

Роль эпителиальных клеток в патогенезе атопии

Казимирский А.Н.¹, Салмаси Ж.М.¹, Порядин Г.В.¹, Свитич О.А.¹,
Брагвадзе Б.Г.¹, Алексеева А.А.², Ганковская Л.В.¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет (РГИМУ) имени Н.И. Пирогова
Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

² Национальный научно-практический центр здоровья детей (ННПЦЗД)
Россия, 117997, г. Москва, Ломоносовский пр., 2/1

РЕЗЮМЕ

Цель. Исследование механизмов развития атопии и построение модели иммунопатогенеза атопических заболеваний.

Материалы и методы. Определение поверхностных рецепторов лимфоцитов периферической крови у больных атопической бронхиальной астмой и атопическим дерматитом с помощью моноклональных антител методом непрямой иммунофлуоресценции. Также у больных атопической бронхиальной астмой с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени оценивали экспрессию генов, кодирующих toll-подобные рецепторы (TLRs) TLR2, TLR4 и TLR9 клетками воздухоносного эпителия, а методом иммуноферментного анализа определяли содержание цитокинов TSLP, IL-33, IL-4 и TGFβ (eBioscience) в смывах с воздухоносных путей.

Результаты. При обострении атопических заболеваний в лимфоцитах периферической крови развивается интенсивный активационный процесс с нарушением активационного апоптоза лимфоцитов, направленный на образование плазматических клеток, способных развивать интенсивный синтез IgE. Для поиска сигналов, которые могли бы объяснить механизм перестройки В-клеточного звена иммунной системы при атопии, исследовали клетки эпителия воздухоносных путей у группы больных атопической бронхиальной астмой и обнаружили увеличение экспрессии генов, кодирующих TLR2, TLR4, TLR9 в 6,3 и 2,5 раза соответственно. Вместе с повышенной экспрессией генов TLRs у больных с бронхиальной астмой выявлено повышенное содержание цитокинов TSLP и IL-33, секретируемых эпителиальными клетками воздухоносных путей. Эти цитокины обладают иммунорегуляторным действием – активируют антигенпрезентирующие функции, формируют Th2-тип иммунного ответа, способствуют выработке цитокинов (IL-4, IL-9, IL-13) и обуславливают развитие аллергического типа воспаления.

Заключение. Мы предполагаем, что основным звеном патогенеза атопических заболеваний является нарушение взаимодействия TLRs с соответствующими лигандами, вызванное спонтанной димеризацией TLRs под влиянием малонового диальдегида. Поступление медленно метаболизирующихся димеров TLRs в клетки эпителия является сигналом для активации генома, что ведет к синтезу аллергических цитокинов IL-33 и TSLP.

Таким образом, главный путь иммунопатогенеза атопических заболеваний представляет патологическое функциональное взаимодействие эпителиальных клеток и В-лимфоцитов периферической крови.

Ключевые слова: атопия, TLRs, IL-33, TSLP, CD-антигены.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

✉ Казимирский Александр Николаевич, e-mail: alnica10@mail.ru.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол № 178 от 22.10.2018 г.).

Благодарности. Авторы выражают свою признательность в работе проректору по научной работе РНИМУ им. Н.И. Пирогова Денису Владимировичу Ребрикову за поддержку настоящего исследования и методическую помощь.

Для цитирования: Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Свитич О.А., Брагвадзе Б.Г., Алексеева А.А., Ганковская Л.В. Роль эпителиальных клеток в патогенезе атопии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 201–210. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-201-210>.

УДК 616.5-002.2-056.43-092:611.018.7

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-201-210>

The role of epithelial cells in atopy pathogenesis

Kazimirsky A.N.¹, Salmasi J.M.¹, Poryadin G.V.¹, Svitich O.A.¹,
Bragvadze B.G.¹, Alekseeva A.A.², Gankovskaya L.V.¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU)

1, Ocrovityuninov Str., Moscow, 117997, Russian Federation

² National Scientific and Practical Center of Children's Health (NSPCCH)

2/1, Lomonosovskiy Av., Moscow, 117997, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. The study of the mechanisms of atopic disease formation and a model of immunopathogenesis of the atopic diseases.

Methods. Determination of surface lymphocytes receptors in peripheral blood of atopic bronchial asthma and atopic dermatitis patients with the help of monoclonal antibodies using the indirect immunofluorescence method. Expression of genes encoding TLR2, TLR4 and TLR9 receptors of airborne epithelial cells by real-time polymerase chain reaction, as well as determination of cytokine TSLP, IL-33, IL-4 and TGFβ (eBioscience) in airway flushes in atopic asthma patients and healthy people.

Results. During the exacerbation of atopic diseases in peripheral blood lymphocytes, an intensive activation process develops with impaired lymphocytes activating apoptosis aimed at the formation of plasma cells capable of developing intensive IgE synthesis. To search for signals that could explain the mechanism of rearrangement of the B-cell part of the immune system during atopy, the epithelium cells of the airways were examined in a group of patients with atopic asthma and found an increase in gene expression coding for TLR2, TLR4, TLR9 in 6, 3 and 2.5 times respectively. Along with increased expression of TLRs genes in patients with bronchial asthma, an increased content of TSLP and IL-33 cytokines secreted by epithelial cells of the airways was detected. These cytokines have an immunoregulatory action - their nearby antigen presenting functions format the Th2 type of immune response, promote the production of cytokines (IL-4, IL-9, IL-13) and cause the development of an allergic type of inflammation.

