

и БА, но была достоверно выше чем показатели контрольной группы ($p=0,00$; $p=0,00$). Корреляционный анализ подтвердил важное значение TARC в развитии аллергического воспаления и патогенетическую роль TARC в формировании Th2-ответа у больных АБЛА. Установлена прямая корреляционная связь уровня TARC с уровнями общего IgE ($r = 0,35$, $p<0,05$) и sIgE к *A.fumigatus* ($r = 0,39$, $p<0,05$), с абсолютным числом эозинофилов ($r = 0,30$, $p<0,05$) и обратная корреляционная связь с оценкой контроля бронхиальной астмы АСТ ($r = -0,31$, $p<0,05$) и ухудшением функции внешнего дыхания и ОФВ1 ($r = -0,44$, $p<0,05$).

Заключение. Своевременная диагностика и лечение АБЛА предотвращают прогрессирование аллергического воспаления и формирование тяжелого фиброза легких. Выявленное в ходе исследования повышение содержания TARC у больных АБЛА и его связь со степенью выраженности микогенной сенсибилизации и клиническими проявлениями заболевания позволяет рассматривать этот показатель в качестве биомаркера активной воспалительной реакции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Masaki K., Fukunaga K., Matsusaka M. et al. Characteristics of severe asthma with fungal sensitization. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017 Sep; 119(3): 253-257.
2. Goh K.J., Yü A.C.A., Lapperre T.S. et al. Sensitization to *Aspergillus* species is associated with frequent exacerbations in severe asthma. *J. Asthma Allergy.* 2017 Apr 21; 10: 131-140.
3. Shah A., Paniabi C. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: A Perplexing Clinical Entity. *Allergy Asthma Immunology Res.* 2016 Jul; 8(4): 282-297.
4. Denning D.W., Pashley C., Hartl D. et al. Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs. *Clin. Transl. Allergy.* 2014 Apr; 15;4:14.
5. Agarwal R.A., Chakrabarti A., Shah D. et al. For the ABPA complicating asthma ISHAM working group 2013. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clinical & Experimental Allergy.* 2013. 43: 850-873.
6. Wang Y.H., Liu Y.J. Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses. *Clin. Exp. Allergy.* 2009 Jun; 39(6): 798-806.
7. Chai R., Liu B., Qi F. IL-31, IL-33, and TSLP expression and relation to severity of asthma and rhinitis in Chinese allergic patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2017; 10(2): 1774-1782.
8. Becerra-Díaz M., Wills-Karp M., Heller N.M. New perspectives on the regulation of type II inflammation in asthma. *F1000Res.* 2017 Jun 28;6:1014.
9. Hartl D., Latzin P., Zissel G. et al. Chemokines indicate allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 2006 Jun 15;173(12):1370-1376.
10. Latzin P., Hartl D., Regamey N. et al. Comparison of serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Eu.rRespir. J.* 2008; 31: 36-42.

АКТИВАЦИЯ КЛЕТОК КРОВИ ЛПС И DPE: РОЛЬ SMD-2 И P38 МАРК В РАЗВИТИИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Косякова Н.И.

Радзюкевич Я.В., Морозова А.А., Прохоренко И.Р.

¹ ФГАУЗ БПНЦ РАН, Пушкино, Россия

² ОП ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Россия

E-mail: nelia_kosiakova@mail.ru

ACTIVATION OF BLOOD CELLS BY LPS AND DPE: THE ROLE OF SMD-2 AND P38 MARK IN THE DEVELOPMENT OF ALLERGIC INFLAMMATION

Kosyakova N.I.¹, Radzyukovich Y.V.^{1,2}, Morozova A.A.^{1,2}, Prokhorenko I.R.^{1,2}

¹ Hospital of Pushchino Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia Federation

² PSCBR RAS Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Russia Federation

Аэроаллергия является результатом неадекватного иммунного ответа на чужеродные антигены. В связи с глобальным распространением аллергической астмы

