (2,17-3,2), что статистически достоверно выше СИФ TLR4 на CD14⁺ моноцитах больных аллергической БА (2,0 (1,47-2,2)). Различий между группами больных смешанной и аллергической БА не было выявлено.

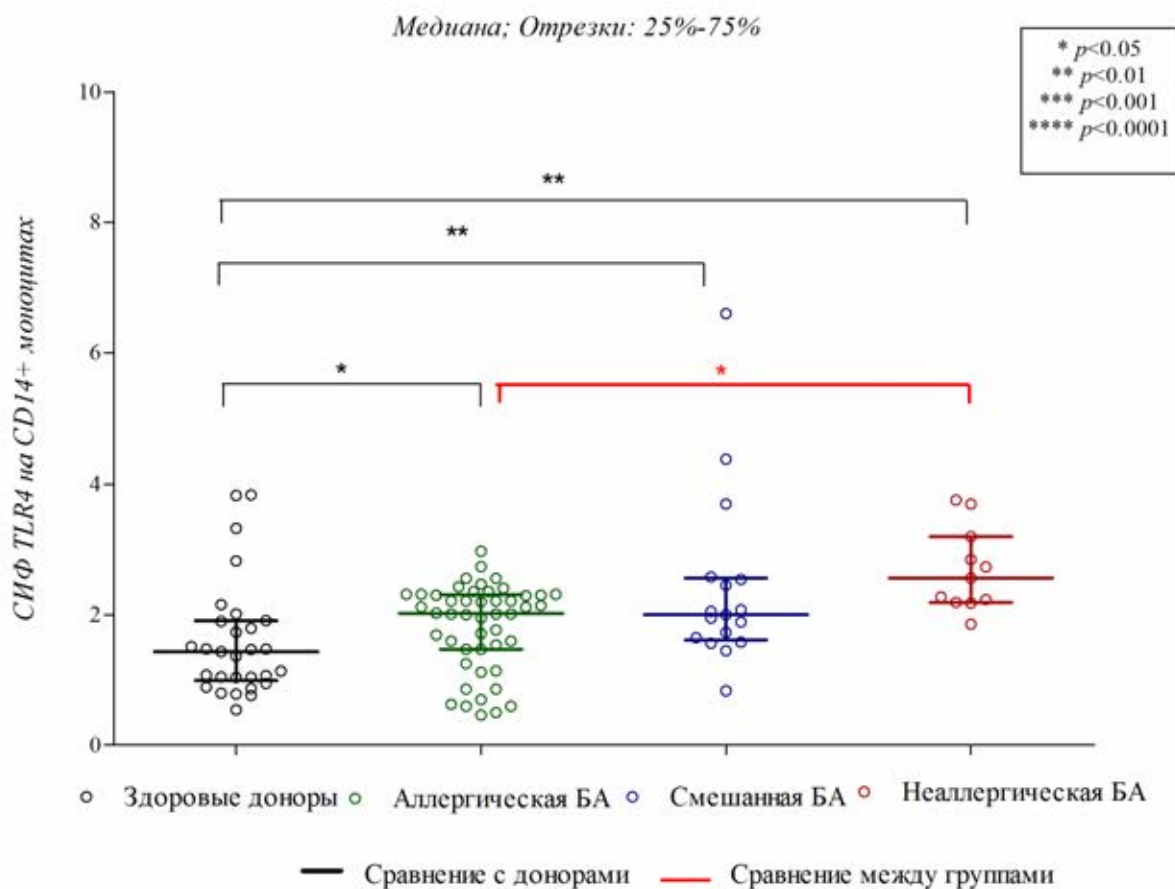


Рисунок 21. Средняя интенсивность флюоресценции TLR4 на CD14⁺ моноцитах здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

Таким образом, во всех обследуемых группах больных бронхиальной астмой установили достоверное повышение CD14⁺TLR2⁺ и CD14⁺TLR4⁺ - моноцитов по сравнению со здоровыми донорами. Также средняя интенсивность флюоресценции TLR2 и TLR4 на поверхности CD14⁺ моноцитов достоверно превышала показатели у здоровых доноров во всех группах пациентов с бронхиальной астмой.

В рамках исследования экспрессии TLR2 и TLR4 нами ранее было показано [4], что у больных смешанной бронхиальной астмой достоверно увеличен процент лимфоцитов, экспрессирующих TLR2 и СИФ TLR2 на лимфоцитах по сравнению со здоровыми донорами. При этом, в данной группе больных смешанной БА СИФ TLR2 на лимфоцитах достоверно выше, чем у

больных аллергической БА ($p < 0,05$). Достоверно повысился процент гранулоцитов, экспрессирующих TLR2 и TLR4 у больных аллергической БА и смешанной БА, в то время как у больных неаллергической БА увеличился только процент гранулоцитов, экспрессирующих TLR4. СИФ TLR4 на гранулоцитах статистически достоверно увеличилась в группе больных смешанной БА по сравнению со здоровыми донорами [4].

Таким образом, у больных контролируемой БА установлено увеличение количества клеток периферической крови, экспрессирующих TLR2 и TLR4, а также их интенсивность флюоресценции по сравнению со здоровыми донорами. Это может оказывать влияние на дальнейшую продукцию цитокинов данными клетками при взаимодействии TLR2 и TLR4 с их лигандами.

В дальнейшем нами оценивалась функциональная активность TLR2 и TLR4, а также TLR2- и TLR4-опосредованная продукция про- и противовоспалительных цитокинов МНК периферической крови у здоровых доноров и больных контролируемой БА.

3.3 Анализ функциональной активности TLR2 и TLR4 по индуцированной лигандами продукции TNF α МНК периферической крови больных бронхиальной астмой

Связывание TLR2 и TLR4 со своими лигандами (ПГ и ЛПС, соответственно) приводит к активации NF- κ B, определяя таким образом индукцию синтеза TNF α и других про- и противовоспалительных цитокинов. На кафедре иммунологии медико-биологического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова разработан метод оценки функциональной активности TLR по индуцированной соответствующими лигандами выработке TNF α МНК периферической крови [2].

TNF α является одним из наиболее важных провоспалительных цитокинов. Известно, что TNF α действует на гладкие мышцы дыхательных путей, увеличивая сократительный ответ, и может принимать участие в развитии

астмы. В ряде работ было показано, что в плазме больных БА повышено содержание TNF α [87, 96].

На данном этапе исследования мы оценивали спонтанную продукцию TNF α МНК периферической крови здоровых доноров и больных контролируемой бронхиальной астмой разных форм легкого и среднетяжелого течения.

Было выявлено, что концентрация TNF α у больных аллергической БА (615,21 (385,4-922,4) пг/мл), смешанной БА (677,5 (318,6-869,5) пг/мл) и неаллергической БА (652,5 (299,5-859,3) пг/мл) значительно превышала значения в группе здоровых доноров (103,51 (59-312) пг/мл). Различия были статистически достоверны для всех исследуемых групп (рис. 22-24). Значения спонтанной продукции TNF α МНК периферической крови больных бронхиальной астмой были сопоставимы во всех трех обследуемых группах (рис. 22).

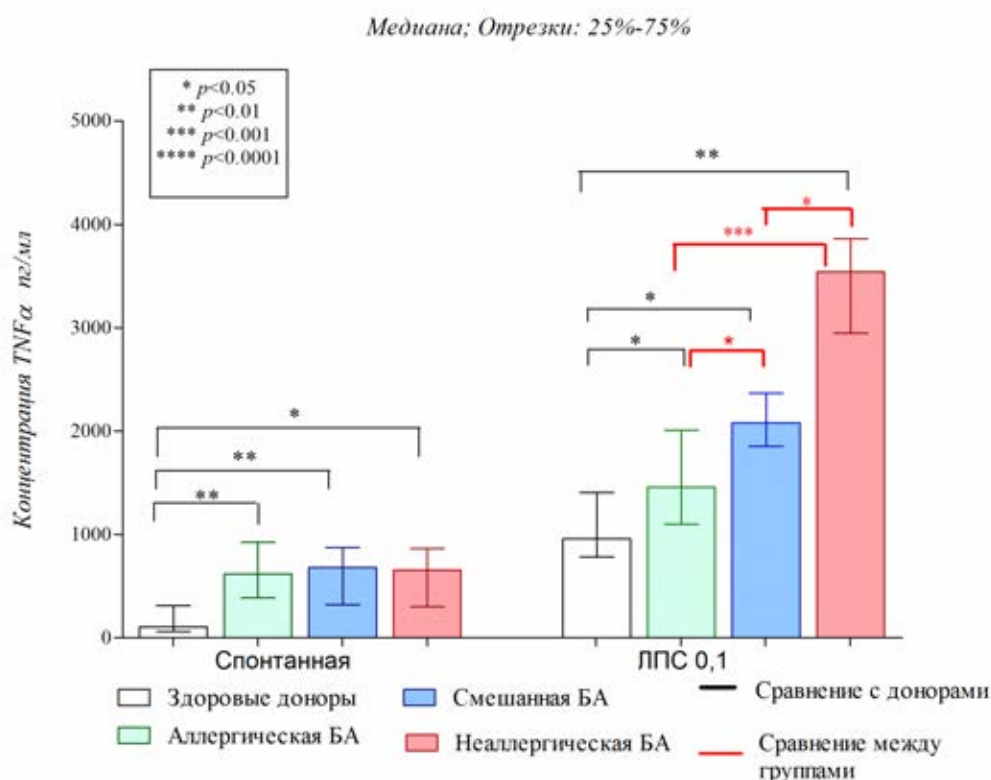


Рисунок 22. Спонтанная и ЛПС-индуцированная продукция TNF α мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

ЛПС-индуцированная продукция $\text{TNF}\alpha$ МНК периферической крови была статистически достоверно выше во всех исследуемых группах по сравнению со здоровыми донорами (956 (782,03-1407) пг/мл).

У пациентов со смешанной формой БА концентрация $\text{TNF}\alpha$ составила 2079 (1883-2353,6) пг/мл, что статистически достоверно выше, чем в группе больных аллергической БА (1457,2 (1111,4-1912) пг/мл). Наибольший прирост продукции $\text{TNF}\alpha$ МНК периферической крови среди исследуемых пациентов наблюдали у больных неаллергической БА (3541 (2946-3863) пг/мл, $p < 0,05$). Таким образом, у больных неаллергической БА значения функциональной активности в 2,4 и 1,7 раз выше, чем у больных аллергической и смешанной, соответственно.

ПГ-индуцированная продукция $\text{TNF}\alpha$ МНК периферической крови была статистически достоверно выше во всех исследуемых группах по сравнению со здоровыми донорами (1081,43 (967,14-1198) пг/мл). Концентрации $\text{TNF}\alpha$ 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) были сопоставимы и статистически достоверно не отличались между группами (рис. 23).

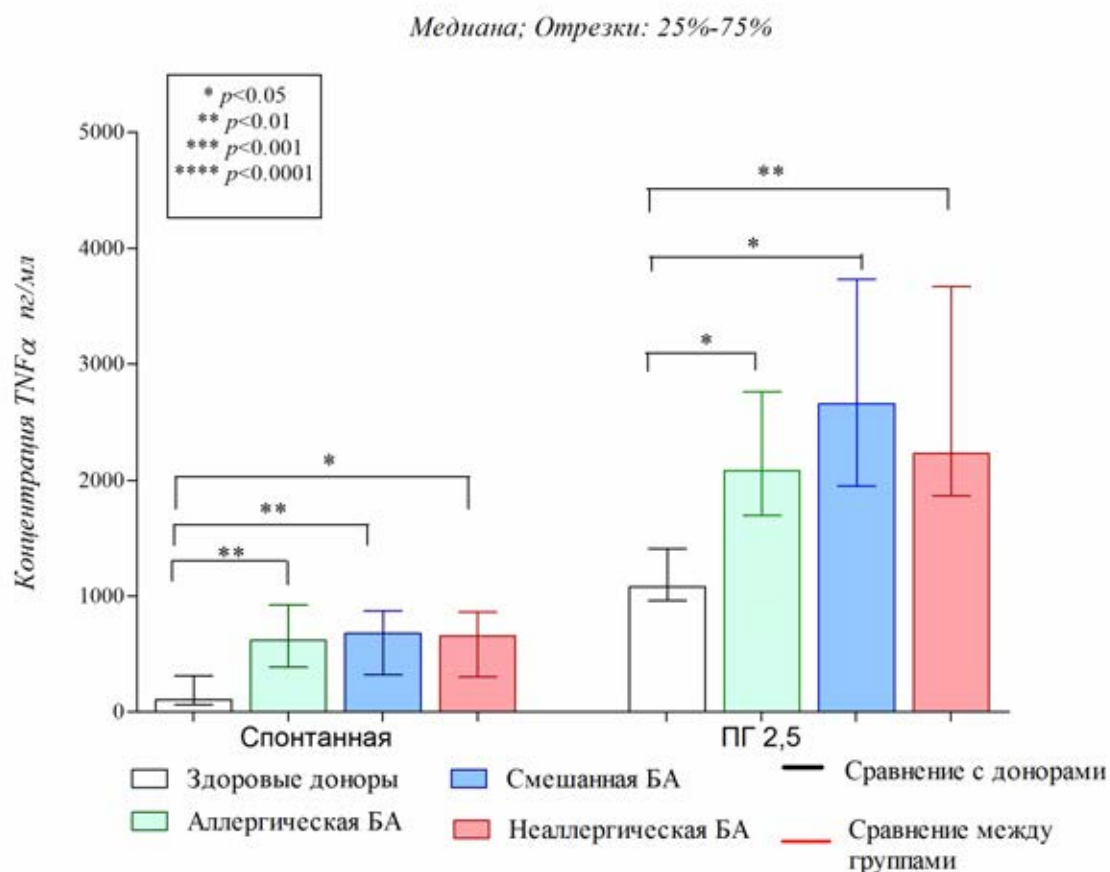


Рисунок 23. Спонтанная и ПГ-индуцированная продукция $TNF\alpha$ мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

В дальнейшем оценивали различия в продукции $TNF\alpha$ МНК периферической крови у больных аллергической БА в зависимости от тяжести течения заболевания (рис. 24).

Спонтанная продукция $TNF\alpha$ у больных аллергической БА легкого (668,1 (340-904) пг/мл) и среднетяжелого течения (577,7 (422-928,6) пг/мл), была статистически достоверно выше, чем у здоровых доноров (103,51 (59-312) пг/мл). Однако различий между группами выявлено не было.

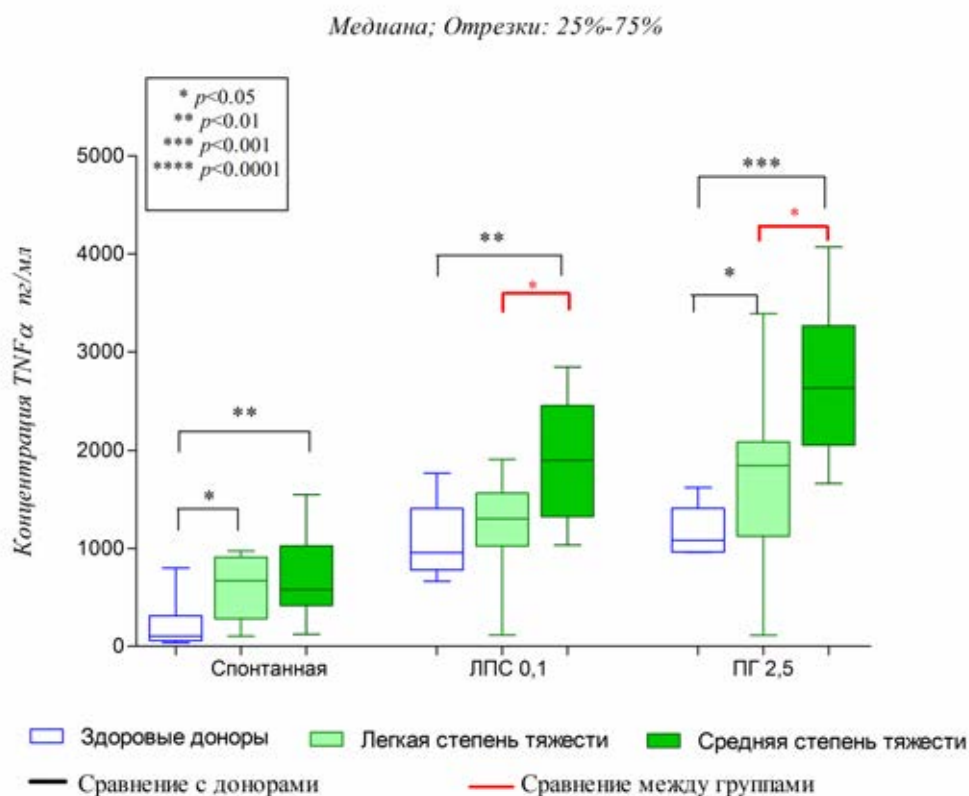


Рисунок 24. Спонтанная, ЛПС- и ПГ- индуцированная продукция $\text{TNF}\alpha$ мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных легкой и среднетяжелой аллергической БА.

Выявили, что только в группе больных среднетяжелой аллергической БА ЛПС-индуцированный уровень $\text{TNF}\alpha$ был статистически достоверно выше по сравнению со здоровыми донорами. Также установили, что ЛПС-индуцированная продукция $\text{TNF}\alpha$ МНК периферической крови статистически достоверно выше у больных среднетяжелой аллергической БА, чем у больных аллергической БА легкой степени тяжести (1900 (1326-2318) пг/мл и 1304 (1052-1564) пг/мл, соответственно; рис. 24).

В группе больных среднетяжелой аллергической БА ПГ-индуцированная продукция $\text{TNF}\alpha$ статистически достоверно выше, чем у больных аллергической БА легкой степени тяжести (2628,42 (2116-3068,6) пг/мл и 1846,14 (1182-2053) пг/мл, соответственно).

Полученные результаты свидетельствуют о повышенной функциональной активности TLR2 и TLR4 у больных БА.

TNF α является провоспалительным цитокином, в большом количестве присутствующим в дыхательных путях у пациентов с астмой. На модели *in vitro* показано, что TNF α играет важную роль в ремоделировании дыхательных путей, способствует формированию гиперреактивности бронхов у больных БА [132]. TNF α присутствует в БАЛ у пациентов с бронхиальной астмой, также этот цитокин синтезируется альвеолярными макрофагами после попадания аллергена [9]. Нами установлено, что у больных БА повышена спонтанная и лиганд-индуцированная выработка TNF α по сравнению со здоровыми донорами. У больных БА также процент CD14⁺TLR2⁺ и CD14⁺TLR4⁺ моноцитов и СИФ TLR2 и TLR4 выше, чем у здоровых доноров. Таким образом, нам было выявлено, что у больных БА высокая базовая экспрессии и функциональная активность TLR2 и TLR4 на клетках периферической крови. Бронхиальная астма является системным заболеванием, и полученные нами данные могут свидетельствовать о существенном вкладе циркулирующих клеток периферической крови в процесс воспаления. Это согласуется с проведенным ранее *Tashiro H. и соавт.* эксперименте на мышах, когда было показано, что у моноцитов более существенная роль в поддержании аллергического воспаления, чем у альвеолярных макрофагов [203]. Увеличение базовой экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 на МНК периферической крови может приводить к усилению восприимчивости данных пациентов к действию аллергенов или инфекционных агентов.

Мы установили, что у больных неаллергической БА наибольший уровень ЛПС-индуцированной продукции TNF α МНК периферической крови. В данной группе пациентов приступ развивается на фоне присоединения инфекции. Постоянный контакт с патогеном поддерживает активацию TLR, что может способствовать стойкому воспалительному процессу в дыхательных путях и дальнейшему усугублению течения воспаления. При этом высокий уровень TNF α может приводить к увеличению количества нейтрофилов в бронхоальвеолярном лаваже [16], что также способно усугубить тяжесть течения заболевания и в дальнейшем влиять на формирование ГКС-резистентности. У

больных смешанной БА уровень продукции $\text{TNF}\alpha$ достоверно превышал показатели в группе больных аллергической БА. Пациенты со смешанной БА имеют сенсibilизацию к аллергенам, однако за счет присоединения инфекционного компонента заболевание протекает круглогодично. Развитие наиболее тяжелых обострений при контакте пациентов с инфекционными агентами может быть связано с увеличенной функциональной активностью TLR2 и TLR4. Присоединение инфекционного агента в данной группе пациентов может усиливать действие причинно-значимого аллергена. У больных аллергической БА приступ развивается при контакте пациента с причинно-значимым аллергеном. При этом, например, содержание аллергена в домашней пыли не влияет на тяжесть заболевания [140]. Но известно, что увеличение содержания ЛПС в домашней пыли может коррелировать с усилением тяжести БА [141]. Согласно проведенному нами исследованию у больных среднетяжелой аллергической БА ЛПС-индуцированная продукция $\text{TNF}\alpha$ МНК периферической крови достоверно выше, чем у больных с легкой степенью тяжести заболевания. Полученные нами данные свидетельствуют, что активация механизмов врожденного иммунитета вносит существенный вклад в развитие и поддержание воспаления при бронхиальной астме различных форм. При этом, гиперактивация TLR4 вносит существенный вклад в поддержание воспаления у больных неаллергической БА, механизмы развития которой до сих пор остаются предметом дискуссии.

3.4 Определение спонтанной и TLR2- и TLR4-индуцированной продукции цитокинов МНК периферической крови больных бронхиальной астмой

3.4.1 Анализ спонтанной и TLR2- и TLR4-индуцированной продукции IL-18 МНК периферической крови больных бронхиальной астмой

На следующем этапе оценивали стимулированную лигандами TLR2 и TLR4 выработку IL-18. Интерлейкин (IL)-18 продуцируется моноцитами, макрофагами, дендритными клетками, Т- и В-лимфоцитами и др. Вырабатывается в ответ на попадание в организм вирусных и бактериальных патогенов, и участвует в поляризации иммунного ответа [176, 183]. Известно, что IL-18 необходим для дифференцировки Treg, которые супрессируют развитие аллергических реакций [107]. С другой стороны, согласно последним данным литературы, экспрессия IL-18 увеличивается при аллергических заболеваниях [12, 19, 32, 87, 183]. Было выявлено, что IL-18 и IL-18R в большом количестве экспрессируются на эпителиальных клетках легких у пациентов с тяжелой астмой [154], а уровень IL-18 напрямую коррелирует с тяжестью течения бронхиальной астмы [74].

На данном этапе исследования, проводилась оценка влияния лигандов TLR2 и TLR4 на продукцию IL-18 МНК периферической крови здоровых доноров и больных контролируемой бронхиальной астмой. Спонтанная продукция IL-18 была статистически достоверно выше у больных аллергической БА (212 (187-287) пг/мл), смешанной БА (234,5 (178,5-279,5) и неаллергической БА (264,5 (252-277) пг/мл) по сравнению со здоровыми донорами (113,5 (90-132) пг/мл, рис. 25).

