

TLR-ОПОСРЕДОВАННАЯ ВЫРАБОТКА ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Хорева М.В.¹, Латышева Т.В.², Смирнова А.Д.¹, Грачева Л.А.³, Бологов А.А.³, Захаров М.В.³

¹ ФГБОУ ВО РНИМУ им Н.И.Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА, Москва, Россия;

³ ФГБУ «РДКБ» Минздрава России, Москва, Россия

TLR-MEDIATED CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN ASTHMATIC PATIENTS

Khoreva M.V.¹, Latisheva T.V.², Smirnova A.D.¹, Gracheva L.V.³, Bologov A.A.³, Zakharov M.V.³

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

² National Research Center – Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

³ Russian Children's Clinical Hospital, Moscow, Russia

Toll-подобные рецепторы (TLRs) являются рецепторами врожденного иммунитета и играют ключевую роль в защите организма от патогенов, распознавая консервативные структуры микроорганизмов, так называемые PAMP (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны). При распознавании лигандов TLRs происходит запуск каскада сигнальных молекул, в результате которого экспрессируются гены про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, костимуляторных молекул. На протяжении последних лет активно изучается роль TLRs в патогенезе различных заболеваний, в том числе бронхиальной астмы (БА) [1]. Одним из механизмов развития бронхиальной астмы является дисбаланс Т-хелперов 1-го типа (Th1) и Т-хелперов 2-го типа (Th2), про- и противовоспалительных цитокинов. Известно, что TLRs могут участвовать в регуляции дифференцировки Th, действие лигандов TLRs в раннем возрасте индуцирует созревание Th1, снижая Th2-зависимый ответ. Показано, что некоторые аллергены могут содержать в своем составе такие широко распространенные лиганды TLRs, как ЛПС или β-глюканы, кроме того, не-

которые аллергены (например, аллергены клещей домашней пыли) способны непосредственно индуцировать TLR-зависимый сигнальный путь [2]. Таким образом, действие аллергенов может приводить к усиленной выработке цитокинов, развитию хронического воспаления, и усугублять течение бронхиальной астмы. Целью данного исследования является определение опосредованной лигандами TLRs выработки про- и противовоспалительных цитокинов МНК периферической крови больных БА.

Материалы и методы. Группу обследуемых составили 36 больных бронхиальной астмой в возрасте 18-45 лет. Пациенты были разделены на группы: I группа – пациенты с атопической бронхиальной астмой (n=23), среди них у 12 больных – легкая степень, у 11 – средняя степень тяжести заболевания; II группа – 13 пациентов со смешанной формой бронхиальной астмы средней степени тяжести. Все обследуемые наблюдались в отделении иммунопатологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Диагноз устанавливался в соответствии с критериями GINA (2016). Критериями включения в исследование

являлся установленный диагноз бронхиальной астмы, отказ от приема системных глюкокортикостероидов минимум за 4 недели до забора крови для проведения исследования, отсутствие хронических заболеваний в анамнезе. Контрольную группу составили 20 здоровых доноров в возрасте от 18 до 47 лет.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из гепаринизированной периферической крови (25 ед/1 мл крови) здоровых доноров и больных БА в одноступенчатом градиенте плотности фикоколл-урографина (1,077 г/см³). Полученные клетки культивировали в среде RPMI-1640 (HyClone) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma), 100 мкг/мл гентамицина и 2 mM-глутамин (Sigma) в течение 24 часов в СО₂-инкубаторе. Рабочая концентрация клеток составила $1 \cdot 10^6$ в мл. В качестве лигандов TLR использовали ЛПС (*E. Coli* 0111:B4, Sigma) в дозе 0,1 мкг/мл, ПГ (*Staphylococcus aureus*, InvivoGen) в дозе 2,5 мкг/мл, действующие через TLR4 и TLR2 соответственно. Контролем служили МНК, культивированные только в среде RPMI 1640. Полученные супернатанты хранили в течение 2-3 месяцев при -70°C.

