

## **ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ НА ЛПС-ИНДУЦИРОВАННУЮ СЕКРЕЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**

**Серов Д.А.<sup>1</sup>, Кабанов Д.С.<sup>1</sup>, Косякова Н.И.<sup>2</sup>, Прохоренко И.Р.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт фундаментальных проблем биологии РАН», г. Пушкино, Московская обл., Россия

<sup>2</sup> ФГАУЗ «Больница Пушкинского научного центра РАН», г. Пушкино, Московская обл., Россия

**Резюме.** Среди хронических воспалительных заболеваний респираторного тракта бронхиальная астма (БА) является одним из самых распространенных в мире. Поскольку БА индуцирует системный воспалительный процесс, необходимо всестороннее исследование влияния этого заболевания и его терапии на функциональное состояние организма и иммунной системы крови в частности. В фазе обострения БА клетки респираторного тракта пациентов могут усиливать секрецию не только провоспалительных, но и противовоспалительных медиаторов, последние из которых способны подавлять активность клеток иммунной системы крови. В настоящей работе была проведена оценка влияния терапии БА на выраженность воспаления и функциональное состояние клеток иммунитета периферической крови. Тестом функциональной активности иммунных клеток крови служила липополисахарид (ЛПС)-индуцированная секреция цитокинов *ex vivo*. ЛПС является классическим провоспалительным агентом бактериальной природы. Нами исследованы ответы клеток крови пациентов с верифицированным диагнозом БА до начала лечения и через две недели базисной противовоспалительной терапии. По клиническим показателям пациентам была назначена терапия комбинацией ингаляционных глюкокортикостероидов и агонистов  $\beta$ -адренорецепторов или антилейкотриеновый препарат (монтелукаст). Параллельно были исследованы ответы клеток крови условно здоровых добровольцев на ЛПС. Секрецию TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 клетками крови оценивали после экспозиции с ЛПС (100 нг/мл) в течение 6 ч, IFN $\gamma$ , IL-17A, IL-1 $\beta$  – 24 ч. Параллельно оценивали секрецию цитокинов клетками крови, не стимулированными ЛПС. Проведен контроль уровней IL-4 в плазме крови пациентов и условно здоровых добровольцев. Концентрации цитокинов определяли методом ИФА. Показано, что через две недели терапии у пациентов уменьшалась фоновая секреция IL-6 клетками крови, что может указывать на снижение выраженности воспаления. Терапия не оказывала влияния на фоновую и ЛПС-индуцированную секрецию IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-8 клетками пациентов с БА. В течение 2-недельной терапии концентрация IL-4 в плазме крови пациентов не изменялась. Клетки крови пациентов с БА секретируют значительно меньше TNF $\alpha$  и IL-8 в контроле и после стимуляции ЛПС, чем клетки условно здоровых добровольцев, что подтверждает предположение о частичном угнетении активности иммунных клеток крови при БА. Через две недели терапии наблюдалось увеличение ЛПС-индуцированной секреции TNF $\alpha$  клетками крови пациентов. С целью определения механизма усиления ЛПС-индуцированной секреции TNF $\alpha$  была оценена фоновая секреция растворимой формы рецептора CD14 (sCD14) в крови пациентов с БА до терапии и через две недели после терапии. Показано, что после терапии БА в крови пациентов не происходит увеличения концентрации sCD14. Полученные результаты указывают на sCD14-независимый механизм усиления ЛПС-

**Адрес для переписки:**

Серов Дмитрий Александрович  
ФГБУН «Институт фундаментальных проблем  
биологии РАН»  
142290, Россия, Московская обл., г. Пушкино,  
ул. Институтская, 2.  
Тел.: 8 (985) 319-03-21.  
Факс: 8 (4967) 33-05-32.  
E-mail: dmitriy\_serov\_91@mail.ru

**Address for correspondence:**

Serov Dmitry A.  
Institute of Fundamental Problems of Biology  
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino,  
Institutskaya str., 2.  
Phone: 7 (985) 319-03-21.  
Fax: 7 (4967) 33-05-32.  
E-mail: dmitriy\_serov\_91@mail.ru

**Образец цитирования:**

Д.А. Серов, Д.С. Кабанов., Н.И. Косякова,  
И.Р. Прохоренко «Влияние терапии на ЛПС-  
индуцированную секрецию цитокинов клетками  
врожденного иммунитета крови пациентов  
с бронхиальной астмой» // Медицинская иммунология,  
2019, Т. 21, № 4. С. 789-796.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-789-796

© Серов Д.А. и соавт., 2019

**For citation:**

D.A. Serov, D.S. Kabanov, N.I. Kosyakova., I.R. Prokhorenko  
“Influence of therapy upon LPS-induced cytokine secretion  
by the blood-derived innate immunity cells of the bronchial  
asthma patients”, *Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 4,  
pp. 789-796. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-789-796

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-789-796

индуцированной секреции TNF $\alpha$ . Базисная противовоспалительная терапия не только снижает концентрацию IL-6 в крови, но частично восстанавливает активность клеток врожденного иммунитета крови пациентов с БА.