повышенное внимание уделяется механизму развития аллергического ответа и усиливающим этот эффект молекулам. Распространенная причина развития аллерги-

ческой реакции – белки клещей рода *Dermatophagoides*, содержащиеся в домашней пыли, эффект белков-аллергенов часто усиливается ЛПС, содержащимися в среде обитания клещей. Основным аллергеном клеща *D. pteronyssinus*, белок Der p 2, является структурным и функциональным гомологом белка крови человека – MD-2 [1]. MD-2 – корцепторная молекула TLR4, необходимая для распознавания эндотоксина, доставленного транспортными белками (LBP, sCD14) [2]. Der p 2 так же усиливает экспрессию РНК MD-2 и синтез самого белка [3, 4], может напрямую взаимодействовать с TLR4, восстанавливая ЛПС-управляемую сигнализацию в отсутствие MD-2 [5]. Избыточно нарабатанный MD-2 секретируется в кровь в виде растворимой формы (sMD-2) [6], обеспечивая доставку ЛПС к эффекторным клеткам. sMD-2 также способен создавать внеклеточные комплексы со свободным TLR4 на поверхности клеток, усиливая ответ на ЛПС [7].

МАРК, участвующие в цепях передачи внутриклеточного сигнала от TLR4, представляют группу белков, включающих три небольших семейства – p38 МАРК, JNK/SAPK и ERK. Основными мишенями МАРК являются транскрипционные факторы. Ответ клеток на Der p 2 включает активацию МАРК и NF-κB, и эти пути передачи сигнала по-разному регулируют синтез медиаторов воспаления [8].

В настоящее время не известно, насколько полным функциональным гомологом белка sMD-2 является аллерген Der p 2, как взаимодействуют эти белки непосредственно в крови, происходит ли активация клеток врожденного иммунитета комплексами ЛПС•MD-2 или ЛПС•Der p 2 по одному и тому же сигнальному пути, индуцированному TLR4.

Цель исследования: определение роли sMD-2 и p38 МАРК в активации клеток крови ЛПС из *Escherichia coli* O55:B5 и собственно экстрактом аллергенов из *D. pteronyssinus* (DpE).

Материалы и методы исследования. В работе использовали S-гликоформу ЛПС *E. coli* O55:B5 («Sigma-Aldrich», USA); экстракт аллергенов из клеща *D. pteronyssinus* – DpE (1000 PNU/ml, АО БИОМЕД), anti-MD2 антитела (Abcam), среду RPMI1640, содержащую 25 мМ HEPES, NaHCO₃ и L-глутамин (Sigma), раствор Дульбекко (0,137 М NaCl; 2,68 мМ KCl; 8,06 мМ Na₂HPO₄×12 H₂O; 1,47 мМ KH₂PO₄), SB 203580 ингибитор p38 МАРК («Sigma-Aldrich», USA), иммуноферментные тест-системы для определения цитокинов TNF-α и IL-8 (ООО «Цитокин»).

Периферическую кровь условно здоровых добровольцев обоих полов (25-30 лет) получали в клинических условиях (БПНЦ РАН) по информированному согласию на проведение исследований. Определение содержания цитокинов в образцах проводили с помо-

щью иммуноферментных наборов по методикам, предложенным производителями. Результаты представлены в виде медианных значений с квартилями (IQR). Достоверность различий между медианными значениями оценивали с помощью U-теста Манна-Уитни и критерия знаков Вилкоксона.

Влияние блокирования белка MD-2/sMD-2 на синтез TNF-α и IL-8 в ответ на аллерген и эндотоксины.

Для оценки провоспалительного ответа образцы крови инкубировали с эндотоксином и/или DpE в течение 6 ч. При исследовании эффекта блокирования MD-2/sMD-2 образцы инкубировали сначала 30 минут при комнатной температуре с блокирующими антителами, а затем 6 ч с агонистами.