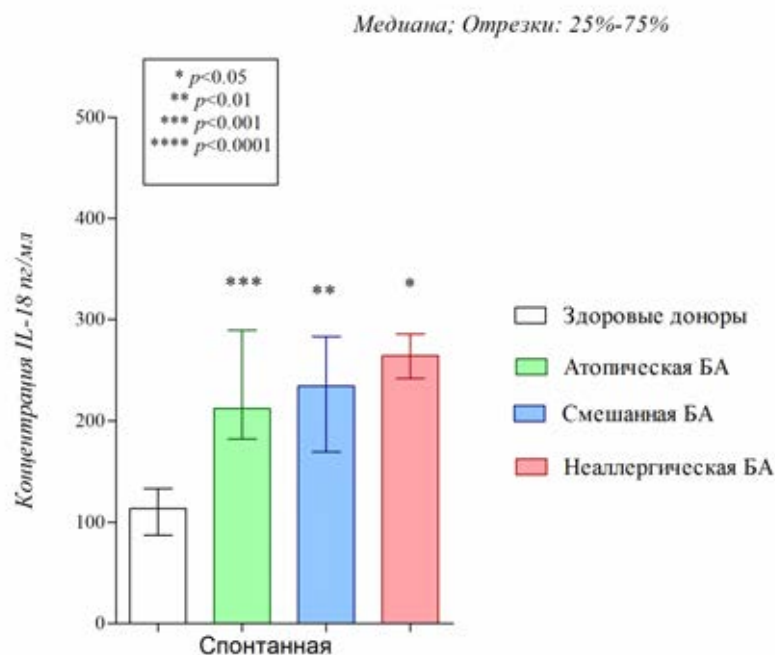


Рисунок 25. Спонтанная продукция IL-18 мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

Уровень спонтанной продукции IL-18 МНК периферической крови не зависел от формы бронхиальной астмы.

Известно, что IL-18 – провоспалительный цитокин, обладающий плеiotропными эффектами, который способен участвовать в развитии иммунного ответа. IL-18 может поляризовать иммунный ответ как в сторону Th2 [77], так и в сторону Th1 [119]. Результат активации иммунной системы под влиянием IL-18 будет зависеть от многих факторов, в том числе от цитокинового микроокружения. В патогенезе аллергических заболеваний IL-18 играет двойственную роль. В исследовании *Yang и соавт.* [234] было показано, что уровень данного цитокина повышался в сыворотках больных аллергической бронхиальной астмой, что коррелировало с тяжестью заболевания. Однако также существуют исследования, в которых показан низкий уровень концентрации IL-18 в сыворотке [86] и мокроте [176] у пациентов с тяжелой астмой.

У трансгенных мышей с гиперэкспрессией IL-18, показано увеличение продукции IFN γ , IL-4, IL-5 и IL-13 [85]. На экспериментальной мышинной модели было показано, что стимулированные IL-18 Th1 клетки памяти приобретают

способность индуцировать гиперреактивность дыхательных путей [199]. Согласно работе *Campbell и соавт.* [30] систематическая нейтрализация IL-18 приводит к накоплению эозинофилов. Эти исследования и другие показывают, что в зависимости от условий, IL-18 может определять как Th1 тип ответа, так и Th2 тип иммунного ответа. Решающее значение играют клетки-продуценты и микроокружение.

В дальнейшем нами было установлено, что лиганды TLR2 и TLR4 (ПГ и ЛПС, соответственно), не влияют на продукцию данного цитокина МНК периферической крови ни у здоровых доноров, ни у больных контролируемой бронхиальной астмой легкого и среднетяжелого течения (рис. 26).

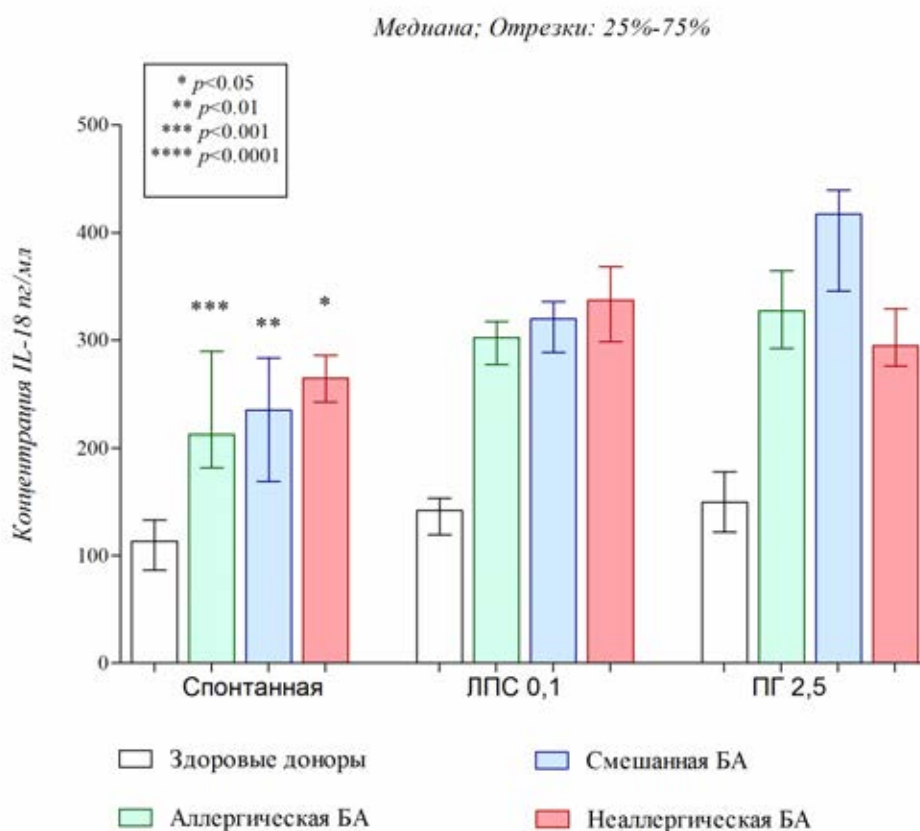


Рисунок 26. Спонтанная и ПГ-индуцированная продукция IL-18 мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

Известно также, что IL-18 преимущественно продуцируется в ответ на активацию PRR, среди которых не только TLR, но RIG-1, NOD1, NOD2.

Передача сигнала через NOD1 и NOD2 идет двумя путями: через NFκB и путем образования инфламмасомы и активации каспазы-1. На экспериментальной мышинной модели астмы было показано, что сенсibilизация овалальбумином приводит к воспалению через активацию NLRP3 [120]. Возможно, что активация транскрипции генов IL-18 в большей степени связана с активацией NODR, чем TLR, что может объяснить отсутствие ЛПС- и ПГ-индуцированной продукции данного цитокина МНК.

3.4.2 Анализ спонтанной и TLR2- и TLR4-индуцированной продукции IL-33 МНК периферической крови больных бронхиальной астмой

IL-33 – цитокин, обладающий плеiotропными эффектами, который способен участвовать в развитии иммунного ответа, воспалительной реакции и может быть вовлечен в иммунопатогенез многих заболеваний. Рецептор к IL-33 содержит цитоплазматический TIR (Toll/IL-1R) домена, необходимый для передачи сигнала внутрь клетки [175]. Впервые IL-33 был обнаружен в эпителии бронхов и дыхательных путей, фибробластах и гладкомышечных клетках, что указывало на роль этого цитокина в регуляции защиты слизистых оболочек [27]. В исследованиях последних лет показано, что IL-33 играет важную роль в развитии аллергических заболеваний.

Согласно литературным данным, сывороточный уровень IL-33 увеличивается у больных с аллергической бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми донорами [97]. Также на экспериментальных моделях показано, что IL-33 играет важную роль при развитии аллергического воспаления в слизистой оболочке полости носа [27].

На экспериментальной мышинной модели показано, что IL-33 усиливает ответ макрофагов на стимуляцию ЛПС, увеличивая экспрессию MD2, TLR4, растворимой формы CD14 и MyD88 [131]. IL-33 активирует иммунный ответ Th2-типа, действуя либо непосредственно на Т-лимфоциты, либо опосредованно через ILC2 клетки, которые в свою очередь синтезируют IL-5, IL-9, IL-13 [198,

219]. У больных аллергическими заболеваниями IL-33 может играть связующую роль между врожденным и адаптивным иммунитетом [138].

В данной работе впервые была проведена оценка индуцированной лигандами TLR2 и TLR4 продукции IL-33 МНК периферической крови больных аллергической, смешанной и неаллергической бронхиальной астмы (табл. 7).

Таблица 7. Сравнительная характеристика продукции IL-33 МНК здоровых доноров и больных бронхиальной астмой разных форм.

Концентрация лиганда, мкг/мл	Спонтанная продукция	ЛПС 0,1	ПГ 2,5
Группы обследуемых	Концентрация IL-33, пг/мл		
Здоровые доноры	10 (9,2-10,8)	11,3 (10,3-11,9)	10,2 (9,4-12,5)
Больные аллергической БА	10,5 (9,7-10,8)	9,9 (9,2-10,4)	9,9 (9,4-10,8)
Больные смешанной БА	8,6 (8-10,1)	9 (8,8-9,3)	9,6 (9-9,9)
Больные неаллергической БА	8,8 (8,6-9,2)	8,8 (7,8-9)	9 (8,6-9,4)

У здоровых доноров спонтанная продукция IL-33 МНК периферической крови составила 10 (9,2-10,8) пг/мл. Как видно из таблицы 7, спонтанная продукция IL-33 у здоровых доноров сопоставима с показателями у больных аллергической БА (10,5 (9,7-10,8) пг/мл), смешанной БА (8,6 (8-10,1) пг/мл) и неаллергической БА (8,8 (8,6-9,2) пг/мл). В дальнейшем МНК периферической крови здоровых доноров и больных БА культивировали в присутствии ЛПС в концентрации 0,1 мкг/мл и ПГ в концентрации 2,5 мкг/мл. Таким образом,

изучалась TLR2- и TLR4-индуцированной продукция IL-33 МНК периферической крови.

ЛПС-индуцированная выработка IL-33 достоверно не отличалась от контроля и составила: 11,3 (10,3-11,9) пг/мл у здоровых доноров, 9,9 (9,2-10,4) пг/мл у больных аллергической БА, 9 (8,8-9,3) пг/мл у больных смешанной БА и 8,8 (7,8-9) пг/мл у больных неаллергической БА. ПГ-индуцированная продукция IL-33 у здоровых доноров составила 10,2 (9,4-12,5) пг/мл, что статистически достоверно не отличалось от концентрации цитокина в группе больных аллергической БА (9,9 (9,4-10,8) пг/мл), смешанной БА (9,6 (9-9,9) пг/мл) и неаллергической БА (9 (8,6-9,4) пг/мл).

Таким образом, выявили, что у больных контролируемой бронхиальной астмой легкого и среднетяжелого течения не изменяется спонтанная или ЛПС-, ПГ-индуцированная продукция IL-33 МНК периферической крови по сравнению со здоровыми донорами.

Известно, что IL-33 важен также при развитии аллергического воспаления в коже, слизистой оболочке полости носа [71, 76, 181]. Возможно, повышение концентрации IL-33 у больных с аллергопатологией в большей степени обусловлено продукцией этого цитокина эпителиальными клетками.

В исследовании *Li и соавт.* на экспериментальной модели аллергического риноконъюнктивита была показана связь активации TLR4 и продукции IL-33 эпителиальными клетками роговицы *in vitro* [127]. Неизвестно, приводит ли активация TLR к продукции данного цитокина в периферической крови человека. Многие клетки периферической крови продуцируют растворимую форму ST2. Экспрессия sST2 индуцибельна. Известно, что в мокроте [120] и периферической крови пациентов с БА [78] наблюдается повышение концентрации растворимой формы ST2. Изоформа sST2 служит рецептором-ловушкой для IL-33 и ингибирует сигнальный путь через ST2L [224]. Таким образом, в периферической крови обследуемых пациентов IL-33 может быть связан рецептором-ловушкой.

3.4.3 Анализ спонтанной и TLR2- и TLR4-индуцированной продукции IL-10 МНК периферической крови больных бронхиальной астмой

В дальнейшем оценивали продукцию IL-10 МНК периферической крови здоровых доноров и больных контролируемой БА легкого и среднетяжелого течения.

IL-10 первоначально был описан на мышинных моделях в качестве ингибитора пролиферации Th1 типа, а также аутокринного фактора роста для Th2 типа [149]. IL-10 в основном вырабатывается Th2-типа и Treg, подавляет выработку провоспалительных цитокинов [217]. На экспериментальной модели, *Laouini и соавт.* [116] показали, что данный цитокин имеет решающее значение для развития эозинофилии при атопическом дерматите. Также в ряде исследований было выявлено, что экспрессия мРНК IL-10 повышается у больных бронхиальной астмой [114, 171].

В нашем исследовании спонтанная продукция IL-10 была статистически достоверно выше у больных аллергической БА (129 (62,6-200,6) пг/мл), смешанной БА (169,6 (51,4-172,9) пг/мл) и неаллергической БА (177,1 (164,2-184,2) пг/мл) по сравнению со здоровыми донорами (37,16 (29,1-55,2) пг/мл).

ЛПС-индуцированная выработка IL-10 МНК периферической крови также статистически достоверно выше во всех группах обследуемых больных по сравнению со здоровыми донорами. При этом, у больных аллергической БА ЛПС-индуцированная продукция IL-10 (329,7 (305,8-475,9) пг/мл) статистически достоверно выше по сравнению с больными смешанной БА (282,2 (127,4-309,8) пг/мл). Данные представлены на рисунке 27.

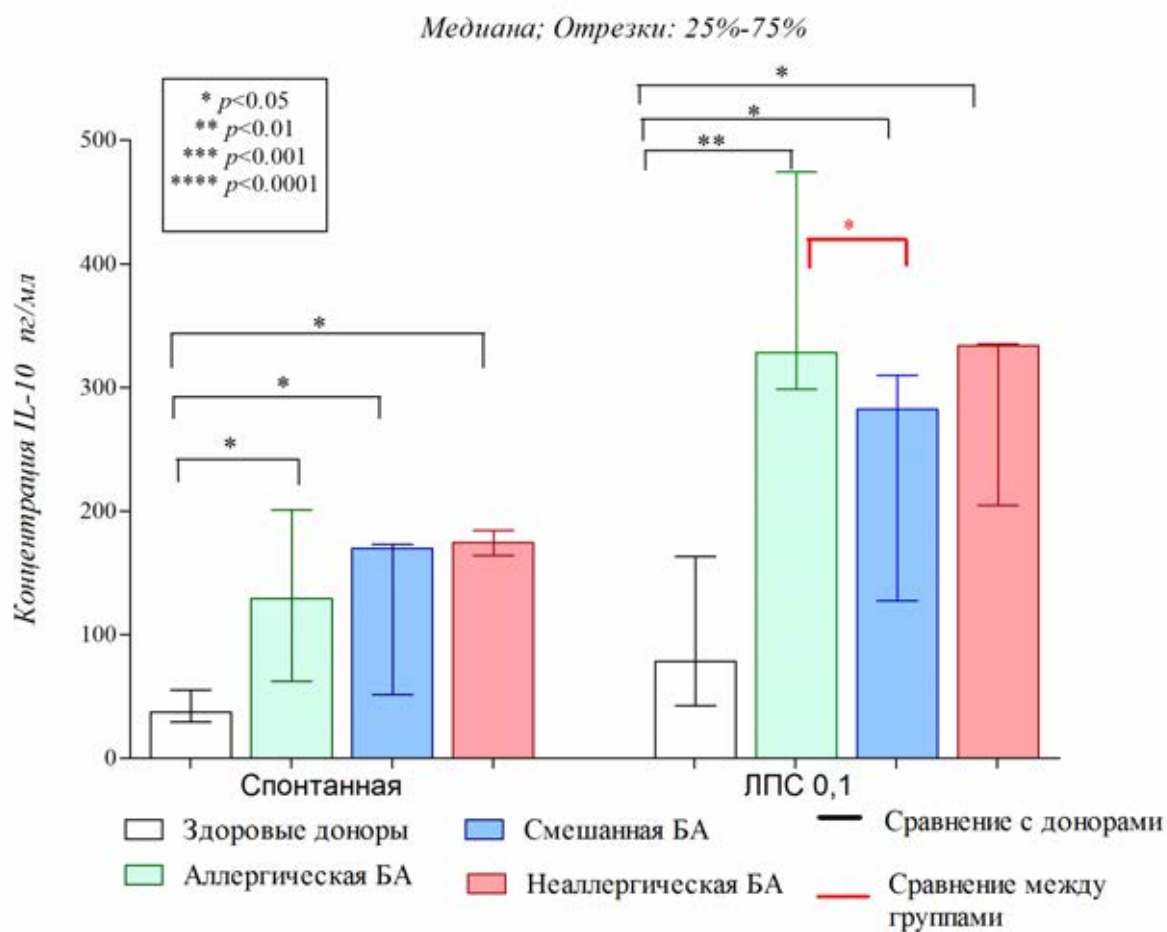


Рисунок 27. Спонтанная и стимулированная ЛПС продукция IL-10 мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

На следующем этапе установили, что только в группе больных аллергической БА статистически достоверно повысился ПГ-индуцированный уровень IL-10 по сравнению со здоровыми донорами: 274,9 (192,5-366,6) пг/мл и 70,2 (47,3-157,4) пг/мл, соответственно.

Выявили, что в группе больных аллергической БА концентрация IL-10 была статистически достоверно выше, чем у больных смешанной БА (130 (115,6-202,6) пг/мл), данные представлены на рисунке 28.

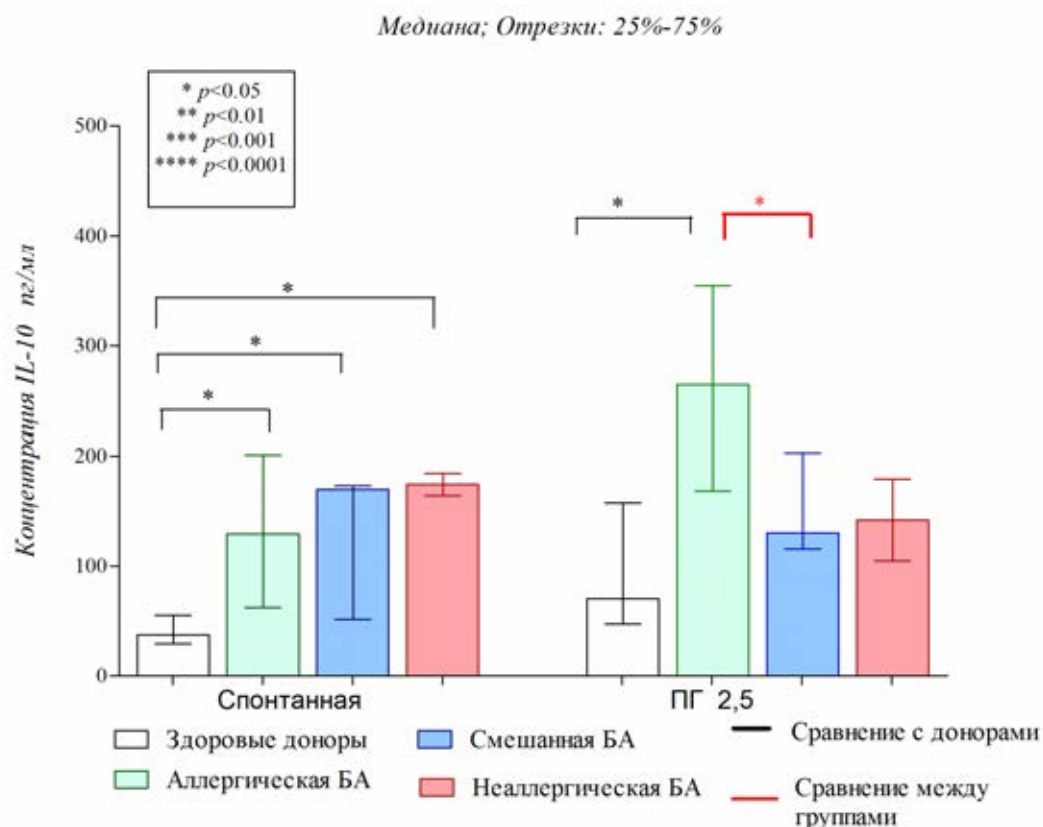


Рисунок 28. Спонтанная и стимулированная ПГ продукция IL-10 мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

Данные о роли IL-10 в развитии гиперреактивности дыхательных путей и аллергии носят противоречивый характер. В некоторых исследованиях показано, что IL-10 ингибирует аллергическое воспаление [94], но увеличивает гиперреактивность дыхательных путей [229].

Из-за иммуносупрессивных свойств IL-10 *in vitro* этот цитокин был предложен в качестве потенциального терапевтического агента при развитии аллергического воспаления и астме. Аллерген-индуцированная продукция IgE приводит к индукции синтеза эозинофилами, базофилами и тучными клетками цитокинов, способствующих дифференцировке Th2 и секреции этими клетками IL-10.

У больных аллергической БА, согласно нашему исследованию, лиганд-опосредованная продукция IL-10 выше, чем в других группах. Повышение

спонтанной и TLR2- и TLR4-индуцированной продукции IL-10 согласуется с литературными данными, показывающими увеличение сывороточного уровня IL-10 [229] и мРНК IL-10 [171] у больных аллергической БА. Этот цитокин с одной стороны может поддерживать дисбаланс Th в сторону Th2 типа, тем самым усугубляя течение воспаления. С другой стороны, так как в ряде работ было показано, что у IL-10 протективная роль в аллергических заболеваниях, его повышение может быть связано с развитием компенсаторных реакций, которые направлены на снижение воспаления [191]. Таким образом, IL-10 обладает плеiotропными эффектами и играет двойственную роль в иммунопатогенезе БА.

Более низкие уровни индуцированной продукции IL-10 у пациентов, страдающих смешанной и неаллергической БА могут свидетельствовать о переключении у этих пациентов Th2-иммунного ответа на Th1 или Th17-иммунный ответ. Дисбаланс в выработке про- и противовоспалительных цитокинов может направлять развитие заболевания по Th1-типу иммунного ответа, или Th17-типу иммунного ответа. Эти данные согласуются с исследованиями на экспериментальных мышинных моделях, когда было показано что действие агонистов TLR4 (ЛПС и β -глюканов) способствует развитию воспаления, связанного с Th17 типа, выработкой IL-17 [136]. IL-17 в свою очередь связывают с развитием стойкого нейтрофильного воспаления в легких. Механизм нейтрофильного воспаления до конца не ясен, предполагают, что оно может развиваться в слизистой оболочке дыхательных путей в ответ на аэрополлютанты или профессиональные сенсибилизаторы, различные инфекционные агенты. Нейтрофильное воспаление при БА связано со значительным ослаблением ответа на терапию ингаляционными и пероральными ГКС.

Таким образом, увеличение продукции IL-10 МНК периферической крови больных контролируемой БА при культивировании клеток с лигандами TLR может указывать на существенный вклад данных рецепторов в формирование воспаления и возможное развитие осложнений.

3.4.4 Анализ спонтанной и TLR2- и TLR4-индуцированной продукции IL-4 МНК периферической крови больных бронхиальной астмой

IL-4 – противовоспалительный цитокин, являющийся аутокринным фактором роста для Th2-типа. IL-4 усиливает экспрессию на мембране тучных клеток FcεRI, а также участвует в переключении синтеза изотипов иммуноглобулинов с IgM на IgE и IgG4, таким образом, непосредственно принимая участие в развитии аллергической или смешанной бронхиальной астмы [15]. Согласно проведенному исследованию, спонтанная продукция IL-4 была статистически достоверно выше у больных аллергической и смешанной бронхиальной астмой, но не у больных, страдающих неаллергической БА (рис. 29).