*Ключевые слова:* бронхиальная астма, врожденный иммунитет, лейкоциты крови человека, липополисахариды, продукция цитокинов

## INFLUENCE OF THERAPY UPON LPS-INDUCED CYTOKINE SECRETION BY THE BLOOD-DERIVED INNATE IMMUNITY CELLS OF THE BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS

Serov D.A.<sup>a</sup>, Kabanov D.S.<sup>a</sup>, Kosyakova N.I.<sup>b</sup>, Prokhorenko I.R.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

<sup>b</sup> Clinical Hospital at the Pushchino Research Center, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

**Abstract.** Bronchial asthma (BA) is the most widespread chronic inflammatory disease. Since BA is associated with a systemic inflammation state, a comprehensive study of its effect in this disease, and influence of pathogenetic therapy should be performed, by studying the whole blood cytokine status of the patients suffering with BA. The cells from respiratory tract in acute-phase BA patients may produce pro-, as well as anti-inflammatory mediators. The anti-inflammatory mediators are able to suppress activity of immune cells in peripheral blood. Thus, the aim of present study was to evaluate eventual inflammation-associated and functional activity of immune cells from the patients' peripheral blood in BA and following appropriate therapy. Bacterial lipopolysaccharide (LPS) a classical pro-inflammatory agent. We have studied an LPS-induced cytokine-induced *ex vivo* secretion model by peripheral blood immune cells, as a relevant test for their functional activity. The LPS-induced responses of whole blood cells from patients with proven BA diagnosis have been studied at pre-treatment time points, and following two weeks of basic anti-inflammatory therapy. According to clinical indications, the antagonists of CysLTR1, or combinations of glucocorticosteroids and  $\beta$ -adrenoreceptor agonists were administered by inhalation to BA patients. LPS-induced production of TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 (at 6 h) and IFN $\gamma$ , IL-17A or IL-1 $\beta$  (at 24 h) by whole blood cells from BA patients or healthy volunteers has been assessed by ELISA technique. The cytokine production from non-stimulated whole blood cells from BA patients and healthy volunteers were used as the baseline control. IL-4 concentrations in plasma of BA patients and healthy volunteers were also measured. We have shown a decrease of IL-6 production in control blood samples from BA patients after two weeks of therapy. This may indicate the attenuation of the observed inflammatory process. The therapy applied did not influence the background levels and LPS-induced secretion of IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IFN $\gamma$ , and IL-8 in whole blood samples from BA patients. IL-4 plasma levels in BA patients were not changed after two weeks of therapy. It has been shown that whole blood from BA patients produced less TNF $\alpha$  and IL-8, both in control samples, and during their response to LPS, than the values obtained in healthy volunteers. These findings are in agreement with a notion that BA causes partial depression of innate immune cells activity. The increased LPS-induced TNF $\alpha$  secretion by the whole blood cells from BA patients has been observed following two weeks of basic anti-inflammatory therapy. We suggest that the increased LPS-induced TNF $\alpha$  secretion could be explained by partial restoration of peripheral blood immune cell activity associated with anti-inflammatory BA therapy. To elucidate the mechanism of increased LPS-induced TNF $\alpha$  secretion, we have estimated whole blood concentration of soluble CD14 (sCD14) in BA patients. No significant differences between sCD14 concentrations have been found. Obtained result presume existence of sCD14-independent mechanism of TNF $\alpha$  regulation by whole blood cells in response on LPS which may occur during anti-inflammatory therapy of BA. We suppose that basic anti-inflammatory therapy of BA does not simply reduce IL-6 concentration in peripheral blood, but may also partially restore the activity of innate immune cells in BA patients.

*Keywords:* bronchial asthma, innate immunity, blood leukocyte, human, lipopolysaccharides, cytokine production

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0478-2017-006 «Общие механизмы ответа врожденного иммунитета при сепсисе и аллергических заболеваниях».

### Введение

Бронхиальная астма (БА) относится к самым распространенным хроническим заболеваниям

респираторного тракта, встречающимся в клинической практике. Суммарно БА страдают до 10-20% населения в развитых странах [30, 46]. В связи с этим всестороннее исследование данного патологического процесса является важной задачей современной клинической медицины [44]. Считается, что астма развивается у лиц с генетической предрасположенностью к этому заболеванию на фоне воздействия аллергенов

и инфекционных агентов на клетки респираторного тракта [14, 16, 25, 32]. Респираторные аллергены, попадая в организм больного БА, вызывают активацию системного воспалительного ответа по Th2- или Th17-зависимому (Th2-независимому) механизму [23-25].

Обнаружено, что в фазе обострения БА повышается секреция противовоспалительных цитокинов IL-1ra и sTNFRII клетками респираторного тракта пациентов по сравнению с клетками здоровых добровольцев [41, 43]. Избыточная секреция противовоспалительных цитокинов может снижать способность клеток иммунной системы отвечать на инвазию инфекционного агента. В частности, повышение концентрации IL-1ra в плазме крови пациентов после инсульта может являться фактором риска развития инфекционных заболеваний и обострения хронических очагов инфекции [9]. Это может усугублять течение БА [7]. В связи с этим необходимо, чтобы терапия не только купировала основные симптомы БА, но и не угнетала эффекторные функции иммунных клеток крови.

Большинство исследований, посвященных терапии БА, направлены на изучение процессов, происходящих непосредственно в респираторном тракте [25, 30]. Однако неизвестно, как воспаление, развивающееся при БА, влияет на функциональные ответы иммунных клеток в системном кровотоке.

В 60% случаев возбудителями инфекционных заболеваний дыхательных путей при БА являются грамотрицательные микроорганизмы [18]. Один из наиболее сильных провоспалительных агентов, высвобождаемых в кровь при грамотрицательной бактериемии, — липополисахарид (ЛПС), или эндотоксин [21, 22]. Эндотоксины активируют каскад воспалительных реакций, в частности секрецию клетками врожденного иммунитета провоспалительных (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ ) и противовоспалительных (IL-1ra) цитокинов [13, 23, 28]. ЛПС в высоких концентрациях (100 нг/мл) вызывает активацию клеток адаптивного иммунитета по Th1-зависимому пути [26, 39]. В связи с вышесказанным мы исследовали влияние терапии БА на реактивность клеток врожденной иммунной системы крови в ответ на ЛПС как фактор инфекционного генеза.

