

На правах рукописи

**Гайсина Алина Рашидовна**

**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-33 В ПАТОГЕНЕЗЕ  
АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ  
И ЕЕ ВИРУС-ИНДУЦИРОВАННЫХ ОБОСТРЕНИЯХ**

03.03.03 - иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук  
Шиловский Игорь Петрович

**Официальные оппоненты:**

**Топтыгина Анна Павловна**, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории цитокинов Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;

**Шмаров Максим Михайлович**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства.

Защита диссертации состоится «24» октября 2018 года в 14-00 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.017.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте <http://nrcii.ru/dissertatsionnyy-sovet/zashchity-dissertatsiy/>

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук

Г. О. Гудима

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Бронхиальная астма (БА) является гетерогенным заболеванием, характеризующимся хроническим воспалением дыхательных путей. Атопическая БА является серьезной медико-социальной проблемой для мирового здравоохранения вследствие стремительного роста распространенности в последние десятилетия. По данным Всемирной организации здравоохранения количество больных с диагнозом «бронхиальная астма» в настоящий момент в мире составляет порядка 300 миллионов человек. Число заболевших в различных странах мира может достигать 18%. В России заболеваемость БА колеблется от 3 до 5% населения, что существенно сказывается на экономике государства ввиду значительных затрат на ее лечение. Смертность от БА достигает 300 000 человек в год. При этом основной причиной смертности при БА (до 80% случаев) являются обострения, вызванные острыми респираторными вирусными инфекциями дыхательных путей. Самые распространенные из них - это риновирус и респираторно-синцитиальный вирус (РСВ).

Существующие на сегодняшний день методы лечения БА эффективны лишь в 40-60% случаев. Для лечения бронхиальной астмы на сегодняшний день применяют терапию, основанную на использовании глюкокортикостероидов,  $\beta$ -адреномиметиков и ингибиторов лейкотриенов. Эти препараты купируют обострение путем подавления симптомов БА, но не влияют на первичные звенья патогенеза. Для лечения аллергической БА успешно применяют аллерген-специфическую иммунотерапию, которая является единственным патогенетическим видом лечения, влияющим на саму природу заболевания. Однако применение АСИТ возможно только для пациентов с установленной причиной развития аллергии, и сопряжено с опасностью возникновения местных и системных реакций на проводимое лечение. Кроме того, применение АСИТ затруднительно для пациентов, сенсibilизированных сразу ко множеству разных аллергенов. В связи с вышесказанным активно ведется поиск новых способов терапии БА и ее вирус-

индуцированных обострений. Однако этот поиск невозможен без детального изучения молекулярных механизмов указанных патологий.

Имеющиеся на сегодняшний день экспериментальные данные указывают на определяющую роль Th2-цитокинов (IL-4, IL-5 и IL-13) в формировании проявлений БА, что привело к созданию так называемого анти-цитокинового подхода к терапии данного заболевания. Для лечения бронхиальной астмы активно разрабатываются препараты на основе моноклональных антител, направленных против указанных цитокинов. Кроме того, продолжается активный поиск новых, ранее не изученных генов, участвующих в патогенезе БА. В результате недавних исследований было показано, что ген, кодирующий интерлейкин-33 (IL-33), вовлечен в формирование признаков БА. В частности, нокаут данного гена или нейтрализация IL-33 с использованием моноклональных антител приводила к нивелированию экспериментальной БА у мышей. Наоборот, сверхэкспрессия данного гена или введение мышам экзогенного IL-33 индуцировали признаки заболевания. Также было установлено, что одними из главных продуцентов IL-33 являются эпителиальные клетки, в том числе бронхов, что позволяет предположить возможное участие данного цитокина в индукции обострений БА, вызванных респираторными вирусами, воздействующих именно на бронхиальный эпителий. Однако, в мировой научной литературе отсутствует достаточное количество сведений о роли данного интерлейкина в вирус-индуцированных обострениях бронхиальной астмы.

**Целью работы** являлось изучение роли IL-33 при аллергической бронхиальной астме и ее вирус-индуцированных обострениях.

**В задачи исследования** входило:

1. С использованием экспериментальной модели аллергической бронхиальной астмы у мышей изучить изменение уровня экспрессии гена *il-33* в ткани легких и клетках бронхоальвеолярного лаважа;
2. Разработать модель вирус-индуцированных обострений аллергической бронхиальной астмы у мышей с использованием респираторно-

- синцитиального вируса, как одного из самых актуальных вирусных патогенов;
3. Изучить изменение экспрессии гена *il-33* в ткани легких мышей при вирус-индуцированных обострениях бронхиальной астмы;
  4. Методом проточной цитометрии изучить изменение внутриклеточной экспрессии IL-33 в клетках нелейкоцитарного происхождения при вирус-индуцированных обострениях бронхиальной астмы;
  5. Изучить влияние подавления гена *il-33* посредством молекул миРНК на степень проявления признаков вирус-индуцированных обострений бронхиальной астмы у мышей.

**Научная новизна.** В ходе настоящей работы создана модель вирус-индуцированных обострений бронхиальной астмы на мышах с использованием респираторно-синцитиального вируса. В данной экспериментальной модели у мышей регистрировались основные проявления аллергического воспаления дыхательных путей, а также происходила репликация вируса в ткани легких, что свидетельствует о ее адекватности.

С использованием созданной модели впервые показано, что именно инфекция респираторно-синцитиальным вирусом, а не аллергическое воспаление, индуцирует экспрессию гена *il-33* в ткани легких мышей. Кроме того, впервые проведены исследования по изучению эффекта, вызванного подавлением экспрессии гена *il-33* в ткани легких посредством молекул миРНК, на проявления признаков вирус-индуцированных обострений бронхиальной астмы у мышей. Показано, что, несмотря на активацию *il-33* в ответ на РСВ-инфекцию, блокирование экспрессии *il-33* приводит к нивелированию признаков аллергической бронхиальной астмы, но не влияет на течение инфекции. Учитывая это, IL-33 можно отнести к перспективным биомаркерам для создания новых способов терапии данной патологии.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в возможности использования ее результатов при дальнейшем изучении механизмов

обострений бронхиальной астмы, вызванных респираторными вирусными инфекциями.

Практическая значимость работы состоит в: 1) создании экспериментальной модели вирус-индуцированных обострений бронхиальной астмы, которая может использоваться для оценки эффективности различных противоастматических и противовирусных лекарственных препаратов; 2) создании научного задела для фармакологической разработки миРНК против IL-33, как препарата для лечения вирус-индуцированных обострений бронхиальной астмы; 3) получении нескольких эффективных молекул миРНК против гена *il-33*, которые могут использоваться для нокдауна экспрессии данного гена в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы были представлены на 34-м (6-10 июня 2015 г., Барселона, Испания), 35-м (11-15 июня 2016 г., Вена, Австрия), 36-м (17-21 июня 2017 г., Хельсинки, Финляндия) конгрессах Европейской Академии Аллергологии и Клинической Иммунологии, а также на международной конференции Всемирной аллергологической организации (Сеул, 2015 г).

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов, изложение результатов и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц, 26 рисунков. Список литературы включает 183 источника.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Аллерген, культура вируса.** Для индукции аллергического ответа в работе использовали модельный аллерген - овальбумин (OVA). Для инфицирования лабораторных животных использовали респираторно-синцитиальный вирус штамм A2 в дозе  $5 \times 10^6$  ТЦД<sub>50</sub>/мышь, предоставленный ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова.

**Проектирование молекул миРНК против гена *il-33* и определение их биологической активности *in vitro*.** Для проектирования молекул миРНК

использовали программу OligoWalk. Синтез молекул миРНК осуществлялся компанией ООО «ДНК-Технология». Биологическую оценку миРНК проводили путем трансфекции модельных клеток L929 (фибробласты мыши) с последующим определением активности гена *il-33* методом ПЦР-РВ.

**Лабораторные животные.** В экспериментах использовали самок мышей линии BALB/c весом 20-22 г., в возрасте 6-8 недель, полученных из питомника «Столбовая» ГУНЦ БМТ РАМН.

**Протоколы экспериментов *in vivo*.** Для моделирования экспериментальной БА у мышей, смесь овальбумина с гидроокисью алюминия вводили внутривентрально трехкратно с интервалом в 2 недели (на 0, 14, 28 дни эксперимента) в объеме 0,5 мл (растворитель – фосфатно-солевой буфер) в дозе 20 мкг/мышь ОВА и 2 мг/мышь адьюванта – гидроокиси алюминия. Через две недели после последней иммунизации, 10 мг/мл раствор ОВА вводили интраназально трехкратно по 50 мкл/мышь (Рисунок 1А).

