

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 2 И TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 4 У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Ганковская Л.В.¹, Намазова-Баранова Л.С.^{1,2}, Хорева М.В.¹,
Брагвадзе Б.Г.¹, Огурцова А.Д.¹, Алексеева А.А.^{1,2}, Ганковский В.А.²,
Свитич О.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ,
Москва, Россия

Резюме. В настоящее время в литературе активно обсуждается неоднозначная роль распознающих рецепторов врожденного иммунитета, в частности TLRs, в иммунопатогенезе бронхиальной астмы (БА).

Цель нашей работы — исследование экспрессии TLR2 и TLR4 на уровне клеток слизистой полости носа и лейкоцитов периферической крови (ЛПК) больных БА разной степени тяжести.

В исследование были включены 40 детей с БА (3–12 лет) и 10 здоровых детей того же возраста. Методом ПЦР-РВ оценивали экспрессию генов TLR2 и TLR4 в соскобах со слизистой полости носа и в ЛПК; методом проточной цитометрии определяли процент моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLR2 TLR4, и интенсивность их экспрессии; методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа оценивали уровень про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-1α, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα) в назальных смывах.

В результате проведенного исследования выявлена гиперактивация факторов врожденного иммунитета на уровне слизистой оболочки полости носа у больных с БА, проявляющаяся повышением экспрессии генов TLR2, TLR4 и выработки как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. Выявлена связь между уровнем цитокинов и степенью тяжести бронхиальной астмы. В периферической крови определено достоверное увеличение экспрессии TLR2 и TLR4 на циркулирующих CD14⁺ моноцитах у детей с БА.

Таким образом, показано увеличение экспрессии генов TLRs слизистой полости носа и повышение поверхностной экспрессии TLR2 и TLR4 на циркулирующих моноцитах больных бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми детьми. Выявленные изменения свидетельствуют о вовлечении системы TLRs в иммунопатогенез бронхиальной астмы. В дальнейшем TLRs могут быть использованы в качестве маркеров прогноза течения БА и возможных терапевтических мишеней.

Ключевые слова: TLR2, TLR4, провоспалительные цитокины, экспрессия гена, проточная цитометрия, бронхиальная астма

Адрес для переписки:

Брагвадзе Белла Гелаевна
ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ
117513, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 9.
Тел.: 8 (925) 302-01-63.
E-mail: b.bragvadze@mail.ru

Address for correspondence:

Bragvadze Bella G.
Russian National N. Pirogov Research Medical University
117513, Russian Federation, Moscow, Ostrovityanova str., 1,
bldg 9.
Phone: 7 (925) 302-01-63.
E-mail: b.bragvadze@mail.ru

Образец цитирования:

Л.В. Ганковская, Л.С. Намазова-Баранова, М.В. Хорева,
Б.Г. Брагвадзе, А.Д. Огурцова, А.А. Алексеева,
В.А. Ганковский, О.А. Свитич «Особенности экспрессии
Toll-подобного рецептора 2 и Toll-подобного рецептора 4
у детей с бронхиальной астмой» // Медицинская
иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 431–440.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-431-440

© Ганковская Л.В. и соавт., 2017

For citation:

L.V. Gankovskaya, L.S. Namazova-Baranova, M.V. Khoreva,
B.G. Bragvadze, A.D. Ogurtsova, A.A. Alekseeva,
V.A. Gankovskii, O.A. Svitich “Expression features of Toll-like
receptor 2 and Toll-like receptor 4 in children with asthma”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2017, Vol. 19, no. 4, pp. 431–440.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-431-440

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-431-440

EXPRESSION FEATURES OF TOLL-LIKE RECEPTOR 2 AND TOLL-LIKE RECEPTOR 4 IN CHILDREN WITH ASTHMA

Gankovskaya L.V.^a, Namazova-Baranova L.S.^{a, b}, Khoreva M.V.^a,
Bragvadze B.G.^a, Ogurtsova A.D.^a, Alekseeva A.A.^{a, b}, Gankovskii V.A.^b,
Svitich O.A.^a

^a Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

^b National Scientific and Practical Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Abstract. Currently actively discussed the role of innate immunity receptors, in particular TLRs in the immunopathogenesis of bronchial asthma (BA).

The aim of our work was to study the expression of TLR2 and TLR4 on the nasal mucosal cells and peripheral blood leukocytes of patients with BA of different severity.

The study included 40 children with asthma (3-12 years) and 10 healthy children. Methods: real-time PCR, flow cytometry and multiplex immunofluorescence analysis evaluated the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α) in nasal swabs.

The result of the study - hyperactivation of the factors of innate immunity at the level of the mucosal of the nasal cavity in patients with asthma, manifested by increased gene expression of TLR2, TLR4, and production of proinflammatory as well as anti-inflammatory cytokines. Correlation between cytokine levels and the severity of asthma. In the peripheral blood identified a significant increase in the expression of TLR2 and TLR4 on circulating CD14⁺ monocytes in children with BA.

Thus, the increase of gene expression of TLRs mucosa of the nasal cavity, increase surface expression of TLR2 and TLR4 on circulating monocytes of patients with bronchial asthma compared to healthy children. The revealed changes indicate the involvement of the system of TLRs in the immunopathogenesis of bronchial asthma. In the future, TLRs can be used as markers to predict the course of ad and possible therapeutic targets.