Conclusion. We suppose that the main link in pathogenesis is a disruption of the interaction of TLRs with the corresponding ligands caused by spontaneous dimerization of TLRs under the malonic dialdehyde influence. The intake of slowly metabolized dimers of TLRs into epithelial cells is a signal for genome activation, which leads to the synthesis of allergic cytokines IL-33 and TSLP. Thus, the main immunopathogenesis pathway of atopic diseases is the pathological functional interaction between epithelial cells and peripheral blood B-lymphocytes.

Key words: atopy, TLRs, IL-33, TSLP, CD antigens.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee under Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol No. 178 of 22.10.2018).

Acknowledgements. The authors would like to thank Denis V. Rebrikov, Vice-Rector for Science of Pirogov Russian National Research Medical University, for supporting the research and providing methodological assistance in the study.

For citation: Kazimirsky A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Svitich O.A., Bragvadze B.G., Alekseeva A.A., Gankovskaya L.V. The role of epithelial cells in atopy pathogenesis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 201–210. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-201-210>.

ВВЕДЕНИЕ

В исследованиях последних лет получены новые данные о важной роли эпителиальных клеток в развитии атопии. В частности, получены доказательства о недостаточности барьерной функции эпителиальных клеток дыхательных путей у больных с атопической бронхиальной астмой. Эпителий представляет собой активный в иммунологическом отношении слой клеток, способный удалять патогены за счет распознавания их Toll-подобными рецепторами (TLRs), секреции ряда цитокинов, а также влиять на характер активации дендритных клеток и определять направление Th1- или Th2-типов иммунного ответа.

Актуальность исследования иммунопатогенеза атопических заболеваний обосновывается распространенностью аллергических (атопических) заболеваний и их недостаточной изученностью. Полноценные представления в отношении иммунопатогенеза атопии позволят улучшить диагностику и лечение таких заболеваний, как полиноз, атопическая бронхиальная астма, атопический дерматит. Иммунопатогенез атопических заболеваний привлекает внимание исследователей в связи с тем, что нарушения в функционировании иммунной системы у больных вызывают образование плазматических клеток, синтезирующих аллергенспецифический иммуноглобулин (Ig) E. Пусковая роль в аллергическом воспалении, по-видимому, принадлежит TLRs эпителиальных клеток, способных после активации синтезировать проаллергические цитокины: тимусно-стромальный лимфопоэтин (TSLP), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерлейкин (IL) 25 и IL-33 [1]. Построение модели иммунопатогенеза атопии, выявление специфического процесса, характерного только для атопии, требуют учета изменений как в системе врожденного, так и адаптивно-го иммунитета.

Целью настоящей работы являлось исследование концентрации ответственных за аллергическую форму иммунной реакции цитокинов IL-4, IL-33, TSLP, трансформирующего фактора роста

β (TGF β) в смывах воздухоносных путей и экспрессии генов, кодирующих рецепторы TLR-2, TLR-4, TLR-9, у больных атопической бронхиальной астмой, а также определение специфических изменений субпопуляционного состава лимфоцитов крови у больных атопической бронхиальной астмой и атопическим дерматитом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Больные. Дети – 42 ребенка (14 девочек и 28 мальчиков) в возрасте от 3 до 12 лет (средний возраст $8,1 \pm 3,1$ года) с бронхиальной астмой тяжелой степени, находившихся на лечении в аллергологическом отделении Федерального государственного автономного учреждения «Национальный научно-практический центр здоровья детей» (ФГАУ ННПЦЗД) Министерства здравоохранения Российской Федерации. Перед включением в исследование было получено информированное согласие у родителей пациентов. Критерии включения в исследование: верифицированный диагноз тяжелой бронхиальной астмы, подтвержденный атопический фенотип (положительные кожные пробы, повышение уровня сывороточного IgE. Критерии исключения: наличие на момент исследования вирусной инфекции, острых воспалительных заболеваний, патологии ЛОР-органов. Контрольную группу составили 67 здоровых детей (29 девочек и 38 мальчиков) в возрасте $6,4 \pm 2,8$ лет.

Обследовано 44 взрослых больных атопической бронхиальной астмой (16 мужчин и 28 женщин) 16–60 лет (средний возраст $42,2 \pm 4,3$ года) и 36 взрослых пациентов (9 мужчин и 27 женщин) 16–62 лет (средний возраст $36,5 \pm 4,6$ года) с атопическим дерматитом. Все больные с атопической бронхиальной астмой и атопическим дерматитом были обследованы в период обострения заболевания. Контрольную группу составили 26 здоровых людей (12 мужчин и 14 женщин) 19–56 лет (средний возраст $32,2 \pm 5,4$ года).