Концентрацию ФНО α , ИЛ-18, ИЛ-10 и ИЛ-33 в супернатантах МНК определяли с помощью иммуноферментного анализа, использовали коммерческие наборы фирмы «e-Biosciences». При обработке результатов пользовались программным обеспечением STATISTICA 6.0. Данные выражали в виде медианы (Me) и 25-75 перцентилей. Для оценки статистической значимости использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Уровень достоверности считали значимым при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Для определения TLR-опосредованной выработки цитокинов МНК больных БА и здоровых доноров стимулировали агонистами TLR2 и TLR4, ПГ и ЛПС, соответственно. На первом этапе оценивали TLR2- и TLR4-опосредованную выработку ФНО α у больных БА. ФНО α является одним из наиболее важных провоспалительных цитокинов. Известно, что ФНО 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 ФНО α [3,4].

Выявили, что спонтанная продукция ФНО α МНК периферической крови в группе больных атопической БА составила 615,21 (390,71-916,29) пг/мл, в группе больных смешанной БА - 677,5 (408,57-859) пг/мл, что статистически достоверно выше, чем у здоровых доноров (103,51 (59-312) пг/мл). Наибольшее увеличение концентрации ФНО α во всех группах наблюдалось при стимуляции ПГ. В результате проведенных исследований установили, что при стимуляции ПГ концентрация ФНО α достоверно выше у больных атопической БА средней степени тяжести - 2628,42 (2116-3068,6) пг/мл, чем у больных с легким течением заболевания - 1846,14 (1182-2053) пг/мл ($p < 0,05$). Во II группе индуцированная ПГ продукция ФНО α также достоверно выше, чем у здоровых доноров (2654,14 (1982-3628,14) пг/мл и 1081,43 (967,14-1198) пг/мл, соответственно). При использовании ЛПС также наблюдается достоверное увеличение концентрации ФНО α в группах больных атопической БА средней степени тяжести и смешанной БА по сравнению со здоровыми донорами: 2106,1 (1541,43-2845,7) пг/мл, 1989 (1293,6-2294,7) пг/мл и 956 (782,03-1407) пг/мл, соответственно. Повышенная выработка ФНО α под действием лигандов TLR может способствовать развитию стойкого воспалительного процесса у больных БА.

На следующем этапе оценивали стимулированную лигандами TLR2 и TLR4 выработку ИЛ-18 МНК больных БА и здоровых доноров. Спонтанная продукция ИЛ-18 МНК больных атопической и смешанной формами БА была достоверно выше, чем в группе здоровых доноров (292 (277-302) пг/мл, 279,5 (264,5-292) пг/мл и 124,5 (112-132) пг/мл, соответственно), при этом не выявили различий между группами больных.

Стимуляция ЛПС и ПГ МНК периферической крови здоровых доноров и больных БА не приводила к существенным изменениям выработки ИЛ-18, при этом индуцированная продукция ИЛ-18 у больных БА была достоверно выше, чем в группе здоровых доноров. ЛПС-индуцированная продукция ИЛ-18 у здоровых доноров составила 142 (137-152) пг/мл, у больных БА легкой степени тяжести - 304,5 (249,5-334,5) пг/мл, средней степени тяжести - 302 (277-302) пг/мл, у больных смешанной БА - 319,5 (294,5-334,5) пг/мл. ПГ-индуцированная выработка ИЛ-18 МНК здоровых доноров составила 149,5 (132-172) пг/

мл, больных БА легкой степени тяжести - 324,5 (299,5-364,5) пг/мл, средней степени тяжести - 332 (292-352) пг/мл, больных БА смешанного типа - 417 (369,5-432) пг/мл. На экспериментальных мышинных моделях показано, что ИЛ-18 может усиливать выработку цитокинов Th2, индуцируя синтез IgE и таким образом участвовать в развитии аллергического воспаления [5].