Keywords: TLR2, TLR4, proinflammatory cytokines, expression, flow cytometry, asthma

Введение

Бронхиальная астма (БА) является наиболее распространенным респираторным заболеванием в мире. Это хроническое воспалительное заболевание нижних дыхательных путей, характеризующееся тяжелой обратимой обструкцией, дыхательной гиперчувствительностью и прогрессирующим течением. На сегодняшний день количество больных БА в России приближается к 12 млн человек, при этом доля детского населения составляет 20% [6].

Ключевую роль в патогенезе БА отводят IgE-опосредованному механизму формирования атопического фенотипа [8]. Частые респираторные инфекции провоцируют обострение астмы у детей. Однако данные механизмы недостаточно изучены. В последнее время активно исследуется роль врожденного иммунитета в патогенезе БА.

Известно, что врожденный иммунитет представляет первую линию защиты организма от патогенов. Ключевыми распознающими рецепторами врожденного иммунитета являются Toll-подобные рецепторы (TLRs), экспрессируемые в большей степени на клетках иммунной системы, слизистых оболочек и кожи [3]. Распозна-

вая консервативные структуры патогенов, TLRs активируют сигнальные пути, индуцирующие транскрипцию генов хемокинов, цитокинов, что приводит к развитию воспаления.

Наиболее важным представляется изучение TLR2 и TLR4, т.к. данные рецепторы распознают широкий спектр лигандов. В частности, TLR2 распознает PAMP (pathogen-associated molecular pattern) грамположительных бактерий, микоплазм и дрожжей, в то время как TLR4 активируется в ответ на грамотрицательные бактерии, белки теплового шока, а также аллергены [3, 5]. В последние годы показано, что аллергены, загрязненные бактериальным ЛПС, активируют TLR2- и TLR4-опосредованные механизмы, вызывающие переключение дифференцировки Т-лимфоцитов по пути Th2-клеток

Имеются противоречивые данные о роли этих рецепторов в патогенезе БА. В исследовании Krespo-Lesmana и соавт. показано увеличение экспрессии TLR2 и TLR4 на клетках макрофагально-моноцитарного ряда и отсутствие изменений экспрессии на нейтрофилах [9]. В то же время, по данным Расе и соавт., обнаружено снижение TLR2 и TLR4 в клетках пациен-

тов с БА по сравнению с контрольной группой [13].

Diogenes S. Ferreira и соавт. выявили увеличение экспрессии TLR2, TLR3 и TLR4 на эпителиальных клетках слизистых дыхательных путей у пациентов с тяжелой БА иммуногистохимическим методом [10]. До сих пор не проведено сравнительной оценки экспрессии генов и молекул распознающих рецепторов TLR2 и TLR4 на слизистой оболочке респираторного тракта и лейкоцитах периферической крови. Отсутствуют данные об уровне экспрессии TLRs в зависимости от тяжести заболевания. Исследование роли TLRs в аллергическом воспалении важно для совершенствования программ профилактики и лечения БА.

Цель данной работы — исследование экспрессии рецепторов врожденного иммунитета (TLR2, TLR4) на уровне клеток слизистой оболочки полости носа и лейкоцитов периферической крови больных с бронхиальной астмой разной степени тяжести.

Материалы и методы

В исследование включено 40 пациентов с бронхиальной астмой в возрасте от 3-х до 12-ти лет, находившихся на обследовании в отделении аллергологии ФГАУ «ННПЦЗД» Министерства здравоохранения РФ. Критерием для включения в исследование явилось наличие у детей установленного диагноза бронхиальная астма, отсутствие на момент исследования вирусной инфекции, острых воспалительных заболеваний, патологии ЛОР-органов. Контрольную группу составили 10 здоровых детей того же возраста.

Исследуемые пациенты были поделены на 2 группы, в зависимости от степени тяжести. 27 пациентов с установленным диагнозом БА средней степени тяжести вошли в группу I. Группа II включала 13 детей с тяжелой степенью БА. Диагноз устанавливался в соответствии с критериями GINA (2015).

В качестве исследуемого материала в работе были использованы соскобы слизистой оболочки полости носа, полученные с помощью «цитощетки» тип D, смывы из полости носа [1], а также цельная кровь, собранная в пробирки с ЭДТА.

Оценка экспрессии генов TLRs в соскобах со слизистых полости носа и лейкоцитах больных БА и здоровых детей

Для оценки экспрессии генов TLR2, TLR4 проводился метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Первоначально

получали лейкомассу из цельной крови строго в соответствии с протоколом, с использованием стерильного 6% раствора декстрана, серии отмывок и центрифугирования (ссылка на практикум). Из лейкоцитов крови и соскобов со слизистой оболочки выделяли общую РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля, используя набор для выделения РНК «АмплиПРАЙМРибо-сорб» (ИнтерЛабСервис, Россия) по инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием «Набора для проведения реакции обратной транскрипции» (Синтол, РФ) для синтеза первой цепи ДНК на матрице РНК интересующего гена (TLR2, TLR4) для последующего определения числа копий с помощью ПЦР в реальном времени. Реакцию проводили с применением «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBRGreenI» и праймеров, синтезированных на фирме «Синтол», РФ. Количество копий кДНК исследуемых генов рассчитывалось относительно актина. Реакцию проводили в амплификаторе ДТ-96.