Определения экспрессии генов TLR-2, TLR-4, TLR-9. Для определения экспрессии генов TLR-2, TLR-4, TLR-9 использовали метод полимеразной

цепной реакции в режиме реального времени. РНК из соскобов слизистой оболочки выделяли методом аффинной сорбции на частицах силикагеля, используя набор для выделения РНК «АмплиПрайм РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис, Россия). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реактивов для синтеза первой цепи ДНК на матрице РНК интересующего гена. Амплификацию ДНК проводили в присутствии высокочувствительного флуоресцентного красителя двухцепочечной ДНК SYBR Green I и праймеров (Синтол, Россия). Анализ результатов проводили относительным методом измерений по DD_{Ct}, получая результаты в виде относительных единиц RQ (relative quantity), показывающих во сколько раз больше экспрессия исследуемого гена в образце по отношению к гену актина [2].

Определение IL-33, TSLP, IL-4, TGFβ методом иммуноферментного анализа. Использовали смывы со слизистой полости носа пациентов с атопической бронхиальной астмой и здоровых детей в объеме 1 мл. Для определения концентрации IL-33, IL-4 и TGFβ1 в назальных смывах и сыворотке крови применяли наборы для иммуноферментного анализа Human IL-33 Platinum ELISA, Human IL-4 Platinum ELISA, Human TGF beta1 Platinum ELISA (Affymetrix eBioscience, San Diego, CA, США), а также тест-набор Quantikine ELISA Human TSLP Immunoassay (R&D systems, США).

Определение поверхностных рецепторов лимфоцитов периферической крови. Оценку относительного и абсолютного содержания в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD20, CD72, CD38, CD23, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, CD54, CD30, CD178 и мембранный иммуноглобулин (mIg) M, mIgG, проводили методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител (ИКО, Россия). В качестве вспомогательных методов проводили выделение лимфоцитов по методу Воуит в градиенте плотности фиколл-верографина, оценку жизнеспособности лимфоцитов сразу после выделения из крови и подсчета их абсолютного числа в периферической крови.

Статистическую обработку полученных результатов с целью оценки достоверности регистрируемых изменений проводили при большой выборке с помощью t-критерия Стьюдента, при малой выборке с ненормальным распределением, а также при сравнении попарно связанных вариантов применяли непараметрический критерий Вилкоксона – Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для исследования механизма перестройки В-клеточного звена иммунной системы при атопии изучению подвергли клетки эпителия воздухоносных путей у группы больных атопической бронхиальной астмой и обнаружили увеличение экспрессии генов, кодирующих TLR2, TLR4 и TLR9. Так, в группе детей с бронхиальной астмой средней и тяжелой степени выявлено значительное повышение экспрессии гена *TLR2* в 5,6 и 6,5 раз соответственно по сравнению с группой здоровых детей ($p \leq 0,05$). Экспрессия гена *TLR4* увеличивалась в 2,5 раза по сравнению с контролем как в группе больных средней тяжести, так и с тяжелой бронхиальной астмой ($p \leq 0,05$). Экспрессия гена *TLR9* у детей со средней степенью тяжести заболевания и при тяжелой форме бронхиальной астмы в 2,6–2,5 раза превышала показатели контрольной группы ($p \leq 0,05$). Результаты этого раздела исследования показывают, что у больных атопической бронхиальной астмой наблюдается активация экспрессии генов распознающих рецепторов врожденного иммунитета. Полученные результаты сочетаются с данными других исследований. Так, при исследовании мононуклеарных клеток периферической крови у больных бронхиальной астмой обнаружены высокие уровни экспрессии TLR2 и TLR9 [3]. Значительное увеличение экспрессии TLR2 и TLR4 найдено у больных атопическим дерматитом на лимфоцитах периферической крови, при этом высокий уровень экспрессии этих рецепторов сохранялся в течение 4 мес после окончания обострения [4].

Активация наивных В-лимфоцитов зависит от последовательной интеграции двух сигналов: связывания В-клеточного рецептора (BCR) и антигена с последующим взаимодействием В-клеток с хелперными Т-клетками через рецептор-опосредованные контактные взаимодействия. Эти взаимодействия индуцируют начальное деление клеток, но не являются достаточными для обеспечения полноценного выживания и прохождения всех стадий дифференцировки, что приводит к гибели части активированных пролиферирующих В-клеток. Предполагается, что для прохождения всех стадий дифференцировки и превращения наивных В-лимфоцитов в плазматические клетки требуется дополнительная сигнализация. Таким сигналом формирования плазматических клеток является стимуляция через любой из TLRs [5, 6]. Обнаруженное увеличение экспрессии генов распознающих рецепторов врожденного иммунитета TLR2, TLR4 и TLR9 у больных атопической

бронхиальной астмой, а также данные по увеличению экспрессии TLRs при других atopических заболеваниях могут свидетельствовать, на наш взгляд, о повышении чувствительности организма atopических пациентов к молекулам патогенов.