Вклад p38 МАРК в активацию лейкоцитов цельной крови к продукции цитокинов. Гепаринизированную кровь (концентрация гепарина 5%) разводили средой RPMI1640 в соотношении 1:4 и разносили по 1 мл в 24-луночные планшеты «Cellstar» («Greiner bio-one», Germany). Часть образцов крови предварительно инкубировали с ингибитором p38 МАРК-киназы SB203580 (10 мкМ) в течение 15 мин [9]. К образцам цельной крови добавляли ЛПС *E. coli* (40 нг/мл) и/или DpE (1000 PNU/ml). Образцы инкубировали в течение 6 ч в CO₂-инкубаторе («Jouan», France) при 37° С и 5%-ном содержании CO₂. После инкубации клетки крови осаждали центрифугированием при 300 g (10 мин). Полученные супернатанты отбирали и хранили при –20° С до определения содержания цитокинов.

Результаты.

Влияние блокирования белка MD-2/sMD-2 на синтез TNF-α и IL-8 в ответ на аллерген и эндотоксины.

Активация клеток крови DpE не влияла на уровень провоспалительных цитокинов в крови. Блокирование белка MD-2/sMD-2 также не влияло на количество TNF-α и IL-8 при действии аллергена. Активация клеток крови эндотоксином и комбинацией эндотоксина и аллергена достоверно увеличивала количество секретируемых провоспалительных цитокинов. При блокировании белка MD-2/sMD-2 синтез TNF-α клетками крови в ответ на комбинацию аллергена и ЛПС снижался примерно на 7%. С заблокированным белком MD-2/sMD-2 клетки активнее нарабатывали провоспалительный цитокин по сравнению с активацией только эндотоксинами.

Количество нарабатываемого клетками крови хемокина IL-8 при одновременной активации аллергеном и ЛПС *E. coli* достоверно не изменялось по сравнению с активацией только ЛПС. Блокирование белка MD-2/sMD-2 не влияло на наработку хемокина клетками крови в ответ на комбинацию эндотоксина и аллергена.

Вклад p38 МАРК в активацию лейкоцитов цельной крови к продукции цитокинов.

Блокирование p38 MAPK снижало синтез TNF- α , индуцированный ЛПС *E. coli* (на 32% ($p < 0,05$)) и практически полностью ингибировало эффект DpE ($p < 0,001$). Сочетанное действие DpE и ЛПС *E. coli* снижало эффективность SB203580, продукция TNF- α подавлялась на 23% ($p < 0,05$). Ингибирование p38 MAP-киназы не влияло на продукцию клетками крови IL-8 во всех вариантах эксперимента.

Обсуждение.

Нами показано, что при одновременной активации клеток крови эндотоксином и экстрактом аллергена клеща домашней пыли усиливается синтез TNF- α и IL-8. Мы предположили, что данный результат связан с увеличением количества растворимой формы белка MD-2 в крови, приводящей к более эффективной доставке ЛПС к TLR4-несущим клеткам [4]. Исследования показали, что блокирование MD-2 и sMD-2 с помощью антител снижает уровень нарабатываемого провоспалительного цитокина TNF- α в ответ на комбинацию ЛПС *E. coli* и DpE. Количество синтезируемых цитокинов в ответ на комбинацию ЛПС *E. coli* и аллергена при блокировании MD-2/sMD-2 остаётся выше, чем при активации клеток только эндотоксином. Таким образом, Der p 2 усиливает ответ на ЛПС *E. coli* в цельной крови человека по двум механизмам: активируя синтез дополнительного sMD-2 с одной стороны, и за счёт собственной функциональной гомологии с этим белком – с другой. Это позволяет ему обеспечивать доставку ЛПС *E. coli* к клеткам и взаимодействовать с TLR4 в отсутствие MD-2/sMD-2.

Данные *in vitro* свидетельствуют о том, что помимо p38 MAPK ЛПС-индуцированный синтез TNF- α запускается при участии других путей сигнализации, например, членов семейства MAPK p42/44, c-Jun N-концевой киназы и пути NF- κ B [11]. Проведенные нами исследования показали, что при активации клеток цельной крови DpE и/или ЛПС *E. coli*, роль киназы p38 MAPK в продукции TNF- α является значимой, т.к. в каждом варианте опыта ингибирование продукции этого цитокина было достоверным.