Оценка экспрессии TLR2, TLR4 на лейкоцитах периферической крови

Экспрессию молекул TLR2 и TLR4 на лейкоцитах периферической крови оценивали методом проточной цитометрии. 100 мкл цельной крови инкубировали с мечеными МАТ в течение 10 минут, затем осуществляли лизис эритроцитов с помощью лизирующего раствора IOTest 3 LysingSolution (BeckmanCoulter, США), после чего клетки отмывали при 1000 об/мин в растворе Хенкса. Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре Beckman Coulter Navios (BeckmanCoulter, США). В каждом образце было проанализировано не менее 100000 событий. Для идентификации клеток использовали следующие моноклональные антитела: CD14, меченые APC (e-Biosciences), CD45, меченые ECD (e-Biosciences), CD282 (TLR2) и CD 284 (TLR4), меченые Alexa Fluor 488 (e-Biosciences), изотипический контроль Mouse IgG2a, меченые Alexa Fluor 488 (e-Biosciences). Анализ образцов проводили на проточном цитометре «Navios» (Beckman coulter, Inc.). Оценивали процент CD14⁺ моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLR2 или TLR4, а также среднюю интенсивность экспрессии (СИФ) этих рецепторов на клетках периферической крови у больных бронхиальной астмой и здоровых доноров. Среднюю интенсивность флуоресценции рассчитывали как отношение интенсивности

флуоресценции образца на интенсивность флуоресценции изотипического контроля.

Определение цитокинов в назальных смывах

Для определения содержания цитокинов (IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α) в назальных смывах проводили мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ (Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader, США), с помощью набора Bio-Plex Pro Assays строго по протоколу фирмы-производителя. Перед исследованием все пробы доводили до комнатной температуры (18–25 °C), аккуратно перемешивали и проводили оценку содержания белка на микроспектрофотометре NanoDrop™ 2000. В качестве материала исследования для проведения иммунофлуоресцентного анализа были использованы смывы со слизистой полости носа пациентов с БА и здоровых детей. Для получения назального смыва в носовую ход вводили по 1 мл теплого стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Промывную жидкость собирали в одну стерильную пробирку. Содержание цитокинов представлено в пикограммах в пересчете на миллиграмм белка.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6. Данные представлены в виде медианы и 25–75 перцентилей. Достоверные различия между исследуемыми группами рассчитывали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Достоверными считались данные с коэффициентом $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе работы проводилась оценка экспрессии генов TLR2, TLR4 в соскобах со слизистых полости носа и определение про- и проти-

вовоспалительных цитокинов в назальных смывах у больных с БА и здоровых детей. В соскобах со слизистой полости носа у пациентов со среднетяжелой БА выявлено достоверное увеличение экспрессии гена TLR2 в 3,1 раза ($p = 0,03$), гена TLR4 в 10,6 раз в сравнении с группой контроля ($p = 0,02$) (табл. 1).

У детей с тяжелой БА также обнаружено достоверное повышение экспрессии гена TLR2 в 4,8 раза по сравнению с показателем в группе здоровых детей ($p = 0,03$). Показатели экспрессии генов TLR4 в данной группе пациентов повышены, но не являются статистически достоверными (табл. 1).

Анализ результатов оценки спектра цитокинов выявил закономерное увеличение содержания провоспалительных цитокинов в смывах из полости носа больных с БА в зависимости от степени тяжести. В образцах пациентов с тяжелой астмой содержание исследуемых провоспалительных цитокинов было выше по сравнению с показателями у больных среднетяжелой БА (рис. 1). Так, у пациентов группы II содержание IL-1, IL-6 и TNF α составило: 45 (35,4–54,6) пг/мг; 6,6 (6,3–7) пг/мг и 17,0 (15,6–19,1) пг/мг соответственно. Эти показатели превышали показатели здоровых детей ($P \leq 0,05$). Содержание цитокинов в назальных смывах здоровых детей составило для IL-1 – 10,0 (9,7–11,2) пг/мг; для IL-6 – 1,4 (1,3–2,5) пг/мг; для TNF α – 3 (2,5–6,8) пг/мг. В группе I также отмечается тенденция к повышению уровня провоспалительных цитокинов, относительно контроля, но не является достоверной (рис. 1).

Концентрация IL-8 у детей с тяжелой БА в 10,5 раз превышала этот показатель в образцах

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ TLR2 И TLR4 В СОСКОБАХ СО СЛИЗИСТЫХ ПОЛОСТИ НОСА ПАЦИЕНТОВ С БА И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

TABLE 1. EXPRESSION OF TLR2 AND TLR4 IN SCRAPINGS FROM THE NASAL MUCOSA OF PATIENTS WITH AD AND HEALTHY DONORS

Группы наблюдения Groups	I группа Group I	II группа Group II	Здоровые дети Healthy children
TLR			
TLR2	110 411 (40 691–129 024)*	168 006 (74 147–217 358)*	34 840 (12 573–56 162)
TLR4	713 (684–962)*	205 (45–342)	67 (36–388)

Примечание. I группа – больных БА средней степени тяжести; II группа – больные БА тяжелой степени тяжести. * – статистически значимое отличие от группы здоровых доноров ($p < 0,05$).

Note. Group I, patients with moderate BA. Group II, patients with severe asthma severity. *, statistically significant difference ($p < 0.05$).