## Материалы и методы

Исследование проведено на базе отделения аллергологии и иммунологии больницы Пущинского научного центра (БПНЦ РАН) и лаборатории молекулярной биомедицины Института фундаментальных проблем биологии РАН (ИФПБ РАН), одобрено Локальным этическим комитетом БПНЦ РАН (протокол № 7 от 17.10.2016 г.). Все пациенты и условно здоровые добровольцы дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Верификация диагноза БА проводилась согласно рекомендациям GINA-2017. В группу исследования были включены пациенты (n = 10), которым впервые был

поставлен диагноз БА (возраст 18-48 лет, м. — 3, ж. — 7, курящие — 4 пациента, ИК < 10 лет).

На основании клинических показателей (в частности, оценки функции внешнего дыхания) пациентам была назначена базисная противовоспалительная терапия на основе ингаляционных глюкокортикостероидов, агонистов  $\beta$ -адренорецепторов или монтелукаста согласно рекомендациям GINA-17. Контроль симптомов БА проводили после двух недель терапии. Для оценки функциональной активности иммунных клеток крови у пациентов с БА нами исследованы ответы клеток крови на ЛПС до начала терапии и через две недели после терапии. Параллельно оценивали ЛПС-индуцированные ответы клеток крови условно здоровых добровольцев *ex vivo*.

Критерии включения пациентов (n = 10) в исследование: верифицированный диагноз БА, отсутствие других тяжелых хронических заболеваний, гельминтозов, отсутствие применения бронхолитиков короткого действия и антигистаминных препаратов в течение месяца до начала исследования. Критерии включения в контрольную группу для иммуносерологических исследований (n = 9): отсутствие клинико-лабораторных признаков респираторной патологии и тяжелых хронических заболеваний, неиспользование медикаментозной терапии в течение последних 3-х месяцев.

Забор крови у пациентов и условно здоровых добровольцев осуществлялся персоналом Больницы ПНЦ РАН в гепаринизированные (5%) пробирки (Becton Dickinson International, США). Кровь разводили средой RPMI 1640 в соотношении 1:9 в ячейках 24-луночного планшета (Greiner bioone, Германия) и инкубировали с ЛПС из *Escherichia coli* штамм O55:B5 (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 100 нг/мл в течение 6 ч или 24 ч. ЛПС из *E. coli* O55:B5 был выбран в качестве активирующего агента, поскольку он обладает выраженной провоспалительной активностью [Alexander and Rietschel, 2001; Gaekwad et al., 2010].

Контролем служили образцы крови пациентов с БА и условно здоровых добровольцев, не стимулированные ЛПС. Все пробы инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Jouan, Франция) при 37 °C, 100% влажности и атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации образцы центрифугировали 10 мин при 300 g, отбирали супернатанты, замораживали и хранили при -20 °C до процедуры измерения. В пробах после 6 ч инкубации измеряли концентрации TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, после 24 ч — IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IFN $\gamma$ , IL-17A, sCD14.

Концентрацию IL-4 измеряли в плазме крови пациентов до и через 2 недели терапии и у условно здоровых добровольцев. Для получения плазмы цельную гепаринизированную кровь центрифугировали 20 мин при 300 g и отбирали супернатанты. Полученную плазму замораживали и хранили при -20 °C до процедуры измерения.

Концентрацию цитокинов измеряли методом ИФА с использованием наборов реагентов

(ООО «Цитокин», Санкт-Петербург) согласно инструкции, рекомендованной производителем.

Результаты экспериментов анализировали с использованием методов непараметрической статистики. Статистическую значимость различий выборочных медианных значений оценивали с использованием U-теста Манна–Уитни и W-критерия Вилкоксона.

## Результаты

### TNF $\alpha$

Статистически значимых различий между концентрациями TNF $\alpha$ , секретируемыми в контроле клетками крови пациентов с БА и условно здоровых добровольцев, не обнаружено. ЛПС-индуцированная секреция TNF $\alpha$  клетками крови пациентов с БА до терапии была значительно ниже, чем ЛПС-индуцированная секреция TNF $\alpha$  клетками условно здоровых добровольцев (рис. 1). Через две недели терапии наблюдалось усиление ЛПС-индуцированной секреции TNF $\alpha$  *ex vivo*.

### IL-6

В образцах клеток крови пациентов с БА, инкубированных в течение 6 ч без стимуляции ЛПС, обнаружены уровни IL-6, значительно превышающие уровни этого цитокина в контрольных образцах клеток крови условно здоровых добровольцев. Через две недели базисной противовоспалительной терапии наблюдалось снижение секреции IL-6 клетками крови пациентов с БА (контроль). После стимуляции ЛПС, количество IL-6, секретируемого клетками крови пациентов с БА, значительно превышало количество этого цитокина в образцах клеток крови условно здоровых добровольцев. Терапия не оказывала значимых эффектов на ЛПС-индуцированную секрецию IL-6 клетками крови пациентов *ex vivo*.

### IL-8

Статистически значимых различий между концентрациями IL-8, секретируемыми клетками крови пациентов с БА и условно здоровых добровольцев, в контроле не обнаружено. До базисной терапии клетки крови пациентов с БА, стимулированные ЛПС, секретируют меньше IL-8, чем клетки крови условно здоровых добровольцев. После двух недель терапии БА не наблюдалось изменений в продукции IL-8, индуцированной ЛПС.