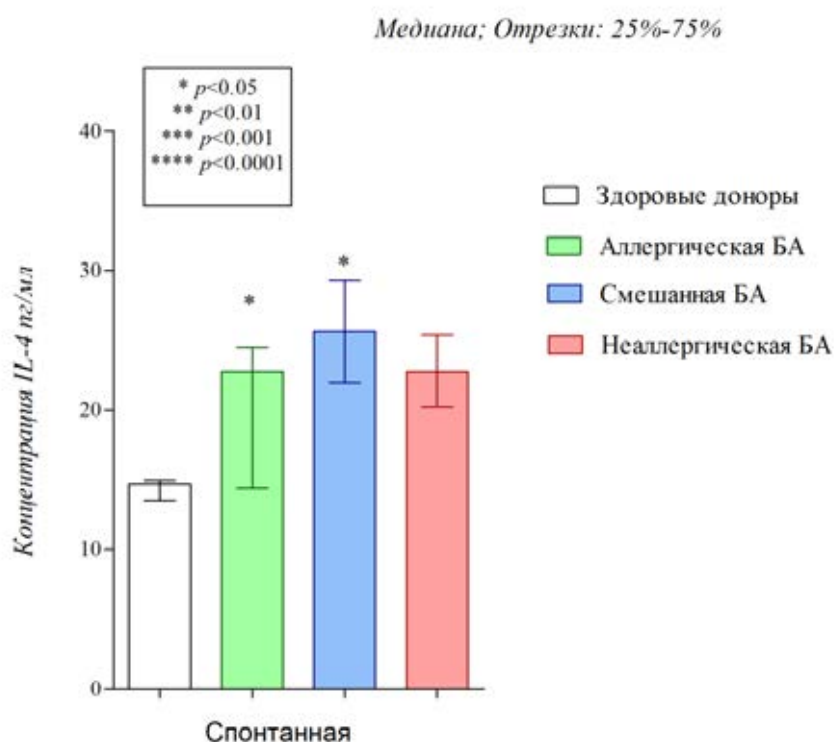


Рисунок 29. Спонтанная продукция IL-4 мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

Выявили, что лиганды TLR2 и TLR4, а именно ЛПС и ПГ, не оказывают влияние на продукцию IL-4 МНК периферической крови человека (рис. 30).

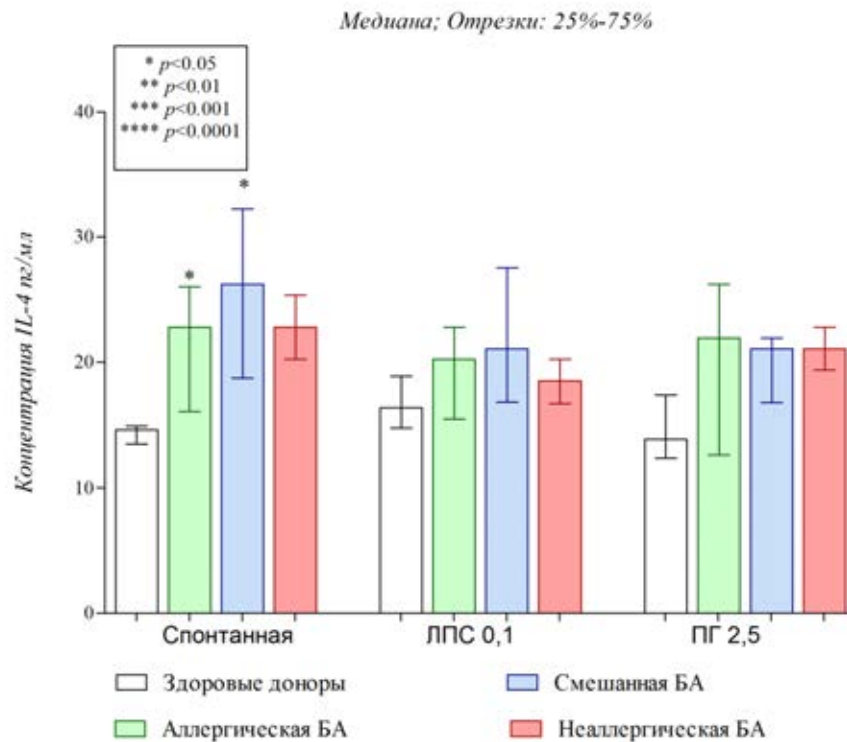


Рисунок 30. Спонтанная и стимулированная ЛПС и ПГ продукция IL-4 мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

В работе *Duan D и соавт.* на животной модели было показано, что вирусная инфекция индуцирует снижение синтеза IL-4 лимфоцитами, и эти изменения регулируются сигнальным путем TLR-MyD88-NF- κ B [52]. При этом, в работах *Reese P. и соавт.* было показано, что IL-4 может изменять чувствительность CD34⁺ клеток к ЛПС [167]. Основным продуцентом IL-4 в периферической крови являются лимфоциты, а на данных клетках исследуемые TLR представлены в гораздо меньшей степени, чем на моноцитах [4]. Это может объяснить отсутствие TLR-индуцированной продукции МНК периферической крови IL-4.

3.4.5 Анализ спонтанной и TLR2- и TLR4-индуцированной продукции IL-13 МНК периферической крови больных бронхиальной астмой

IL-13 вырабатывается Th2 типа, обладает плеiotропным действием и участвует в патогенезе бронхиальной астмы [50]. При бронхиальной астме формируется воспалительная реакция, приводящая к эозинофилии,

повреждению тканей и патологии дыхательных путей. IL-13 играет важную роль в привлечении эозинофилов в дыхательные пути при бронхиальной астме. Показано, что IL-13 участвует в переключении изотипов иммуноглобулина на IgE, являющегося маркером воспаления при аллергических заболеваниях [50, 161].

Установили, что уровень продукции IL-13 МНК периферической крови больных аллергической и смешанной БА по сравнению со здоровыми донорами существенно не менялся (рис. 31). Однако было выявлено статистически достоверное уменьшение продукции МНК IL-13 у пациентов, страдающих неаллергической бронхиальной астмой. При этом культивирование МНК в присутствии ЛПС и ПГ также не приводило к изменению продукции IL-13 МНК периферической крови здоровых доноров или в обследуемых группах больных БА.

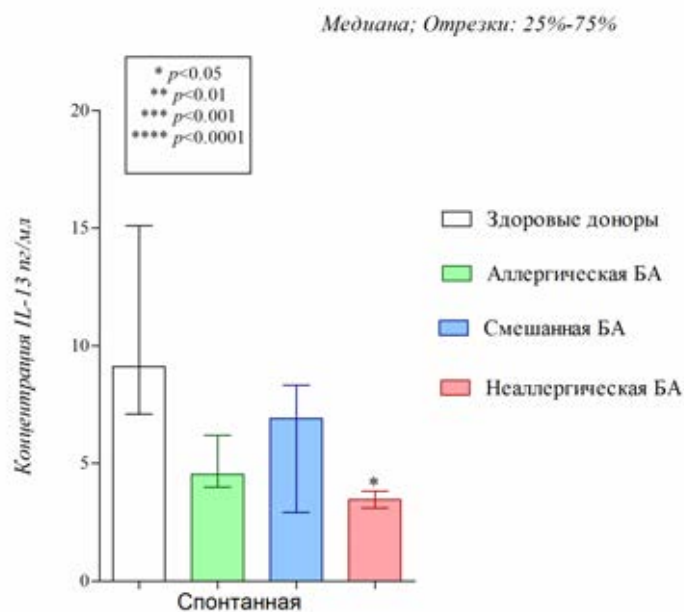


Рисунок 31. Спонтанная продукция IL-13 мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

Известно, что IL-13 – это цитокин поздней стадии воспалительного процесса у больных аллергопатологией. Этот цитокин непосредственно принимает участие в формировании гиперреактивности дыхательных путей.

На следующем этапе выявили, что действие ЛПС и ПГ не приводит к изменению продукции IL-13 МНК периферической крови здоровых доноров или во всех группах больных БА (рис. 32).

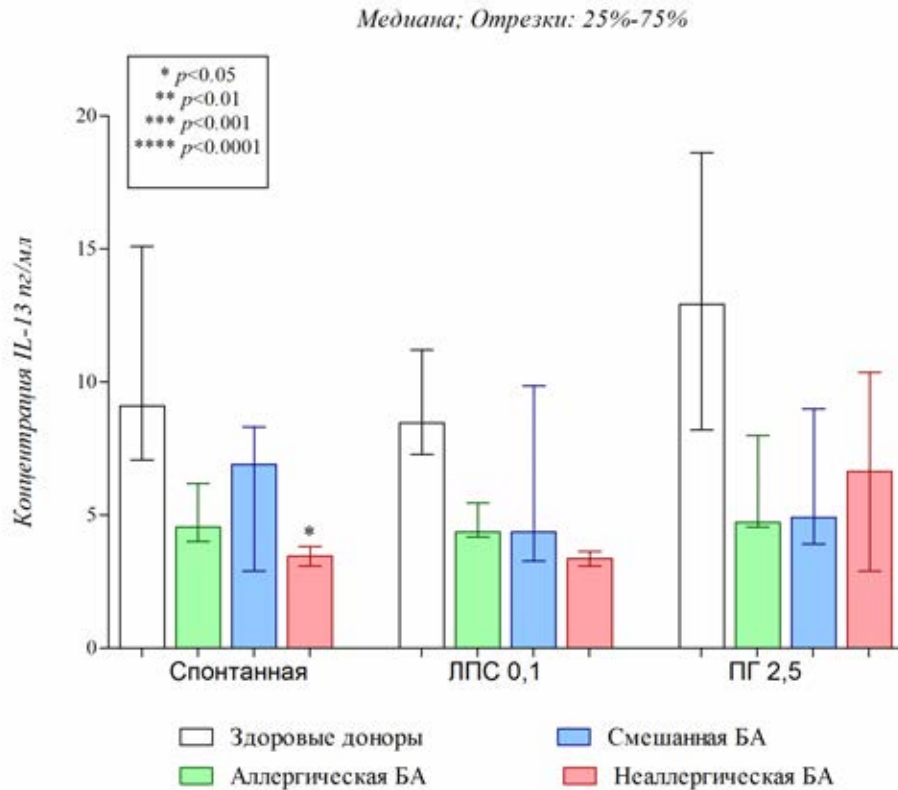


Рисунок 32. Спонтанная и стимулированная ЛПС и ПГ продукция IL-13 мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных бронхиальной астмой различных форм.

Таким образом, нами не было установлено увеличения индуцированной лигандами TLR2 и TLR4 продукции IL-13 МНК периферической крови во всех трех группах больных БА по сравнению со здоровыми донорами. Наши данные соотносятся с результатами исследования *Dovoodi P. и соавт.* в котором было показано, что уровень IL-13 в сыворотке больных бронхиальной астмой достоверно не отличается от здоровых людей [46]. Известно, что *in vitro* активация через TLR2 на эпителиальных клетках может приводить к продукции IL-13. Возможно, продукция данного цитокина в ответ на стимуляцию TLR возможна только на местном уровне [166].

Wang L. и соавт. и *Lee Y. и соавт.* показали значимое увеличение уровня IL-13 у пациентов с бронхиальной астмой в остром периоде, по сравнению с пациентами с БА в ремиссии [121, 221]. Сопоставимые уровни спонтанной продукции IL-13 МНК периферической крови, полученные в процессе проведения нашего исследования, возможно могут быть связаны с тем, что в данное исследование были включены пациенты с контролируемой БА (то есть, находящиеся в стадии ремиссии заболевания).

3.5 Исследование влияния Der p и комбинации Der p с ЛПС на продукцию TNF α , IL-4, IL-13 у больных аллергической бронхиальной астмой.

Согласно последним данным, TLR4 может принимать участие в распознавании бытовых аллергенов, в частности Der p [178, 208]. В связи с тем, что аллерген клещей домашней пыли широко распространен в окружающей среде и часто контаминирован липополисахаридом [213], 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.

В группе здоровых доноров наблюдалось увеличение выработки TNF α МНК периферической крови в ответ на стимуляцию Der p в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл по сравнению с контролем: 411,2 (296,7-625,6) и 447,5 (425,3-496,5) против 118 (50,0-190,6), соответственно (рис. 33).

У больных бронхиальной астмой концентрация TNF α после стимуляции МНК Der p в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл составили 1270,1 (863,8-1365,2) пг/мл и 1145,0 (805,6-1421) пг/мл, соответственно, против 481,8 (471,6-596,2) пг/мл в контроле (рис. 33).

При этом у больных БА Der p-индуцированная продукция TNF α выше, чем у здоровых доноров ($p < 0,05$). Таким образом, выявлено, что Der p оказывает

стимулирующее влияние на продукцию $\text{TNF}\alpha$ МНК периферической крови больных аллергической БА с сенсibilизацией к бытовым аллергенам.

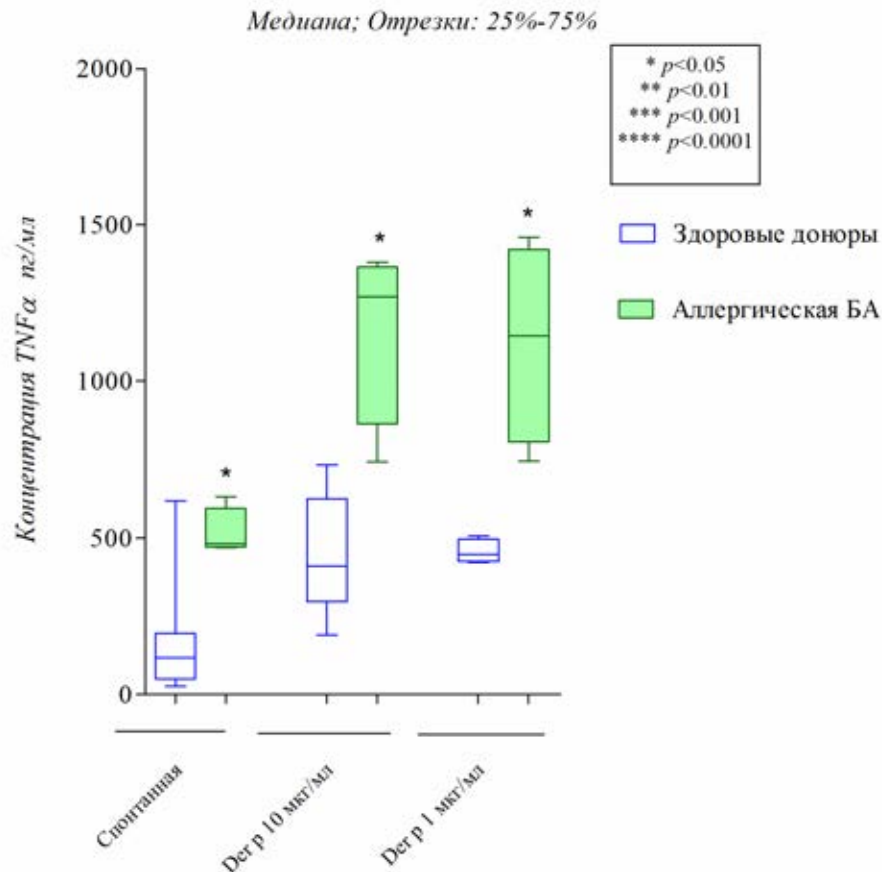


Рисунок 33. Спонтанная и Der p-индуцированная продукция $\text{TNF}\alpha$ мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных аллергической бронхиальной астмой.

Увеличение продукции $\text{TNF}\alpha$ после стимуляции МНК Der p свидетельствует об активации TLR4 в ответ на действие бытовых аллергенов

Согласно литературным данным, у пациентов, страдающих аллергической бронхиальной астмой с сенсibilизацией аллергеном клещей домашней пыли, наблюдалось усиление тяжести течения бронхиальной астмы при увеличении содержания ЛПС в домашней пыли. При этом содержание аллергена в домашней пыли не оказывало влияния на тяжесть течения бронхиальной астмы [141].

Таким образом, контакт с ЛПС может быть одним из факторов, определяющим увеличение степени тяжести течения бронхиальной астмы.

В дальнейшем мы оценивали влияние Der p в сочетании с ЛПС на выработку TNF α МНК периферической крови. В обеих группах стимуляция МНК Der p в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл в комбинации с ЛПС также приводила к увеличению выработки TNF α по сравнению с контролем. В группе здоровых доноров концентрации TNF α достоверно ниже и составили: 576,5 (415,5-986) и 763,2 (413,6-911,3), соответственно (рис. 34).

В группе больных БА после стимуляции МНК Der p в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл в комбинации с ЛПС выработка TNF α составила 1330,0 (1239-1668) пг/мл и 1337,8 (1164-1692) пг/мл, соответственно.

Наблюдалась тенденция к увеличению концентрации TNF α в ответ на комбинацию Der p с ЛПС по сравнению с показателями, полученными после стимуляции МНК периферической крови только Der p как у здоровых доноров, так и у больных бронхиальной астмой. Однако данные не были достоверными.

Нами было показано, что различия в концентрации используемого аллергена не влияют на уровень продукции TNF α МНК периферической крови больных БА.

Таким образом, нами было обнаружено увеличение выработки TNF α МНК периферической крови больных бронхиальной астмой и здоровых доноров в ответ на стимуляцию Der p и комбинацию Der p с ЛПС по сравнению с контролем. TLR4-опосредованная продукция TNF α в ответ на Der p и комбинацию Der p с ЛПС была выше в группе больных бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми донорами. 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.

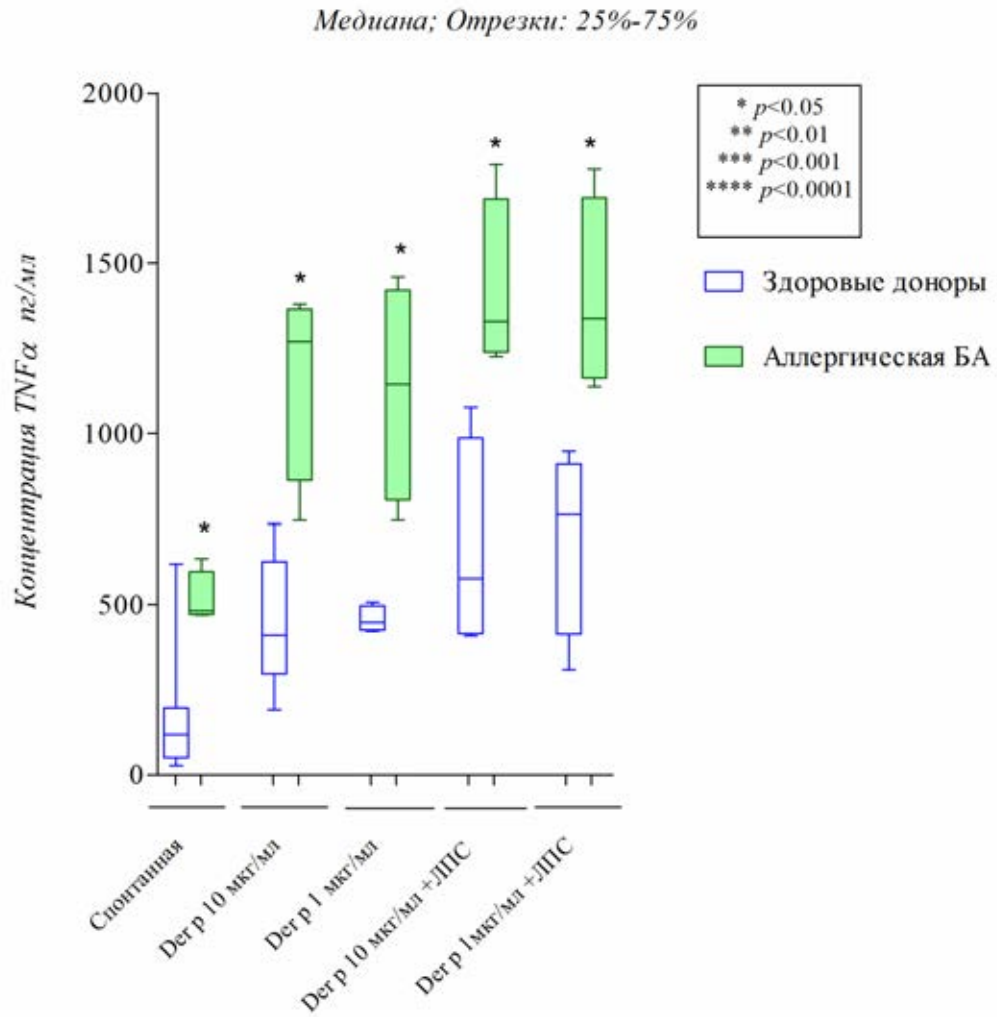


Рисунок 34. Продукция $TNF\alpha$ мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных аллергической БА, стимулированная Der p и комбинацией Der p с ЛПС.

На следующем этапе работы оценивали индуцированную Der p и сочетанное действие Der p с ЛПС на продукцию IL-13 и IL-4 МНК периферической крови больных БА с сенсibilизацией к бытовым аллергенам и здоровых доноров (рис. 35).

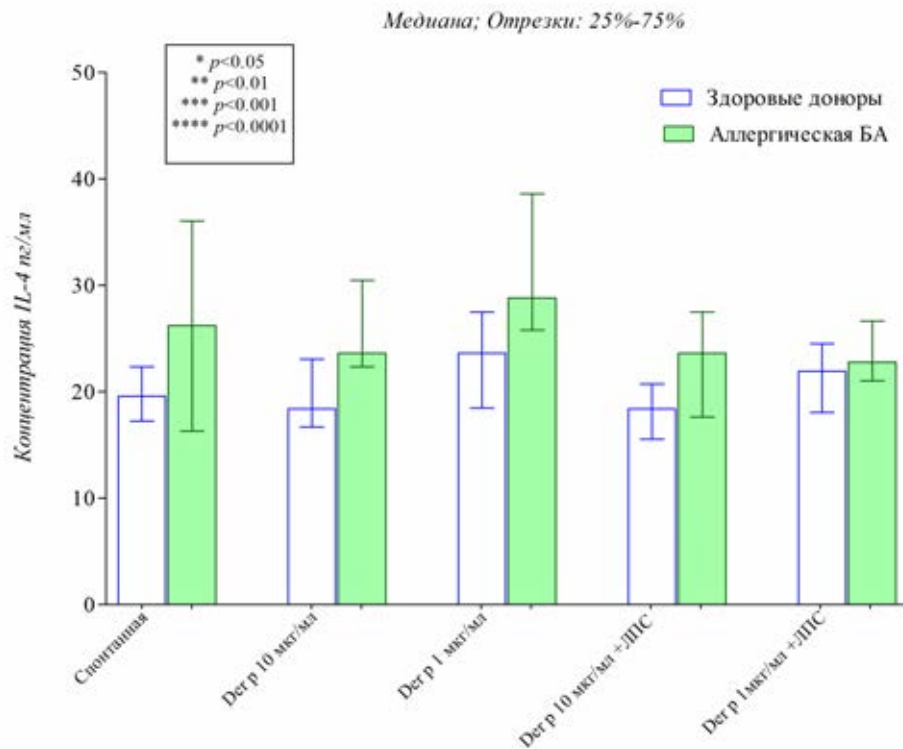


Рисунок 35. Продукция IL-4 мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных аллергической БА, индуцированная Der p и комбинацией Der p с ЛПС.