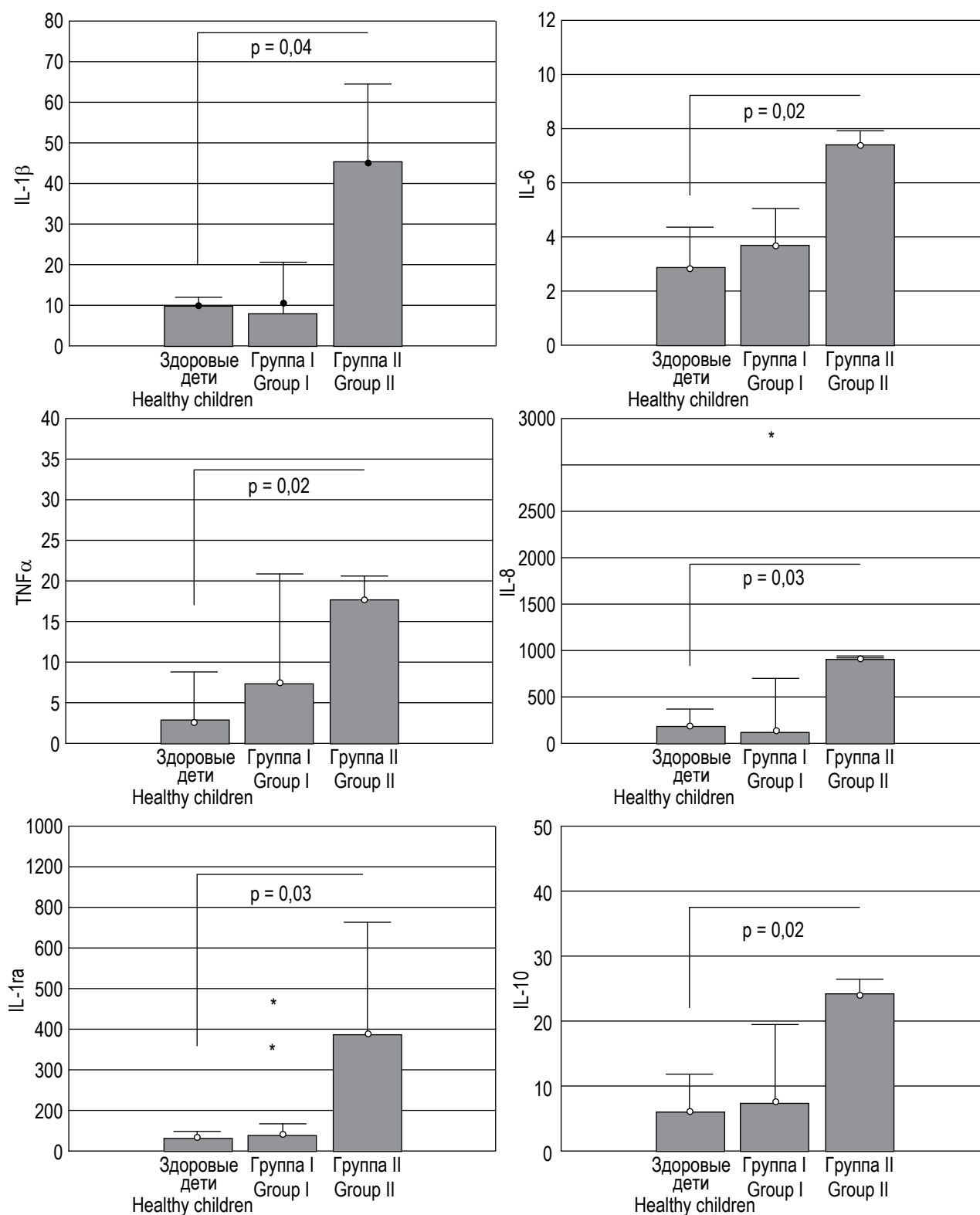


Рисунок 1. Содержание цитокинов в смывах со слизистой полости носа у здоровых детей и больных бронхиальной астмой

Примечание. I группа – больных БА средней степени тяжести; II группа – больные БА тяжелой степени тяжести. По оси ординат: содержание цитокинов, в расчете на пг/мг белка.

Figure 1. Cytokine content in the lavages from the nasal cavity in healthy children and patients with bronchial asthma

Note. Group I, patients with moderate BA. Group II, patients with severe asthma severity. The Y-axis: cytokine concentration normalized per 1 mg of protein.