Для моделирования вирусных обострений бронхиальной астмы на фоне развития признаков БА интраназально однократно вводили РСВ в объеме 50 мкл (растворитель – ФСБ) в дозе  $5 \times 10^6$  ТЦД50/мышь на 38 день эксперимента (Рисунок 1Б).

Для изучения молекул миРНК на экспериментальной модели вирус-индуцированных обострений БА, раствор миРНК, направленных против гена *gfp* (использовался в качестве отрицательного контроля) и *il-33* вводили интраназально шестикратно (с 38 по 42 дни эксперимента) в объеме 50 мкл (растворитель - вода, очищенная от РНКаз), в дозе 35 мкг/мышь/сутки (суммарная доза составила 175 мкг/мышь). Введение миРНК в дни инфицирования вирусом и провокации аллергеном проводили не менее, чем за два часа до манипуляций (Рисунок 1В).

Для оценки параметров воспаления дыхательных путей, во всех протоколах был собран следующий материал: 1) периферическая кровь для оценки уровня сывороточных аллерген-специфических антител методом иммуноферментного анализа; 2) бронхоальвеолярный лаваж для оценки

изменения клеточного состава методом световой микроскопии; 3) левое легкое для гистологического анализа; 4) правое легкое для измерения уровня цитокинов методом ПЦР-РВ.

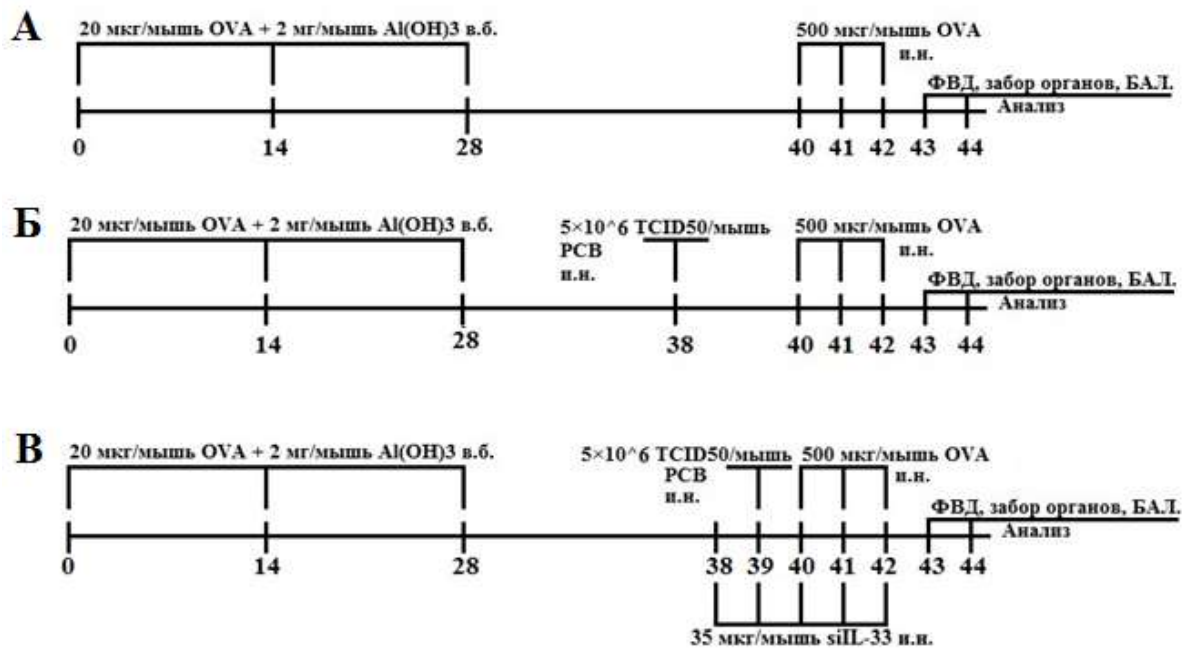


Рисунок 1. Схемы экспериментальных протоколов.

А - Схема экспериментального протокола по моделированию бронхиальной астмы у мышей. Б - Схема экспериментального протокола по моделированию обострений бронхиальной астмы, вызванных вирусной инфекцией у мышей. В - Экспериментальный протокол изучения молекул миРНК, направленных против гена *il-33*, на модели вирус-индуцированных обострений БА у мышей.

**Измерение гиперреактивности бронхов** проводили с использованием прибора FinePoint Series NAM Sites Non-Invasive Airway Mechanics (Baxco). Гиперреактивность бронхов определяли при появлении бронхоспазма у модельных мышей, вызванного аэрозольным введением метахолина в возрастающих дозах (6,25, 12,5, 25 мг/мл) по оценке показателя пиковой объемной скорости выдоха - PEF (peak expiratory flow), выражаемого в объеме на единицу времени (л/мин).

**Иммуноферментный анализ** для определения уровня аллерген-специфических антител классов IgE, IgG1 и IgG2a в сыворотке крови использовали коммерческие ИФА-наборы (BD) в соответствии с рекомендациями производителя.



**Бронхоальвеолярный лаваж** (БАЛ) получали путем промывки легких полной средой RPMI 1640 в объеме 1 мл. Клеточность БАЛ оценивали с помощью гемоцитометра Abacus (Junior Vet). Мазок БАЛ на предметном стекле окрашивали азуром и эозином и оценивали клеточный состав с помощью иммерсионной световой микроскопии.

**Гистологическое исследование** микропрепаратов легких мышей осуществляли на световом микроскопе. Микротомированием парафиновых блоков получали срезы легких толщиной 4-6 мкм. Полученные препараты окрашивали гематоксилин-эозином. Помимо качественной, проводили полуколичественную оценку признаков воспаления и ремоделирования бронхов, по методике, описанной в [Ennis, Cassidy, Mahon, 2005].

**Экспрессия целевых генов** в ткани легких оценивалась методом ПЦР в реальном времени с использованием набора реактивов «Синтол» (Россия). Предварительное выделение РНК из ткани легких осуществляли с использованием коммерческого набора Rneasy MiniKit (Qiagen), по протоколу, рекомендуемому производителем. Тотальную РНК использовали в реакции обратной транскрипции для получения библиотеки кДНК с применением набора «Синтол» (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

**Цитофлюориметрическое исследование клеток**, выделенных из ткани легкого, осуществляли на проточном цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) в стандартном режиме. Анализировали не менее  $10^5$  клеток, попадающих в гейт лимфоцитов. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Благодаря развитию молекулярно-биологических методов, а также появлению технологии создания трансгенных животных (чаще всего мышей), например, дефектных по интересующему гену-мишени, удалось выделить несколько групп факторов, участвующих в патогенезе БА. К ним относятся цитокины (IL-4, -5, -9, -13 и т.д.), и их рецепторы (IL4Ra, IL5R, IL9R и др.),

транскрипционные факторы (GATA3, STAT6), поверхностные белки клетки (ICAM1), факторы сигнальной трансдукции и киназы (SYK и др).

Открытие и активное изучение биологических свойств цитокина IL-33 позволило предположить, что данный цитокин, наравне с ранее изученными IL-4, -5 и -13, может быть вовлечен в патогенез аллергической БА. В связи с этим объектом изучения являлся IL-33, роль которого рассматривалась в патогенезе развития бронхиальной астмы, а также ее обострений, вызванных вирусной инфекцией.

### **Изучение профиля экспрессии гена *il-33* при индукции экспериментальной бронхиальной астмы у мышей**

На основании полученных данных установлено, что введение модельного аллергена – овалбумина по предложенной схеме (Рисунок 1А) приводит к развитию основных признаков аллергической бронхиальной астмы, а именно: к заметной продукции аллерген-специфических антител класса IgE в сыворотке крови, развитию гиперреактивности бронхов и воспалительному процессу в ткани легких, сопряженному с инфильтрацией эозинофилов. Также на основании ПЦР-РВ анализа подтверждено, что признаки аллергической БА у мышей развиваются по Th2-зависимому механизму, как это наблюдается в клинической практике: экспрессия генов основных Th2-цитокинов *il-4* и *il-13* в клетках БАЛ статистически значимо повышалась, в то время как экспрессия *ifn $\gamma$* , который является маркером Th1-иммунного ответа, оставалась неизменной.