### IL-1 $\beta$

У пациентов до и через две недели после терапии БА в контрольных образцах обнаружены низкие уровни IL-1 $\beta$ , сопоставимые с уровнями IL-1 $\beta$  в пробах крови условно здоровых добровольцев. Продукция IL-1 $\beta$  клетками крови пациентов с БА, стимулированных ЛПС до терапии, превышала продукцию этого цитокина клетками крови условно здоровых добровольцев в ответ на ЛПС. Через две недели терапии БА не наблюдалось изменений в продукции IL-1 $\beta$  клетками крови пациентов, стимулированных ЛПС.

### IL-1ra

В контрольных образцах клеток крови условно здоровых добровольцев не обнаружено IL-1ra,

тогда как значительные концентрации этого цитокина идентифицированы нами в контрольных образцах клеток крови пациентов с БА.

В ответ на ЛПС клетки крови условно здоровых добровольцев нарабатывали значительные количества IL-1ra. В отличие от условно здоровых добровольцев, после стимуляции эндотоксином клеток крови пациентов с БА уровни IL-1ra в образцах достоверно снижались. Терапия не оказывала статистически значимых эффектов на фоновую и ЛПС-индуцированную секрецию IL-1ra клетками крови пациентов *ex vivo*.

### IFN $\gamma$

Клетки крови условно здоровых добровольцев и пациентов с БА не секретируют IFN $\gamma$  без стимуляции ЛПС. В ответ на ЛПС клетки крови условно здоровых добровольцев секретируют значительные количества IFN $\gamma$ . Количества IFN $\gamma$ , секретируемого клетками крови пациентов с БА в ответ на ЛПС и контроле, не отличались. Через две недели базисной терапии не наблюдалось усиления продукции IFN $\gamma$  клетками крови пациентов с БА, стимулированных ЛПС *ex vivo*.

### IL-4

Концентрации IL-4 в плазме крови пациентов с БА значительно выше, чем в плазме крови условно здоровых добровольцев (рис. 2). Через две недели базисной терапии не наблюдалась статистически значимых изменений уровней IL-4 в плазме крови пациентов с БА.

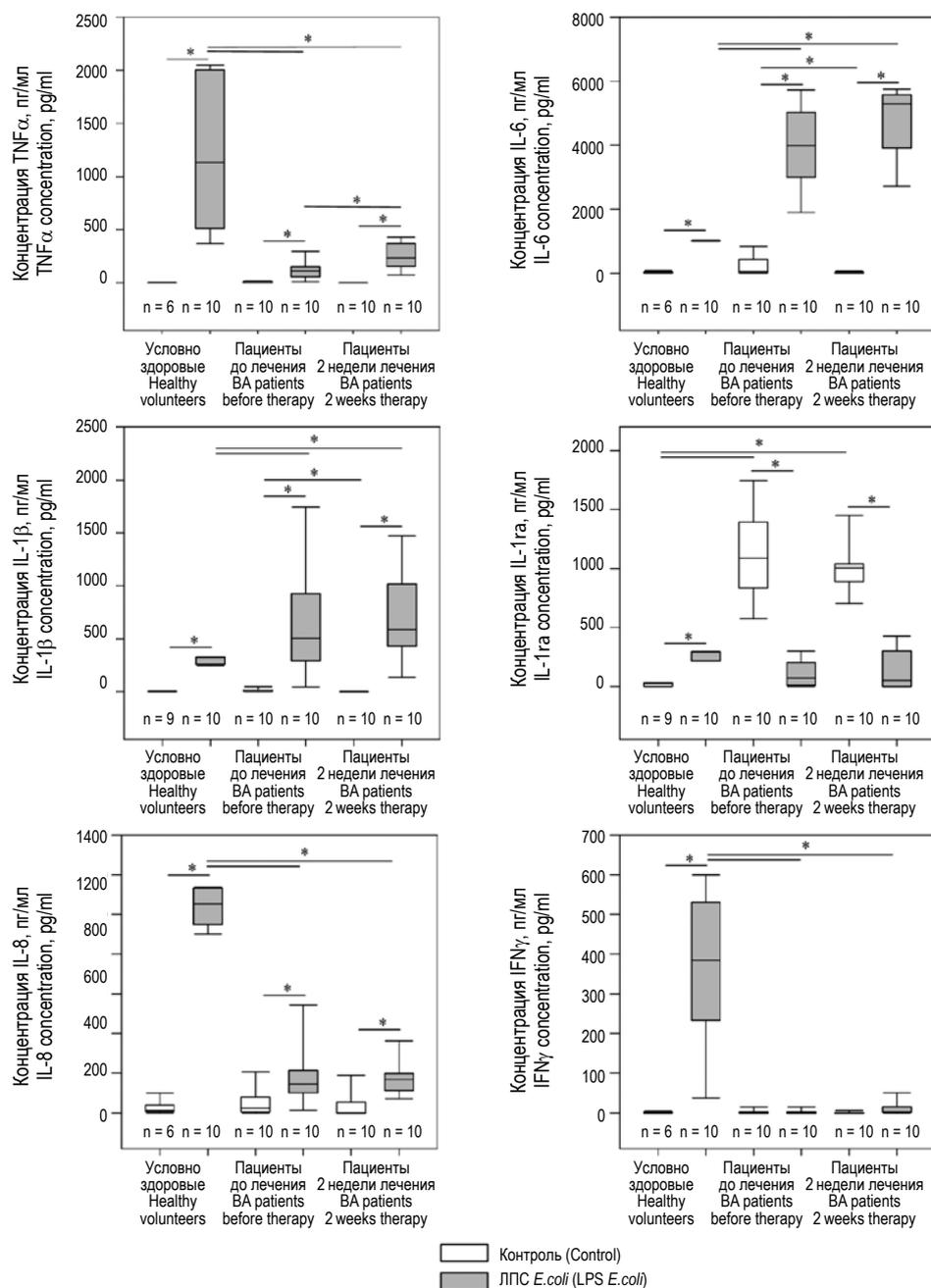
## Обсуждение

У пациентов с БА после терапии отмечается тенденция к снижению выраженности симптомов заболевания, положительная динамика в сторону прироста ОФВ1 и улучшение качества жизни (АСТ-тест), что указывает на купирование симптомов БА при базисной противовоспалительной терапии.