В группе здоровых доноров абсолютные значения спонтанной продукции IL-4 МНК периферической крови, а также уровня IL-4 после стимуляции МНК Der p в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл были сопоставимы и составили: 19,57 (17,25-22,36) против 18,41 (16,67-23,09) и 23,6 (18,48-27,5), соответственно. В группе больных БА абсолютные значения выработки IL-4 МНК после стимуляции Der p в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл составили 23,64 (22,35-30,50) пг/мл и 28,78 (25,79-38,62) пг/мл, что было сопоставимо со значениями спонтанной выработки IL-4: 26,22 (16,32-36,06) пг/мл. Не выявлено различий между группами здоровых доноров и больных БА в спонтанной или индуцированной продукции IL-4 МНК периферической крови.

У здоровых доноров после стимуляции МНК периферической крови комбинацией Der p в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл с ЛПС абсолютные значения выработки IL-4 составили 18,41 (15,52-20,74) и 22,92 (18,04-24,5),

соответственно. В группе больных БА после стимуляции МНК комбинацией Der p в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл с ЛПС абсолютные значения выработки IL-4 составили 23,64 (17,61-27,50) и 22,78 (21,06-26,65), соответственно. Таким образом, культивирование МНК периферической крови больных БА и здоровых доноров в присутствии Der p или в комбинации Der p с ЛПС не приводит к достоверному изменению продукции IL-4 у здоровых доноров или больных БА.

Абсолютные значения продукции IL-13 МНК периферической крови в группе здоровых доноров после стимуляции Der p в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл были также сопоставимы со спонтанной продукцией и составили: 6,71 (5,5-10,1) и 4,60 (3,77-5,26) против 7,96 (5,86-8,54), соответственно (рис. 36). В группе больных БА абсолютные значения выработки IL-13 МНК после стимуляции Der p в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл составили 6,39 (5,64-7,24) и 6,39 (5,01-7,63), что также было сопоставимо со значениями спонтанной продукции данного цитокина МНК периферической крови: 6,71 (5,6-7,6).

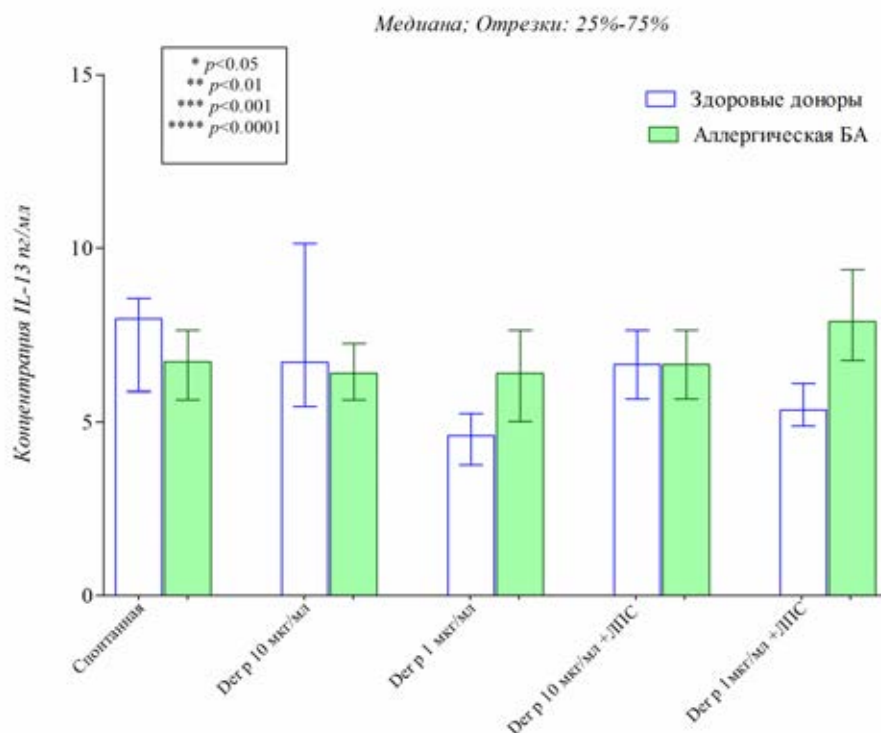


Рисунок 36. Продукция IL-13 мононуклеарными клетками здоровых доноров и больных аллергической БА, индуцированная Der p и комбинацией Der p с ЛПС.

Стимуляция МНК периферической крови комбинацией Der p с ЛПС также не приводила к достоверному изменению продукции IL-13 в группах больных БА и здоровых доноров. У больных БА после стимуляции МНК комбинацией Der p в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл с ЛПС абсолютные значения выработки IL-13 составили 6,64 (5,67- 7,63) и 7,88 (6,76-9,37) против 6,64 (5,67- 7,63) и 5,35 (4,89-6,1) у здоровых доноров, соответственно. Таким образом, между больными БА и здоровыми донорами достоверных различий в продукции IL-13 МНК периферической крови выявлено не было.

Таким образом, было установлено, что активация TLR4 аллергеном, а также сочетанное действие аллергена и ЛПС не приводит к увеличению выработки IL-13 и IL-4 мононуклеарными клетками периферической крови здоровых доноров и больных бронхиальной астмой с сенсibilизацией к бытовым аллергенам. Однако, как нами было показано ранее, на моноцитах периферической крови, у больных БА экспрессия и функциональная активность TLR4 больше, чем в контрольной группе. Моноциты будут мигрировать в подслизистую оболочку бронхов и дифференцироваться в макрофаги. Известно, что на уровне дыхательных путей воздействие ЛПС и аллергенов приводит к увеличению продукции TLR4-опосредованной выработки TSLP, IL-1 β , IL-25 и IL-33 [123]. В ответ на IL-25 и IL-33 активируются ILC2 и Th2-лимфоциты, что сопровождается усилением выработки IL-5, IL-13 и IL-4. Помимо этого, ЛПС, воздействуя через TLR4 на тучных клетках, может приводить к их дегрануляции, что сопровождается увеличением выработки цитокинов [53, 233]. Несмотря на отсутствие TLR-индуцированной продукции IL-13 и IL-4 МНК периферической крови, на местном уровне высокая функциональная активность TLR4 может способствовать развитию воспаления.

Заключение

Факторы врожденного иммунитета играют важную роль в развитии, течении и прогрессировании многих заболеваний, таких как аутоиммунные заболевания, инфаркт миокарда, острый деструктивный панкреатит, atopический дерматит и др. [33, 69]. Ключевыми рецепторами врожденного иммунитета являются Toll-подобные рецепторы. TLR распознают консервативные структуры микроорганизмов, так называемые PAMP (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) и эндогенные сигналы опасности DAMP [216]. Чрезмерная или недостаточная активация TLR может привести к формированию цитокинового дисбаланса, повлиять на процессы воспаления и, в дальнейшем, определить исход и прогноз заболевания [5, 44, 45, 159, 172]. Таким образом, изучение механизмов врожденного иммунитета при различных иммуноопосредованных заболеваниях, в том числе при развитии аллергических заболеваний, остается важной ключевой проблемой фундаментальной и клинической иммунологии.

Накапливаются данные об участии TLR в патогенезе аллергических заболеваний. Показано, что β -глюканы, полученные из аллергена клещей домашней пыли, действуют подобно PAMP и индуцируют TLR-зависимый путь активации врожденного иммунитета при аллергических заболеваниях [7, 39, 73, 109, 210]. Однако большинство работ по исследованию роли TLR в патогенезе бронхиальной астмы проведено на животных моделях [79, 151, 177, 245] или основано на изучении экспрессии TLR в клетках слизистых оболочек [82, 117, 210, 226, 240].

В современной научной литературе нет работ, посвященных комплексному исследованию TLR на клетках периферической крови человека. Существуют отдельные исследования по изучению полиморфизмов TLR2 и TLR4 при бронхиальной астме, продукции цитокинов МНК периферической крови, однако данные имеют разрозненный или противоречивый характер.

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). Сравнение проводили как с группой здоровых доноров, так и между больными контролируемой БА в зависимости от формы и степени тяжести заболевания. Экспрессию и функциональную активность TLR2 и TLR4 оценивали на МНК периферической крови и CD14⁺ моноцитах. Данный подход был разработан на кафедре иммунологии медико-биологического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова [2] и включает три основных этапа.

1 этап: анализ экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* в МНК периферической крови больных БА и здоровых доноров.

2 этап: исследование экспрессии TLR2 и TLR4 на поверхности CD14⁺-моноцитов.

3 этап: оценка функциональной активности TLR2 и TLR4 по лиганд-индуцированной продукции TNF α .

Также 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) [11, 19, 85, 132, 146, 236, 242].

При проведении исследования выявили, что в 1 группе больных аллергической БА легкого и среднетяжелого течения заболевания повышена экспрессия генов *TLR2* и *TLR4* в МНК периферической крови в 2,3 ($p<0,05$) и 1,9 раз, соответственно, по сравнению со здоровыми донорами, при этом уровни экспрессии гена TLR2 в МНК больных легкой и средней степени тяжести были сопоставимы. Достоверное увеличение экспрессии гена *TLR4* по сравнению с группой здоровых доноров выявили только у больных аллергической бронхиальной астмой среднетяжелого течения (в 5 раз, $p<0,05$). Повышение уровня экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* при

бронхиальной астме выявили в экспериментальных работах на мышинных моделях [82, 84, 117]. Кроме того, в работе *Diogenes S. Ferreira и соавт.* [58] было показано, что экспрессия генов *TLR2* и *TLR4* увеличена на клетках слизистых оболочек дыхательных путей у больных тяжелой аллергической БА, закончившейся летальным исходом. В нашем исследовании экспрессия генов *TLR2* и *TLR4* была наиболее выражена у больных со среднетяжелым течением заболевания, что сопоставимо с имеющимися данными литературы.

На 2-м этапе оценивали экспрессию *TLR2* и *TLR4* на моноцитах периферической крови. У больных аллергической БА вне зависимости от степени тяжести заболевания процент $CD14^{+}TLR2^{+}$ и $CD14^{+}TLR4^{+}$ моноцитов выше, чем у здоровых доноров ($p < 0,0001$ и $p < 0,0001$, соответственно). Средняя интенсивность флуоресценции *TLR2* и *TLR4* на $CD14^{+}$ моноцитах также была повышена в группе больных аллергической бронхиальной астмой ($p < 0,0001$ и $p < 0,05$, соответственно), что свидетельствует об усилении экспрессии $TLR2^{+}$ и $TLR4^{+}$ на моноцитах периферической крови больных аллергической БА независимо от тяжести течения заболевания. Данные литературы об экспрессии *TLR* на клетках периферической крови у больных аллергической БА носят разрозненный характер [44, 158]. Наши исследования совпадают с данными работы *Crespo-Lesmana и соавт.*, в которой показано увеличение экспрессии данных рецепторов на клетках макрофагально-моноцитарного ряда как в мокроте, так и в периферической крови [44].

На 3-м этапе при оценке функциональной активности *TLR2* и *TLR4* у больных аллергической БА выявили увеличение лиганд-индуцированной продукции $TNF\alpha$ по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). Повышение функциональной активности *TLR2* и *TLR4* может быть связано с полиморфизмами генов этих рецепторов.

Не выявили различий в *TLR2*-опосредованной продукции $TNF\alpha$ у больных аллергической БА легкой и среднетяжелой БА, при этом у больных со среднетяжелым течением значения *TLR4*-опосредованной продукции

TNF α были выше, чем у больных с легким течением ($p < 0,05$). Повышенные значения могут быть связаны с увеличением экспрессии гена *TLR4* в МНК больных среднетяжелой аллергической БА и с высокой функциональной активностью TLR на клетках периферической крови больных БА. TNF α – провоспалительный цитокин, вырабатываемый преимущественно моноцитами и макрофагами в первые 30 минут после индукции воспаления [57]. Опосредуя свое действие через транскрипционный фактор NF- κ B, TNF α запускает множество различных реакций, в том числе, увеличение экспрессии молекул адгезии, а также усиление миграции нейтрофилов и эозинофилов и синтез других провоспалительных цитокинов и хемокинов [243].

У больных аллергической БА спонтанная продукция IL-10, IL-18 и IL-4 МНК периферической крови выше, чем у здоровых доноров. При этом уровень TLR2- и TLR4- индуцированной продукции IL-10 МНК периферической крови у больных аллергической БА значительно выше, чем у здоровых доноров ($p < 0,05$) и больных смешанной БА ($p < 0,05$) и неаллергической БА ($p > 0,05$). Известно, что IL-10 подавляет дифференцировку Th1 типа [29], что приводит к преобладанию Th2-иммунного ответа. Th2 лимфоциты являются одним из основных источников IL-4, который участвует в переключении изотипов иммуноглобулинов на IgE [242]. Несмотря на повышенный уровень спонтанной продукции IL-4 МНК периферической крови больных АБА по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$), лиганды TLR2 или TLR4 (ПГ и ЛПС, соответственно) не влияли на уровень IL-4 в МНК периферической крови. Это может быть связано с тем, что на лимфоцитах периферической крови, основных продуцентах IL-4, исследуемые TLR представлены в меньшей степени, чем на моноцитах [4].

Недавно стало известно, что TLR4 может принимать участие в распознавании бытовых аллергенов, в частности, Der p [178, 208]. В связи с этим, мы выделили внутри группы больных аллергической БА пациентов с сенсibilизацией к домашней пыли. Была проведена оценка спонтанной и

индуцированной Der p продукции МНК периферической крови $\text{TNF}\alpha$, IL-4 и IL-13.

Нами выявлено, что в ответ на аллерген клещей домашней пыли (Der p) происходит увеличение продукции $\text{TNF}\alpha$ МНК периферической крови больных аллергической бронхиальной астмой и здоровых доноров ($p < 0,05$). На продукцию IL-4 и IL-13 МНК периферической крови Der p не влияет. При этом у больных БА индуцированная Der p продукция $\text{TNF}\alpha$ достоверно выше, чем у здоровых доноров ($p < 0,05$).

Согласно литературным данным, увеличение содержания ЛПС в домашней пыли коррелирует с усилением тяжести БА [141]. Работами *Michel O. и соавт.* показано, что содержание ЛПС в домашней пыли колеблется от 300 до 18 000 нг/г [141, 169]. У пациентов с бронхиальной астмой средней степени тяжести вдыхание воздуха, содержащего небольшие количества ЛПС (250 нг/м^3), за 4 часа до проведения провокационных тестов с аллергенами приводило к усилению реактивности бронхов и эозинофилии [141, 165]. В работе *Hunt L. и соавт.* было показано, что контакт с аллергеном, контаминированным ЛПС, приводит к увеличению количества нейтрофилов в бронхоальвеолярном лаваже у пациентов с бронхиальной астмой [88]. На следующем этапе исследования мы выявили, что в ответ на аллерген клещей домашней пыли (Der p) в комбинации с ЛПС также происходит увеличение продукции $\text{TNF}\alpha$ МНК периферической крови больных аллергической бронхиальной астмой и здоровых доноров ($p < 0,05$). При этом уровни $\text{TNF}\alpha$ у больных БА выше, чем у здоровых доноров ($p < 0,05$). Аллерген клещей домашней пыли (Der p) и совместное действие Der p с ЛПС не приводит к увеличению выработки IL-4 и IL-13 МНК периферической крови больных БА и здоровых доноров. Сочетанное действие Der p с ЛПС имело тенденцию к повышению продукции $\text{TNF}\alpha$ по сравнению со стимуляцией только Der p, однако данные не были достоверными. ЛПС присутствует как в стенке грамотрицательных бактерий, так и является компонентом домашней пыли [53], это может способствовать

постоянной активации TLR4. Сочетанное воздействие причинно-значимого аллергена и ЛПС на организм пациентов с аллергической БА может способствовать формированию у больного смешанной формы БА. Полученные данные могут быть использованы в дальнейшем для обоснования назначения постоянной базисной терапии больным с сенсibilизацией к аллергенам клещей домашней пыли.

Смешанная бронхиальная астма сочетает в себе признаки как аллергической, так и неаллергической бронхиальной астмы. На 1 этапе исследования, у пациентов этой группы наблюдалось увеличение экспрессии генов *TLR2* в 2,8 раза ($p < 0,05$) и *TLR4* в 3,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению со здоровыми донорами. На втором этапе выявили, что у больных смешанной БА увеличен процент $CD14^{+}TLR2^{+}$ ($p < 0,0001$) и $CD14^{+}TLR4^{+}$ ($p < 0,01$) моноцитов, а также СИФ TLR2 ($p < 0,0001$) и TLR4 ($p < 0,01$) по сравнению со здоровыми донорами. На третьем этапе выявили, что у больных смешанной БА повышена спонтанная продукция $TNF\alpha$, IL-10, IL-18 и IL-4 по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). Увеличена TLR2- и TLR4-индуцированная продукция $TNF\alpha$ и IL-10 МНК периферической крови по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). Особенный интерес представляют полученные нами данные о том, что TLR4-индуцированная продукция $TNF\alpha$ МНК периферической крови у больных смешанной БА достоверно выше, чем у больных аллергической БА ($p < 0,05$). Существенных различий по другим исследуемым показателям между больными смешанной и аллергической БА не было выявлено. Возможно, что именно увеличение функциональной активности TLR4 способствует формированию смешанного типа воспаления в данной группе больных и развитию обострений при присоединении к БА бактериальной или вирусной инфекции.

В группу больных неаллергической БА вошли пациенты без сенсibilизации к аллергенам и данных о наличии атопии. Механизмы развития воспаления при неаллергической бронхиальной астме до конца не

изучены. В выбранной нами группе пациентов обострения БА наблюдались только на фоне различных вирусных и бактериальных инфекций.

На первом этапе исследования нами выявлено, что у больных неаллергической БА экспрессия генов *TLR2* и *TLR4* выше, чем у здоровых доноров, в 2,5 раза ($p < 0,05$). На втором этапе было показано, что по сравнению со здоровыми донорами у больных неаллергической БА увеличено количество $CD14^{+}TLR2^{+}$ и $CD14^{+}TLR4^{+}$ моноцитов ($p < 0,0001$ и $p < 0,0001$, соответственно), а также СИФ *TLR2* ($p < 0,0001$) и *TLR4* ($p < 0,01$). При этом количество $CD14^{+}TLR4^{+}$ моноцитов периферической крови в данной группе пациентов достоверно выше по сравнению с больными аллергической ($p < 0,05$) и смешанной БА ($p < 0,05$). Также в данной группе больных средняя интенсивность флюоресценции *TLR4* на моноцитах периферической крови выше, чем у больных аллергической БА ($p < 0,05$).

У больных неаллергической БА повышена спонтанная продукция $TNF\alpha$, $IL-10$, $IL-18$ и снижена продукция $IL-13$ МНК периферической крови по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). По сравнению с контрольной группой у больных неаллергической БА также повышена *TLR2*- и *TLR4*-индуцированная продукция $TNF\alpha$ и *TLR4*-индуцированная продукция $IL-10$ МНК периферической крови ($p < 0,05$).

В группе больных неаллергической БА мы выявили, что *TLR4*-индуцированная продукция $TNF\alpha$ МНК периферической крови в 2,4 и 1,7 раз превышает исследуемый показатель у больных аллергической и смешанной БА, соответственно ($p < 0,001$ и $p < 0,05$, соответственно). Следовательно, в данной группе пациентов наиболее высокая функциональная активность *TLR4* на МНК в сочетании с повышенным уровнем СИФ данного рецептора на моноцитах периферической крови. Контакт с инфекционными агентами может приводить к существенному увеличению экспрессии и функциональной активности данных рецепторов, что будет в дальнейшем способствовать формированию цитокинового дисбаланса.

В исследованиях последних лет показано, что IL-33 важен при развитии аллергического воспаления в коже, слизистой оболочке полости носа [71, 76, 181]. У больных бронхиальной астмой была обнаружена высокая экспрессия IL-33 в легочной ткани [31, 175]. Показано, что IL-33 увеличивает продукцию CCL3 M1-клетками, усиливает синтез CCL18 и способствует дифференцировке макрофагов в M2-клетки [137]. В нашем исследовании мы не выявили повышения спонтанной продукции IL-33 МНК периферической крови больных БА или здоровых доноров. Стимуляция МНК периферической крови здоровых доноров и больных БА лигандами TLR2 и TLR4 (ПГ и ЛПС, соответственно) не приводила к статистически достоверному изменению продукции IL-33. Возможно, что в системном кровотоке изменение экспрессии TLR не приводит к нарушениям в продукции IL-33, а повышение концентрации IL-33 у больных с аллергопатологией обусловлено продукцией этого цитокина клетками эпителия дыхательных путей. Также известно, что в крови многие клетки продуцируют растворимую форму ST2. Экспрессия sST2 индуцибельна, изоформа sST2 служит рецептором-ловушкой для IL-33, ингибирует сигнальный путь через ST2L, и может связывать избыток IL-33 [224].

Высокий уровень экспрессии TLR2 и TLR4 на моноцитах периферической крови может влиять на формирование цитокинового дисбаланса. Изменение продукции цитокинов клетками в процессе воспаления может в дальнейшем сказаться на формировании более тяжелого состояния пациента или развитии осложнений. Во всех исследуемых группах спонтанная и TLR2-, TLR4-индуцированная продукция таких цитокинов как TNF α и IL-10 у больных бронхиальной астмой была достоверно выше по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$).

Выявленные в нашей работе изменения экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 в МНК периферической крови свидетельствуют о вовлечении этих рецепторов в патогенез бронхиальной астмы. Механизм

вовлечения TLR2 и TLR4 в иммунопатогенез аллергической, смешанной и неаллергической БА может быть различным (рис. 37).

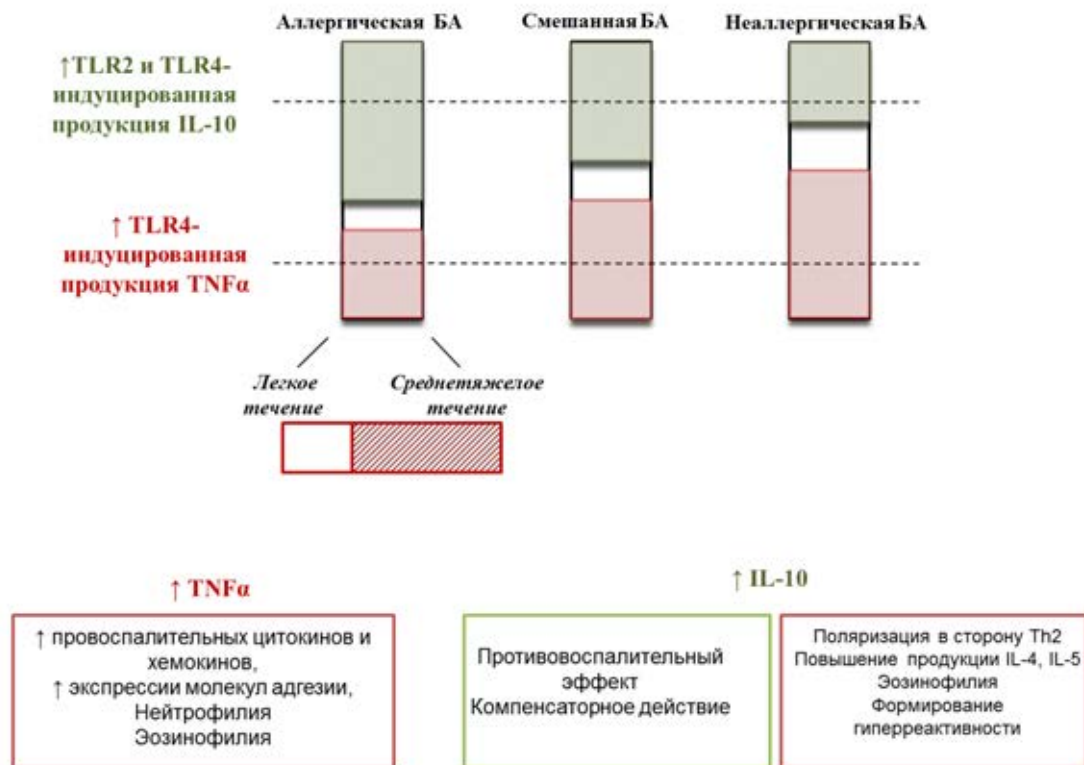


Рисунок 37. Соотношение TLR2- и TLR4-индуцированной продукции TNFα и IL-10 у больных БА разных форм.