Далее на модели аллергической БА у мышей методом количественной ПЦР была изучена экспрессия гена *il-33* и показан ее незначительный рост (в 1,3 раза в сравнении с интактными мышами) в клетках БАЛ (Рисунок 2А). Поскольку основными клетками-продуцентами IL-33, на основании данных литературы, являются эпителиальные клетки, доля которых в БАЛ составляет менее 5%, то был изучен уровень экспрессии гена *il-33* в гомогенатах цельных легких (Рисунок 2Б). Показано, что уровень экспрессии гена *il-33* в гомогенатах легких возрастал в 1,6 раза при индукции БА, по сравнению с

интактными мышами, что может быть свидетельством вклада структурных клеток (эпителиальные и эндотелиальные клетки) в экспрессию *il-33* в легких.

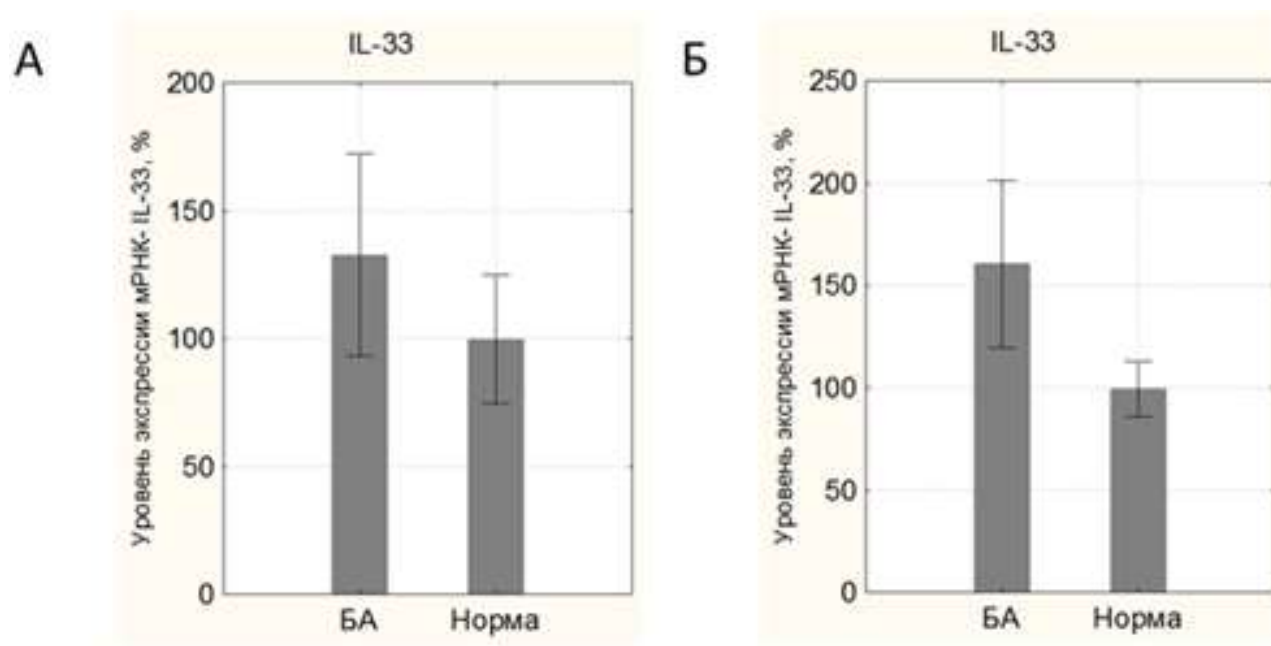


Рисунок 2. Уровень экспрессии IL-33 в БАЛ (А) и ткани легких (Б) на модели БА у мышей.

### **Разработка модели РСВ-индуцированных обострений аллергической бронхиальной астмы у мышей**

Экспериментальный протокол моделирования вирус-индуцированных обострений БА представлен на рисунке 1Б. Создание данной модели требует подтверждения у экспериментальных животных, как наличия продуктивной вирусной инфекции, так и развития аллергического воспаления в легких. Одним из основных критериев, свидетельствующим о наличии инфекции, является снижение массы тела мышей после инфицирования вирусом. Регулярное измерение массы тела, показало, что мыши, получавшие РСВ, быстро теряли вес (до 15%) уже через 2-3 суток после инфекции (Рисунок 3А). Еще одним доказательством инфекционного процесса является наличие вирусной РНК в ткани легких. Для ее выявления использовали метод РТ-ПЦР. Данным методом показано, что в легких инфицированных мышей количество копий вирусной РНК находилось в пределах 1-5 мкл копий на 1 г ткани легких (Рисунок 3Б).

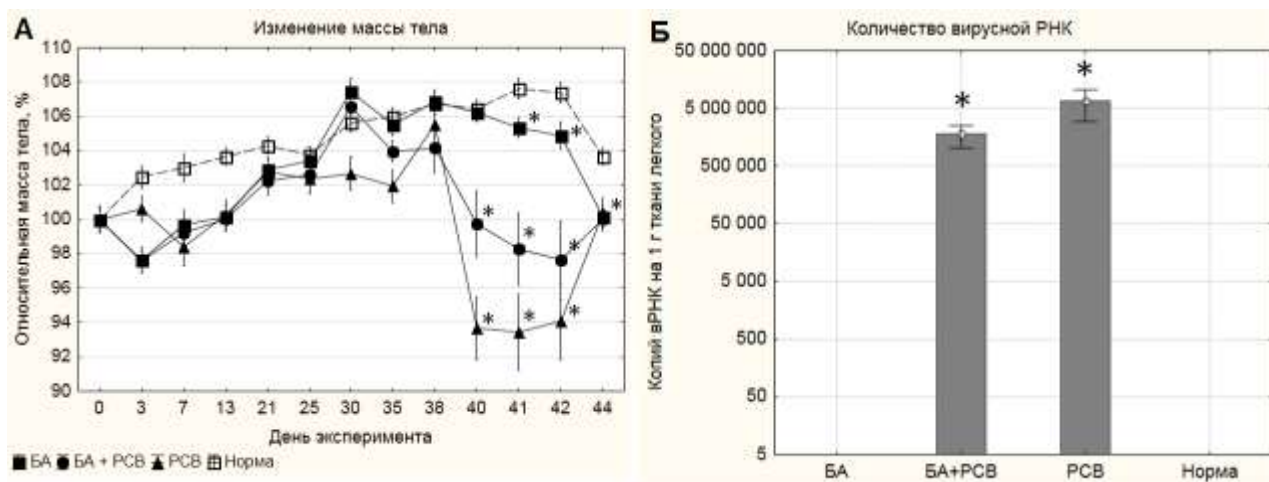


Рисунок 3. Динамика изменения массы тела (А) и количество копий вРНК в гомогенатах легких (Б).

\* - статистически значимо отличается от группы «Норма» ( $p < 0,05$ );  $n = 10$ .

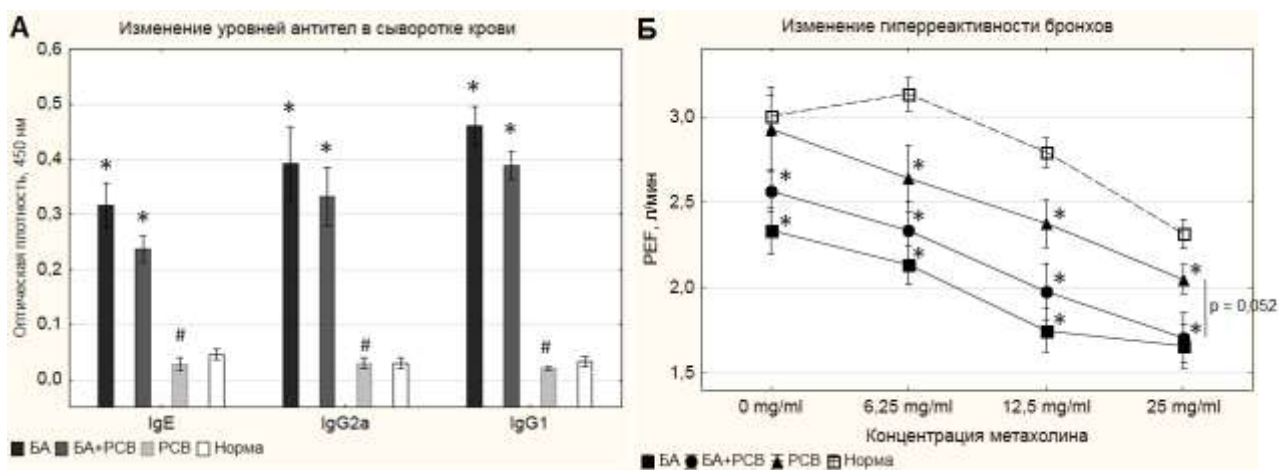


Рисунок 4. Развитие аллергического процесса у экспериментальных животных А – Уровень ОВА-специфических антител в сыворотке крови. Б – Оценка гиперреактивности дыхательных путей.