В пределах настоящего исследования определяли цитокины, ответственные за аллергическую форму иммунной реакции, IL-33 и TSLP в смывах воздухоносных путей у больных atopической бронхиальной астмой. Это исследование показало, что содержание цитокинов IL-33 и TSLP, секретируемых эпителиальными клетками воздухоносных путей, было в 2,1 и 2,5 раза выше ($p \leq 0,05$) по сравнению с их контрольным уровнем у здоровых доноров. Так, концентрация IL-33 в пробах, полученных от больных atopической бронхиальной астмой, составляла 42,5 (32,7– 82,3) пг/мг белка по сравнению с контрольным уровнем у здоровых доноров 20,04 (11,0–28,5) пг/мг белка ($p < 0,05$). Концентрация TSLP в пробах, полученных от больных детей, была повышенной до 91,7 (84,5– 107,9) пг/мг белка по сравнению с 37,2 (25,2– 73,6) пг/мг белка в контроле ($p < 0,05$).

Эти цитокины (IL-33 и TSLP) обладают иммунорегуляторным действием – активируют антигенпрезентирующие функции дендритных клеток, формируют Th2-тип иммунного ответа, а также способны активировать ILC2 (врожденные лимфоидные клетки 2-го типа), что ведет к синтезу и секреции цитокинов (IL-4, IL-9, IL-13) и обуславливает развитие аллергического типа воспаления.

Проникая в эпителий дыхательных путей, аллергены и патогены активируют распознающие рецепторы врожденного иммунитета (TLRs), индуцируя секрецию провоспалительных цитокинов и интерферонов (рис. 1). Эпителиальные клетки синтезируют TSLP, IL-33 и IL-25, которые через активацию ILC2 способствуют синтезу цитокинов (IL-4, IL-9, IL-13), инициирующих, в свою очередь, тучные клетки и эозинофилы, и вызывают развитие аллергического типа воспаления. Вместе с этим аллергические эпителиальные цитокины (TSLP и IL-33) активируют способность миелоидных дендритных клеток индуцировать Th2-воспалительный ответ [7].

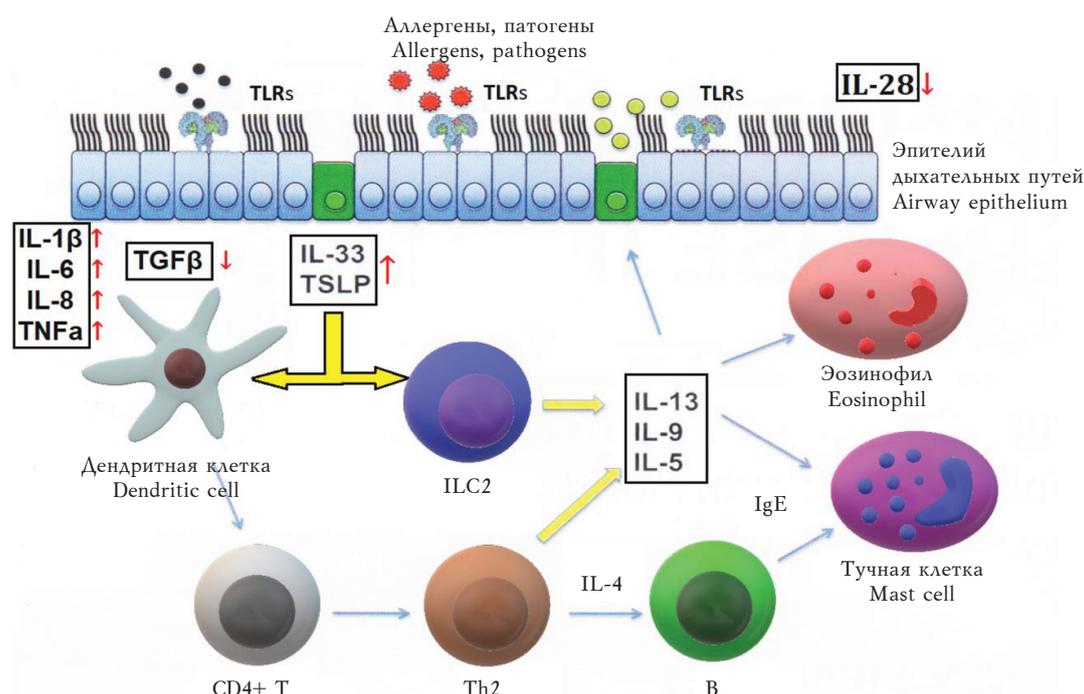


Рис. 1. Схема участия механизмов врожденного иммунитета в патогенезе atopии: ↑ – повышение показателя, ↓ – снижение показателя

Fig. 1. Involvement of innate immunity mechanisms in the pathogenesis of atopii: ↑ – increase in the parameter, ↓ – decrease in the parameter

В исследуемой группе больных также было выявлено 4-кратное увеличение содержания IL-4 до уровня 6,2 (3,3– 8,5) пг/мг белка против контрольного уровня у здоровых доноров 1,5

(0,7–2,7), а также существенное снижение уровня TGFβ в 3,2 раза (385,1 (47,7–971,4) пг/мг белка у больных против контроля 2 532,9 (1 687,5–3 175,8) пг/мг белка), блокирующего стимуляцию клеток

иммунной системы и способствующего индукции апоптоза. Полученные данные позволяют заключить, что эпителиальные клетки иммунологически активны и принимают участие как в инициации аллергического процесса, так и в его поддержании. Синтез и секреция аллергических цитокинов клетками эпителия, а также контактные взаимодействия лимфоцитов периферической крови с антигенпрезентирующими клетками создают определенный профиль экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов, что отражается на их популяционном и субпопуляционном составе в периферической крови.