В исследованиях последних лет показано, что ИЛ-33 играет важную роль в развитии аллергических заболеваний. ИЛ-33 - мультифункциональный цитокин, он активирует как гемопоэтические клетки (НК-, НКТ-клетки, Т-лимфоциты и др.), так и клетки негемопоэтического происхождения. Впервые ИЛ-33 был обнаружен в эпителии бронхов и дыхательных путей, фибробластах и гладкомышечных клетках, что указывало на роль этого цитокина в регуляции защиты слизистых оболочек [6]. У больных бронхиальной астмой была обнаружена высокая экспрессия ИЛ-33 в легочной ткани [7]. Мы не выявили повышения спонтанной продукции ИЛ-33 МНК периферической крови больных БА. Стимуляция лигандами TLR2 и TLR4 также не приводила к достоверному увеличению выработки ИЛ-33 МНК больных БА по сравнению со здоровыми донорами. Возможно, повышение концентрации ИЛ-33 у больных с аллергопатологией обусловлено продукцией этого цитокина клетками эпителия дыхательных путей.

Оценивали спонтанную и индуцированную продукцию ИЛ-10 МНК больных БА и здоровых доноров. ИЛ-10 является противовоспалительным цитокином, может регулировать баланс цитокинов Th1/Th2 типа и направлять дифференцировку Th в сторону Th2 типа, усиливая аллергическое воспаление [8]. Выявили, что спонтанная выработка ИЛ-10 МНК достоверно повышена у больных атопической БА средней степени тяжести по сравнению со здоровыми донорами - 129,3 (61,58-201,48) пг/мл и 45,20 (33,16-84,5) пг/мл. Под действием ЛПС у больных атопической БА легкого течения концентрация ИЛ-10 составила 310,38 (195,18-353,8) пг/мл, среднего течения - 320,48 (300,9-491,3) пг/мл, а у здоровых доноров 78,03 (42,32-146,6) пг/мл. Таким образом, мы установили, что в группе больных атопической БА как легкого, так и среднего течения концентрация ИЛ-10 под действием ЛПС стати-

стически достоверно повысилась по сравнению со здоровыми донорами. У больных II группы не выявили достоверного увеличения индуцированной ЛПС выработки ИЛ-10 МНК. Действие ПГ приводило к увеличению продукции ИЛ-10 МНК периферической крови больных БА по сравнению с группой здоровых доноров, однако выявленные изменения не были статистически достоверными.

Таким образом, у больных атопической и смешанной формами БА выявили TLR2 и TLR4-опосредованное повышение продукции ФНО α , ИЛ-18 и ИЛ-10. Повышение TLR-опосредованной выработки цитокинов у больных БА свидетельствует об увеличении функциональной активности TLR2 и TLR4 и вовлечении этих рецепторов в иммунопатогенез бронхиальной астмы, что в дальнейшем может определять восприимчивость больных БА к инфекционным агентам. Изменение функциональной активности TLRs может объяснять предрасположенность больных БА к развитию осложнений, а TLRs - служить новой мишенью для терапевтического воздействия.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bauer S. et al. Immunobiology of toll-like receptors in allergic disease. *Immunobiology* (2007) 212(6):521-533.
2. Bezemer GF, et al: Dual role of toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* (2012) 64(2):337-358.
3. Kalinina EP, et al: The mechanisms of the regulation of immune response in patients with comorbidity of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Can Respir J* (2016) 2016(4503267).
4. Huang AX, et al: Plasma inflammatory cytokine il-4, il-8, il-10, and tnf- α levels correlate with pulmonary function in patients with asthma-chronic obstructive pulmonary disease (copd) overlap syndrome. *Med Sci Monit* (2016) 22(2800-2808).
5. Xu MH, et al.: Association of interleukin-18 and asthma. *Inflammation* (2017) 40(1):324-327.
6. Wood IS, et al: Il-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* (2009) 384(1):105-109.
7. Byers DE, et al: Long-term il-33-producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease. *J Clin Invest* (2013) 123(9):3967-3982.
8. Kobayashi N, et al: Il-10 enhances b-cell ige synthesis by promoting differentiation into plasma cells, a process that is inhibited by cd27/cd70 interaction. *Clin Exp Immunol* (2002) 129(3):446-452.