\* - статистически значимо отличается от группы «Норма» ( $p < 0,05$ );  $n = 10$ .

# - статистически значимо отличается от группы «БА+РСВ» ( $p < 0,05$ );  $n = 10$ .

Статистически значимое повышение уровня аллерген-специфических IgE- и IgG1-антител в сыворотке крови животных, сенсibilизированных овальбумином, является важным критерием аллергического процесса. Кроме того, показано, что уровни аллерген-специфических IgG2a-антител, являющихся маркерами Th1-иммунного ответа, не изменялось после инфицирования мышей вирусом, что свидетельствует об отсутствии влияния РСВ на системный Th1/Th2-баланс у животных, сенсibilизированных к аллергену (Рисунок 4А). Помимо этого, мы вновь регистрировали изменения в гиперреактивности дыхательных путей у животных, сенсibilизированных

аллергеном. РСВ-инфекция, по результатам исследования, также вносит вклад в развитие гиперреактивности, но менее значимое, чем аллергическое воспаление (Рисунок 4Б).

Важным критерием при оценке воспаления дыхательных путей является оценка патологических изменений в ткани легких. Методом проточной цитометрии показано, что при моделировании экспериментальной БА происходил рост числа эозинофилов, Т- и В-клеток; при этом у животных, подвергшихся моделированию РСВ-индуцированных обострений БА, происходила более выраженная инфильтрация указанных клеток (Рисунок 5).

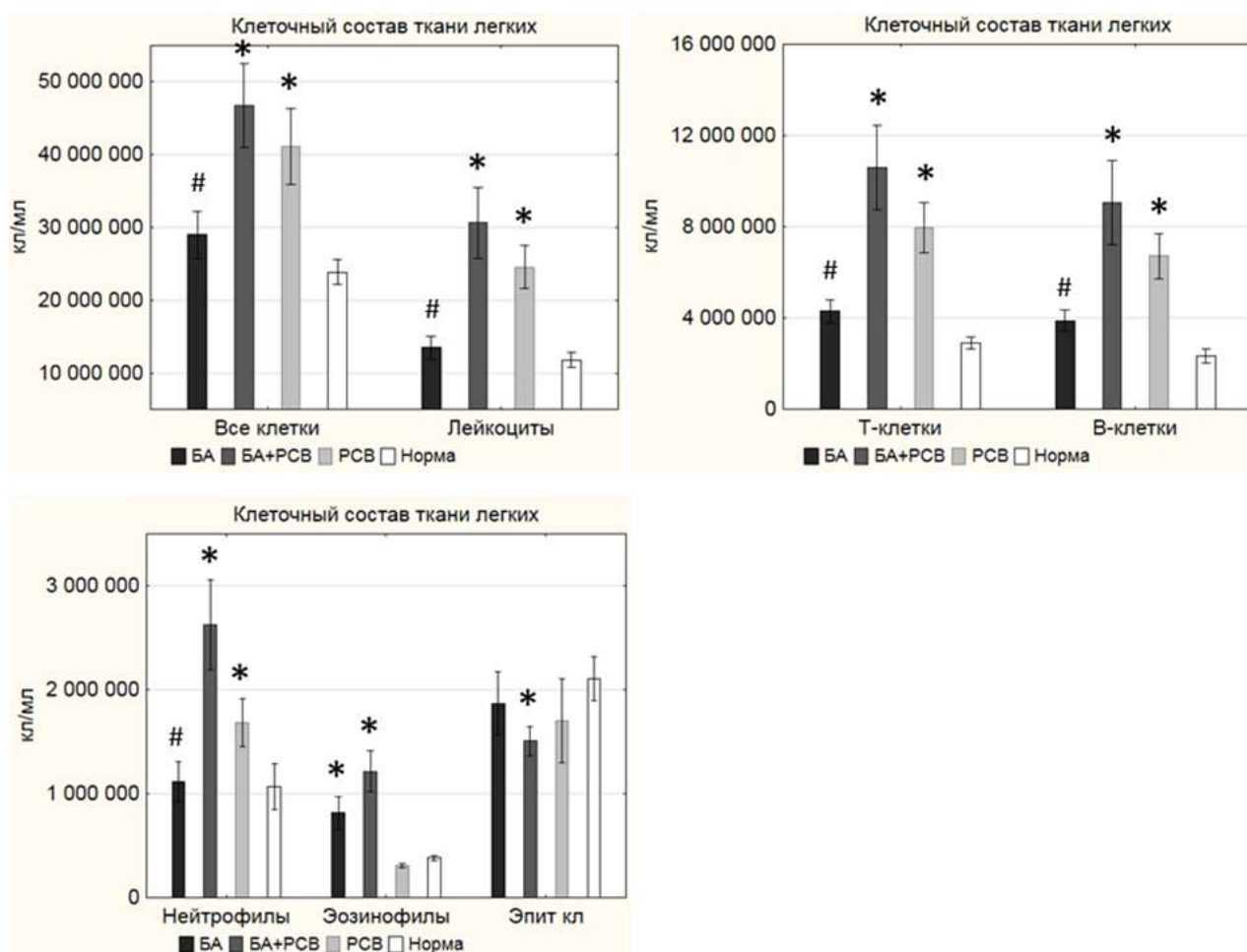


Рисунок 5. Клеточный состав ткани легких.

\* - статистически значимо отличается от группы «Норма» ( $p < 0,05$ );  $n = 10$ .

# - статистически значимо отличается от группы «БА+РСВ» ( $p < 0,05$ );  $n = 10$ .

Кроме того, у животных с РСВ-индуцированными обострениями БА гистологический анализ выявил более выраженные нарушения эпителия (слизистая метаплазия и гиперплазия эпителия) и более значительный рост числа лимфоцитов, чем у мышей с экспериментальной БА (Рисунок 6).