Из литературных данных известно, что в альвеолярной жидкости и в крови пациентов с БА могут обнаруживаться существенные концентрации TNF $\alpha$  [10, 11, 17, 43]. В настоящее время описаны два механизма развития БА. Первый, Th2-зависимый механизм, активируется в ответ на аллергены, тогда как второй, Th2-независимый (Th17-зависимый), реализуется при инфекции [18].

Уровни IL-4 в плазме крови пациентов с БА превышали уровни этого цитокина в плазме крови условно здоровых добровольцев, что указывает на развитие заболевания по Th2-зависимому механизму [46]. Кроме того, уровни TNF $\alpha$  в контрольных образцах пациентов с БА и условно здоровых добровольцев были сравнимы, подтверждая развитие БА по Th2-зависимому механизму, для которого не характерно увеличение продукции TNF $\alpha$  [8]. Полученные в ходе настоящего исследования результаты, подтверждают, что высокие уровни TNF $\alpha$  характерны для БА, развивающейся по Th2-независимому механизму [8, 35].

Одним из маркеров ослабления иммунного ответа является снижение секреции TNF $\alpha$  клет-



**Рисунок 1. Секретия цитокинов клетками крови условно здоровых добровольцев, пациентов с БА до терапии и через две недели терапии**

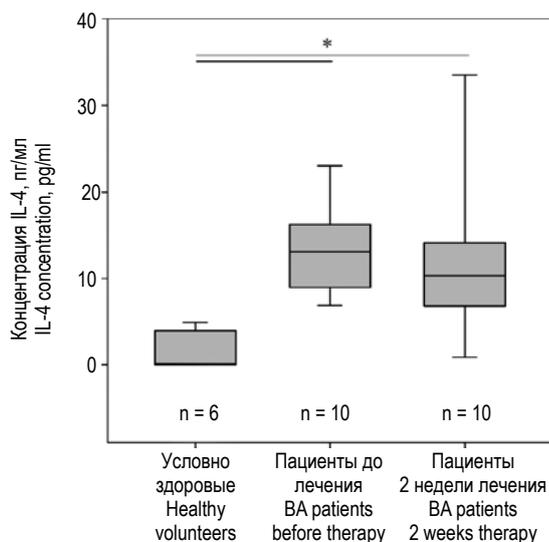
**Примечание.** Концентрации цитокинов оценивали в контрольных образцах крови (белые гистограммы) и после стимуляции ЛПС *E. coli* (100 нг/мл) (серые гистограммы). Концентрации TNFα, IL-6, IL-8 определяли после 6 ч инкубации, IL-1β, IL-1ra и IFNγ – после 24 ч инкубации. Определение концентраций цитокинов проводили методом ИФА. \* – p < 0,05, U-тест Манна-Уитни и W-критерий Вилкоксона.

Figure 1. Cytokines secretion by whole blood cells of healthy volunteers, patients with bronchial asthma (BA) before treatment or after 2 weeks therapy

Note. Cytokine secretion was measured in control samples (white histograms) and after LPS (100 ng/ml) challenge (gray histograms). TNFα, IL-6 and IL-8 concentrations were measured after 6 h exposure, IL-1β, IL-1ra and IFNγ concentrations were measured after 24 h exposure. Cytokine concentrations were measured by ELISA. \*, p < 0.05, Mann–Whitney U test, Wilcoxon signed-rank test.

ками цельной крови, стимулированными эндотоксином *ex vivo* [31]. В нашем исследовании ЛПС-индуцированная секретия TNFα клетками крови пациентов с БА была значительно ниже,

чем ЛПС-индуцированная секретия этого цитокина клетками условно здоровых добровольцев, что может указывать на снижение активности иммунных клеток крови у пациентов с БА. Снижение



**Рисунок 2. Концентрации IL-4 в плазме крови условно здоровых добровольцев, пациентов с БА до терапии и через две недели терапии**

**Примечание.** Определение концентраций цитокинов проводили методом ИФА. \* –  $p < 0,05$ , U-тест Манна–Уитни и W-критерий Вилкоксона.

Figure 2. IL-4 plasma levels of healthy volunteers, patients with bronchial asthma (BA) before treatment or after 2 weeks therapy  
Note. Cytokine concentrations were measured by ELISA. \*,  $p < 0.05$ , Mann–Whitney U test, Wilcoxon signed-rank test.

количеств TNF $\alpha$  в образцах крови пациентов с БА может объясняться повышением уровней sTNFR II, секретируемого клетками крови и связывающего TNF $\alpha$  [43, 48]. Через две недели терапии наблюдалось усиление ЛПС-индуцированной секреции TNF $\alpha$  *ex vivo*. ЛПС-индуцированный синтез TNF $\alpha$  характерен для моноцитов, но не характерен для лимфоцитов крови человека [2]. В связи с этим нами предположено, что усиление ЛПС-индуцированной секреции TNF $\alpha$  (6 ч) через две недели после терапии может быть связано с частичным восстановлением активности моноцитов крови пациентов с БА.