Повышенная экспрессия TLR2 и TLR4 у больных БА может оказывать влияние на формирование неконтролируемой продукции цитокинов, вносящих существенный вклад в поддержание воспаления. При аллергической БА постоянный контакт с аллергеном может активировать TLR2 и TLR4 на клетках. Дополнительный вклад могут вносить лиганды TLR из «окружающей среды», и в зависимости от их концентрации, может усугубляться течение заболевания. Это подтверждается увеличением функциональной активности TLR4 с усилением степени тяжести заболевания. Гиперактивация TLR2 и TLR4 может привести к усилению восприимчивости к инфекционным агентам, что будет способствовать формированию смешанной БА. Повышенная продукция IL-10 у больных

аллергической БА может с одной стороны способствовать поляризации иммунного ответа в сторону Th2 типа, с другой – быть компенсаторным.

Присоединение вирусных и бактериальных инфекций часто сопровождается развитием обострения бронхиальной астмы [164, 204]. При неаллергической БА функциональная активность TLR4 в МНК периферической крови наиболее высокая, что может приводить к усилению восприимчивости исследуемой когорты пациентов к различным патогенам вирусной или бактериальной природы. Активация TLR в ответ на патоген может приводить к излишней продукции провоспалительных цитокинов. В работе *Tashiro H. и соавт.* [203] на экспериментальных мышинных моделях было установлено, что моноциты периферической крови вовлечены в процесс поддержания аллергического воспаления больше, чем альвеолярные макрофаги. Моноциты принимают участие в элиминации патогенов, а также в формировании цитокинового микроокружения [203, 218, 219], на них TLR2 и TLR4 представлены наиболее широко [38, 249]. У больных с различными формами БА в дальнейшем моноциты мигрируют в подслизистую оболочку бронхов и формируют различный пул макрофагов - M1 или M2. Известно, что M1 макрофаги играют большую роль при неаллергической бронхиальной астме, а M2 макрофаги – при аллергической бронхиальной астме [170]. Из-за высокой экспрессии и функциональной активности TLR, в тканях макрофаги могут продуцировать чрезмерное количество про- и противовоспалительных цитокинов. Например, увеличение продукции TNF α приводит к усилению синтеза провоспалительных цитокинов и хемокинов, увеличению экспрессии молекул адгезии, привлечению нейтрофилов и эозинофилов [90, 238]. Нейтрофилы в повышенных количествах обнаруживаются в слюне и бронхоальвеолярном лаваже пациентов с астматическим статусом, а также в дыхательных путях пациентов, умерших вскоре после приступа бронхиальной астмы [243]. Таким образом, увеличение TLR-индуцированной выработки TNF α опосредует развитие и поддержание воспаления дыхательных путей. Увеличение продукции TNF α может являться триггером

увеличения концентрации противовоспалительных цитокинов, в частности, IL-10. Данный цитокин обладает плеiotропными эффектами и считается основным регулятором воспаления при аллергических заболеваниях [40]. Повышение продукции IL-10 у больных БА может быть компенсаторным, направленным на снижение воспаления, что показано в ряде исследований о протективной роли данного цитокина в патогенезе БА [43, 191]. В других исследованиях было показано, что IL-10 может способствовать формированию эозинофилии и увеличивать продукцию клетками IL-5 [236], способствовать формированию гиперреактивности дыхательных путей на экспериментальных мышинных моделях [94, 185]. Таким образом, IL-10 может способствовать как поддержанию воспаления, так и его разрешению.

Изменение экспрессии и функциональной активности TLR у больных БА может приводить к формированию цитокинового дисбаланса, что может повышать гиперреактивность бронхов, способствовать обструкции дыхательных путей, формированию обострения бронхиальной астмы, определять развитие осложнений после перенесенной инфекции, поддерживать клиническую симптоматику.

Исследование роли TLR2 и TLR4 в иммунопатогенезе БА может способствовать развитию новых подходов к профилактике и лечению данного заболевания. Изменения экспрессии и функциональной активности TLR2 и TLR4 могут служить критериями оценки проводимой терапии, в том числе эффективности новых лекарственных препаратов. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов врожденного иммунитета, вовлеченных в развитие бронхиальной астмы, поможет уточнить иммунопатогенез данного заболевания, определить новые диагностические маркеры и терапевтические мишени.

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 $TNF\alpha$, 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 сокращений

БА – бронхиальная астма;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИФА – иммуноферментный анализ;

МНК – моноклеарные клетки;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

БА – бронхиальная астма

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж;

ПГ – пептидогликан;

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

ECD – внеклеточный домен TLR

HDM – клещ домашней пыли

ИКК – киназа ингибитора ядерного фактора κB (IκB);

IL – интерлейкин;

IRAK – киназа, ассоциированная с рецептором ИЛ-1;

LRR – богатые лейцином повторы;

MyD88 – белок первичного ответа миелоидной дифференцировки 88;

PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны;

TIR-домен – Toll/ИЛ-1 рецепторный домен;

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

TLSP – тимический стромальный лимфопоэтин

TNF – фактор некроза опухоли;

TRAF6 – фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли;

TRAM – родственная TRIF адаптерная молекула;

TRIF – TIR-домен-содержащий адаптерный белок, индуцирующий ИФ-β

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

Список литературы

1. Борисова Т.В. Цитокины: участие в патогенезе и перспективы лечебного применения при бронхиальной астме / Т. В. Борисова, А. В. Караулов, С. И. Сокурено // Клиническая практика Мультидисциплинарный журнал для врачей – 2010. – Т. 2 – С. 81–87.
2. Ковальчук Л.В. Рецепторы врожденного иммунитета: подходы к количественной и функциональной оценке Toll-подобных рецепторов / Ковальчук Л. В., Хорева М. В., Варивода А. С., Кондратенко И. В., Грачева Л. А., Константинова Е. В., Бологов А. А., Юдин А. А. / Иммунология – 2008. – Т. 4. – С. 223–227.
3. Хаитов Р.М. Аллергология и иммунология: национальное руководство / Р. М. Хаитов, Н. И. Ильина – М: ГЭОТАР-Медиа, 2009.
4. Хорева М.В. Анализ экспрессии TLR 2 и TLR 4 на клетках периферической крови больных бронхиальной астмой. / М. В. Хорева, А. Д. Смирнова, Т. В. Латышева, М. В. Захаров // Российский аллергологический журнал – 2016. – Т. 3 – № 10 (19) – С. 358–360.
5. Adamczak D. The Role Of Toll-Like Receptors And Vitamin D In Cardiovascular Diseases—A Review / D. Adamczak // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – Vol. 18 – № 11– P. 2252.
6. Adner M. Toll-Like Receptor (Tlr) 7 Decreases And Tlr9 Increases The Airway Responses In Mice With Established Allergic Inflammation / M. Adner, M. Starkhammar, S. K. Georén, S.-E. Dahlén, L.-O. Cardell // Eur. J. Pharmacol. – 2013. – Vol. 718 – № 1–3– P. 544–551.
7. Afzal W. Asthma And Innate Immunity; Current Perspective / W. Afzal // J Pak Med Assoc – 2017. – Vol. 67 – № 9– P. 1310–1312.
8. Akira S. Pathogen Recognition By Innate Immunity And Its Signaling. / S. Akira // Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. – 2009. – Vol. 85 – № 4– P. 16-34.
9. Albuquerque R. V Association Of Polymorphisms Within The Tumour Necrosis Factor (Tnf) Genes And Childhood Asthma / R. V Albuquerque, C. M.

Hayden, L. J. Palmer, I. A. Laing, P. J. Rye, N. A. Gibson, P. R. Burton, J. Goldblatt, P. N. Lesouëf // *Clin Exp Allergy* – 1998. – Vol. 28 – № 5– P. 578–584.

10. Allakhverdi Z. Thymic Stromal Lymphopoietin Is Released By Human Epithelial Cells In Response To Microbes, Trauma, Or Inflammation And Potently Activates Mast Cells / Z. Allakhverdi, M. R. Comeau, H. K. Jessup, B. R. Yoon, A. Brewer, S. Chartier, N. Paquette, S. F. Ziegler, M. Sarfati, G. Delespesse // *J Exp Med* – 2007. – Vol. 204 – № 2– P. 253–258.

11. Allakhverdi Z. Cutting Edge: The St2 Ligand Il-33 Potently Activates And Drives Maturation Of Human Mast Cells / Z. Allakhverdi, D. E. Smith, M. R. Comeau, G. Delespesse // *J Immunol* – 2007. – Vol. 179 – № 4– P. 2051–2054.

12. Ando M. Serum Interleukins 12 And 18 And Immunoglobulin E Concentrations And Allergic Symptoms In Japanese Schoolchildren / M. Ando, M. Shima // *J Investig Allergol Clin Immunol* – 2007. – Vol. 17 – № 1– P. 14–19.

13 Andreakos E. Il-25: The Missing Link Between Allergy, Viral Infection, And Asthma? / E. Andreakos, N. G. Papadopoulos // *Sci Transl Med* – 2014. – Vol. 6 – № 256– P. 1-3.

14. Athari S.S. Critical Role Of Toll-Like Receptors In Pathophysiology Of Allergic Asthma / S. S. Athari, S. M. Athari, F. Beyzay, M. Movassaghi, E. Mortaz, M. Taghavi // *Eur J Pharmacol* – 2017 – Vol. 808 – P. 21-27.

15. Bagnasco D. A Critical Evaluation Of Anti-Il-13 And Anti-Il-4 Strategies In Severe Asthma / D. Bagnasco, M. Ferrando, G. Varricchi, G. Passalacqua, G. W. Canonica // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2016. – Vol. 170 – № 2– P. 122–131.

16. Baines K.J. Transcriptional Phenotypes Of Asthma Defined By Gene Expression Profiling Of Induced Sputum Samples / K. J. Baines, J. L. Simpson, L. G. Wood, R. J. Scott, P. G. Gibson // *J Allergy Clin Immunol* – 2011. – Vol. 127 – № 1– P. 153–160.

17. Barlow J.L. Innate Il-13-Producing Nuocytes Arise During Allergic Lung Inflammation And Contribute To Airways Hyperreactivity / J. L. Barlow, A.

Bellosi, C. S. Hardman, L. F. Drynan, S. H. Wong, J. P. Cruickshank, A. N. Mckenzie // *J Allergy Clin Immunol* – 2012. – Vol. 129 – № 1– P. 191–194.

18. Barlow J.L. Il-33 Is More Potent Than Il-25 In Provoking Il-13-Producing Nuocytes (Type 2 Innate Lymphoid Cells) And Airway Contraction / J. L. Barlow, S. Peel, J. Fox, V. Panova, C. S. Hardman, A. Camelo, C. Bucks, X. Wu, C. M. Kane, D. R. Neill, R. J. Flynn, I. Sayers, I. P. Hall, A. N. Mckenzie // *J Allergy Clin Immunol* – 2013. – Vol. 132 – № 4– P. 933–941.

19. Barnes P.J. The Cytokine Network In Asthma And Chronic Obstructive Pulmonary Disease / P. J. Barnes // *J Clin Invest* – 2008. – Vol. 118 – № 11– P. 3546–3556.

20. Bartemes K.R. Enhanced Innate Type 2 Immune Response In Peripheral Blood From Patients With Asthma / K. R. Bartemes, G. M. Kephart, S. J. Fox, H. Kita // *J Allergy Clin Immunol* – 2014. – Vol. 134 – № 3– P. 671–678.

21. Bauer S. Human Tlr9 Confers Responsiveness To Bacterial Dna Via Species-Specific Cpg Motif Recognition / S. Bauer, C. J. Kirschning, H. Häcker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, G. B. Lipford // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2001. – Vol. 98 – № 16– P. 9237–9242.

22. Beeh K.-M. The Novel Tlr-9 Agonist Qbg10 Shows Clinical Efficacy In Persistent Allergic Asthma / K.-M. Beeh, F. Kannies, F. Wagner, C. Schilder, I. Naudts, A. Hammann-Haenni, J. Willers, H. Stocker, P. Mueller, M. F. Bachmann, W. A. Renner // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2013. – Vol. 131 – № 3– P. 866–874.

23. Bezemer G.F. Dual Role Of Toll-Like Receptors In Asthma And Chronic Obstructive Pulmonary Disease / G. F. Bezemer, S. Sagar, J. Van Bergenhenegouwen, N. A. Georgiou, J. Garssen, A. D. Kraneveld, G. Folkerts // *Pharmacol Rev* – 2012. – Vol. 64 – № 2– P. 337–358.

24. Bieneman A.P. Toll-Like Receptor 2 Ligands Activate Human Basophils For Both Ige-Dependent And Ige-Independent Secretion / A. P. Bieneman, K. L. Chichester, Y. H. Chen, J. T. Schroeder // *J Allergy Clin Immunol* – 2005. – Vol. 115 – № 2– P. 295–301.

25. Botos I. The Structural Biology Of Toll-Like Receptors. / I. Botos, D. M. Segal, D. R. Davies // *Structure* – 2011. – Vol. 19 – № 4– P. 447–459.

26. Brown R.A. The R753q Polymorphism Abrogates Toll-Like Receptor 2 Signaling In Response To Human Cytomegalovirus / R. A. Brown, J. H. Gralewski, R. R. Razonable // *Clin Infect Dis* – 2009. – Vol. 49 – № 9– P. 1-6.

27. Byers D.E. Long-Term Il-33-Producing Epithelial Progenitor Cells In Chronic Obstructive Lung Disease / D. E. Byers, J. Alexander-Brett, A. C. Patel, E. Agapov, G. Dang-Vu, X. Jin, K. Wu, Y. You, Y. Alevy, J. P. Girard, T. S. Stappenbeck, G. A. Patterson, R. A. Pierce, S. L. Brody, M. J. Holtzman // *J Clin Invest* – 2013. – Vol. 123 – № 9– P. 3967–3982.

28. Byrne A.J. Pulmonary Macrophages: Key Players In The Innate Defence Of The Airways / A. J. Byrne, S. A. Mathie, L. G. Gregory, C. M. Lloyd // *Thorax* – 2015. – Vol. 70 – № 12– P. 1189–1196.

29. Cai R. Surface-Displayed Il-10 By Recombinant *Lactobacillus Plantarum* Reduces Th1 Responses Of Raw264.7 Cells Stimulated With Poly(I:C) Or Lps / R. Cai, Y. Jiang, W. Yang, S. Shi, C. Shi, J. Hu, W. Gu, L. Ye, F. Zhou, Q. Gong, W. Han, G. Yang, C. Wang // *J Microbiol Biotechnol* – 2016. – Vol. 26 – № 2– P. 421–431.

30. Campbell E. Differential Roles Of Il-18 In Allergic Airway Disease: Induction Of Eotaxin By Resident Cell Populations Exacerbates Eosinophil Accumulation / E. Campbell, S. L. Kunkel, R. M. Strieter, N. W. Lukacs // *J Immunol* – 2000. – Vol. 164 – № 2– P. 1096–1102.

31. Carriere V. Il-33, The Il-1-Like Cytokine Ligand For St2 Receptor, Is A Chromatin-Associated Nuclear Factor In Vivo / V. Carriere, L. Roussel, N. Ortega, D. A. Lacorre, L. Americh, L. Aguilar, G. Bouche, J. P. Girard // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2007. – Vol. 104 – № 1– P. 282–287.

32. Cayrol C. Il-33: An Alarmin Cytokine With Crucial Roles In Innate Immunity, Inflammation And Allergy / C. Cayrol, J. P. Girard // *Curr Opin Immunol* – 2014. – Vol. 31– P. 31–37.

33. Chen C. Role Of Extracellular Rna And Tlr3-Trif Signaling In Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury / C. Chen, Y. Feng, L. Zou, L. Wang, H. H. Chen, J. Y. Cai, J. M. Xu, D. E. Sosnovik, W. Chao // J Am Hear. Assoc – 2014. – Vol. 3 – № 1– P. 1-17.
34. Chen K. The Active Contribution Of Toll-Like Receptors To Allergic Airway Inflammation / K. Chen, Y. Xiang, X. Yao, Y. Liu, W. Gong, T. Yoshimura, J. M. Wang // Int Immunopharmacol – 2011. – Vol. 11 – № 10– P. 1391–1398.
35. Cheng D. Epithelial Interleukin-25 Is A Key Mediator In Th2-High, Corticosteroid-Responsive Asthma / D. Cheng, Z. Xue, L. Yi, H. Shi, K. Zhang, X. Huo, L. R. Bonser, J. Zhao, Y. Xu, D. J. Erle, G. Zhen // Am J Respir Crit Care Med – 2014. – Vol. 190 – № 6 – P. 639–648.
36. Chun E. Toll-Like Receptor Expression On Peripheral Blood Mononuclear Cells In Asthmatics; Implications For Asthma Management / E. Chun, S. H. Lee, S. Y. Lee, E. J. Shim, S. H. Cho, K. U. Min, Y. Y. Kim, H. W. Park // J Clin Immunol – 2010. – Vol. 30 – № 3 – P. 459–464.
37. Cochet F. The Role Of Carbohydrates In The Lipopolysaccharide (Lps)/Toll-Like Receptor 4 (Tlr4) Signalling. / F. Cochet, F. Peri // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – Vol. 18 – № 11 – P. 1-16.
38. Connolly D.J. New Developments In Toll-Like Receptor Targeted Therapeutics / D. J. Connolly, L. A. O’neill // Curr Opin Pharmacol – 2012. – Vol. 12 – № 4 – P. 510–518.
39. Conti P. Potential Therapeutic Use Of Il-37: A Key Suppressor Of Innate Immunity And Allergic Immune Responses Mediated By Mast Cells / P. Conti, F. Carinci, G. Lessiani, E. Spinaz, S. K. Kritas, G. Ronconi, A. Caraffa, T. C. Theoharides // Immunol Res – 2017 - Vol. 65 - № 5 – P. 982-986 .
40. Coomes S.M. Cd4(+) Th2 Cells Are Directly Regulated By Il-10 During Allergic Airway Inflammation / S. M. Coomes, Y. Kannan, V. S. Pelly, L. J. Entwistle, R. Guidi, J. Perez-Lloret, N. Nikolov, W. Müller, M. S. Wilson // Mucosal Immunol – 2017. – Vol. 10 – № 1– P. 150–161.

41. Corrigan C.J. Allergen-Induced Expression Of Il-25 And Il-25 Receptor In Atopic Asthmatic Airways And Late-Phase Cutaneous Responses / C. J. Corrigan, W. Wang, Q. Meng, C. Fang, G. Eid, M. R. Caballero, Z. Lv, Y. An, Y. H. Wang, Y. J. Liu, A. B. Kay, T. H. Lee, S. Ying // *J Allergy Clin Immunol* – 2011. – Vol. 128 – № 1– P. 116–124.

42. Corrigan C.J. T-Helper Cell Type 2 (Th2) Memory T Cell-Potentiating Cytokine Il-25 Has The Potential To Promote Angiogenesis In Asthma / C. J. Corrigan, W. Wang, Q. Meng, C. Fang, H. Wu, V. Reay, Z. Lv, Y. Fan, Y. An, Y. H. Wang, Y. J. Liu, T. H. Lee, S. Ying // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2011. – Vol. 108 – № 4– P. 1579–1584.

43. Corthésy B. Therapeutic Intranasal Instillation Of Allergen-Loaded Microbubbles Suppresses Experimental Allergic Asthma In Mice / B. Corthésy, G. Bioley // *Biomaterials* – 2017. – Vol. 142 – P. 41–51.

44. Crespo-Lessmann A. Expression Of Toll-Like Receptors 2 And 4 In Subjects With Asthma By Total Serum Ige Level / A. Crespo-Lessmann, E. Mateus, S. Vidal, D. Ramos-Barbón, M. Torrejón, J. Giner, L. Soto, C. Juárez, V. Plaza // *Respir Res* – 2016. – Vol. 17 – № 41 – P. 1-8.

45. Crespo-Lessmann A. Asthma With Bronchial Hypersecretion: Expression Of Mucins And Toll-Like Receptors In Sputum And Blood / A. Crespo-Lessmann, E. Mateus, M. Torrejón, A. Belda, J. Giner, S. Vidal, O. Sibila, V. Plaza // *J Asthma Allergy* – 2017. – Vol. 10 – P. 269–276.

46. Davoodi P. Serum Levels Of Interleukin-13 And Interferon-Gamma From Adult Patients With Asthma In Mysore / P. Davoodi, P. A. Mahesh, A. D. Holla, G. S. Vijayakumar, B. S. Jayaraj, S. Chandrashekara, N. B. Ramachandra // *Cytokine* – 2012. – Vol. 60 – № 2– P. 431–437.

47. Deckers J. Innate Immune Cells In Asthma / J. Deckers, F. Branco Madeira, H. Hammad // *Trends Immunol* – 2013. – Vol. 34 – № 11– P. 540–547.

48. Doherty T.A. Lung Type 2 Innate Lymphoid Cells Express Cysteinyl Leukotriene Receptor 1, Which Regulates Th2 Cytokine Production / T. A.

Doherty, N. Khorram, S. Lund, A. K. Mehta, M. Croft, D. H. Broide // J Allergy Clin Immunol – 2013. – Vol. 132 – № 1– P. 205–213.

49. Dong L. Different Doses Of Lipopolysaccharides Regulate The Lung Inflammation Of Asthmatic Mice Via Tlr4 Pathway In Alveolar Macrophages / L. Dong, H. Li, S. Wang, Y. Li // J Asthma – 2009. – Vol. 46 – № 3 – P. 229–233.

50. Doran E. Interleukin-13 In Asthma And Other Eosinophilic Disorders / E. Doran, F. Cai, C. T. J. Holweg, K. Wong, J. Brumm, J. R. Arron // Front Med – 2017. – Vol. 4 – P. 1-14.

51. Drake M.G. The Therapeutic Potential Of Toll-Like Receptor 7 Stimulation In Asthma / M. G. Drake, E. H. Kaufman, A. D. Fryer, D. B. Jacoby // Inflamm Allergy Drug Targets – 2012. – Vol. 11 – № 6 – P. 484–491.

52. Duan D. Activation Of The Tlr/Myd88/Nf-Kb Signal Pathway Contributes To Changes In Il-4 And Il-12 Production In Piglet Lymphocytes Infected With Porcine Circovirus Type 2 In Vitro / D. Duan, S. Zhang, X. Li, H. Guo, M. Chen, Y. Zhang, J. Han, Y. Lv // Plos One – 2014. – Vol. 9 – № 5 – P. 1-8.