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при обострении атопических заболеваний отражает как общевоспалительные изменения, так и те, которые характерны только для атопии. К числу

иммунных проявлений воспаления любого геназа относят снижение количества Т-лимфоцитов (CD3), повышение количества В-клеток (CD20), увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих молекулу межклеточной коммуникации ICAM-1 (Inter-cellular adhesion molecule 1, или CD54), а также повышение экспрессии ранних активационных антигенов CD23 (на активированных В-лимфоцитах) и CD25 (на активированных Т-лимфоцитах).

Обострение атопических заболеваний (атопической бронхиальной астмы и атопического дерматита) сопровождается значительными изменениями в популяционном и субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови. Наиболее выраженные изменения наблюдаются в субпопуляционном составе В-лимфоцитов (рис. 2).

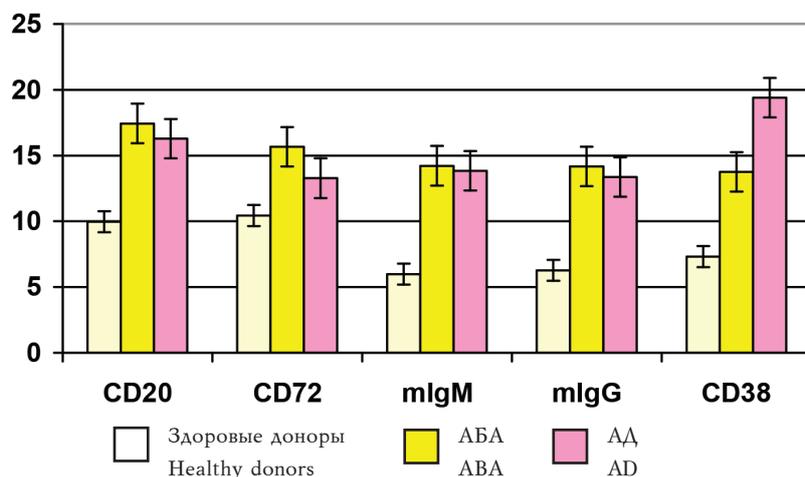


Рис. 2. Субпопуляции В-лимфоцитов у больных атопической бронхиальной астмой и атопическим дерматитом: АБА – атопическая бронхиальная астма, АД – атопический дерматит. По оси ОХ: CD20 – В-лимфоциты; CD72 – В-лимфоциты, примированные антигеном; mIgM – лимфоциты, несущие поверхностный иммуноглобулин М; mIgG – лимфоциты, несущие поверхностный иммуноглобулин G; CD38 – предшественники плазматических клеток. По оси ОУ – относительное количество лимфоцитов периферической крови, %

Fig. 2. Subpopulations of B-lymphocytes in patients with atopic bronchial asthma and atopic dermatitis: ABA – atopic bronchial asthma, AD – atopic dermatitis. At the x-axis: CD20 – B lymphocytes; CD72 – B lymphocytes primed with antigen; mIgM – lymphocytes carrying surface immunoglobulin M; mIgG – lymphocytes carrying surface immunoglobulin G; CD38 are plasma cell precursors. At the y-axis – the relative number of peripheral blood lymphocytes, %

Обнаруживается повышение количества В-лимфоцитов (CD20⁺-клетки), примированных антигеном В-лимфоцитов (CD72⁺-клетки), числа лимфоцитов mIgM⁺ и mIgG⁺, а также предшественников плазматических клеток (CD38⁺-лимфоциты). Приведенные результаты показывают, что атопическая бронхиальная астма и атопический дерматит характеризуются сходными изменениями в численности субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови, что свидетельствует о наличии некоторого общего имму-

нопатологического процесса в организме атопических пациентов [8–10].

Полученные данные (см. рис. 2) демонстрируют, что дифференцировочный процесс в В-лимфоцитах направлен в сторону образования предшественников плазматических клеток (CD38⁺-лимфоциты), количество которых увеличивается до (13,76 ± 0,55)% у больных атопической бронхиальной астмой и (19,40 ± 1,14)% у больных атопическим дерматитом по сравнению с контролем (7,33 ± 0,52)%.