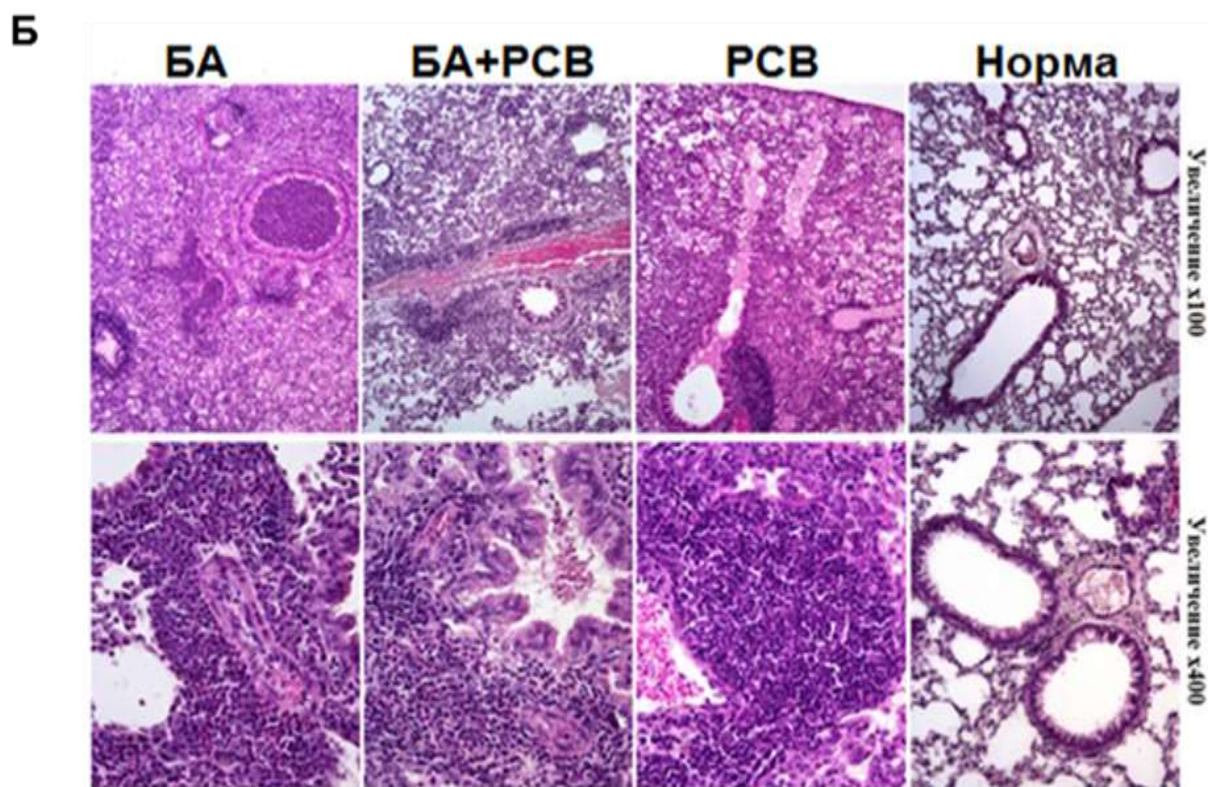
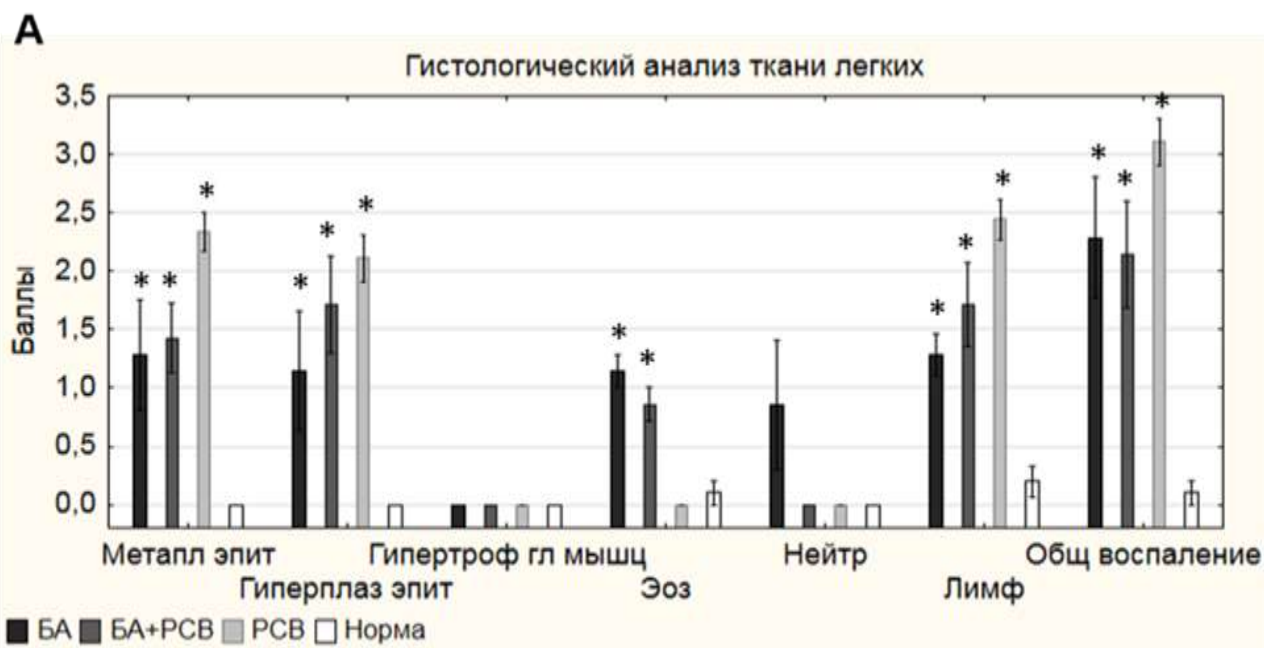


Рисунок 6. Гистологическое исследование ткани легких

А – Показатели воспаления в баллах. Б - Микрофотографии ткани легких.

\* - статистически значимо отличается от группы «Норма» ( $p < 0,05$ );  $n = 10$ .

### Изучение экспрессии гена *il-33* при РСВ-индуцированных обострениях аллергической бронхиальной астмы у мышей.

С использованием созданной модели обострений аллергической БА, вызванных РСВ-инфекцией мы показали, что вирусная инфекция, а не аллергическое воспаление вносило наибольший вклад в индукцию экспрессии

гена *il-33* в легких. Об этом свидетельствуют данные количественной ПЦР, показавшие увеличение экспрессии данного гена в гомогенатах цельного лёгкого в 2 раза в группе «РСВ» при сравнении с мышами группы «Норма». Животные с экспериментальной БА демонстрировали лишь 1,4-кратное статистически не значимое увеличение экспрессии *il-33*. В то же время при РСВ-инфекции на фоне развития экспериментальной БА, экспрессия *il-33* в гомогенатах легких статистически значимо повышалась в 1,6 раза по сравнению с группой «Норма» (Рисунок 7).

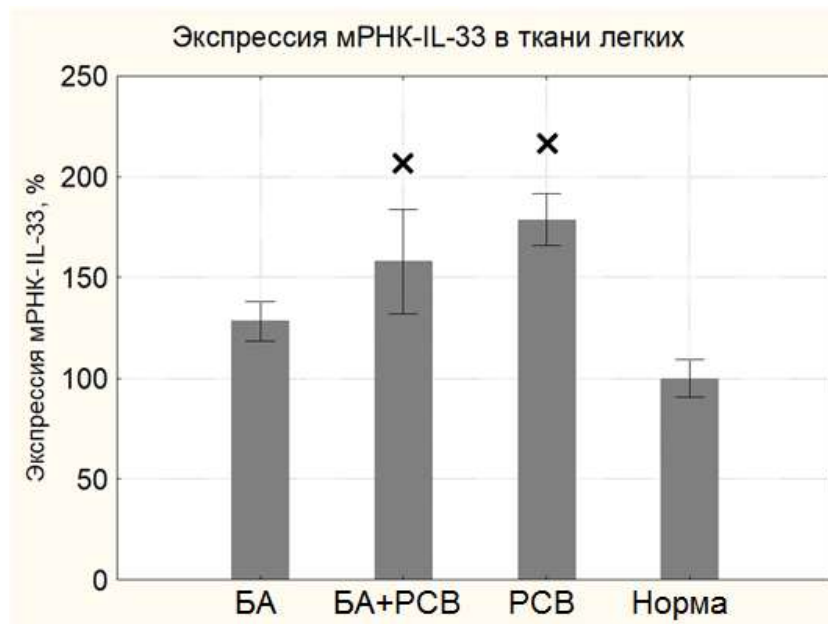


Рисунок 7. Уровень экспрессии *il-33* в ткани легких.

× - статистически значимо отличается от группы «Норма» ( $p < 0,05$ );  $n = 10$ .

Методом проточной цитометрии нами была изучена внутриклеточная экспрессия белка IL-33 в клетках не лейкоцитарного происхождения ( $CD45^-$ -клетки), выделенных из ткани легких экспериментальных животных. Данный анализ показал, что, несмотря на увеличение уровня экспрессии гена *il-33* в легких мышей, инфицированных РСВ, происходит статистически значимое снижение количества внутриклеточного белка IL-33 в клетках не лейкоцитарного происхождения по сравнению с показателями группы «Норма». При этом в эпителиальных клетках ( $CD45^-CD324^+$ ) легочной ткани снижение уровня внутриклеточного IL-33 не происходило, а снижение экспрессии белка IL-33 в общей популяции  $CD45^-$ -клеток было обусловлено в основном его снижением в субпопуляции  $CD45^-CD324^-$ -клеток (Таблица 1).

Несовпадение результатов по уровню экспрессии мРНК и внутриклеточного белка IL-33 в группах мышей, инфицированных РСВ, может быть объяснено выходом данного цитокина во внеклеточное пространство вследствие апоптоза и/или некроза IL-33-продуцирующих клеток под действием именно вируса, а не аллергена. Это предположение подтверждается полученными нами данными, демонстрирующими, что в группах мышей, подвергшихся РСВ-инфекции, статистически значимо снижается количество эпителиальных клеток, считающихся основными продуцентами IL-33 (Рисунок 5). Не стоит исключать и возможность секреции IL-33 из жизнеспособных клеток.

Таблица 1. Оценка уровня экспрессии внутриклеточного IL-33 по MFI в клетках не лейкоцитарного происхождения, выделенных из легких мышей.

\* - статистически значимо отличается от группы «Норма» ( $p < 0,05$ );  $n = 7$ .