53. Eisenbarth S.C. Lipopolysaccharide-Enhanced, Toll-Like Receptor 4-Dependent T Helper Cell Type 2 Responses To Inhaled Antigen / S. C. Eisenbarth, D. A. Piggott, J. W. Huleatt, I. Visintin, C. A. Herrick, K. Bottomly // J Exp Med – 2002. – Vol. 196 – № 12 – P. 1645–1651.

54. Eisenbarth S.C. Understanding Asthma Pathogenesis: Linking Innate And Adaptive Immunity / S. C. Eisenbarth, S. Cassel, K. Bottomly // Curr Opin Pediatr – 2004. – Vol. 16 – № 6 – P. 659–666.

55. Ekman A.K. Toll-Like Receptor 7 Activation Reduces The Contractile Response Of Airway Smooth Muscle / A. K. Ekman, M. Adner, L. O. Cardell // Eur J Pharmacol – 2011. – Vol. 652 – № 1–3– P. 145–151.

56. Eskian M. Monoclonal Antibodies For Treatment Of Eosinophilic Esophagitis / M. Eskian, M. Khorasanizadeh, A. H. Assa'ad, N. Rezaei // Clin. Rev. Allergy Immunol. – 2017 – P. 1-11.

57. Esposito E. Tnf-Alpha As A Therapeutic Target In Inflammatory Diseases, Ischemia-Reperfusion Injury And Trauma / E. Esposito, S. Cuzzocrea // *Curr Med Chem* – 2009. – Vol. 16 – № 24 – P. 3152–3167.

58. Ferreira D.S. Toll-Like Receptors 2, 3 And 4 And Thymic Stromal Lymphopoietin Expression In Fatal Asthma / D. S. Ferreira, R. Annoni, L. F. Silva, M. Buttignol, A. B. Santos, M. C. Medeiros, L. N. Andrade, C. Y. Yick, P. J. Sterk, J. L. Sampaio, M. Dolhnikoff, S. E. Wenzel, T. Mauad // *Clin Exp Allergy* – 2012. – Vol. 42 – № 10– P. 1459–1471.

59. Ferreira T.P. Potential Of Pegylated Toll-Like Receptor 7 Ligands For Controlling Inflammation And Functional Changes In Mouse Models Of Asthma And Silicosis / T. P. Ferreira, L. L. Mariano, R. Ghiloso-Bortolini, A. C. De Arantes, A. J. Fernandes, M. Berni, V. Cecchinato, M. Uguccioni, R. Maj, A. Barberis, P. M. Silva, M. A. Martins // *Front Immunol* – 2016. – Vol. 7– № 95 – P. 1-15.

60. Flood-Page P. A Study To Evaluate Safety And Efficacy Of Mepolizumab In Patients With Moderate Persistent Asthma. / P. Flood-Page, C. Swenson, I. Faierman, J. Matthews, M. Williams, L. Brannick, D. Robinson, S. Wenzel, W. Busse, T. T. Hansel, N. C. Barnes, International Mepolizumab Study Group // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2007. – Vol. 176 – № 11– P. 1-10.

61. Fuchs B. Modulation Of Asthma And Allergy By Addressing Toll-Like Receptor 2 / B. Fuchs, A. Braun // *J Occup Med Toxicol* – 2008. – Vol. 3 - № 1 – P. 1-4.

62. Gandhi N.A. Targeting Key Proximal Drivers Of Type 2 Inflammation In Disease. / N. A. Gandhi, B. L. Bennett, N. M. H. Graham, G. Pirozzi, N. Stahl, G. D. Yancopoulos // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2016. – Vol. 15 – № 1– P. 35–50.

63. Gandhi N.A. Commonality Of The Il-4/Il-13 Pathway In Atopic Diseases / N. A. Gandhi, G. Pirozzi, N. M. H. Graham // *Expert Rev. Clin. Immunol.* – 2017. – Vol. 13 – № 5– P. 425–437.

64. Gina Global Strategy For Asthma Management And Prevention / Gina // *Glob. Initiat. Asthma* – 2011. – Vol. 31– P. 1–105.

65. Global Asthma Networkthe Global Asthma Report 2014 / Global Asthma Network – 2014.– P. 14-16.
66. Gómez-Casado C. Allergen-Associated Immunomodulators: Modifying Allergy Outcome / C. Gómez-Casado, A. Díaz-Perales // Arch Immunol Ther Exp – 2016. – Vol. 64 – № 5– P. 339–347.
67. Goodsell D.S. Toll-Like Receptors // J Mol Recognit. –2011 – Vol 19 - № 5 – P. 387-388
68. Gordon S. Alternative Activation Of Macrophages: Mechanism And Functions / S. Gordon, F. O. Martinez // Immunity – 2010. – Vol. 32 – № 5– P. 593–604.
69. Gorskii V.A. Effect Of Lornoxicam Therapy On Expression Of Tlr2 And Tlr4 Mrna During Systemic Complications Of Acute Pancreatitis / V. A. Gorskii, M. A. Agapov, M. V Khoreva, V. A. Petrov, A. Y. Kravchenko, A. I. Battaev // Bull Exp Biol Med – 2014. – Vol. 158 – № 1– P. 13–15.
70. Gould H.J. The Allergic March From Staphylococcus Aureus Superantigens To Immunoglobulin E / H. J. Gould, P. Takhar, H. E. Harries, E. Chevetton, B. J. Sutton // Chem Immunol Allergy – 2007. – Vol. 93 – P. 106–136.
71. Haenuki Y. A Critical Role Of Il-33 In Experimental Allergic Rhinitis / Y. Haenuki, K. Matsushita, S. Futatsugi-Yumikura, K. J. Ishii, T. Kawagoe, Y. Imoto, S. Fujieda, M. Yasuda, Y. Hisa, S. Akira, K. Nakanishi, T. Yoshimoto // J Allergy Clin Immunol – 2012. – Vol. 130 – № 1– P. 184–194.
72. Halim T.Y. Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Critical For The Initiation Of Adaptive T Helper 2 Cell-Mediated Allergic Lung Inflammation / T. Y. Halim, C. A. Steer, L. Mathä, M. J. Gold, I. Martinez-Gonzalez, K. M. McNaghy, A. N. Mckenzie, F. Takei // Immunity – 2014. – Vol. 40 – № 3– P. 425–435.
73. Han M. The Innate Cytokines Il-25, Il-33, And Tslp Cooperate In The Induction Of Type 2 Innate Lymphoid Cell Expansion And Mucous Metaplasia In Rhinovirus-Infected Immature Mice / M. Han, C. Rajput, J. Y. Hong, J. Lei, J. L.

Hinde, Q. Wu, J. K. Bentley, M. B. Hershenson // J Immunol – 2017. – Vol. 199 – № 4 – P. 1308–1318.

74. Harada M. A Functional Polymorphism In Il-18 Is Associated With Severity Of Bronchial Asthma / M. Harada, K. Obara, T. Hirota, T. Yoshimoto, Y. Hitomi, M. Sakashita, S. Doi, A. Miyatake, K. Fujita, T. Enomoto, M. Taniguchi, N. Higashi, Y. Fukutomi, K. Nakanishi, Y. Nakamura, M. Tamari // Am J Respir Crit Care Med – 2009. – Vol. 180 – № 11– P. 1048–1055.

75. Harada M. Thymic Stromal Lymphopoietin Gene Promoter Polymorphisms Are Associated With Susceptibility To Bronchial Asthma / M. Harada, T. Hirota, A. I. Jodo, Y. Hitomi, M. Sakashita, T. Tsunoda, T. Miyagawa, S. Doi, M. Kameda, K. Fujita, A. Miyatake, T. Enomoto, E. Noguchi, H. Masuko, T. Sakamoto, N. Hizawa, Y. Suzuki, S. Yoshihara, M. Adachi, M. Ebisawa, H. Saito, K. Matsumoto, T. Nakajima, R. A. Mathias, N. Rafaels, K. C. Barnes, B. E. Himes, Q. L. Duan, K. G. Tantisira, S. T. Weiss, Y. Nakamura, S. F. Ziegler, M. Tamari // Am J Respir Cell Mol Biol – 2011. – Vol. 44 – № 6– P. 787–793.

76. Hardman C.S. Il-33 Citrine Reporter Mice Reveal The Temporal And Spatial Expression Of Il-33 During Allergic Lung Inflammation / C. S. Hardman, V. Panova, A. N. Mckenzie // Eur J Immunol – 2013. – Vol. 43 – № 2– P. 488–498.

77. Hata H. Il-18 Together With Anti-Cd3 Antibody Induces Human Th1 Cells To Produce Th1- And Th2-Cytokines And Il-8 / H. Hata, T. Yoshimoto, N. Hayashi, T. Hada, K. Nakanishi // Int Immunol – 2004. – Vol. 16 – № 12– P. 1733–1739.

78. Hayakawa H. Soluble St2 Blocks Interleukin-33 Signaling In Allergic Airway Inflammation / H. Hayakawa, M. Hayakawa, A. Kume, S. Tominaga // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282 – № 36– P. 26369–26380.

79. He M. Urban Pm2.5 Exacerbates Allergic Inflammation In The Murine Lung Via A Tlr2/Tlr4/Myd88-Signaling Pathway / M. He, T. Ichinose, Y. Yoshida, K. Arashidani, S. Yoshida, H. Takano, G. Sun, T. Shibamoto // Sci Rep – 2017. – Vol. 7 – № 1– P. 1-9.

80. Herbert C. Alveolar Macrophages Stimulate Enhanced Cytokine Production By Pulmonary Cd4⁺ T-Lymphocytes In An Exacerbation Of Murine Chronic Asthma / C. Herbert, M. M. Scott, K. H. Scruton, R. P. Keogh, K. C. Yuan, K. Hsu, J. S. Siegle, N. Tedla, P. S. Foster, R. K. Kumar // *Am J Pathol* – 2010. – Vol. 177 – № 4 – P. 1657–1664.

81. Hirota J.A. The Nucleotide-Binding Domain And Leucine-Rich Repeat Protein-3 Inflammasome Is Not Activated In Airway Smooth Muscle Upon Toll-Like Receptor-2 Ligation / J. A. Hirota, H. Im, M. M. Rahman, N. N. Rumzhum, M. Manetsch, C. D. Pascoe, K. Bunge, H. Alkhouri, B. G. Oliver, A. J. Ammit // *Am J Respir Cell Mol Biol* – 2013. – Vol. 49 – № 4 – P. 517–524.

82. Hirschberg A. Different Activations Of Toll-Like Receptors And Antimicrobial Peptides In Chronic Rhinosinusitis With Or Without Nasal Polyposis / A. Hirschberg, M. Kiss, E. Kadocsa, H. Polyanka, K. Szabo, Z. Razga, Z. Bella, L. Tiszlavicz, L. Kemeny // *Eur Arch Otorhinolaryngol* – 2016. – Vol. 273 – № 7– P. 1779–1788.

83. Hoffjan S. Evaluation Of The Toll-Like Receptor 6 Ser249pro Polymorphism In Patients With Asthma, Atopic Dermatitis And Chronic Obstructive Pulmonary Disease / S. Hoffjan, S. Stemmler, Q. Parwez, E. Petrasch-Parwez, U. Arinir, G. Rohde, K. Reinitz-Rademacher, G. Schultze-Werninghaus, A. Bufer, J. T. Epplen // *Bmc Med Genet* – 2005. – Vol. 6– P. 1-6.

84. Hongjia L. House Dust Mite Regulate The Lung Inflammation Of Asthmatic Mice Through Tlr4 Pathway In Airway Epithelial Cells / L. Hongjia, G. Qingling, L. Meiyang, W. Weixuan, Z. Lihong, G. Yongsheng, L. Yanli, W. Jinxiang, D. Liang // *Cell Biochem Funct* – 2010. – Vol. 28 – № 7– P. 597–603.

85. Hoshino T. Cutting Edge: Il-18-Transgenic Mice: In Vivo Evidence Of A Broad Role For Il-18 In Modulating Immune Function / T. Hoshino, Y. Kawase, M. Okamoto, K. Yokota, K. Yoshino, K. Yamamura, J. Miyazaki, H. A. Young, K. Oizumi // *J Immunol* – 2001. – Vol. 166 – № 12– P. 7014–7018.

86. Hossny E.M. Serum Interleukin-18 Expression In Children With Bronchial Asthma / E. M. Hossny, S. S. El-Sayed, E. S. El-Hadidi, S. R. Moussa // World Allergy Organ J – 2009. – Vol. 2 – № 5– P. 63–68.
87. Huang A.X. Plasma Inflammatory Cytokine Il-4, Il-8, Il-10, And Tnf-A Levels Correlate With Pulmonary Function In Patients With Asthma-Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Copd) Overlap Syndrome / A. X. Huang, L. W. Lu, W. J. Liu, M. Huang // Med Sci Monit – 2016. – Vol. 22– P. 2800–2808.
88. Hunt L.W. Endotoxin Contamination Causes Neutrophilia Following Pulmonary Allergen Challenge / L. W. Hunt, G. J. Gleich, T. Ohnishi, D. A. Weiler, E. S. Mansfield, H. Kita, S. Sur // Am J Respir Crit Care Med – 1994. – Vol. 149 – № 6– P. 1471–1475.
89. Hussein Y.M. Toll-Like Receptor 2 And Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms And Susceptibility To Asthma And Allergic Rhinitis: A Case-Control Analysis / Y. M. Hussein, H. A. Awad, S. M. Shalaby, A. S. Ali, S. S. Alzahrani // Cell Immunol – 2012. – Vol. 274 – № 1–2– P. 34–38.
90. Jiang X.G. Elevated Serum Levels Of Tnf-A, Il-8, And Ecp Can Be Involved In The Development And Progression Of Bronchial Asthma / X. G. Jiang, X. D. Yang, Z. Lv, P. H. Zhuang // J Asthma – 2018. – Vol. 55 - № 2 – P. 111-118.
91. Jiang Z. Update On The Role Of Alternatively Activated Macrophages In Asthma / Z. Jiang, L. Zhu // J Asthma Allergy – 2016. – Vol. 9 – P. 101–107.
92. Jimenez-Dalmaroni M.J. Soluble Cd36 Ectodomain Binds Negatively Charged Diacylglycerol Ligands And Acts As A Co-Receptor For Tlr2 / M. J. Jimenez-Dalmaroni, N. Xiao, A. L. Corper, P. Verdino, G. D. Ainge, D. S. Larsen, G. F. Painter, P. M. Rudd, R. A. Dwek, K. Hoebe, B. Beutler, I. A. Wilson // Plos One – 2009. – Vol. 4 – № 10– P. 1-16.
93. Jung J.S. Association Of Il-17rb Gene Polymorphism With Asthma / J. S. Jung, B. L. Park, H. S. Cheong, J. S. Bae, J. H. Kim, H. S. Chang, T. Rhim, J. S. Park, A. S. Jang, Y. M. Lee, K. U. Kim, S. T. Uh, J. O. Na, Y. H. Kim, C. S. Park, H. D. Shin // Chest – 2009. – Vol. 135 – № 5– P. 1173–1180.

94. Justice J.P. Il-10 Gene Knockout Attenuates Allergen-Induced Airway Hyperresponsiveness In C57bl/6 Mice / J. P. Justice, Y. Shibata, S. Sur, J. Mustafa, M. Fan, M. R. Van Scott // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* – 2001. – Vol. 280 – № 2 – P. 363-368.

95. Kaesler S. Toll-Like Receptor 2 Ligands Promote Chronic Atopic Dermatitis Through Il-4–Mediated Suppression Of Il-10 / S. Kaesler, T. Volz, Y. Skabytska, M. Köberle, U. Hein, K.-M. Chen, E. Guenova, F. Wölbing, M. Röcken, T. Biedermann // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2014. – Vol. 134 – № 1– P. 92–99.

96. Kalinina E.P. The Mechanisms Of The Regulation Of Immune Response In Patients With Comorbidity Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease And Asthma / E. P. Kalinina, Y. K. Denisenko, T. I. Vitkina, E. G. Lobanova, T. P. Novgorodtseva, M. V Antonyuk, T. A. Gvozdenko, V. V Knyshova, A. V Nazarenko // *Can Respir J* – 2016. – Vol. 2016– P. 1-8.

97. Kamekura R. The Role Of Il-33 And Its Receptor St2 In Human Nasal Epithelium With Allergic Rhinitis / R. Kamekura, T. Kojima, K. Takano, M. Go, N. Sawada, T. Himi // *Clin Exp Allergy* – 2012. – Vol. 42 – № 2– 218–228p.

98. Kang S.S.W. Toll-Like Receptors: Applications To Dermatologic Disease / S. S. W. Kang, L. S. Kauls, A. A. Gaspari // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2006. – Vol. 54 – № 6 – P. 951–983.

99. Kant R. Immunostimulatory Cpg Motifs In The Genomes Of Gut Bacteria And Their Role In Human Health And Disease / R. Kant, W. M. De Vos, A. Palva, R. Satokari // *J. Med. Microbiol.* – 2014. – Vol. 63– № 2– P. 293–308.

100. Kawasaki T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. / T. Kawasaki, T. Kawai // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5– P. 1-8.

101. Kijpittayarit S. Relationship Between Toll-Like Receptor 2 Polymorphism And Cytomegalovirus Disease After Liver Transplantation / S. Kijpittayarit, A. J. Eid, R. A. Brown, C. V Paya, R. R. Razonable // *Clin Infect Dis* – 2007. – Vol. 44 – № 10– P. 1315–1320.

102. Kim H.Y. The Many Paths To Asthma: Phenotype Shaped By Innate And Adaptive Immunity / H. Y. Kim, R. H. Dekruyff, D. T. Umetsu // *Nat Immunol* – 2010. – Vol. 11 – № 7– P. 577–584.

103. Kim Y.K. Airway Exposure Levels Of Lipopolysaccharide Determine Type 1 Versus Type 2 Experimental Asthma / Y. K. Kim, S. Y. Oh, S. G. Jeon, H. W. Park, S. Y. Lee, E. Y. Chun, B. Bang, H. S. Lee, M. H. Oh, Y. S. Kim, J. H. Kim, Y. S. Gho, S. H. Cho, K. U. Min, Y. Y. Kim, Z. Zhu // *J Immunol* – 2007. – Vol. 178 – № 8 – P. 5375–5382.

104. Kivit S. De In Vitro Evaluation Of Intestinal Epithelial Tlr Activation In Preventing Food Allergic Responses / S. De Kivit, M. C. Tobin, M. T. Demeo, S. Fox, J. Garssen, C. B. Forsyth, A. Keshavarzian, A. L. Landay // *Clin. Immunol.* – 2014. – Vol. 154 – № 2– P. 91–99.

105. Klein Wolterink R.G. Pulmonary Innate Lymphoid Cells Are Major Producers Of Il-5 And Il-13 In Murine Models Of Allergic Asthma / R. G. Klein Wolterink, A. Kleinjan, M. Van Nimwegen, I. Bergen, M. De Bruijn, Y. Levani, R. W. Hendriks // *Eur J Immunol* – 2012. – Vol. 42 – № 5 – P. 1106–1116.

106. Kleinjan A. Airway Inflammation In Asthma / A. Kleinjan // *Curr. Opin. Pulm. Med.* – 2016. – Vol. 22 – № 1– P. 46–52.

107. Koch K.N. Helicobacter Urease-Induced Activation Of The Tlr2/Nlrp3/Il-18 Axis Protects Against Asthma / K. N. Koch, M. L. Hartung, S. Urban, A. Kyburz, A. S. Bahlmann, J. Lind, S. Backert, C. Taube, A. Müller // *J Clin Invest* – 2015. – Vol. 125 – № 8– P. 3297–3302.

108. Komai-Koma M. Il-33 Is A Chemoattractant For Human Th2 Cells / M. Komai-Koma, D. Xu, Y. Li, A. N. McKenzie, I. B. McInnes, F. Y. Liew // *Eur J Immunol* – 2007. – Vol. 37 – № 10 – P. 2779–2786.

109. Kortekaas Krohn I. Emerging Roles Of Innate Lymphoid Cells In Inflammatory Diseases: Clinical Implications / I. Kortekaas Krohn, M. M. Shikhagaie, K. Golebski, J. H. J. Bernink, C. Breynaert, B. Creyns, Z. Diamant, W. J. Fokkens, P. Gevaert, P. Hellings, R. W. Hendriks, L. Klimek, J. Mjösberg, H.

Morita, G. Ogg, L. O'mahony, J. Schwarze, S. F. Seys, M. H. Shamji, S. M. Bal // Allergy – 2017– Vol. 73 – № 4 – P. 837-850.

110. Kouzaki H. Transcription Of Interleukin-25 And Extracellular Release Of The Protein Is Regulated By Allergen Proteases In Airway Epithelial Cells / H. Kouzaki, I. Tojima, H. Kita, T. Shimizu // Am J Respir Cell Mol Biol – 2013. – Vol. 49 – № 5 – P. 741–750.

111. Küçüksezer U.C. Triggering Of Specific Toll-Like Receptors And Proinflammatory Cytokines Breaks Allergen-Specific T-Cell Tolerance In Human Tonsils And Peripheral Blood / U. C. Küçüksezer, O. Palomares, B. Rückert, T. Jartti, T. Puhakka, A. Nandy, B. Gemicioğlu, H. B. Fahrner, A. Jung, G. Deniz, C. A. Akdis, M. Akdis // J Allergy Clin Immunol – 2013. – Vol. 131 – № 3– P. 875–885.

112. Kurowska-Stolarska M. Interleukin-33: A Novel Mediator With A Role In Distinct Disease Pathologies / M. Kurowska-Stolarska, A. Hueber, B. Stolarski, I. B. Mcinnes // J Intern Med – 2011. – Vol. 269 – № 1– P. 29–35.

113. Lachmandas E. Microbial Stimulation Of Different Toll-Like Receptor Signalling Pathways Induces Diverse Metabolic Programmes In Human Monocytes / E. Lachmandas, L. Boutens, J. M. Ratter, A. Hijmans, G. J. Hooiveld, L. A. Joosten, R. J. Rodenburg, J. A. Fransen, R. H. Houtkooper, R. Van Crevel, M. G. Netea, R. Stienstra // Nat Microbiol – 2016. – Vol. 2– P. 1-10.

114. Lamblin C. Overexpression Of Il-10 Mrna In Gut Mucosa Of Patients With Allergic Asthma / C. Lamblin, P. Desreumaux, J. F. Colombel, A. B. Tonnel, B. Wallaert // J Allergy Clin Immunol – 2001. – Vol. 107 – № 4– 739–741p.

115. Lambrecht B.N. The Immunology Of Asthma / B. N. Lambrecht, H. Hammad // Nat. Immunol. – 2015. – Vol. 16 – № 1– P. 45–56.

116. Laouini D. Il-10 Is Critical For Th2 Responses In A Murine Model Of Allergic Dermatitis / D. Laouini, H. Alenius, P. Bryce, H. Oettgen, E. Tsitsikov, R. S. Geha // J Clin Invest – 2003. – Vol. 112 – № 7– P. 058–1066.

117. Lee H.Y. Effect Of Intranasal Rosiglitazone On Airway Inflammation And Remodeling In A Murine Model Of Chronic Asthma / H. Y. Lee, C. K. Rhee,

J. Y. Kang, C. K. Park, S. Y. Lee, S. S. Kwon, Y. K. Kim, H. K. Yoon // Korean J Intern Med – 2016. – Vol. 31 – № 1– P. 89–97.