В основе повышения численности всех исследованных популяций В-клеток лежит развернутый активационный процесс, сопровождающийся нарушением активационного апоптоза [10]. Увеличение численности всех исследованных субпопуляций В-лимфоцитов, найденное при обострении atopических заболеваний, свидетельствует о высокой выживаемости В-лимфоцитов в ходе пролиферативного процесса в организме atopических пациентов и направленности дифференцировочного процесса в В-клеточном звене иммунной системы на образование плазматических клеток, способных развивать высокоинтенсивный синтез IgE. Можно обоснованно утверждать, что в В-клеточном звене иммунной системы развиваются два параллельных процесса, вызывающих образование повышенного количества плазматических клеток. В основе увеличенной численности всех исследованных популяций В-лимфоцитов лежит нарушение активационного апоптоза лимфоцитов, а повышение их выживаемости обусловлено высоким уровнем внутриклеточного цАМФ [8, 11]. Механизм нарушения экспрессии рецептора активационного апоптоза в лимфоцитах atopических пациентов не установлен, но можно предполагать, что его причиной является образование определенных микроРНК [12]. Повышение уровня внутриклеточного цАМФ и высокая выживаемость лимфоцитов у больных atopическими заболеваниями могут быть вызваны

также действием аллергических цитокинов IL-4, IL-33, TSLP [13].

Согласно данным, полученным в последнее время, ключевая роль в экспрессии генома, кодирующего аллергические цитокины, принадлежит внутриклеточному белку MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), который участвует в передаче сигнала от TLRs на внутриклеточные структуры. Особенностью белка MyD88 является его высокая скорость обновления. Ингибирование базальной аутофагии в макрофагах увеличивает время жизни MyD88 в цитозоле и вызывает экспрессию генома с последующим синтезом воспалительных цитокинов [14]. Сложные для лизосомального гидролиза антигены вызывают в клетках эпителия активацию генома и синтез аллергических цитокинов. Культивирование эпителиальных клеток T84 с овалбумином, в который ввели дополнительные ковалентные связи с помощью малонового диальдегида (МДА), индуцирует повышенную секрецию этими клетками воспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-25, IL-33, TSLP и TNF α) [15]. На основании этих результатов можно предположить, что запуск секреции клетками эпителия воздухоносных путей аллергических цитокинов обусловлен прямым взаимодействием TLRs эпителия с МДА модифицированными патогенами, собственными белками организма или димеризацией TLRs под влиянием МДА.



Рис. 3. Схема «порочного круга» в клетках бронхиального эпителия: АДМА – асимметричный диметиларгинин, TLRs – toll-like рецепторы

Fig. 3. The “vicious cycle” in the cells of the bronchial epithelium: ADMA – asymmetric dimethylarginine, TLRs – toll-like receptors

Мы предполагаем, что в клетках эпителия действует «порочный круг», ведущий к повышению экспрессии TLRs (см. рис. 3). Первичное воспаление эпителия вызывает повреждение клеток и активацию аутофагии. При этом в клетках эпителия образуется асимметричный диметиларгинин (АДМА). Образование АДМА вызывает снижение активности аргиназы, повышение концентрации внутриклеточного аргинина, увеличение образования оксида азота (NO) и, как следствие, образование токсичного пероксинитрита (NO_3^-), вызывающего дополнительное повреждение слоя эпителиальных клеток. Репаративные процессы в клетках эпителия активируют путь синтеза биогенных полиаминов, в котором из аргинина образуется орнитин, а затем путресцин, спермин и спермидин. Конечный продукт пути синтеза биогенных полиаминов – спермидин – является мощным активатором аутофагии. Этот процесс, с одной стороны, увеличивает синтез клеточных белков и, в том числе, TLRs. С другой стороны, повышается уровень образования АДМА, так как единственный доказанный путь образования этого эндогенного ингибитора аргиназы – гидролиз клеточных белков, в которые включен модифицированный аргинин.

Повышенный уровень аутофагии, найденный при атопических заболеваниях в лимфоцитах и эпителиальных клетках, надо заметить, недостаточен для полноценного гидролиза молекул патогенов. Поэтому приходится признать, что увеличение интенсивности аутофагии в эпителиальных клетках при ее относительной функциональной недостаточности – процесс, лежащий в основе атопии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность полученных результатов позволяет сформулировать гипотезу о взаимодействии врожденного и адаптивного иммунитета при воспалении, сопровождающем течение атопических заболеваний.

Первичное повреждение эпителиальных клеток активирует в них аутофагию в течение продолжительного времени, происходит накопление АДМА, ингибирование активности аргиназы и увеличение образования спермидина, являющегося стимулятором аутофагии. Интенсивный процесс аутофагии вызывает увеличение синтеза и экспрессию распознающих рецепторов врожденного иммунитета (TLRs) в клетках эпителия. Конечный продукт перекисного окисления липидов МДА вызывает образование ковалентных связей между субъединицами TLRs, что служит сигнала-

лом к интернализации этих рецепторов. Димеры TLRs медленно гидролизуются, и в их внутриклеточной части формируется NF-κB-активирующий комплекс, центральное место в котором занимает белок MyD88. В клетках эпителия главный транскрипционный фактор NF-κB активирует экспрессию генов, кодирующих синтез и секрецию аллергических цитокинов IL-33, TSLP, а также IL-4, регулирующего рост и дифференцировку В-лимфоцитов. Навивные В-лимфоциты быстро превращаются в плазматические клетки, способные развивать высокоинтенсивный синтез IgE после контактных взаимодействий с антигенпрезентирующими клетками и поступления ростостимулирующих сигналов со стороны IL-33, TSLP, а также IL-4.