Группа	CD45 <sup>-</sup>	CD45 <sup>-</sup> CD324 <sup>+</sup> Эпителиальные кл.	CD45 <sup>-</sup> CD324 <sup>-</sup> Не эпителиальные кл.
БА	752	1410	675
БА+РСВ	686*	1442	628
РСВ	636*	1335	586*
Норма	794	1504	693

Таким образом, мы показали, что аллергическая бронхиальная астма существенно не влияет на экспрессию IL-33 в ткани легких. Скорее всего, это объясняется тем, что аллерген не воздействует на эпителиальные клетки, являющиеся основными продуцентами IL-33. Развитие же признаков астмы протекает по Th2-зависимому механизму и регулируется IL-4, IL-5 и IL-13. В то же время, вирусная инфекция значительно усиливает экспрессию IL-33, что скорее всего связано с воздействием патогена на эпителиальные клетки дыхательных путей, которые в свою очередь высвобождают IL-33 в результате некроза. Одновременное воздействие вируса и аллергена приводит к значительному повышению экспрессии *il-33* в ткани легких, тем самым способствуя более выраженному воспалительному процессу в легких, что проявляется в усиленной инфильтрации ткани Т-клетками, В-клетками, нейтрофилами и эозинофилами (Рисунок 8).



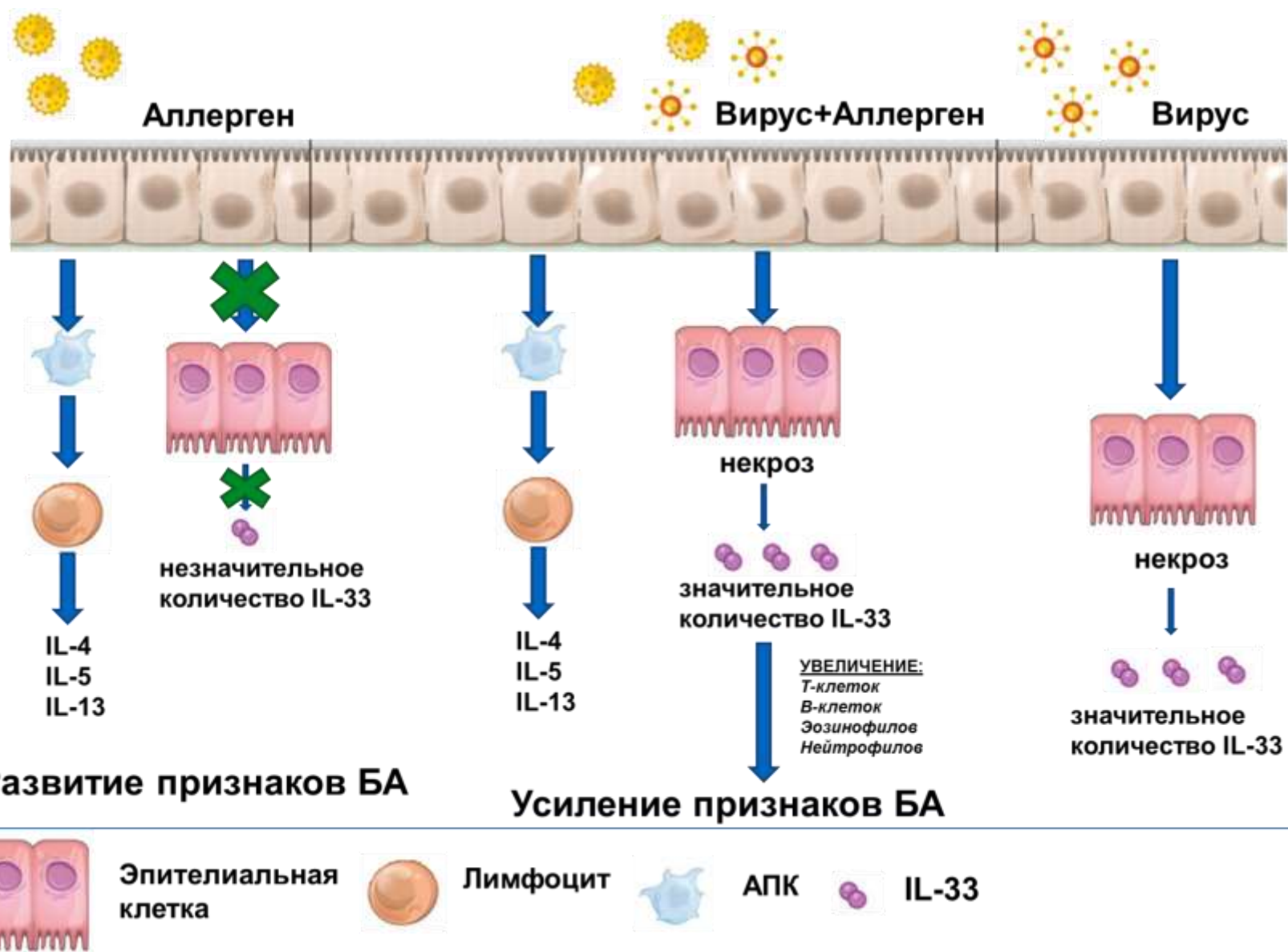


Рисунок 8. Роль IL-33 в развитии БА, вирусной инфекции, вирус-индуцированных обострениях БА.

## **Подавление гена *il-33* с использованием молекул миРНК на модели обострений БА, вызванных РСВ-инфекцией у мышей**

Технология интерференции РНК, позволяющая подавлять активность генов с известной нуклеотидной последовательностью, широко применяется в молекулярной биологии с целью выяснения роли целевых генов в биологических процессах. Поэтому для оценки роли IL-33 в патогенезе РСВ-индуцированных обострений БА мы использовали миРНК. С помощью программного обеспечения OligoWalk было спроектировано 150 вариантов молекул миРНК против гена *il-33* мыши, из которых для исследования *in vitro* было отобрано 5 вариантов. Проектировали такие молекулы миРНК, таким образом чтобы максимально охватить различные участки гена *il-33*, а также, чтобы избежать потенциальных off-target эффектов.

Изучение специфической биологической активности синтезированных молекул миРНК осуществляли с использованием культуры клеток фибробластов мыши - L929, т.к. она конститутивно экспрессирует IL-33. В результате изучения биологической активности молекул миРНК было показано, что после трансфекции в клетки L929, 4 из 5-ти вариантов (siIL-33-198, siIL-33-465, siIL-33-554 и siIL-33-767) статистически значимо снижали экспрессию целевого гена на: 50%, 67%, 67% и 41%, соответственно. Максимальную биологическую активность проявляли варианты siIL-33-465 и siIL-33-554, подавляя *il-33* мыши в среднем в три раза. По результатам данных исследований для последующей работы *in vivo* выбран вариант siIL-33-465, поскольку он обеспечивал более стабильное подавление экспрессии целевого гена в различных независимых повторях.

Спроектированные молекулы миРНК против гена *il-33* вводили мышам интраназально на фоне развития у них РСВ-индуцированных обострений БА. Протокол эксперимента описан в разделе «материалы и методы» (Рисунок 1В). В результате введения молекул миРНК в суммарной дозе 175 мкг/мышь, было показано, что экспрессия целевого цитокина статистически значимо снижалась в 2 раза по сравнению с животными, получавшими неспецифические молекулы миРНК - siGFP, что доказывает сиквенс-специфическое действие на целевой ген

(Рисунок 9). При том, было показано, что подавление *il-33* не влияет на показатели течения вирусной инфекции, такие как изменение массы тела экспериментальных животных и накопление вирусной РНК в ткани легких. Следует, однако, отметить, что мыши из опытной группы, обработанные молекулами миРНК, направленными к гену *il-33* имели тенденцию к более быстрому восстановлению веса тела в сравнении с животными из группы, получавшей неспецифические миРНК. Введение миРНК против *il-33* также не оказывало влияние на уровень сывороточных антител в сыворотке крови (Рисунок 10А).