118. Lee J. Maintenance Of Colonic Homeostasis By Distinctive Apical Tlr9 Signalling In Intestinal Epithelial Cells / J. Lee, J. H. Mo, K. Katakura, I. Alkalay, A. N. Rucker, Y. T. Liu, H. K. Lee, C. Shen, G. Cojocaru, S. Shenouda, M. Kagnoff, L. Eckmann, Y. Ben-Neriah, E. Raz // Nat. Cell Biol. – 2006. – Vol. 8 – № 12– P. 1327–1336.

119. Lee K.S. Antioxidant Down-Regulates Interleukin-18 Expression In Asthma / K. S. Lee, S. R. Kim, S. J. Park, K. H. Min, K. Y. Lee, S. M. Jin, W. H. Yoo, Y. C. Lee // Mol Pharmacol – 2006. – Vol. 70 – № 4 – P. 1184–1193.

120. Lee T.-H. Role Of Inflammasome Activation In Development And Exacerbation Of Asthma / T.-H. Lee, H. J. Song, C.-S. Park // Asia Pac. Allergy – 2014. – Vol. 4 – № 4– P. 187-196.

121. Lee Y.C. Serum Levels Of Interleukins (Il)-4, Il-5, Il-13, And Interferon-Gamma In Acute Asthma / Y. C. Lee, K. H. Lee, H. B. Lee, Y. K. Rhee // J Asthma – 2001. – Vol. 38 – № 8– P. 665–671.

122. Lester S.N. Toll-Like Receptors In Antiviral Innate Immunity. / S. N. Lester, K. Li // J. Mol. Biol. – 2014. – Vol. 426 – № 6– P. 1246–1264.

123. Li S. Association Of Tlr4 (896a/G And 1196c/T) Gene Polymorphisms With Asthma Risk: A Meta-Analysis / S. Li, X. Xie, Y. Song, H. Jiang, X. Wu, X. Su, L. Yang, M. Li // Med Sci Monit – 2015. – Vol. 21– P. 3591–3599.

124. Li X. Toll-Like Receptor 4 Increases Intestinal Permeability Through Up-Regulation Of Membrane Pkc Activity In Alcoholic Steatohepatitis. / X. Li, C. Wang, J. Nie, D. Lv, T. Wang, Y. Xu // Alcohol – 2013. – Vol. 47 – № 6– P. 459–465.

125. Lin S.C. Helical Assembly In The Myd88-Irak4-Irak2 Complex In Tlr/Il-1r Signalling / S. C. Lin, Y. C. Lo, H. Wu // Nature – 2010. – Vol. 465 – № 7300– P. 885–890.

126. Li M. TLR4 antagonist suppresses airway remodeling in asthma by inhibiting the T-helper 2 response /Li M,Wang ZN,Yang LF, Yan Y, Cai LM, Li

YT, Qiao YK, Chen ZG // Experimental and therapeutic medicine – 2017 – Vol. 14 - №4 – P. 2911-2916

127. Li J. Pollen/TLR4 Innate Immunity Signaling Initiates IL-33/ST2/Th2 Pathways in Allergic Inflammation. / J. Li, L. Zhang, X. Chen, D. Chen, X. Hua, F. Bian, R. Deng, F. Lu, Z. Li, S. C. Pflugfelder, De-Quan Li // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6– № 36150– P. 1–10.

128. Livak K.J. Analysis Of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative Pcr And The 2(-Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // Methods – 2001. – Vol. 25 – № 4– P. 402–408.

129. Lluís A. Increased Regulatory T-Cell Numbers Are Associated With Farm Milk Exposure And Lower Atopic Sensitization And Asthma In Childhood / A. Lluís, M. Depner, B. Gaugler, P. Saas, V. I. Casaca, D. Raedler, S. Michel, J. Tost, J. Liu, J. Genuneit, P. Pfefferle, M. Roponen, J. Weber, C. Braun-Fahrlander, J. Riedler, R. Lauener, D. A. Vuitton, J. C. Dalphin, J. Pekkanen, E. Von Mutius, B. Schaub, P. A. A. S. In R. E. S. Group // J Allergy Clin Immunol – 2014. – Vol. 133 – № 2– P. 551–559.

130. Loss G. Prenatal And Early-Life Exposures Alter Expression Of Innate Immunity Genes: The Pasture Cohort Study / G. Loss, S. Bitter, J. Wohlgensinger, R. Frei, C. Roduit, J. Genuneit, J. Pekkanen, M. Roponen, M. R. Hirvonen, J. C. Dalphin, M. L. Dalphin, J. Riedler, E. Von Mutius, J. Weber, M. Kabesch, S. Michel, C. Braun-Fahrlander, R. Lauener, P. Study Group // J Allergy Clin Immunol – 2012. – Vol. 130 – № 2– P. 523–530.

131. Lu J. The Role Of Il-33/St2l Signals In The Immune Cells / J. Lu, J. Kang, C. Zhang, X. Zhang // Immunol Lett – 2015. – Vol. 164 – № 1– P. 11–17.

132. Mahajan S. Role Of Cytokines In Pathophysiology Of Asthma / S. Mahajan, A. Mehta // Iran. J. Pharmacol. Ther. – 2006. – Vol. 5 – № 1– P. 1–14.

133. Månsson Kvarnhammar A. Innate Immune Receptors In Human Airway Smooth Muscle Cells: Activation By Tlr1/2, Tlr3, Tlr4, Tlr7 And Nod1 Agonists / A. Månsson Kvarnhammar, L. Tengroth, M. Adner, L. O. Cardell // Plos One – 2013. – Vol. 8 – № 7– P. 1-10.

134. Månsson Kvarnhammar A. Innate Immune Receptors In Human Airway Smooth Muscle Cells: Activation By Tlr1/2, Tlr3, Tlr4, Tlr7 And Nod1 Agonists / A. Månsson Kvarnhammar, L. Tengroth, M. Adner, L. O. Cardell // Plos One – 2013. – Vol. 8 – № 7– P. 1-10.
135. Marshak-Rothstein A. Toll-Like Receptors In Systemic Autoimmune Disease / A. Marshak-Rothstein // Nat Rev Immunol – 2006. – Vol. 6 – № 11– P. 823–835.
136. Mcalees J.W. Distinct Tlr4-Expressing Cell Compartments Control Neutrophilic And Eosinophilic Airway Inflammation / J. W. Mcalees, G. S. Whitehead, I. T. Harley, M. Cappelletti, C. L. Rewerts, A. M. Holdcroft, S. Divanovic, M. Wills-Karp, F. D. Finkelman, C. L. Karp, D. N. Cook // Mucosal Immunol – 2015. – Vol. 8 – № 4– P. 863–873.
137. McLaren J.E. Il-33 Reduces Macrophage Foam Cell Formation / J. E. McLaren, D. R. Michael, R. C. Salter, T. G. Ashlin, C. J. Calder, A. M. Miller, F. Y. Liew, D. P. Ramji // J Immunol – 2010. – Vol. 185 – № 2– P. 1222–1229.
138. Mcsorley H.J. Blockade Of Il-33 Release And Suppression Of Type 2 Innate Lymphoid Cell Responses By Helminth Secreted Products In Airway Allergy / H. J. Mcsorley, N. F. Blair, K. A. Smith, A. N. Mckenzie, R. M. Maizels // Mucosal Immunol – 2014. – Vol. 7 – № 5– P. 1068–1078.
139. Meng L. Tlr3 And Tlr7 Modulate Ige Production In Antigen Induced Pulmonary Inflammation Via Influencing Il-4 Expression In Immune Organs / L. Meng, X. He, W. Zhu, X. Yang, C. Jiang, Q. Sun, M. B, S. Zhang, Q. Xue, X. Xie, S. Lu // Plos One – 2011. – Vol. 6 – № 2– P. 1-11.
140. Michel O. Role Of Lipopolysaccharide (Lps) In Asthma And Other Pulmonary Conditions / O. Michel // J Endotoxin Res – 2003. – Vol. 9 – № 5– P. 293–300.
141. Michel O. Severity Of Asthma Is Related To Endotoxin In House Dust / O. Michel, J. Kips, J. Duchateau, F. Vertongen, L. Robert, H. Collet, R. Pauwels, R. Sergysels // Am J Respir Crit Care Med – 1996. – Vol. 154– № 6 Pt 1– P. 1641–1646.

142. Mitchell P.D. Biologics And The Lung: Tslp And Other Epithelial Cell-Derived Cytokines In Asthma / P. D. Mitchell, P. M. O'byrne // *Pharmacol Ther* – 2016. – Vol. 169 – P. 104-112.

143. Moffatt M.F. A Large-Scale, Consortium-Based Genomewide Association Study Of Asthma / M. F. Moffatt, I. G. Gut, F. Demenais, D. P. Strachan, E. Bouzigon, S. Heath, E. Von Mutius, M. Farrall, M. Lathrop, W. O. Cookson, G. Consortium // *N Engl J Med* – 2010. – Vol. 363 – № 13– P. 1211–1221.

144. Møller-Larsen S. Association Analysis Identifies Tlr7 And Tlr8 As Novel Risk Genes In Asthma And Related Disorders / S. Møller-Larsen, M. Nyegaard, A. Haagerup, J. Vestbo, T. A. Kruse, A. D. Børghlum // *Thorax* – 2008. – Vol. 63 – № 12– P. 1064–1069.

145. Moreira A.P. The Protective Role Of Tlr6 In A Mouse Model Of Asthma Is Mediated By Il-23 And Il-17a / A. P. Moreira, K. A. Cavassani, U. B. Ismailoglu, R. Hullinger, M. P. Dunleavy, D. A. Knight, S. L. Kunkel, S. Uematsu, S. Akira, C. M. Hogaboam // *J Clin Invest* – 2011. – Vol. 121 – № 11– P. 4420–4432.

146. Morjaria J.B. The Role Of A Soluble Tnfalpha Receptor Fusion Protein (Etanercept) In Corticosteroid Refractory Asthma: A Double Blind, Randomised, Placebo Controlled Trial / J. B. Morjaria, A. J. Chauhan, K. S. Babu, R. Polosa, D. E. Davies, S. T. Holgate // *Thorax* – 2008. – Vol. 63 – № 7– P. 584–591.

147. Moro K. Innate Production Of T(H)2 Cytokines By Adipose Tissue-Associated C-Kit(+)Sca-1(+) Lymphoid Cells / K. Moro, T. Yamada, M. Tanabe, T. Takeuchi, T. Ikawa, H. Kawamoto, J. Furusawa, M. Ohtani, H. Fujii, S. Koyasu // *Nature* – 2010. – Vol. 463 – № 7280– P. 540–544.

148. Morris G.E. Cooperative Molecular And Cellular Networks Regulate Toll-Like Receptor-Dependent Inflammatory Responses / G. E. Morris, L. C. Parker, J. R. Ward, E. C. Jones, M. K. Whyte, C. E. Brightling, P. Bradding, S. K. Dower, I. Sabroe // *Faseb J* – 2006. – Vol. 20 – № 12– P. 2153–2155.

149. Mosmann T.R. Properties And Functions Of Interleukin-10 / T. R. Mosmann // *Adv Immunol* – 1994. – Vol. 56– P. 1–26.
150. Mushaben E.M. Differential Effects Of Rapamycin And Dexamethasone In Mouse Models Of Established Allergic Asthma / E. M. Mushaben, E. B. Brandt, G. K. Hershey, T. D. Le Cras // *Plos One* – 2013. – Vol. 8 – № 1– P. 1-16
151. Nadeem A. Tlr-7 Agonist Attenuates Airway Reactivity And Inflammation Through Nrf2-Mediated Antioxidant Protection In A Murine Model Of Allergic Asthma / A. Nadeem, N. Siddiqui, N. O. Al-Harbi, M. M. Al-Harbi, S. F. Ahmad // *Int J Biochem Cell Biol* – 2016. – Vol. 73– P. 53–62.
152. Neill D.R. Nuocytes Represent A New Innate Effector Leukocyte That Mediates Type-2 Immunity / D. R. Neill, S. H. Wong, A. Bellosi, R. J. Flynn, M. Daly, T. K. Langford, C. Bucks, C. M. Kane, P. G. Fallon, R. Pannell, H. E. Jolin, A. N. Mckenzie // *Nature* – 2010. – Vol. 464 – № 7293– P. 1367–1370.
153. Novak N. Fcεri-Toll-Like Receptor Interaction In Atopic Dermatitis Basel: Karger // *Curr Probl Dermatol.* – 2011. – Vol 41 – P. 47–53.
154. Oda H. Interleukin-18 Expression, Cd8(+) T Cells, And Eosinophils In Lungs Of Nonsmokers With Fatal Asthma / H. Oda, T. Kawayama, H. Imaoka, Y. Sakazaki, Y. Kaku, M. Okamoto, Y. Kitasato, N. Edakuni, S. Takenaka, M. Yoshida, T. Iwanaga, S. Kato, P. M. O'byrne, T. Hoshino // *Ann Allergy Asthma Immunol* – 2014. – Vol. 112 – № 1– P. 23–28.
155. Oliveira-Nascimento L. The Role Of Tlr2 In Infection And Immunity / L. Oliveira-Nascimento, P. Massari, L. M. Wetzler // *Front. Immunol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1–17.
156. Ong P.Y. Endogenous Antimicrobial Peptides And Skin Infections In Atopic Dermatitis / P. Y. Ong, T. Ohtake, C. Brandt, I. Strickland, M. Boguniewicz, T. Ganz, R. L. Gallo, D. Y. M. Leung // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 347 – № 15– P. 1151–1160.
157. Oshiumi H. Tir-Containing Adapter Molecule (Ticam)-2, A Bridging Adapter Recruiting To Toll-Like Receptor 4 Ticam-1 That Induces Interferon-B /

H. Oshiumi, M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, T. Seya // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278 – № 50– P. 49751–49762.

158. Pace E. Budesonide Increases Tlr4 And Tlr2 Expression In Treg Lymphocytes Of Allergic Asthmatics / Pace E., Di Sano C., Ferraro M., Bruno A., Caputo V., Gallina S., Gjomarkaj M./// Pulm Pharmacol Ther. – 2015 – Vol. 32 . – P. 93–100.

159. Panchapakesan U. The Role Of Toll-Like Receptors In Diabetic Kidney Disease / U. Panchapakesan, C. Pollock // Curr Opin Nephrol Hypertens – 2018– Vol.27 – №1 – P. 30-34

160. Park J.S. Association Of Single Nucleotide Polymorphisms On Interleukin 17 Receptor A (Il17ra) Gene With Aspirin Hypersensitivity In Asthmatics / J. S. Park, B. L. Park, M. O. Kim, J. S. Heo, J. S. Jung, D. J. Bae, S. T. Uh, M. K. Kim, I. S. Choi, S. H. Cho, C. S. Hong, J. Y. Lee, B. W. Choi, H. D. Shin, C. S. Park // Hum Immunol – 2013. – Vol. 74 – № 5– P. 598–606.

161. Parulekar A.D. Targeting The Interleukin-4 And Interleukin-13 Pathways In Severe Asthma: Current Knowledge And Future Needs / A. D. Parulekar, C. C. Kao, Z. Diamant, N. A. Hanania // Curr Opin Pulm Med – 2018. – Vol. 24 – № 1– P. 50-55.

162. Pawankar R. The Paradigm Of Cytokine Networks In Allergic Airway Inflammation / R. Pawankar, M. Hayashi, S. Yamanishi, T. Igarashi // Curr Opin Allergy Clin Immunol – 2015. – Vol. 15 – № 1– P. 41–48.

163. Pillai P. Airway Epithelium In Atopic And Nonatopic Asthma: Similarities And Differences / P. Pillai, C. J. Corrigan, S. Ying // Isrn Allergy – 2011. – Vol. 2011– P. 1-7.

164. Pola-Bibian B. Asthma Exacerbations In A Tertiary Hospital: Clinical Features, Triggers, And Risk Factors For Hospitalization / B. Pola-Bibian, J. Dominguez-Ortega, G. Vilà-Nadal, A. Entrala, L. González-Cavero, P. Barranco, N. Cancelliere, M. Díaz-Almirón, S. Quirce // J Investig Allergol Clin Immunol – 2016. – Vol. 27 – № 4 – P. 238-245.

165. Preller L. Lung Function And Chronic Respiratory Symptoms Of Pig Farmers: Focus On Exposure To Endotoxins And Ammonia And Use Of Disinfectants / L. Preller, D. Heederik, J. S. Boleij, P. F. Vogelzang, M. J. Tielen // *Occup Env. Med* – 1995. – Vol. 52 – № 10– P. 654–660.

166. Rael E.L. Interleukin-13 Signaling And Its Role In Asthma. / E. L. Rael, R. F. Lockey // *World Allergy Organ. J.* – 2011. – Vol. 4 – № 3– P. 54–64.

167. Reece P. Il-4 And Il-13 Differentially Regulate Tlr-Induced Eosinophil-Basophil Differentiation Of Cord Blood Cd34+ Progenitor Cells. / P. Reece, G. M. Gauvreau, R. Sehmi, J. A. Denburg // *Plos One* – 2014. – Vol. 9 – № 6– P. 1–8.

168. Renkonen J. Expression Of Toll-Like Receptors In Nasal Epithelium In Allergic Rhinitis / J. Renkonen, S. Toppila-Salmi, S. Joenväärä, P. Mattila, V. Parviainen, J. Hagström, C. Haglund, M. Lehtonen, R. Renkonen // *Apmis* – 2015. – Vol. 123 – № 8– P. 716–725.

169. Rietschel E.T. Bacterial Endotoxin: Molecular Relationships Of Structure To Activity And Function / E. T. Rietschel, T. Kirikae, F. U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A. J. Ulmer, U. Zähringer, U. Seydel, F. Di Padova // *Faseb J* – 1994. – Vol. 8 – № 2– P. 217–225.

170. Robbe P. Distinct Macrophage Phenotypes In Allergic And Nonallergic Lung Inflammation / P. Robbe, C. Draijer, T. R. Borg, M. Luinge, W. Timens, I. M. Wouters, B. N. Melgert, M. N. Hylkema // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* – 2015. – Vol. 308 – № 4– P. 358–367.

171. Robinson D.S. Increased Interleukin-10 Messenger Rna Expression In Atopic Allergy And Asthma / D. S. Robinson, A. Tsicopoulos, Q. Meng, S. Durham, A. B. Kay, Q. Hamid // *Am J Respir Cell Mol Biol* – 1996. – Vol. 14 – № 2– P. 113–117.

172. Rocha Sobrinho H.M.D. Tlr4 And Tlr2 Activation Is Differentially Associated With Age During Parkinson's Disease / H. M. D. Rocha Sobrinho, D. J. D. Silva, L. F. Gomides, M. L. Dorta, M. A. P. Oliveira, F. Ribeiro-Dias // *Immunol Invest* – 2017. – Vol. 47 – № 1– P. 71–88

173. Rock F.L. A Family Of Human Receptors Structurally Related To Drosophila Toll / F. L. Rock, G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, J. F. Bazan // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 1998. – Vol. 95 – № 2– P. 588–593.

174. Romagnani S. Coming Back To A Missing Immune Deviation As The Main Explanatory Mechanism For The Hygiene Hypothesis / S. Romagnani // *J Allergy Clin Immunol* – 2007. – Vol. 119 – № 6 – P. 1511–1513.

175. Roussel L. Molecular Mimicry Between Il-33 And Kshv For Attachment To Chromatin Through The H2a-H2b Acidic Pocket / L. Roussel, M. Erard, C. Cayrol, J. P. Girard // *Embo Rep* – 2008. – Vol. 9 – № 10 – P. 1006–1012.

176. Rovina N. Low Interleukin (Il)-18 Levels In Sputum Supernatants Of Patients With Severe Refractory Asthma / N. Rovina, E. Dima, P. Bakakos, E. Tseliou, K. Kontogianni, S. Papiris, A. Koutsoukou, N. G. Koulouris, S. Loukides // *Respir Med* – 2015. – Vol. 109 – № 5– P. 580–587.

177. Royer C.M. Vtx-1463, A Novel Tlr-8 Agonist, Attenuates Nasal Congestion After Ragweed Challenge In Sensitized Beagle Dogs / C. M. Royer, K. Rudolph, G. N. Dietsch, R. M. Hershberg, E. G. Barrett // *Immun Inflamm Dis* – 2016. – Vol. 4 – № 1– P. 45–51.

178. Ryu J.H. Distinct Tlr-Mediated Pathways Regulate House Dust Mite-Induced Allergic Disease In The Upper And Lower Airways / J. H. Ryu, J. Y. Yoo, M. J. Kim, S. G. Hwang, K. C. Ahn, J. C. Ryu, M. K. Choi, J. H. Joo, C. H. Kim, S. N. Lee, W. J. Lee, J. Kim, D. M. Shin, M. N. Kweon, Y. S. Bae, J. H. Yoon // *J Allergy Clin Immunol* – 2013. – Vol. 131 – № 2– P. 549–561.

179. Ryu J.H. Distinct Tlr-Mediated Pathways Regulate House Dust Mite-Induced Allergic Disease In The Upper And Lower Airways / J. H. Ryu, J. Y. Yoo, M. J. Kim, S. G. Hwang, K. C. Ahn, J. C. Ryu, M. K. Choi, J. H. Joo, C. H. Kim, S. N. Lee, W. J. Lee, J. Kim, D. M. Shin, M. N. Kweon, Y. S. Bae, J. H. Yoon // *J Allergy Clin Immunol* – 2013. – Vol. 131 – № 2– P. 549–561.

180. Saglani S. Il-33 Promotes Airway Remodeling In Pediatric Patients With Severe Steroid-Resistant Asthma / S. Saglani, S. Lui, N. Ullmann, G. A.

Campbell, R. T. Sherburn, S. A. Mathie, L. Denney, C. J. Bossley, T. Oates, S. A. Walker, A. Bush, C. M. Lloyd // *J Allergy Clin Immunol* – 2013. – Vol. 132 – № 3– P. 676–685.

181. Sakashita M. Association Of Serum Interleukin-33 Level And The Interleukin-33 Genetic Variant With Japanese Cedar Pollinosis / M. Sakashita, T. Yoshimoto, T. Hirota, M. Harada, K. Okubo, Y. Osawa, S. Fujieda, Y. Nakamura, K. Yasuda, K. Nakanishi, M. Tamari // *Clin Exp Allergy* – 2008. – Vol. 38 – № 12– P. 1875–1881.

182. Salter B.M. Thymic Stromal Lymphopoietin Activation Of Basophils In Patients With Allergic Asthma Is Il-3 Dependent / B. M. Salter, J. P. Oliveria, G. Nusca, S. G. Smith, R. M. Watson, M. Comeau, R. Sehmi, G. M. Gauvreau // *J Allergy Clin Immunol* – 2015. – Vol. 136 – № 6 – P. 1636–1644.

183. Sanders N.L. Role Of Interleukin-18 In The Pathophysiology Of Allergic Diseases / N. L. Sanders, A. Mishra // *Cytokine Growth Factor Rev* – 2016. – Vol. 32– P. 31–39.

184. Schmittgen T.D. Analyzing Real-Time Pcr Data By The Comparative C(T) Method / T. D. Schmittgen, K. J. Livak // *Nat Protoc* – 2008. – Vol. 3 – № 6– P. 1101–1108.

185. Scott M.R. Van Il-10 Reduces Th2 Cytokine Production And Eosinophilia But Augments Airway Reactivity In Allergic Mice / M. R. Van Scott, J. P. Justice, J. F. Bradfield, E. Enright, A. Sigounas, S. Sur // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* – 2000. – Vol. 278 – № 4– P. 667-674.