Одним из механизмов усиления ЛПС-индуцированной секреции TNF $\alpha$  клетками крови пациентов с БА на фоне терапии может быть повышение в крови концентраций растворимой формы рецептора CD14 (sCD14), который способствует доставке ЛПС к рецепторному комплексу TLR4/MD-2 на поверхности клеток-мишеней [27]. Нами не обнаружено достоверных изменений концентрации sCD14 в образцах клеток крови пациентов с БА на фоне терапии в контроле и после стимуляции ЛПС (данные не представлены). Полученные результаты указывают на то, что усиление ЛПС-индуцированной секреции TNF $\alpha$  клетками иммунной системы на фоне терапии БА происходит по sCD14-независимым механизмам.

Неполное восстановление ЛПС-индуцированной секреции TNF $\alpha$  клетками крови пациентов с БА до уровней, характерных для клеток крови условно здоровых добровольцев, может

объясняться способностью используемых в терапии ингаляционных глюкокортикостероидов (иГКС) индуцировать развитие иммунологической толерантности к ЛПС [36].

Цитокин IL-6 секретируется альвеолярными макрофагами пациентов с астмой после контакта с аллергеном [35, 45]. В контрольных образцах клеток крови пациентов с БА нами обнаружены уровни IL-6, превышающие уровни этого цитокина в контрольных образцах клеток крови условно здоровых добровольцев, что хорошо согласуется с литературными данными о влиянии астмы на продукцию IL-6 иммунными клетками крови [37, 49]. Терапия снижала фоновую секрецию IL-6 клетками крови пациентов до уровней, регистрируемых в пробах условно здоровых добровольцев, что может указывать на снижение выраженности воспаления.

Нами не было обнаружено статистически значимых различий между концентрациями IL-8 в контрольных образцах клеток крови, полученных от условно здоровых добровольцев и пациентов с БА, что согласуется с литературными данными [19, 29]. ЛПС-индуцированная секреция IL-8 клетками крови пациентов с БА значительно ниже ЛПС-индуцированной секреции IL-8 клетками крови условно здоровых добровольцев, что подтверждает снижение активности иммунных клеток крови пациентов с БА.

Из литературных данных известно, что в течение развития БА повышается экспрессия IL-1 $\beta$  клетками эпителия дыхательных путей и увеличивается количество альвеолярных макрофагов, секретирующих IL-1 $\beta$  [41–43]. В отличие от альвеолярных макрофагов клетки периферической крови пациентов с БА (контроль) секретируют концентрации IL-1 $\beta$ , сопоставимые с концентрациями IL-1 $\beta$  в пробах клеток крови условно здоровых добровольцев. Полученные результаты могут указывать на различия в регуляции секреции IL-1 $\beta$  иммунными клетками респираторного тракта и периферической крови.

В контрольных образцах пациентов с БА обнаружены существенные количества IL-1 $\alpha$  в отличие от контрольных образцов условно здоровых добровольцев. Эти результаты согласуются с литературными данными [43]. Стоит отметить, что высокие концентрации IL-1 $\alpha$  в бронхоальвеолярной жидкости пациентов с БА не блокируют эффекты IL-1 $\beta$  [43]. После активации ЛПС уровни IL-1 $\alpha$  в пробах клеток крови пациентов с БА снижались. Это может объясняться связыванием IL-1 $\alpha$  с IL-1R, экспрессия которого повышается на поверхности мононуклеарных клеток, стимулированных ЛПС [3, 4, 5, 6, 38].

Клетки пациентов с БА практически не секретируют IFN $\gamma$ , как в контроле, так и в ответ на ЛПС. Низкие концентрации IFN $\gamma$  подтверждают развитие БА по Th2-зависимому механизму [18, 33]. Через две недели после терапии БА не обнаружено усиления ЛПС-индуцированной секреции IFN $\gamma$  *ex vivo*, что косвенно указывает на развитие воспаления по Th2-зависимому ме-

ханизму. Секретция Th2-клетками цитокинов IL-4 и IL-10 подавляет дифференцировку наивных Th-клеток в зрелые Th1-клетки и, как следствие, синтез IFN $\gamma$  зрелыми Th1-клетками [15]. Результаты, полученные нами, показывают, что уровни IFN $\gamma$  не могут использоваться для оценки эффективности терапии БА. Это согласуется со слабой терапевтической эффективностью IFN $\gamma$  при лечении БА [12].

Из литературных данных известно, что иГКС являются неэффективными терапевтическими агентами при лечении БА, развивающейся по Th2-независимому пути [40]. Маркером иГКС-резистентной БА являются повышенные уровни IL-17A в крови пациентов. В связи с этим мы оценили продукцию IL-17A клетками крови пациентов и условно здоровых добровольцев (данные не представлены). Концентрации IL-17A во всех пробах были ниже концентрации, ассоциированной с риском иГКС-резистентной астмы (20 пг/мл) [1], что подтверждает развитие

БА по Th2-зависимому механизму [18] и адекватность подобранной терапии.

Оценка продукции IFN $\gamma$  и IL-17A, клетками крови, стимулированными ЛПС, наряду с уровнями IL-4, может быть использована для подтверждения развития БА по Th2-зависимому механизму.

В настоящем исследовании показано, что через две недели после базисной противовоспалительной терапии у пациентов с БА наблюдается снижение фоновой секреции IL-6 клетками крови и частичное восстановление чувствительности иммунных клеток крови, выраженное в усилении ЛПС-индуцированной секреции TNF $\alpha$  *ex vivo*.

## Благодарности

Авторы выражают свою благодарность сотрудникам БПНЦ РАН Акимовой О.Н. за забор биоматериала для обследования и Банниковой Н.П. за помощь в организации исследования.