Описанная модель иммунопатогенеза атопии показывает, что аргиназа и МДА – не только важные эндогенные регуляторы иммунной системы, отвечающие за иммунологическую реактивность, как мы описывали в обзорной статье [16], но и участники функциональной перестройки эпителия при атопии. Таким образом, главный путь иммунопатогенеза атопических заболеваний представляет патологическое функциональное взаимодействие эпителиальных клеток и В-лимфоцитов периферической крови.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hammad H., Chieppa M., Perros F., Willart M.A., Germain R.N., Lambrecht B.N. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* 2009; 15 (4): 410–416. DOI: 10.1038/nm.1946.
2. Ребриков Д.В. (ред.). NSG. Высокопроизводительное секвенирование. М.: БИНОМ, 2014: 234. [Rebrikov D.V. (red.). NSG. High throughput sequencing technologies. Moscow: BINOM Publ., 2014: 234 (in Russ.)].
3. Sánchez-Zaucó N., Del Río-Navarro B., Gallardo-Casas C., Del Río-Chivardi J., Muriel-Vizcaino R., Rivera-Pazos C., Huerta-Yepez S., Cruz-Lopez M., Maldonado-Bernal C. High expression of Toll-like receptors 2 and 9 and Th1/Th2 cytokines profile in obese asthmatic children. *Allergy Asthma Proc.* 2014; 35 (3): 34–41. DOI: 10.2500/aap.2014.35.3749.
4. Tsybikov N.N., Petrisheva I., Fefelova E.V., Kuznik B., Magen E. Expression of TLR2 and TLR4 on peripheral blood monocytes during exacerbation of atopic dermatitis. *Allergy Asthma Proc.* 2015; 36 (6): e140–145. DOI: 10.2500/aap.2015.36.3901.
5. Ruprecht C.R., Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36 (4): 810–816.
6. Manjarrez-Orduco N., Moreno-García M.E., Fink K., Santos-Argumedo L. CD38 cross-linking enhances

- TLR-induced B cell proliferation but decreases IgM plasma cell differentiation. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37 (2): 358–367.
7. Cayrol C., Girard J.P. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 2014; 31: 31–37. DOI: 10.1016/j.coi.2014.09.004.
 8. Poryadin G.V., Zhuravleva N.E., Salmasi J.M., Kazimirsky A.N., Semenova L.Y., Polner S.A., Chervinskaya T.A. Immunological mechanisms of recovery from an acute stage in patients with atopic bronchial asthma. *Russ. J. Immunol.* 2002; 7 (3): 259–264 (in Russ.).
 9. Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Алиева З.О., Казимирский А.Н. Характеристика поверхностных рецепторов лимфоцитов крови больных atopическим дерматитом. *Аллергология и иммунология.* 2004; 5 (1) 54–70. [Salmasi Zh.M., Poryadin G.V., Aliyeva Z.O., Kazimirsky A.N. Features of the surface receptors of blood lymphocytes in patients with atopic dermatitis. *Allergologiya i immunologiya.* 2004; 5 (1): 54–70 (in Russ.)].
 10. Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Семенова Л.Ю. Иммунопатогенез формирования atopических заболеваний. *Бюллетень сибирской медицины.* 2017; 16 (4): 233–241. [Poryadin G.V. Salmasi Zh.M. Kazimirsky A.N. Semenova L.Yu. Immunopathogenesis of the formation of atopical diseases. *Bulletin Siberian Medicine.* 2017; 16 (4) 233–241 (in Russ.)].
 11. Polumuri S.K., Jayakar G.G., Shirey K.A., Roberts Z.J., Perkins D.J., Pitha P.M., Vogel S.N. Transcriptional regulation of murine IL-33 by TLR and non-TLR agonists. *J. Immunol.* 2012; 189 (1): 50–60. DOI: 10.4049/jimmunol.1003554.
 12. Li B., Sun M., Gao F., Liu W., Yang Y., Liu H., Cheng Y., Liu C., Cai J. Up-regulated expression of miR-23a/b targeted the pro-apoptotic Fas in radiation-induced thymic lymphoma. *Cell Physiol. Biochem.* 2013; 32 (6): 1729–1740. DOI: 10.1159/000356607.
 13. Futamura K., Orihara K., Hashimoto N., Morita H., Fukuda S., Sagara H., Matsumoto K., Tomita Y., Saito H., Matsuda A. beta-2-Adrenoceptor agonists enhance cytokine-induced release of thymic stromal lymphopoietin by lung tissue cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2010; 152 (4): 353–361. DOI: 10.1159/000288288.
 14. Into T., Horie T., Inomata M., Gohda J., Inoue J.I., Murakami Y., Niida S. Basal autophagy prevents auto-activation or enhancement of inflammatory signals by targeting monomeric MyD88. *Sci. Rep.* 2017; Apr. 21, 7 (1): 1009. DOI: 10.1038/s41598-017-01246-w.
 15. Nikolić J., Nešić A., Čavić M., Đorđević N., Anđelković U., Atanasković-Marković M., Drakulić B., Gavrović-Jankulović M. Effect of malondialdehyde on the ovalbumin structure and its interactions with T84 epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2017; Feb. 1861 (2): 126–134. DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.11.021.
 16. Kazimirskii A.N., Poryadin G.V., Salmasi Z.M., Semenova L.Y. Endogenous Regulators of the Immune System (sCD100, Malonic Dialdehyde, and Arginase). *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018; Mar. 164 (5): 693–700. DOI: 10.1007/s10517-018-4061-6.