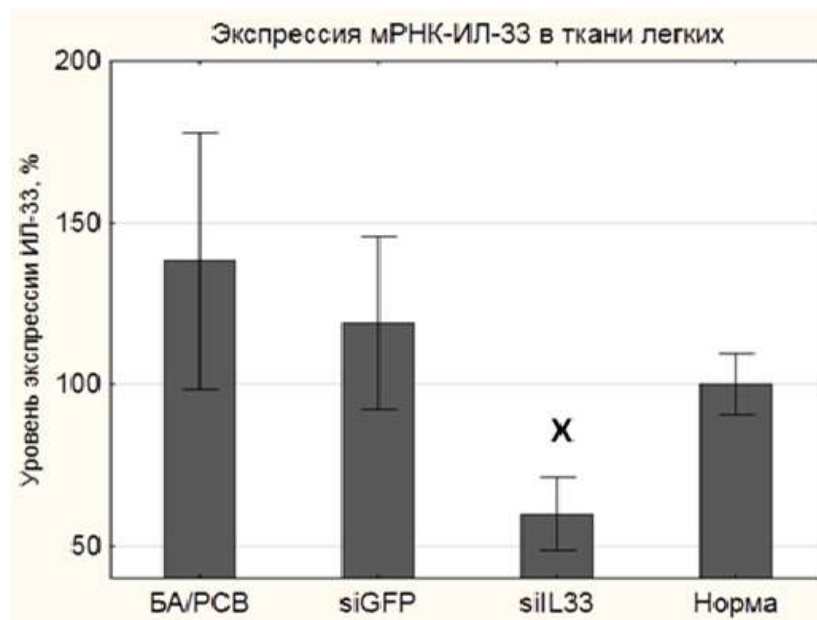


Рисунок 9. Изменение уровня экспрессии *il-33* в ткани легких.

× - статистически значимо отличается от siGFP ( $p < 0,05$ );  $n = 10$ .

Изучение гиперреактивности бронхов выявило тенденцию к восстановлению функции дыхания у животных, получавших миРНК против *il-33*, в сравнении с мышами, получавшими контрольную siGFP, что выразалось в 15-20%-ом повышении пиковой скорости выдоха (Рисунок 10Б). Изучение клеточного состава БАЛ показало двукратное статистически значимое снижение инфильтрации клеток у животных получавших миРНК, направленных к гену *il-33*, в сравнении с животными получавшими siGFP; при этом снижалось количественно лимфоцитов (с 237 тыс. кл/мл до 89 тыс кл/мл) и эозинофилов (4,3 тыс. кл/мл - 0 кл/мл) (Рисунок 10В). Детально основные показатели воспаления в легких оценивали по результатам гистологического анализа. Согласно проведенному анализу, РСВ-

инфекция мышей на фоне развития аллергического воспаления приводит к развитию выраженного воспаления, в частности к слизистой метаплазии и гиперплазии эпителия бронхов, а также к инфильтрации лимфоцитов и эозинофилов. Однако интраназальное введение мышам молекул миРНК против гена *il-33* приводило к статистически значимому двукратному снижению уровня воспаления в легких и таких признаков воспаления как слизистая метаплазия (на 30%) и гиперплазия эпителия бронхов (на 50%), а также инфильтрация лимфоцитами на 45% по сравнению с животными, получавшими контрольную миРНК - siGFP (Рисунок 11А,Б).

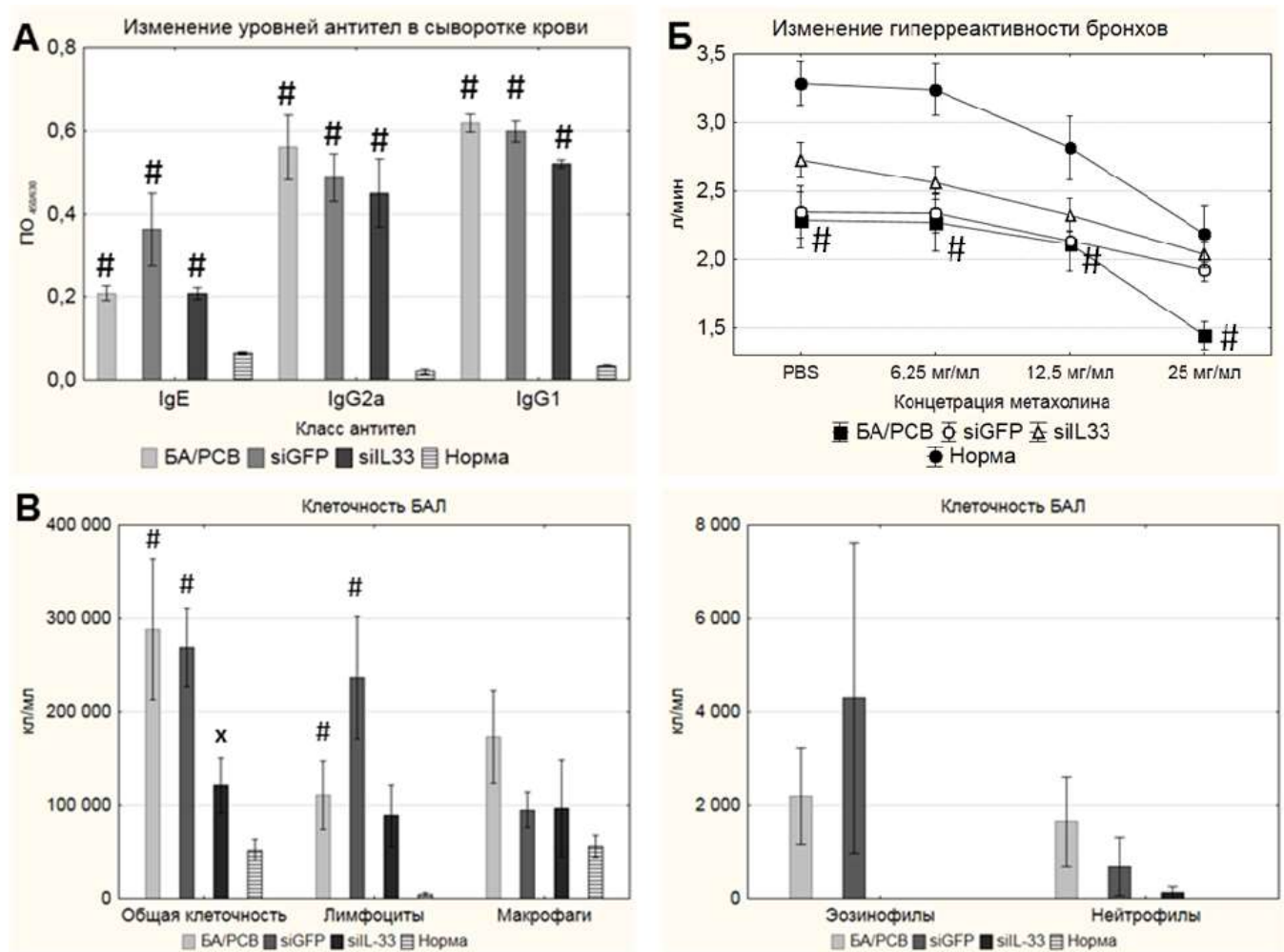


Рисунок 10. Подавление признаков БА посредством молекул миРНК против *il-33*.

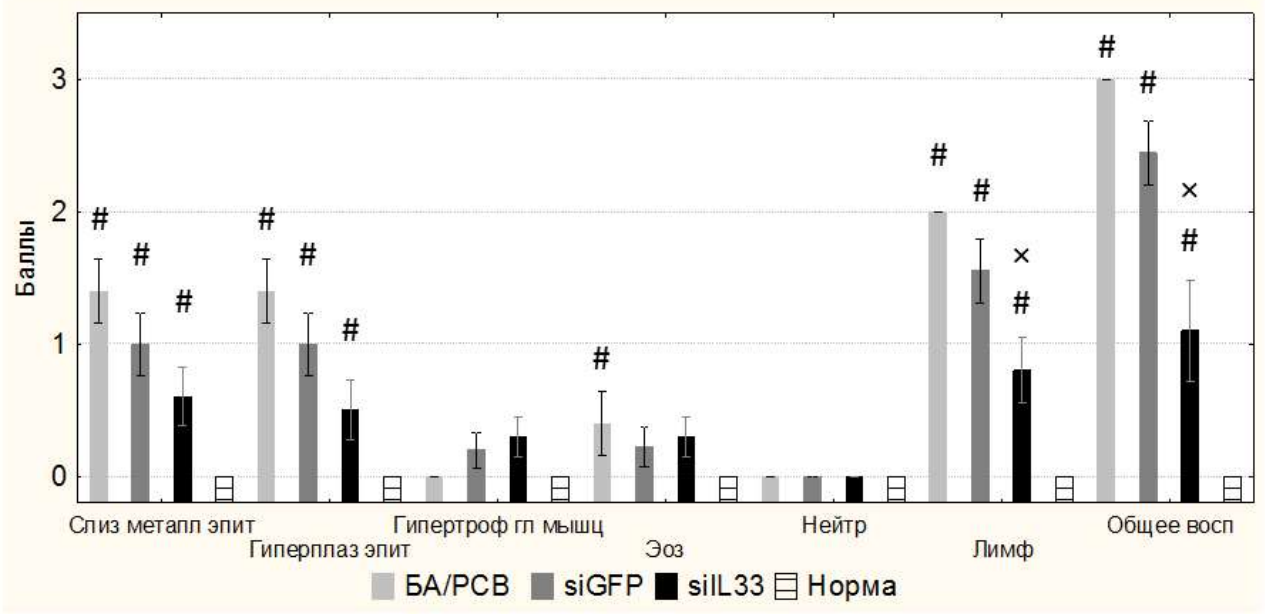
А - Изменение уровня аллерген-специфических антител в сыворотке крови.