## Список литературы / References

1. Agache I, Ciobanu C., Agache C., Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respir. Med.*, 2010, Vol. 104, no. 8, pp. 1131-1137.
2. Andersson U., Matsuda T. Human interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha production studied at a single-cell level. *Eur. J. Immunol.*, 1989, Vol. 19, no. 6, pp. 1157-1160.
3. Arend W.P. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv. Immunol.*, 1993, Vol. 54, pp. 167-227.
4. Arend W.P., Malyak M., Guthridge C.J., Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998, Vol. 16, pp. 27-55.
5. Arend W.P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, Vol. 13, no. 4-5, pp. 323-340.
6. Arend W.P., Gaba C. Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Res.*, 2000, Vol. 2, no. 4, pp. 245-248.
7. Atkinson T.P. Is asthma an infectious disease? New evidence. *Curr. Allergy. Asthma Rep.*, 2013, Vol. 13, no. 6, pp. 702-709.
8. Baines K.J., Simpson J.L., Wood L.G., Scott R.J., Gibson P.G. Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 127, no. 1, pp. 153-160.
9. Becker K.J., Dankwa D., Lee R., Schulze J., Zierath D., Tanzi P., Cain K., Dressel A., Shibata D., Weinstein J. Stroke, IL-1ra, IL1RN, infection and outcome. *Neurocrit. Care.*, 2014, Vol. 21, no. 1, pp. 140-146.
10. Berry M.A., Brightling C., Pavord I., Wardlaw A. TNF-alpha in asthma. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2007, Vol. 7, no. 3, pp. 279-282.
11. Berry M.A., Hargadon B., Shelley M., Parker D., Shaw D.E., Green R.H., Bradding P., Brightling C.E., Wardlaw A.J., Pavord I.D. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N. Engl. J. Med.*, 2006, Vol. 354, no. 7, pp. 697-708.
12. Boguniewicz M., Schneider L.C., Milgrom H., Newell D., Kelly N., Tam P., Izu A.E., Jaffe H.S., Bucalo L.R., Leung D.Y. Treatment of steroid-dependent asthma with recombinant interferon-gamma. *Clin. Exp. Allergy*, 1993, Vol. 23, no. 9, pp. 785-790.
13. de Bont N., Netea M.G., Rovers C., Smilde T., Hijmans A., Demacker P.N. LPS-induced release of IL-1 beta, IL-1Ra, IL-6, and TNF-alpha in whole blood from patients with familial hypercholesterolemia: no effect of cholesterol-lowering treatment. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2006, Vol. 26, no. 2, pp. 101-107.
14. Cookson B. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature*, 1999, Vol. 402, B5-11.
15. Cunha F.Q., Moncada S., Liew F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, Vol. 182, no. 3, pp. 1155-1159.
16. Davies R.J., Wang J., Jiahua W., Abdelaziz M., Calderon M.A., Khair O., Devalia J.L., Rusznak C. New insights into the understanding of asthma. *Chest*, 1997, Vol. 111, pp. 2-10.
17. Desai D., Brightling C. TNF-alpha antagonism in severe asthma? *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, 2010, Vol. 4, no. 3, pp. 193-200.
18. Earl C.S., An S.Q., Ryan R.P. The changing face of asthma and its relation with microbes. *Trends Microbiol.*, 2015, Vol. 23, no. 7, pp. 408-418.
19. Ghaffari J., Rafiei A.R., Ajami A., Mahdavi M., Hoshiar D. Serum interleukins 6 and 8 in mild and severe asthmatic patients, is it difference? *Caspian J. Intern. Med.*, 2011, Vol. 2, no. 2, pp. 226-228.
20. Godwin M.S., Blackburn J., Steele C. IL-1R and IL-1RA differentially contribute to immunopathogenesis during fungal asthma. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, pp. 53-54.
21. Gomes N.E., Brunialti M.K., Mendes M.E., Freudenberg M., Galanos C., Salomão R. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2010, Vol. 43, no. 9, pp. 853-858.
22. Jansky L., Reymanova P., Kopecky J. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or Infected by borrelia. *Physiol. Res.*, 2003, Vol. 52, no. 6, pp. 593-598.
23. Holt P.G., Macaubas C., Stumbles P.A., Sly P.D. The role of allergy in the development of asthma. *Nature*, 1999, Vol. 402, B12-17.
24. Karjalainen J., Hulkkonen J., Nieminen M.M., Huhtala H., Aromaa A., Klaukka T., Hurme M. Interleukin-10 gene promoter region polymorphism is associated with eosinophil count and circulating immunoglobulin E in adult asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2003, Vol. 33, no. 1, pp. 78-83.
25. Holgate S.T., Davies D.E., Powell R.M., Howarth P.H., Haitchi H.M., Holloway J.W. Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. *Eur. Respir. J.*, 2007, Vol. 29, no. 4, pp. 793-803.
26. Kim Y., Lee S., Kim Y.S., Lawler S., Gho Y.S., Kim Y.K., Hwang H.J. Regulation of Th1/Th2 cells in asthma development: a mathematical model. *Math. Biosci. Eng.*, 2013, Vol. 10, no. 4, pp. 1095-1133.