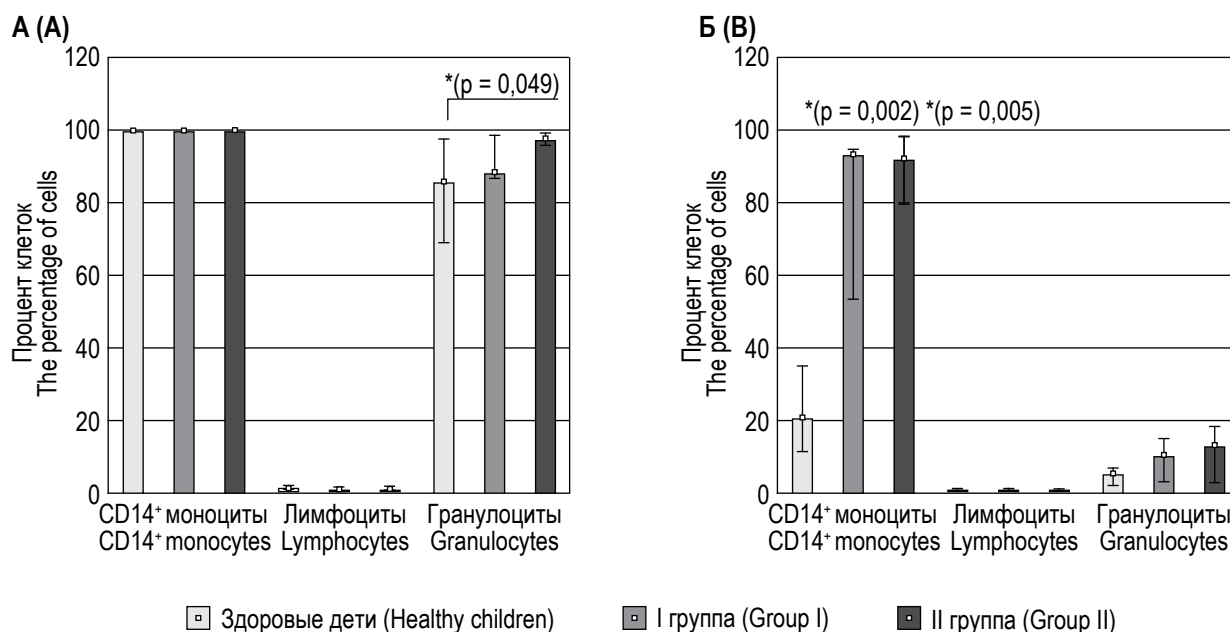


Рисунок 2. Процент клеток периферической крови, экспрессирующих на своей поверхности TLR2 (А) и TLR4 (Б), у здоровых детей и больных бронхиальной астмой

Примечание. По оси ординат: процент клеток, по оси абсцисс: наименование клеточной субпопуляции. * – статистически значимое отличие от группы здоровых детей ($p < 0,05$). I группа – больные БА средней степени тяжести, II группа – больные БА тяжелой степени тяжести.

Figure 2. The percentage of peripheral blood cells expressing of TLR2 (A) and TLR4 (B) in healthy children and asthmatic patients. Note. The Y-axis: the percentage of cells; on the X-axis: cell population. *, statistically significant difference from the group of healthy children ($p < 0.05$). Group I, patients with moderate asthma. Group II, patients with severe asthma.

здоровых детей. Параллельно в смывах из полости носа оценивали уровень противовоспалительных цитокинов. Содержание IL-1ra у больных среднетяжелой БА составило 66 (41,6-106,8) пг/мг, что сопоставимо с группой контроля (60 [55-70,6] пг/мг). При этом у пациентов с тяжелой формой отмечается существенное повышение содержания IL-1ra в 9,5 раз по сравнению с группой здоровых детей. Подобные результаты были выявлены и при анализе показателей противовоспалительного цитокина IL-10 в исследуемых группах. Наиболее значимые различия содержания этого цитокина установлены у больных с тяжелой БА (23 [21,8-24,5] пг/мг) в сравнении с группой I (7,3 [2,4-16,6] пг/мг) и контролем (5,2 [3,3-11,6] пг/мг) (рис. 1).

Следующий этап исследования включал оценку экспрессии генов TLRs в лейкоцитах периферической крови. При сравнении показателей в группе детей с тяжелой степенью БА было выявлено снижение экспрессии гена TLR2 в 22 раза (13 565 [3 833-19 372] относительного числа копий кДНК) по сравнению с показателями у здоровых детей (294 132 [109 020-377 141], $p = 0,02$). При этом экспрессия TLR4 (74 [61-394] относитель-

ного числа копий кДНК) была сопоставима с показателями в контрольной группе (86 [24-1029]).

Тенденция к снижению экспрессии генов TLR2 и TLR4 сохраняется и в группе с БА средней степени тяжести, но не является достоверной. Получив данные о снижении экспрессии генов TLR2 и TLR4 в лейкоцитах больных БА, был проведен анализ экспрессии TLR2 и TLR4 на поверхности CD14⁺ моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов периферической крови исследуемых пациентов по сравнению с группой здоровых детей.

У детей с БА средней степени тяжести не выявили изменений количества клеток периферической крови, экспрессирующих TLR2, по сравнению со здоровыми детьми (рис. 2). В группе детей с тяжелым течением БА обнаружено повышение количества гранулоцитов, экспрессирующих TLR2 ($p = 0,049$). При анализе интенсивности экспрессии TLR2 на лейкоцитах периферической крови установили, что в обеих группах больных достоверно увеличена интенсивность экспрессии TLR2 на CD14⁺ моноцитах ($p = 0,02$ в I группе и $p = 0,048$ во II группе), не выявлено изменений интенсивности экспрессии

ТАБЛИЦА 2. СРЕДНЯЯ ИНТЕНСИВНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ TLR2 И TLR4 НА КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

TABLE 2. MEAN FLUORESCENCE INTENSITY OF TLR2 AND TLR4 ON PERIPHERAL BLOOD CELLS IN HEALTHY CHILDREN AND PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

		Здоровые дети Healthy children	I группа Group I	II группа Group II
TLR2	CD14⁺ моноциты CD14 ⁺ monocytes	9,64 (8,73-10,8)	15,08 (13,9-9,1)*	12,3 (10,4-22,7)*
	Лимфоциты Lymphocytes	1,39 (1,19-1,54)	1,08 (1,03-,17)*	1,17 (1,12-1,23)*
	Гранулоциты Granulocytes	2,27 (1,8-2,4)	2,4 (2,31-3,25)	2,62 (2,2-5,2)
TLR4	CD14⁺ моноциты CD14 ⁺ monocytes	1,52 (1,48-1,67)	1,8 (1,6-2,62)*	2,16 (1,74-2,3)*
	Лимфоциты Lymphocytes	1,08 (1,01-1,14)	1,08 (1-1,12)	1,04 (0,99-1,07)
	Гранулоциты Granulocytes	4,41 (3,33-4,84)	3,26 (2,5-3,6)*	2,51 (1,67-3)*

Примечание. I группа – больных БА средней степени тяжести; II группа – больные БА тяжелой степени тяжести. СИФ представлены в относительных единицах. * – статистически значимое отличие от группы здоровых доноров ($p < 0,05$).