Другая картина наблюдается в синтезе хемокина IL-8. Одновременная активация аллергеном и эндотоксином не приводит к изменению уровня нарабатываемого IL-8 по сравнению с активацией только ЛПС *E. coli*. Блокирование MD-2/sMD-2 не влияет на синтез этого хемокина клетками крови в ответ на комбинированное действие аллергена и ЛПС *E. coli*. Наблюдаемое различие в синтезе TNF- α и IL-8 может быть связано с различными внутриклеточными путями активации синтеза этих цитокинов.

При ингибировании p38 MAPK в клетках цельной крови не происходит достоверных изменений уровня ИЛ-8 в случае активации ЛПС *E. coli* и/или DpE. Это свидетельствует о том, что при использовании ЛПС

E. coli и/или DpE в качестве активирующих агентов синтез цитокина, вероятно, в меньшей степени зависит от активации MAPK-сигнального пути. Ngkelo и др. выяснили, что стимуляция РВМС человека с помощью ЛПС, приводящая к высвобождению провоспалительных цитокинов, таких как CXCL8 и IL-6, частично зависит от сигнализации PI3K [11].

Выводы. Полученные нами результаты демонстрируют значимость sMD-2 в одновременной активации клеток крови ЛПС *E. coli* и DpE. Собственно белок Der p 2 является функциональным гомологом белка sMD-2, способным действовать как синергетически с этим белком, так и выполнять его функции транспорта ЛПС *E. coli* к рецептору TLR4. Это приводит к активации клеток врожденного и приобретённого иммунитета и синтезу провоспалительного цитокина TNF- α .

Вклад сигнального пути p38 MAPK в активацию синтеза TNF- α клетками цельной крови снижается при применении ЛПС *E. coli* совместно с DpE. Синтез IL-8 клетками крови в ответ на ЛПС *E. coli* и ЛПС *E. coli* + DpE преимущественно осуществляется при участии сигнального пути, не вовлекающего p38 MAPK (вероятно, PI3K).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Asturias J. A., Ibarrola I., Arilla M. C., Vidal, C. et al. Engineering of major house dust mite allergens Der p 1 and Der p 2 for allergen-specific immunotherapy // *Clin. Exp. Allergy*. – 2009. – Vol. 39. – P. 1088–1098.
2. Nagai Y., Akashi S., Nagafuku M., Ogata M. et al. Essential role of MD-2 in ЛПС responsiveness and TLR4 distribution // *Nature Immun.* – 2002. – Vol. 3. – P. 667 – 672.
3. Liao E. C., Hsieh C. W., Chang C. Y., Yu S. J. et al. Enhanced allergic inflammation of Der p 2 affected by polymorphisms of MD-2 promoter // *Allergy Asthma Immunol. Res.* – 2015. – Т. 7. – №. 5. – С. 497–506.
4. Radzyukevich Y. V., Kosyakova N. I., Prokhorenko I. R. Synergistic effect of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen and *Escherichia coli* lipopolysaccharide on human blood cells // *PLOS ONE*. – 2018. – Vol. 13. – P. e0207311.
5. Trompette A., Divanovic S., Visintin A., Blanchard C. et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein // *Nature*. – 2009. – Vol. 457. – P. 585–588.
6. Visintin A., Mazzoni A., Spitzer J. A., Segal, D. M. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4 // *PNAS*. – 2001. – Vol. 98. – P. 12156–12161.
7. Tsukamoto H., Ihara H., Ito R., Ukai I. et al. MD-2-dependent human Toll-like receptor 4 monoclonal antibodies detect extracellular association of Toll-like receptor