Вклад авторов

Казимирский А.Н. – определение экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител (ИКО). Выделение лимфоцитов в градиенте плотности фикола-верографина, оценка жизнеспособности лимфоцитов после выделения их из крови. Выявление общевоспалительных изменений в экспрессии CD-антигенов и формулирование концепции atopии. Салмаси Ж.М. – определение экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител. Выделение лимфоцитов в градиенте плотности фикола-верографина, оценка жизнеспособности лимфоцитов после выделения их из крови. Выявление изменений в экспрессии CD-антигенов, характерных только для atopии, и формулирование концепции исследования. Порядин Г.В. – выявление неспецифических изменений в популяционном и субпопуляционном составе лимфоцитов крови, характерных для любых видов воспаления, и определение специфических изменений, характерных для atopии. Формулирование общей концепции atopии. Свитич О.А. – описание результатов по экспрессии генов *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9*. Брагвадзе Б.Г. – постановка полимеразной цепной реакции в режиме реального

Authors contribution

Kazimirsky A.N. – determination of the expression of surface receptors on lymphocytes by indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies (IKO, Russia). Isolation of lymphocytes in ficoll-verografin density gradient, evaluation of lymphocyte viability after their isolation from blood. Detection of inflammatory changes in CD antigen expression and formulation of the concept of atopy. Salmasi Zh.M. – determination of the expression of surface receptors on lymphocytes by indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies. Isolation of lymphocytes in ficoll-verografin density gradient, evaluation of lymphocyte viability after their isolation from blood. Detection of inflammatory changes in CD antigen expression that are typical of atopy only and formulation of the research concept. Poryadin G.V. – identification of nonspecific changes in the population and subpopulation composition of blood lymphocytes, characteristic of any types of inflammation, and the definition of specific changes characteristic of atopy. Formulation of the general concept of atopy. Svitich O.A. – a description of the results on the expression of *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* genes. Bragvadze B.G. – production of polymerase chain reaction in real time to determine the expression of *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* genes and enzyme immunoassay to

времени для определения экспрессии генов *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* и иммуноферментного анализа для определения концентрации цитокинов. Алексеева А.А. – подбор пациентов с бронхиальной астмой и здоровых доноров, их клиническая характеристика. Ганковская Л.В. – анализ результатов по определению цитокинов и разработка общей концепции исследования.

determine the concentration of cytokines. Alekseeva A.A. – selection of patients with asthma and healthy donors, their clinical characteristics. Gankovskaya L.V. – analysis of the results on the determination of cytokines and the development of a general research concept.

Сведения об авторах

Казимирский Александр Николаевич, д-р биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник, отдел молекулярных технологий, РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва. ORCID iD 0000-0002-3079-4089.

Салмаси Жан Мустафаевич, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии, РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва. ORCID iD 0000-001-8524-0019.

Порядин Геннадий Васильевич, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии, РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-2010-3296.

Свитич Оксана Анатольевна, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, кафедра иммунологии, РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-1757-8389.

Брагвадзе Белла Гелаевна, ассистент, кафедра иммунологии, РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-0870-6000.

Алексеева Анна Александровна, канд. мед. наук, зав. отделением восстановительного лечения детей с аллергическими болезнями и заболеваниями органов дыхания, ННП ЦЗД, г. Москва.

Ганковская Людмила Викторовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой иммунологии, РНИМУ имени Н.И. Пирогова, г. Москва. ORCID iD 0000-0003-1271-3078.

✉ **Казимирский Александр Николаевич**, e-mail: alnica10@mail.ru.

Authors information

Kazimirsky Alexander N., Associate Professor, DBSc, Leading Researcher, Department of Molecular Technologies, RNRMU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-3079-4089.

Salmasi Jean M., DM, Professor, Head of the Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, RNRMU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-001-8524-0019.

Poryadin Gennady V., DM, Professor, Corresponding Member of Russian Academy Science, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, RNRMU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2010-3296.

Svitich Oksana A., DM, Professor, Corresponding Member of Russian Academy Science, Department of Immunology, RNRMU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1757-8389.

Bragvadze Bella G., Assistant, Department of Immunology, RNRMU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0870-6000.

Alekseeva Anna A., PhD, Head of the Department of Rehabilitation Treatment of Children with Allergic and Respiratory Diseases, NSPCCH, Moscow, Russian Federation.

Gankovskaya Lyudmila V., DM, Professor, Head of the Department of Immunology, RNRMU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-1271-3078.

✉ **Kazimirsky Alexander N.**, e-mail: alnica10@mail.ru

Received 07.10.2018

Accepted 17.12.2018

Поступила в редакцию 07.10.2018

Подписана в печать 17.12.2018