Note. Group I, patients with moderate asthma. Group II, patients with severe asthma. MFI presented in relative units. *, statistically significant difference ($p < 0.05$).

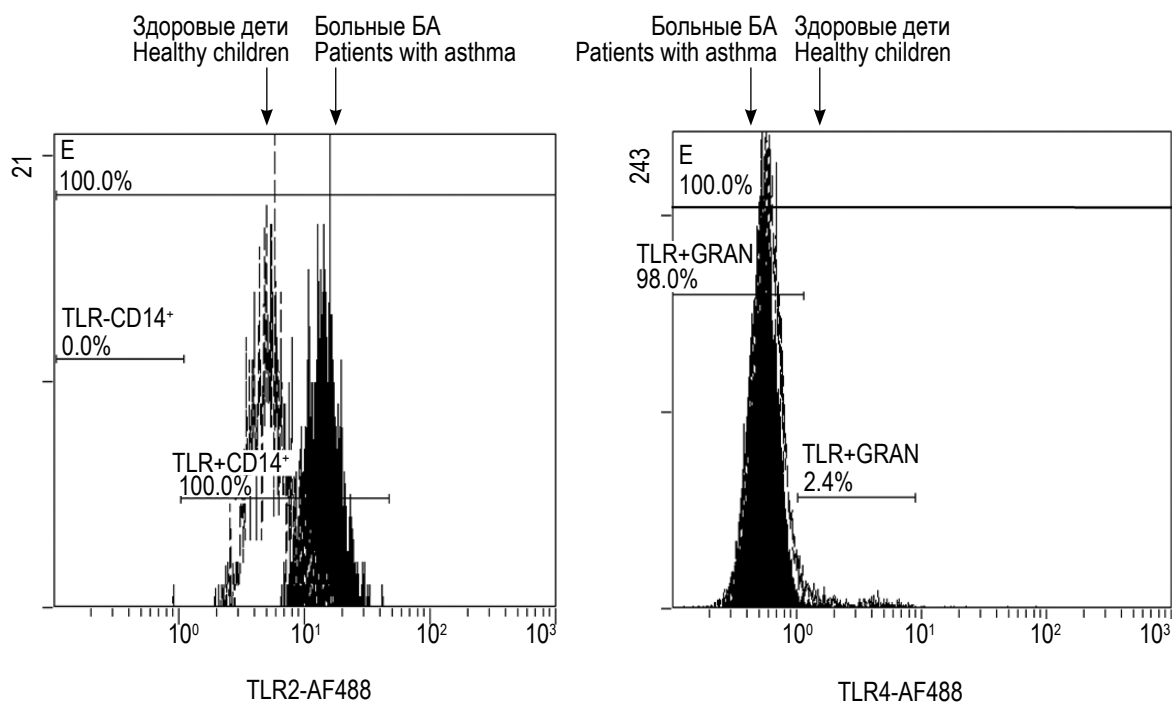


Рисунок 3. Средняя интенсивность экспрессии TLR2 на CD14⁺ моноцитах (слева) и TLR4 на гранулоцитах (справа)

Figure 3. Mean fluorescence intensity of TLR2 (left) on CD14⁺ monocytes and TLR4 on granulocytes (right)

TLR2 на гранулоцитах. Интенсивность экспрессии TLR2 на лимфоцитах периферической крови больных БА средней и тяжелой степени тяжести достоверно снижена по сравнению со здоровыми детьми ($p = 0,005$ и $p = 0,03$ соответственно) (табл. 2, рис. 3).

При оценке экспрессии TLR4 на клетках периферической крови больных БА выявили повышение CD14⁺ моноцитов, экспрессирующих TLR4 в обеих группах ($p = 0,005$ в I группе и $p = 0,002$ во II группе), при этом изменений количества лимфоцитов и гранулоцитов, экспрес-

сирующих TLR4, не обнаружено (рис. 2). Установили, что в обеих группах детей с БА увеличена интенсивность экспрессии TLR4 на CD14⁺ моноцитах ($p = 0,04$ в I группе и $p = 0,009$ во II группе). В обеих группах больных БА наблюдали снижение интенсивности экспрессии TLR4 на гранулоцитах по сравнению с показателями в группе здоровых детей ($p = 0,04$ и $p = 0,044$ соответственно) (табл. 2). Изменений интенсивности экспрессии TLR4 на лимфоцитах периферической крови у детей с БА не выявлено.

Обсуждение

В настоящее время активно исследуется роль врожденного иммунитета в патогенезе БА. Клетки слизистой оболочки рассматриваются как иммунологически активный барьер, через который проникают возбудители, повреждая мерцательный эпителий респираторного тракта, увеличивая его проницаемость для аллергенов, токсических веществ, усиливая тем самым гиперреактивность бронхов. Toll-подобные рецепторы широко представлены на клетках слизистых оболочек респираторного тракта. В последние годы изучается роль TLRs в развитии аллергического воспаления. Обсуждается их участие в распознавании не только патогенов, но и аллергенов, токсических веществ и др. [7]. В результате активации TLRs происходит запуск каскада сигнальных молекул, приводящих к экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, костимуляторных молекул. В итоге в очаг воспаления привлекаются нейтрофилы, моноциты, активируются дендритные клетки легких и макрофаги, индуцируется Th2-тип иммунного ответа.

В настоящем исследовании показано существенное увеличение экспрессии генов TLR2 и TLR4 на уровне слизистой оболочки полости носа. Эти данные подтверждают результаты, полученные D.S. Ferreira и соавт. с помощью иммуногистохимического метода об увеличении экспрессии молекул рецепторов TLR2, TLR3 и TLR4 на эпителиальных клетках респираторного тракта больных с тяжелой формой БА [10, 16].