- 4 with extrinsic soluble MD-2 on the cell surface // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol. 440. – P. 31–36.
8. Prokhorenko I., Morozova A., Kabanov D., Grachev S. Der p 2 from *Dermatophagoides pteronyssinus* potentiates the endotoxic activity of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* // *Intensive Care Med. Exp.* – 2017 – Vol. 5 (Suppl. 1). – P. S3–S4.
9. Fehr S., Unger A., Schaeffeler E., Herrmann S. et al. Impact of p38 MAP kinase inhibitors on LPS-induced release of TNF- α in whole blood and primary cells from different species // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2015. – Vol. 36. – P. 2237–2249.
10. Fitzgerald K. A., Rowe D. C., Barnes B. J., Caffrey D. R. et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the toll adapters TRAM and TRIF // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 198. – P. 1043–1055.
11. Ngkelo A., Meja K., Yeadon M., Adcock I. et al. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and G i α dependent PI-3kinase signaling

РОЛЬ ИНСЕКТНОЙ АЛЛЕРГИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

Косякова Н.И.¹

Андреева Л.А.¹, Панкратова Е.В.¹, Прохоренко И.Р.^{1,2}

¹ Больница Пущинского Научного Центра РАН

² Институт фундаментальных проблем биологии РАН

E-mail: nelia_kosiakova@mail.ru

THE ROLE OF INSECTIVE ALLERGY IN THE PATHOGENESIS OF ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA AMONG CHILDREN

Kosyakova N.I.¹, Andreeva L.A.¹, Pankratova E.V.¹, Prokhorenko I.R.^{1,2}

¹ Hospital of the Pushchino Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

² Institute of Fundamental Problems of Biology RAS, Pushchino, Russia

Бронхиальная астма (БА) относится к наиболее распространенным и гетерогенным заболеваниям с различными патогенетическими вариантами течения. Среди факторов, которые провоцируют или ухудшают симптомы БА выделяют вирусные инфекции, бытовые и/или профессиональные аллергены, табачный дым, физические нагрузки, стресс. Эти факторы особенно важно учитывать в случае неконтролируемого течения астмы. Вызвать или спровоцировать приступ БА могут и некоторые медикаменты [1, 2, 3, 4, 5]. Сенсibilизация к внутри жилищным факторам выявляется более чем у половины больных, страдающих аллергическими заболеваниями, в том числе и БА, при этом аллергия к клещам домашней пыли нередко сочетается с аллергией к инсектным факторам среды. Инсектная фауна жилища человека включает ряд насекомых, которые являются источниками аллергенов [6.]. Попадая в состав домашней пыли или воздуха жилого помещения, а так же при отмирании частицы этих насекомых могут самостоятельно играть роль ингаляционных аллергенов. Значительная «летучесть» размельченных частичек тела насекомого на коврах, полу или бытовых изделиях позволяет им вместе с частичками пыли находится в

воздушном потоке, попадать на слизистые оболочки дыхательного и пищеварительного тракта [7.]. Аллергия на тараканов была признана важной причиной астмы. Тараканы производят несколько аллергенов, которые вызывают сенсibilизацию, и воздействие высоких уровней аллергенов таракана в домашних условиях является основным фактором риска возникновения симптомов у сенсibilизированных детей. Ранее выявленные аллергены из *Blattella germanica* и *Periplaneta americana*, наиболее важных видов домицилий, включают Bla g 2 (неактивная аспарагиновая протеаза), Bla g 4 (калицин), Bla g 5 (глутатион-S-трансфераза), Bla g 6 (тропонин) перекрестные реактивные аллергены группы 1 Bla g 1 и Per a 1, Per a 3 (арилфорин) и Per a 7 (тропомоизин). Аллергию к тараканам диагностировали у 36,8% детей с БА и в 50, 2 % детских спален был высокий уровень аллергенов тараканов. Даже после успешного истребления популяций тараканов у детей сохраняется высокий уровень сенсibilизации к ним [8.]. Реализация воспаления при БА предопределяется сложными иммуноопосредованными механизмами и дисбалансом в системе цитокинов. Многочисленные и в то же время неоднозначные данные литературы об