Б - Изменение гиперреактивности дыхательных путей.

# - статистически значимо отличается от группы «Норма» ( $p < 0,05$ );  $n = 10$ .

× - статистически значимо отличается от группы «siGFP» ( $p < 0,05$ );  $n = 10$ .

**А**



**Б**

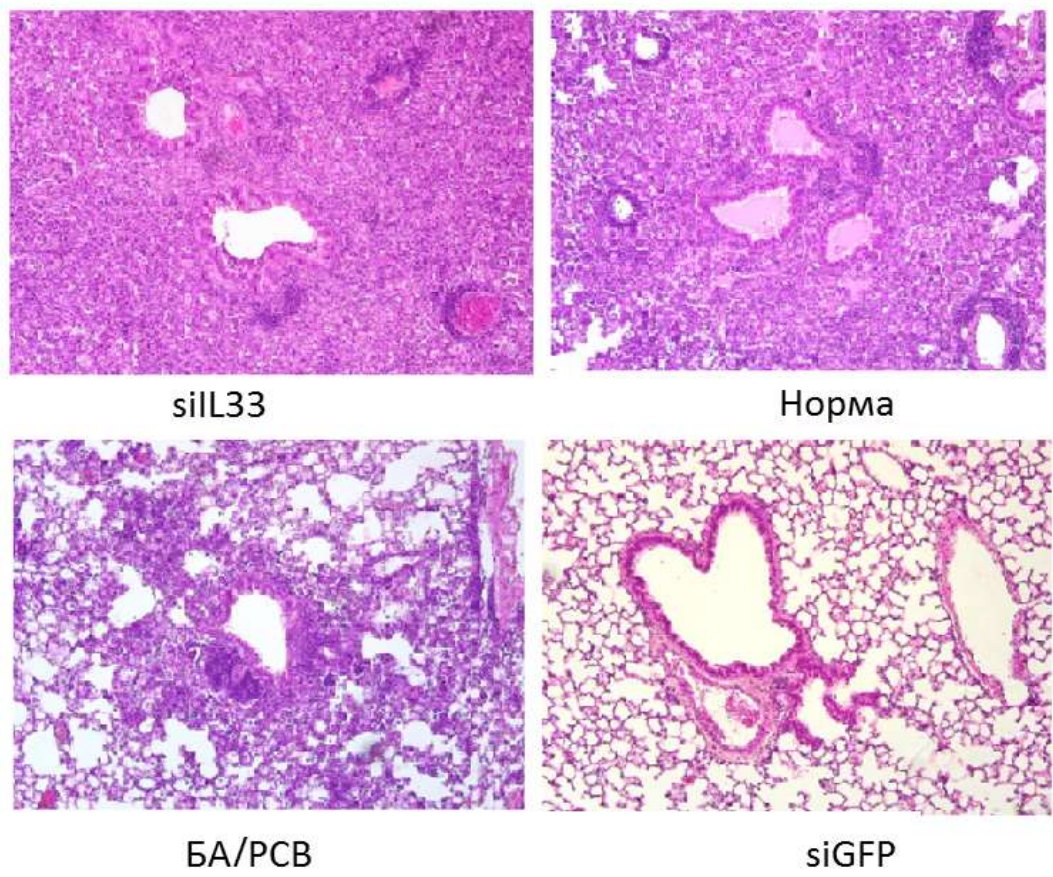


Рисунок 11. Гистологическое исследование ткани легких мышей.  
 А - Выраженность признаков воспаления в баллах. Б - Микрофотографии ткани легких, увеличение x400.  
 # - статистически значимо отличается от группы «Норма» ( $p < 0,05$ );  $n = 10$ .  
 × - статистически значимо отличается от siGFP ( $p < 0,05$ );  $n = 10$ .

## ВЫВОДЫ

1. IL-33 играет важную роль в патогенезе вирус-индуцированных обострений бронхиальной астмы; экспрессируясь эпителиальными клетками и лимфоцитами в легких в ответ на РСВ-инфекцию, он способствует более тяжелому воспалению дыхательных путей.
2. Индукция экспериментальной аллергической бронхиальной астмы у мышей не вызывает значимого повышения уровня экспрессии гена *il-33* в клетках бронхоальвеолярного лаважа и ткани легких.
3. Создана экспериментальная модель РСВ-индуцированных обострений бронхиальной астмы у мышей, которая характеризовалась: наличием вирусной РНК в легких, снижением массы тела на 10%; повышенным лимфоцитарно-эозинофильным воспалением легких у мышей.
4. Методом проточной цитометрии подтверждено, что клетками-продуцентами IL-33 являются клетки нелейкоцитарного происхождения, в частности, эпителиальные клетки; при этом внутриклеточная экспрессия IL-33 в эпителиальных клетках не изменялась под действием вируса, аллергена или обоих этих факторов.
5. Экспрессия гена *il-33* в ткани легких мышей повышается (в 1,6 - 1,8 раза) после РСВ-инфекции или РСВ-индуцированных обострений бронхиальной астмы, но не при развитии экспериментальной бронхиальной астмы.
6. Интразальное введение молекул миРНК, направленных к гену *il-33*, на модели бронхиальной астмы, осложненной РСВ-инфекцией у мышей, снижает экспрессию *il-33* в 2 раза по сравнению с животными, получавшими неспецифическую миРНК, что в свою очередь, оказывает влияние на проявления аллергической бронхиальной астмы:
  - а. происходит снижение гиперреактивности бронхов на 20%;
  - б. наблюдается двухкратное снижение инфильтрации клеток (лимфоцитов и эозинофилов) в БАЛ;

- с. отмечается существенное уменьшение степени воспаления в легких, выражающееся в снижении уровня слизистой метаплазии (на 30%), гиперплазии эпителия (на 50%) и инфильтрации лимфоцитов (на 45%);
7. Подавление экспрессии гена *il-33* молекулами миРНК на модели бронхиальной астмы, осложненной РСВ-инфекцией у мышей не оказывает влияние на течение вирусной инфекции.
8. IL-33 можно рассматривать как перспективную биомишень для создания новых средств для терапии вирус-индуцированных обострений бронхиальной астмы.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Шиловский И.П., Бабахин А.А., Прозорова М.С., **Гайсина А.Р.**, Камышников О.Ю., Хаитов М.Р. Разработка безадыювантной модели хронической бронхиальной астмы у мышей. Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8. № 3 (17). С. 638-641.
2. Shilovsky I.P., Babakhin A.A., Shershakova N.N., Kamyshnikov O.Y., Sundukova M.S., **Gaisina A.R.**, Laskin A.A., Buzuk A.M., Ivanova A.S., Khaitov M.R. Adjuvant and adjuvant-free protocols produce similar phenotypes of allergic asthma in mice. Current Trends in Immunology. 2015. Т. 16. С. 79-91.
3. Шиловский И.П., Сундукова М.С., **Гайсина А.Р.**, Ласкин А.А., Смирнов В.В., Бабахин А.А., Хаитов М.Р. Интерференция РНК - новый подход в терапии аллергической бронхиальной астмы (обзор). Экспериментальная и клиническая фармакология. 2016. Т. 79. № 4. С. 35-44.
4. **Гайсина А.Р.**, Шиловский И.П., Никонова А.А., Сундукова М.С., Зарецкая М.А., Смирнов В.В., Камышников О.Ю., Иванова А.С., Хаитов М.Р. Изучение баланса Th1/Th2-иммунного ответа при вирус-индуцированных

осложнениях бронхиальной астмы. Российский аллергологический журнал. 2016. № 4-5. С. 20-28.

5. Хаитов М.Р., **Гайсина А.Р.**, Шиловский И.П., Смирнов В.В., Раменская Г.В., Никонова А.А., Хаитов Р.М. Роль интерлейкина 33 в патогенезе бронхиальной астмы. Новые экспериментальные данные. Биохимия. 2018. №1. С. 19-33.