Ранее нами проведена оценка уровня экспрессии гена противомикробного пептида HBD1 на слизистой полости носа [2]. Известно, что HBD1, вырабатываемый эпителием слизистой оболочки респираторного тракта, оказывает прямое противомикробное действие и предотвращает вторжение патогенов в слизистую. Обнаружено снижение экспрессии гена HBD1 у пациентов

с БА по сравнению со здоровыми детьми. Таким образом, выявлен дисбаланс факторов врожденного иммунитета на уровне слизистой оболочки полости носа у больных с БА, сопровождающийся повышением экспрессии генов TLR2, TLR4 и снижением экспрессии гена HBD1. Более того, в настоящем исследовании дисбаланс факторов врожденного иммунитета подтвержден высоким уровнем как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов в назальных смывах. Выявлена прямая зависимость от стадии БА, характеризующаяся возрастающим содержанием цитокинов в зависимости от тяжести заболевания [11, 14].

Параллельно с оценкой экспрессии генов TLR2 и TLR4 на слизистой полости носа проведен анализ экспрессии данных генов в лейкоцитах периферической крови. В лейкоцитах выявлено снижение экспрессии генов TLR2, TLR4, что говорит о локальном характере воспаления [4].

При оценке экспрессии TLR2 и TLR4 на поверхности клеток периферической крови установили, что у детей с тяжелым течением БА достоверно выше процент CD14⁺ моноцитов, экспрессирующих TLR4 и гранулоцитов, экспрессирующих TLR2. При этом у детей со среднетяжелой БА увеличен только процент CD14⁺ моноцитов, экспрессирующих TLR4. Интенсивность экспрессии TLR2 и TLR4 на CD14⁺ моноцитах увеличена в обеих группах по сравнению со здоровыми детьми. У детей со среднетяжелым и тяжелым течением БА выявили снижение интенсивности экспрессии TLR2 на лимфоцитах и снижение интенсивности экспрессии TLR4 на гранулоцитах. Таким образом, данное исследование показало увеличение экспрессии TLR2 и TLR4 на циркулирующих CD14⁺ моноцитах периферической крови у детей с бронхиальной астмой по сравнению с группой здоровых детей.

Согласно данным литературы, циркулирующие моноциты периферической крови играют существенную роль в развитии и поддержании аллергического воспаления [15]. Моноциты способны мигрировать в подслизистую оболочку бронхов, где продуцируют провоспалительные цитокины и хемокины, таким образом, принимая участие в развитии и поддержании хронического воспаления. На основании выявленных изменений в экспрессии TLR2 и TLR4 на лейкоцитах периферической крови детей с БА можно предположить, что циркулирующие моноциты периферической крови у детей в ис-

следуемых группах преактивированы. Ранее на кафедре иммунологии РНИМУ им Н.И. Пирогова было показано, что спонтанная и ЛПС-индуцированная продукция про- и противовоспалительных цитокинов МНК периферической крови в культуре *in vitro* у больных БА выше, чем у здоровых доноров, что свидетельствует о повышенной функциональной активности TLR4 на МНК больных БА [12].

Таким образом, выявленные изменения в экспрессии генов TLR2 и TLR4 в соскобах со слизистых полости носа, лейкоцитах периферической крови и TLR2 и TLR4 на поверхности CD14⁺ моноцитов, гранулоцитов или лимфоцитов больных БА свидетельствуют о вовлечении этих рецепторов в иммунопатогенез бронхиальной астмы. TLRs могут рассматриваться перспективными маркерами прогноза течения БА и в дальнейшем — возможными терапевтическими мишенями.