27. Kitchens R.L., Thompson P.A. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J. Endotoxin Res.*, 2005, Vol. 11, no. 4, pp. 225-229.
28. Kumolohasi E., Salim E., Jantan I., Ahmad W. Kinetics of intracellular, extracellular and production of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Trop. J. Pharm. Res.*, 2014, Vol. 13, pp. 536-543.
29. Liu G., Zhu R., Li B. TNF-alpha and IL-8 of the patients with allergic asthma. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.*, 2005, Vol. 25, no. 3, pp. 274-275.
30. McCracken J.L., Veeranki S.P., Ameredes B.T., Calhoun W.J. Diagnosis and management of asthma in adults: a review. *JAMA*, 2017, Vol. 318, no. 3, pp. 279-290.
31. Muszynski J.A., Nofziger R., Greathouse K., Nateri J., Hanson-Huber L., Steele L., Nicol K., Groner J.I., Besner G.E., Raffel C., Geyer S., El-Assal O., Hall M.W. Innate immune function predicts the development of nosocomial infection in critically injured children. *Shock*, 2014, Vol. 42, no. 4, pp. 313-321.
32. Nelson H.S. The importance of allergens in the development of asthma and the persistence of symptoms. *Dis. Mon.*, 2001, Vol. 47, pp. 5-15.
33. Peters M.C. Measures of gene expression in sputum cells can identify T(H)2-high and T(H)2-low subtypes of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 133, no. 2, pp. 388-394.
34. Poynter M.E., Irvin C.G. Interleukin-6 as a biomarker for asthma: hype or is there something else? *Eur. Respir. J.*, 2016, Vol. 48, no. 4, pp. 979-981.
35. Ray A., Oriss T.B., Wenzel S.E. Emerging molecular phenotypes of asthma. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2015, Vol. 308, no. 2, pp. L130-140.
36. Rearte B., Landoni V., Laborde E., Fernández G., Isturiz M. Differential effects of glucocorticoids in the establishment and maintenance of endotoxin tolerance. *Clin. Exp. Immunol.*, 2010, Vol. 159, no. 2, pp. 208-216.
37. Rincon M., Irvin C.G. Role of IL-6 in Asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int. J. Biol. Sci.*, 2012, Vol. 8, no. 9, pp. 1281-1290.
38. Saccani S., Polentarutti N., Penton-Rol G., Sims J.E., Mantovani A. Divergent effects of LPS on expression of IL-1 receptor family members in mononuclear phagocytes *in vitro* and *in vivo*. *Cytokine*, 1998, Vol. 10, no. 10, pp. 773-780.
39. Schnare M., Barton G.M., Holt A.C., Takeda K., Akira S., Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, 2001, Vol. 2, no. 10, pp. 947-950.
40. Silva M.J., Santana M.B.R., Pitangueira H.M., Marques C.R., Carneiro V.L., Figueiredo C.A., Costa R.S. Glucocorticoid resistant asthma: the potential contribution of IL-17. *Biomark. J.*, 2016, Vol. 1, p. 6.
41. Sousa A.R., Lane S.J., Nakhosteen J.A., Lee T.H., Poston R.N. Expression of interleukin-1 beta (IL-1beta) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on asthmatic bronchial epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, Vol. 154, no. 4, Pt 1, pp. 1061-1066.
42. Thomas S.S., Chhabra S.K. A study on the serum levels of interleukin-1beta in bronchial asthma. *J. Indian. Med. Assoc.*, 2003, Vol. 101, no. 5, pp. 282-284.
43. Tillie-Leblond I., Pugin J., Marquette C.H., Lamblin C., Saulnier F., Briche A., Wallaert B., Tonnel A.B., Gosset P. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 1999, Vol. 159, no. 2, pp. 487-494.
44. Uwaezuoke S.N., Ayuk A.C., Eze J.N. Severe bronchial asthma in children: a review of novel biomarkers used as predictors of the disease. *J. Asthma Allergy*, 2018, Vol. 11, pp. 11-18.
45. Vercelli D., Jabara H.H., Arai K., Yokota T., Geha R.S. Endogenous interleukin 6 plays an obligatory role in interleukin 4-dependent human IgE synthesis. *Eur. J. Immunol.*, 1989, Vol. 19, no. 8, pp. 1419-1424.
46. Wegmann M. Th2 cells as targets for therapeutic intervention in allergic bronchial asthma. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2009, Vol. 9, no. 1, p. 85-100.
47. Wohlleben G., Erb K.J. Immune stimulatory strategies for the prevention and treatment of asthma. *Curr. Pharm. Des.*, 2006, Vol. 12, no. 25, pp. 3281-3292.
48. Zahorska-Markiewicz B., Janowska J., Olszanecka-Glinianowicz M., Zurakowski A. Serum concentrations of TNF- $\alpha$  and soluble TNF- $\alpha$  receptors in obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 2000, Vol. 24, no. 11, pp. 1392-1395.
49. Zhu Z., Tang W., Ray A., Wu Y., Einarsson O., Landry M.L., Gwaltney J., Elias J.A. Rhinovirus stimulation of interleukin-6 *in vivo* and *in vitro*: Evidence for nuclear factor- $\kappa$ B-dependent transcriptional activation. *J. Clin. Invest.*, 1996, Vol. 97, no. 2, pp. 421-430.

**Авторы:**

**Серов Д.А.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биомедицины ФГБУН «Институт фундаментальных проблем биологии РАН», г. Пушкино, Московская обл., Россия

**Кабанов Д.С.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биомедицины ФГБУН «Институт фундаментальных проблем биологии РАН», г. Пушкино, Московская обл., Россия

**Косякова Н.И.** — д.м.н., заведующий отделением иммунологии-аллергологии ФГАУЗ «Больница Пушкинского научного центра РАН», г. Пушкино, Московская обл., Россия

**Прохоренко И.Р.** — д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биомедицины ФГБУН «Институт фундаментальных проблем биологии РАН», г. Пушкино, Московская обл., Россия

**Authors:**

**Serov D.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Biomedicine, Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

**Kabanov D.S.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Biomedicine, Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

**Kosyakova N.I.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Immunology/Allergology, Clinical Hospital at the Pushchino Research Center, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

**Prokhorenko I.R.**, PhD, MD (Biology), Main Research Associate, Laboratory of Molecular Biomedicine, Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Поступила 18.07.2018

Отправлена на доработку 10.12.2018

Принята к печати 14.12.2018

Received 18.07.2018

Revision received 10.12.2018

Accepted 14.12.2018