186. . Sel S. Immunomodulatory Effects Of Viral Tlr Ligands On Experimental Asthma Depend On The Additive Effects Of Il-12 And Il-10 / S. Sel, M. Wegmann, S. Bauer, H. Garn, G. Alber, H. Renz // *J Immunol* – 2007. – Vol. 178 – № 12– P. 7805–7813.

187. Seshasayee D. In Vivo Blockade Of Ox40 Ligand Inhibits Thymic Stromal Lymphopoietin Driven Atopic Inflammation / D. Seshasayee, W. P. Lee, M. Zhou, J. Shu, E. Suto, J. Zhang, L. Diehl, C. D. Austin, Y. G. Meng, M. Tan, S. L. Bullens, S. Seeber, M. E. Fuentes, A. F. Labrijn, Y. M. Graus, L. A. Miller, E.

S. Schelegle, D. M. Hyde, L. C. Wu, S. G. Hymowitz, F. Martin // *J Clin Invest* – 2007. – Vol. 117 – № 12– P. 3868–3878.

188. Seyfizadeh N. Interleukin-13 As An Important Cytokine: A Review On Its Roles In Some Human Diseases / N. Seyfizadeh, N. Seyfizadeh, T. Gharibi, Z. Babaloo // *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* – 2015. – Vol. 62 – № 4– P. 341–378.

189. Shen E. Tlr7/8 Ligand, R-848, Inhibits Ige Synthesis By Acting Directly On B Lymphocytes / E. Shen, L. Lu, C. Wu // *Scand J Immunol* – 2008. – Vol. 67 – № 6– P. 560–568.

190. Shi Z. A Novel Toll-Like Receptor That Recognizes Vesicular Stomatitis Virus / Z. Shi, Z. Cai, A. Sanchez, T. Zhang, S. Wen, J. Wang, J. Yang, S. Fu, D. Zhang // *J Biol Chem* – 2011. – Vol. 286 – № 6– P. 4517–4524.

191. Singh M. Correlation Of Cutaneous Sensitivity And Cytokine Response In Children With Asthma / M. Singh, A. Agarwal, B. Chatterjee, A. Chauhan, R. R. Das, N. Paul // *Lung India* – 2017. – Vol. 34 – № 6– P. 506–510.

192. Singh R.K. A Review On Leukotrienes And Their Receptors With Reference To Asthma / R. K. Singh, R. Tandon, S. G. Dastidar, A. Ray // *J Asthma* – 2013. – Vol. 50 – № 9– P. 922–931.

193. Sly P.D. Role Of Innate Immunity In The Development Of Allergy And Asthma / P. D. Sly, P. G. Holt // *Curr Opin Allergy Clin Immunol* – 2011. – Vol. 11 – № 2– P. 127–131.

194. Smith S.G. Thymic Stromal Lymphopoietin And Il-33 Modulate Migration Of Hematopoietic Progenitor Cells In Patients With Allergic Asthma / S. G. Smith, A. Gugilla, M. Mukherjee, K. Merim, A. Irshad, W. Tang, T. Kinoshita, B. Watson, J. P. Oliveria, M. Comeau, P. M. O'byrne, G. M. Gauvreau, R. Sehmi // *J Allergy Clin Immunol* – 2015. – Vol. 135 – № 6– P. 1594–1602.

195. Sodhi C. Dna Attenuates Enterocyte Toll-Like Receptor 4-Mediated Intestinal Mucosal Injury After Remote Trauma. / C. Sodhi, R. Levy, R. Gill, M. D. Neal, W. Richardson, M. Branca, A. Russo, T. Prindle, T. R. Billiar, D. J. Hackam // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2011. – Vol. 300 – № 5– P. 862-873.

196. Spits H. Innate Lymphoid Cells--A Proposal For Uniform Nomenclature / H. Spits, D. Artis, M. Colonna, A. Diefenbach, J. P. Di Santo, G. Eberl, S. Koyasu, R. M. Locksley, A. N. McKenzie, R. E. Mebius, F. Powrie, E. Vivier // *Nat Rev Immunol* – 2013. – Vol. 13 – № 2– P. 145–149.
197. Spits H. Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights In Development, Lineage Relationships, And Function / H. Spits, T. Cupedo // *Annu Rev Immunol* – 2012. – Vol. 30– P. 647–675.
198. Spooner C.J. Specification Of Type 2 Innate Lymphocytes By The Transcriptional Determinant Gfi1 / C. J. Spooner, J. Lesch, D. Yan, A. A. Khan, A. Abbas, V. Ramirez-Carrozzi, M. Zhou, R. Soriano, J. Eastham-Anderson, L. Diehl, W. P. Lee, Z. Modrusan, R. Pappu, M. Xu, J. Devoss, H. Singh // *Nat Immunol* – 2013. – Vol. 14 – № 12– P. 1229–1236.
199. Sugimoto T. Interleukin 18 Acts On Memory T Helper Cells Type 1 To Induce Airway Inflammation And Hyperresponsiveness In A Naive Host Mouse / T. Sugimoto, Y. Ishikawa, T. Yoshimoto, N. Hayashi, J. Fujimoto, K. Nakanishi // *J Exp Med* – 2004. – Vol. 199 – № 4– P. 535–545.
200. Sukkar M.B. Toll-Like Receptor 2, 3, And 4 Expression And Function In Human Airway Smooth Muscle / M. B. Sukkar, S. Xie, N. M. Khorasani, O. M. Kon, R. Stanbridge, R. Issa, K. F. Chung // *J Allergy Clin Immunol* – 2006. – Vol. 118 – № 3– P. 641–648.
201. Svenningsen S. Asthma Endotypes And An Overview Of Targeted Therapy For Asthma / S. Svenningsen, P. Nair // *Front. Med.* – 2017. – Vol. 4 – № 158 - P. 1-10
202. Takeda T. Recent Advances In Understanding The Roles Of Blood Platelets In The Pathogenesis Of Allergic Inflammation And Bronchial Asthma. / T. Takeda, H. Morita, H. Saito, K. Matsumoto, A. Matsuda // *Allergol. Int.* – 2017. – Vol. 1 – № 8. – P. 1-8
203. Tashiro H. Interleukin-33 From Monocytes Recruited To The Lung Contributes To House Dust Mite-Induced Airway Inflammation In A Mouse

Model / H. Tashiro, K. Takahashi, S. Hayashi, G. Kato, K. Kurata, S. Kimura, N. Sueoka-Aragane // Plos One – 2016. – Vol. 11 – № 6– P. 1-16.

204. Taylor S.L. Inflammatory Phenotypes In Patients With Severe Asthma Are Associated With Distinct Airway Microbiology / S. L. Taylor, L. E. X. Leong, J. M. Choo, S. Wesselingh, I. A. Yang, J. W. Upham, P. N. Reynolds, S. Hodge, A. L. James, C. Jenkins, M. J. Peters, M. Baraket, G. B. Marks, P. G. Gibson, J. L. Simpson, G. B. Rogers // J Allergy Clin Immunol – 2017 . – Vol. 141 – № 1– P. 94-103.

205. Temiz-Resitoglu M. Activation Of Mtor/Ikb-A/Nf-Kb Pathway Contributes To Lps-Induced Hypotension And Inflammation In Rats / M. Temiz-Resitoglu, S. P. Kucukkavruk, D. S. Guden, P. Cecen, A. N. Sari, B. Tunctan, A. Gorur, L. Tamer-Gumus, C. K. Buharalioglu, K. U. Malik, S. Sahan-Firat // Eur J Pharmacol – 2017. – Vol. 802– P. 7–19.

206. Thiriou D. Innate Immunity As The Orchestrator Of Allergic Airway Inflammation And Resolution In Asthma / D. Thiriou, I. Morianos, G. Xanthou, K. Samitas // Int Immunopharmacol – 2017. – Vol. 48– P. 43–54.

207. Thomas W.R. Molecular Mimicry As The Key To The Dominance Of The House Dust Mite Allergen Der P 2 / W. R. Thomas // Expert Rev Clin Immunol – 2009. – Vol. 5 – № 3– P. 233–237.

208. Thomas W.R. Hierarchy And Molecular Properties Of House Dust Mite Allergens / W. R. Thomas // Allergol Int – 2015. – Vol. 64 – № 4– P. 304–311.

209. Thorburn A.N. Pneumococcal Conjugate Vaccine-Induced Regulatory T Cells Suppress The Development Of Allergic Airways Disease / A. N. Thorburn, B. J. O'sullivan, R. Thomas, R. K. Kumar, P. S. Foster, P. G. Gibson, P. M. Hansbro // Thorax – 2010. – Vol. 65 – № 12– P. 1053–1060.

210. Törmänen S. Toll-Like Receptor 1 And 10 Gene Polymorphisms Are Linked To Postbronchiolitis Asthma In Adolescence / S. Törmänen, M. Korppi, E. Lauhkonen, P. Koponen, J. Teräsjarvi, J. Vuononvirta, M. Helminen, Q. He, K. Nuolivirta // Acta Paediatr – 2017 – Vol. 107 – № 1– P. 134–139.

211. Torres D. Double-Stranded Rna Exacerbates Pulmonary Allergic Reaction Through Tlr3: Implication Of Airway Epithelium And Dendritic Cells / D. Torres, A. Dieudonné, B. Ryffel, E. Vilain, M. Si-Tahar, M. Pichavant, P. Lassalle, F. Trottein, P. Gosset // J Immunol – 2010. – Vol. 185 – № 1– P. 451–459.
212. Tran N.L. Toll-Like Receptor 8 Deletion Accelerates Autoimmunity In A Mouse Model Of Lupus Through A Toll-Like Receptor 7-Dependent Mechanism / N. L. Tran, C. Manzin-Lorenzi, M. L. Santiago-Raber // Immunology – 2015. – Vol. 145 – № 1– P. 60–70.
213. Trompette A. Allergenicity Resulting From Functional Mimicry Of A Toll-Like Receptor Complex Protein / A. Trompette, S. Divanovic, A. Visintin, C. Blanchard, R. S. Hegde, R. Madan, P. S. Thorne, M. Wills-Karp, T. L. Gioannini, J. P. Weiss, C. L. Karp // Nature – 2009. – Vol. 457 – № 7229– P. 585–588.
214. Tsybikov N.N. Expression Of Tlr2 And Tlr4 On Peripheral Blood Monocytes During Exacerbation Of Atopic Dermatitis / N. N. Tsybikov, I. Petrisheva, E. V Fefelova, B. I. Kuznik, E. Magen // Allergy Asthma Proc – 2015. – Vol. 36 – № 6 – P. 140-145.
215. Vaure C. A Comparative Review Of Toll-Like Receptor 4 Expression And Functionality In Different Animal Species / C. Vaure, Y. Liu // Front Immunol – 2014. – Vol. 5– P. 1-15.
216. Vidya M.K. Toll-Like Receptors: Significance, Ligands, Signaling Pathways, And Functions In Mammals / M. K. Vidya, V. G. Kumar, V. Sejian, M. Bagath, G. Krishnan, R. Bhatta // Int Rev Immunol – 2018. – Vol. 37 – № 1 – P. 1-17
217. Vries J.E. De Immunosuppressive And Anti-Inflammatory Properties Of Interleukin 10 / J. E. De Vries // Ann Med – 1995. – Vol. 27 – № 5– P. 537–541.
218. Walker J.A. Innate Lymphoid Cells--How Did We Miss Them? / J. A. Walker, J. L. Barlow, A. N. Mckenzie // Nat Rev Immunol – 2013. – Vol. 13 – № 2– P. 75–87.

219. Walker J.A. Development And Function Of Group 2 Innate Lymphoid Cells / J. A. Walker, A. N. Mckenzie // Curr Opin Immunol – 2013. – Vol. 25 – № 2– P. 148–155.
220. Walsh G.M. Biologics For Asthma And Allergy / G. M. Walsh // Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg. – 2017. – Vol. 25 – № 3– P. 231–234.
221. Wang L. Changes Of Serum Interleukin (Il)-12 And Il-13 In Asthmatic Patients And Regulatory Effects Of Glucocorticoids On Them / L. Wang, X. Zhang, Y. W. Xue, Y. Li, Q. Shi, C. H. Liu // Zhonghua Nei Ke Za Zhi – 2003. – Vol. 42 – № 1– P. 24–26.
222. Watson B. Thymic Stromal Lymphopoietin: A Central Regulator Of Allergic Asthma / B. Watson, G. M. Gauvreau // Expert Opin Ther Targets – 2014. – Vol. 18 – № 7– P. 771–785.
223. Weigt H. Efficacy Of Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Combined With Interferon-Gamma In A Murine Asthma Model / H. Weigt, C. Nassenstein, T. Tschernig, P. F. Mühlradt, N. Krug, A. Braun // Am J Respir Crit Care Med – 2005. – Vol. 172 – № 5– P. 566–572.
224. Weir R.A. Serum Soluble St2: A Potential Novel Mediator In Left Ventricular And Infarct Remodeling After Acute Myocardial Infarction / R. A. Weir, A. M. Miller, G. E. Murphy, S. Clements, T. Steedman, J. M. Connell, I. B. Mcinnes, H. J. Dargie, J. J. McMurray // J Am Coll Cardiol – 2010. – Vol. 55 – № 3– P. 243–250.
225. Westerholm-Ormio M. Infiltration Of Foxp3- And Toll-Like Receptor-4-Positive Cells In The Intestines Of Children With Food Allergy. / M. Westerholm-Ormio, O. Vaarala, M. Tiittanen, E. Savilahti // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. – 2010. – Vol. 50 – № 4– P. 367–76.
226. Whitehead G.S. Tnf Is Required For Tlr Ligand-Mediated But Not Protease-Mediated Allergic Airway Inflammation / G. S. Whitehead, S. Y. Thomas, K. H. Shalaby, K. Nakano, T. P. Moran, J. M. Ward, G. P. Flake, H. Nakano, D. N. Cook // J Clin Invest – 2017. – Vol. 127 – № 9– P. 3313–3326.

227. Willart M.A. Interleukin-1 α Controls Allergic Sensitization To Inhaled House Dust Mite Via The Epithelial Release Of Gm-Csf And Il-33 / M. A. Willart, K. Deswarte, P. Pouliot, H. Braun, R. Beyaert, B. N. Lambrecht, H. Hammad // *J Exp Med* – 2012. – Vol. 209 – № 8– P. 1505–1517.

228. Wilson R.H. The Toll-Like Receptor 5 Ligand Flagellin Promotes Asthma By Priming Allergic Responses To Indoor Allergens / R. H. Wilson, S. Maruoka, G. S. Whitehead, J. F. Foley, G. P. Flake, M. L. Sever, D. C. Zeldin, M. Kraft, S. Garantziotis, H. Nakano, D. N. Cook // *Nat Med* – 2012. – Vol. 18 – № 11– P. 1705–1710.

229. Wong C.K. Proinflammatory Cytokines (Il-17, Il-6, Il-18 And Il-12) And Th Cytokines (Ifn-Gamma, Il-4, Il-10 And Il-13) In Patients With Allergic Asthma / C. K. Wong, C. Y. Ho, F. W. Ko, C. H. Chan, A. S. Ho, D. S. Hui, C. W. Lam // *Clin Exp Immunol* – 2001. – Vol. 125 – № 2– P. 177–183.

230. World Health Organization. Global Surveillance, Prevention And Control Of Chronic Respiratory Diseases: A Comprehensive Approach. Geneva, Switzerland / World Health Organization – 2007.– P. 1-146.

231. Wu W.H. Thymic Stromal Lymphopoietin-Activated Invariant Natural Killer T Cells Trigger An Innate Allergic Immune Response In Atopic Dermatitis / W. H. Wu, C. O. Park, S. H. Oh, H. J. Kim, Y. S. Kwon, B. G. Bae, J. Y. Noh, K. H. Lee // *J Allergy Clin Immunol* – 2010. – Vol. 126 – № 2– P. 290–299.

232. Wüthrich B. Prevalence Of Atopy And Pollinosis In The Adult Population Of Switzerland (Sapaldia Study). Swiss Study On Air Pollution And Lung Diseases In Adults / B. Wüthrich, C. Schindler, P. Leuenberger, U. Ackermann-Lieblich // *Int Arch Allergy Immunol* – 1995. – Vol. 106 – № 2– P. 149–156.

233. Yang C. Lipopolysaccharide Enhances Fc ϵ ri-Mediated Mast Cell Degranulation By Increasing Ca²⁺ Entry Through Store-Operated Ca²⁺ Channels: Implications For Lipopolysaccharide Exacerbating Allergic Asthma / C. Yang, X. Mo, J. Lv, X. Liu, M. Yuan, M. Dong, L. Li, X. Luo, X. Fan, Z. Jin, Z. Liu, J. Liu // *Exp Physiol* – 2012. – Vol. 97 – № 12– P. 1315–1327.

234. Yang D.X. Serum Interleukin 18 And 33 Levels And Its Clinical Significance In Asthma Patients / D. X. Yang, N. Li, X. L. Zhang, Q. Wang // *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* – 2012. – Vol. 35 – № 7– P. 493–496.

235. Yang J. Naringenin Attenuates Mucous Hypersecretion By Modulating Reactive Oxygen Species Production And Inhibiting Nf-Kb Activity Via Egfr-Pi3k-Akt/Erk Mapkinase Signaling In Human Airway Epithelial Cells / J. Yang, Q. Li, X. D. Zhou, V. P. Kolosov, J. M. Perelman // *Mol Cell Biochem* – 2011. – Vol. 351 – № 1– P. 229–240.

236. Yang X. Il-10 Deficiency Prevents Il-5 Overproduction And Eosinophilic Inflammation In A Murine Model Of Asthma-Like Reaction / X. Yang, S. Wang, Y. Fan, X. Han // *Eur J Immunol* – 2000. – Vol. 30 – № 2– P. 382–391.

237. Yeh D.W. Interplay Between Inflammation And Stemness In Cancer Cells: The Role Of Toll-Like Receptor Signaling / D. W. Yeh, L. R. Huang, Y. W. Chen, C. F. Huang, T. H. Chuang // *J Immunol Res* – 2016. – Vol. 2016– P. 1-14.

238. Yin B.J. Biological Characteristics And Effect Of Tnf-Alpha Binding Peptide And Tnfr Blocking Peptide In Vitro / B. J. Yin, M. X. Yu, J. Wang, X. D. Jiang, Z. Y. Li // *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* – 2007. – Vol. 23 – № 2– P. 172–175.

239. Yin S.C. Der P2 Internalization By Epithelium Synergistically Augments Toll-Like Receptor-Mediated Proinflammatory Signaling / S. C. Yin, E. C. Liao, C. L. Chiu, C. Y. Chang, J. J. Tsai // *Allergy Asthma Immunol Res* – 2015. – Vol. 7 – № 4– P. 393–403.

240. Yin S.C. Der P2 Internalization By Epithelium Synergistically Augments Toll-Like Receptor-Mediated Proinflammatory Signaling / S. C. Yin, E. C. Liao, C. L. Chiu, C. Y. Chang, J. J. Tsai // *Allergy Asthma Immunol Res* – 2015. – Vol. 7 – № 4– P. 393–403.

241. Ying S. Thymic Stromal Lymphopoietin Expression Is Increased In Asthmatic Airways And Correlates With Expression Of Th2-Attracting Chemokines And Disease Severity / S. Ying, B. O'connor, J. Ratoff, Q. Meng, K.

Mallett, D. Cousins, D. Robinson, G. Zhang, J. Zhao, T. H. Lee, C. Corrigan // *J Immunol* – 2005. – Vol. 174 – № 12– P. 8183–8190.

242. Yosri H. Crocin Modulates Il-4/Il-13 Signaling And Ameliorates Experimentally Induced Allergic Airway Asthma In A Murine Model / H. Yosri, W. F. Elkashef, E. Said, N. M. Gameil // *Int Immunopharmacol* – 2017. – Vol. 50– P. 305–312.

243. Zambalde É.P. The Anti-Inflammatory And Pro-Resolution Effects Of Aspirin-Triggered Rvd1 (At-Rvd1) On Peripheral Blood Mononuclear Cells From Patients With Severe Asthma / É. P. Zambalde, M. M. Teixeira, D. C. Favarin, J. R. De Oliveira, M. L. Magalhães, M. M. Cunha, W. C. Silva, C. H. Okuma, V. Rodrigues, B. D. Levy, A. P. Rogerio // *Int Immunopharmacol* – 2016. – Vol. 35– P. 142–148.

244. Zasłona Z. Resident Alveolar Macrophages Suppress, Whereas Recruited Monocytes Promote, Allergic Lung Inflammation In Murine Models Of Asthma / Z. Zasłona, S. Przybranowski, C. Wilke, N. Van Rooijen, S. Teitz-Tennenbaum, J. J. Osterholzer, J. E. Wilkinson, B. B. Moore, M. Peters-Golden // *J Immunol* – 2014. – Vol. 193 – № 8– P. 4245–4253.

245. Zeyer F. Mrna-Mediated Gene Supplementation Of Toll-Like Receptors As Treatment Strategy For Asthma In Vivo / F. Zeyer, B. Mothes, C. Will, M. Carevic, J. Rottenberger, B. Nürnberg, D. Hartl, R. Handgretinger, S. Beer-Hammer, M. S. Kormann // *Plos One* – 2016. – Vol. 11 – № 4– P. 1-10.

246. Zhang L. A Toll-Like Receptor 4 (Tlr4) Variant Is Associated With Asthma Severity / L. Zhang, A. G. Xu, W. Zhao, Q. F. Xu, Y. M. Zhao, D. D. Li, X. Y. Shi, J. J. Zhao // *Int J Clin Exp Med* – 2015. – Vol. 8 – № 5– P. 7849–7854.

247. Zhang Y.-L. Peripheral Blood MdsCs, Il-10 And Il-12 In Children With Asthma And Their Importance In Asthma Development. / Y.-L. Zhang, B. Luan, X.-F. Wang, J.-Y. Qiao, L. Song, R.-R. Lei, W.-X. Gao, Y. Liu // *Plos One* – 2013. – Vol. 8 – № 5– P. 1-9.

248. Zhou B. Thymic Stromal Lymphopoietin As A Key Initiator Of Allergic Airway Inflammation In Mice / B. Zhou, M. R. Comeau, T. De Smedt, H.

D. Liggitt, M. E. Dahl, D. B. Lewis, D. Gyarmati, T. Aye, D. J. Campbell, S. F. Ziegler // *Nat Immunol* – 2005. – Vol. 6 – № 10– P. 1047–1053.

249. Zuany-Amorim C. Toll-Like Receptors As Potential Therapeutic Targets For Multiple Diseases / C. Zuany-Amorim, J. Hastewell, C. Walker // *Nat Rev Drug Discov* – 2002. – Vol. 1 – № 10– P. 797–807.

250. Zuo L. Molecular Regulation Of Toll-Like Receptors In Asthma And Copd / L. Zuo, K. Lucas, C. A. Fortuna, C. C. Chuang, T. M. Best // *Front Physiol* – 2015. – Vol. 6– P. 1-10.

251. Zuśka-Prot M. Involvement Of Regulatory T Cells And Selected Cytokines In The Pathogenesis Of Bronchial Asthma / M. Zuśka-Prot, J. J. Jaroszewski, T. Maślanka // *Postepy Hig. Med. Dosw.* – 2016. – Vol. 70 – P. 668–677.