Список литературы / References

1. Богомильский М.Р., Свитич О.А., Ганковский В.А., Рахманова И.В. Особенности врожденного иммунитета у здоровых детей и у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций // Вестник РГМУ, 2015. № 4. С. 24-27. [Bogomilsky M.R., Svitich O.A., Gankovskiy V.A., Rakhmanova I.V. Innate immunity features in healthy children and in children with adenoid hypertrophy. *Vestnik RGMU = Bulletin of Russian State Medical University*, 2015, no. 4, pp. 24-27. (In Russ.)]
2. Зайцева М.А., Брагвадзе Б.Г., Свитич О.А., Ганковская Л.В. Ассоциация полиморфных маркеров, локализованных в 5'-нетранслируемой области гена DEFB1 с бронхиальной астмой у детей // Вестник РГМУ, 2016. № 4. С. 43-47. [Zaitseva M.A., Bragvadze B.G., Svitich O.A., Gankovskaya L.V. Analysis of TLRs genes expression and defb1 polymorphisms association in children with bronchial asthma. *Vestnik RGMU = Bulletin of Russian State Medical University*, 2016, no. 4, pp. 43-47. (In Russ.)]
3. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2011. С. 148-165. [Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R. Ya. Clinical immunology and allergology with the basics of general immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2011, pp. 148-165. (In Russ.)]
4. Ковальчук Л.В., Свитич О.А., Ганковская Л.В., МIRONSHICHENKOVA А.М., Ганковский В.А. Роль TOLL-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2012. № 2. С. 147-153. [Kovalchuk L.V., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Mironchenko M.A., Gankovskaya V.A. The role of TOLL-like receptors in the pathogenesis of human infectious diseases. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i ego zdorovye» = Kurskiy Scientifically-Practical Bulletin «Person and His Health»*, 2012, no. 2, pp. 147-153. (In Russ.)]
5. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Никонова А.С. Распознающие рецепторы врожденного иммунитета (NLR, RLR и CLR) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2011. № 1. С. 93-100. [Kovalchuk L.V., Khoreva, M.V., Nikonova A.S. Recognition receptors of innate immunity (NLR, RLR and CLR). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, no. 1, pp. 93-100. (In Russ.)]
6. Чучалин А.Г., Оспельникова Т.П., Осипова Г.Л. Роль респираторных инфекций в обострениях бронхиальной астмы // Пульмонология, 2007. № 5. С. 32-34. [Chuchalin A.G., Ospelnikova T.P., Osipova G.L. The role of respiratory infections in exacerbations of bronchial asthma. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2007, no. 5, pp. 32-34. (In Russ.)]
7. Bezemer G.F., Sagar S., van Bergenhenegouwen J., Georgiou N.A., Garssen J., Kraneveld A.D., Folkerts G. Dual role of Toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Rev.*, 2012, no. 64, pp. 337-358.
8. Cirillo I., Marseglia G., Klersy C., Ciprandi G. Allergic patients have more numerous and prolonged respiratory infections than nonallergic subjects. *Allergy*, 2007, Vol. 62, no. 9, pp. 1087-1090.
9. Crespo-Lessmann A., Mateus E., Vidal S., Ramos-Barbón D., Torrejón M., Giner J., Soto L., Juárez C., Plaza V. Expression of toll-like receptors 2 and 4 in subjects with asthma by total serum IgE level. *Respir. Res.*, 2016, no. 17, p. 41.
10. Diogenes S. Ferreira, Raquel Annoni, Luiz F.F. Silva, Monique Buttignol, Angela B.G. Santos, Maria C.R. Medeiros, Luciana N.S. Andrade, Ching Y. Yick, Peter J. Sterk, Jorge L.M. Sampaio, Marisa Dolhnikoff, Sally E. Wenzel, Thais Mauad. Toll-like receptors, 3 and 4 and thymic stromal lymphopoietin expression in fatal asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2012, Vol. 42, no. 10, pp. 1459-1471.
11. Gankovskii V., Svitich O., Gankovskaya L., Alekseeva A., Zaiceva M., Bragvadze B., Namazova-Baranova L. Association between a functional single nucleotide polymorphism in the DEFB-1 gene and risk of child asthma. *Community, Diversity, Vitality*, 2016, p. 44.
12. Khoreva M.V., Gankovskaya L.V., Latisheva T.V. Expression and functional analysis of toll-like receptor 4 on peripheral blood monocytes in asthmatic patients. *Proceedings Allergy & Immunophysiology: Innovate Technologies*, 2016, pp. 43-51.
13. Pace E., Di Sano C., Ferraro M., Bruno A., Caputo V., Gallina S., Gjomarkaj M. Budesonide increases TLR4 and TLR2 expression in Treg lymphocytes of allergic asthmatics. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2015, no. 32, pp. 93-100.

14. Svitich O., Gankovskaya L., Namazova-Baranova L., Gankovskii V., Zaiceva M., Alekseeva A., Bragvadze B. Association of SNPS in DEFB1 gene and HBD-1 expression with bronchial asthma. *Allergy*, 2016, Vol. 71, no. S102, p. 280.

15. Tashiro H., Takahashi K., Hayashi S., Kato G., Kurata K., Kimura S., Sueoka-Aragane N. Interleukin-33 from Monocytes Recruited to the Lung Contributes to House Dust Mite-Induced Airway Inflammation in a Mouse Model. *PLoS One*, 2016, no. 11, pp. 1-16.

16. Wark P., Johnston S. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *The Journal of Experimental Medicine*, 2005, no. 6, pp. 937-947.

Авторы:

Ганковская Л.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Намазова-Баранова Л.С. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующая кафедрой факультетской педиатрии № 1 ПФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ; заместитель директора по научной работе, ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Хорева М.В. — д.м.н., профессор кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Брагвадзе Б.Г. — аспирант кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Огурцова А.Д. — аспирант кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Алексева А.А. — к.м.н., кафедра факультетской педиатрии № 1 ПФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ; заведующая отделением восстановительного лечения детей с аллергическими болезнями и заболеваниями органов дыхания, ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ганковский В.А. — к.м.н., врач-оториноларинголог отделения восстановительного лечения детей с болезнями ЛОР-органов и челюстно-лицевой области, ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, доцент кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Gankovskaya L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, Medicobiologic Faculty, Pirogov Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Namazova-Baranova L.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Pediatrics No. 1, Russian National N. Pirogov Research Medical University; Deputy-director on Science, National Scientific and Practical Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Khoreva M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology, Medicobiologic Faculty, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Bragvadze B.G., Postgraduate Student, Department of Immunology, Medicobiologic Faculty, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Ogurtsova A.D., Postgraduate Student, Department of Immunology, Medicobiologic Faculty, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Alekseeva A.A., PhD (Medicine), Department of Pediatrics No. 1, Russian National N. Pirogov Research Medical University; Head of the Department of rehabilitation of children with allergic diseases and respiratory diseases, National Scientific and Practical Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Gankovskii V.A., PhD (Medicine), The ENT specialist of the Department of rehabilitation treatment of children with diseases of ENT organs and oral and maxillofacial region, National Scientific and Practical Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Assistant Professor, Department of Immunology, Medicobiologic Faculty, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 01.03.2017
Принята к печати 14.03.2017

Received 01.03.2017
Accepted 14.03.2017