

ВЛАДИВОСТОКСКИЙ ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ
ДЫХАНИЯ» – НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МЕДИЦИНСКОЙ КЛИМАТОЛОГИИ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ

На правах рукописи

Сидлецкая Каролина Андреевна

**ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ Т-ХЕЛПЕРНОГО
ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ
БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

3.3.3 – Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Татьяна Исааковна Виткина

Научный консультант:
доктор медицинских наук
Татьяна Александровна Гвозденко

Благовещенск – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ Т-ХЕЛПЕРНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
1.1. Роль Т-хелперного иммунного ответа в патогенезе хронической обструктивной болезни легких	12
1.2. Особенности сигнальных путей в формировании Т-хелперного иммунного ответа при хронической обструктивной болезни легких	17
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1. Характеристика обследуемых.....	33
2.2. Иммунологические методы.....	35
2.2.1. Анализ сывороточного цитокинового профиля.....	35
2.2.2. Анализ уровня поверхностной экспрессии рецепторов на циркулирующих Т-хелперах.....	36
2.3. Статистические методы.....	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	40
3.1. Выделение типов Т-хелперного иммунного ответа при хронической обструктивной болезни легких	40
3.2. Содержание Т-регуляторных клеток в крови при хронической обструктивной болезни легких в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа.....	48
3.3. Экспрессия рецептора к интерлейкину-6, толл-подобных рецепторов 2 и 4 типа на мембране CD4 ⁺ -клеток крови при хронической обструктивной болезни легких в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа.....	51

3.4. Взаимосвязи между сывороточным цитокиновым профилем и экспрессией рецептора к интерлейкину-6, толл-подобных рецепторов 2 и 4 типа на мембране CD4 ⁺ -клеток крови при хронической обструктивной болезни легких.....	58
3.5. Определение диагностической значимости уровней экспрессии рецептора к интерлейкину-6 и толл-подобного рецептора 2 типа на мембране CD4 ⁺ -клеток крови при хронической обструктивной болезни легких	64
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	68
ВЫВОДЫ.....	82
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	87

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) на сегодняшний день является одним из наиболее распространенных хронических воспалительных заболеваний нижних дыхательных путей и относится к глобальным медико-социальным проблемам [71, 110]. Опасения специалистов всего мира в отношении ХОБЛ обусловлены не только широкой распространенностью заболевания, но и высоким риском серьезных осложнений, приводящих к инвалидизации и смерти трудоспособного населения [17, 121].

Согласно современным представлениям, ХОБЛ является гетерогенным заболеванием, которое включает в себя несколько патофизиологических фенотипов [15, 28, 37]. Выявление клеточно-молекулярных механизмов, лежащих в их основе, позволит улучшить методы диагностики и лечения ХОБЛ.

В настоящее время ХОБЛ часто рассматривают с позиции системного воспалительного процесса, который выражается в сверхактивации циркулирующих иммунокомпетентных клеток и увеличении концентрации провоспалительных медиаторов в крови [116]. Ключевую роль в развитии системного воспалительного процесса при ХОБЛ играют Т-хелперные (Th или $CD4^+$) лимфоциты. Каждая из Th субпопуляций формирует свой иммунорегуляторный путь, характеризующийся определенным цитокиновым профилем и набором эффекторных клеток [141]. Предполагается, что клинические и функциональные различия при ХОБЛ связаны с поляризацией $CD4^+$ -клеток [149, 170]. Условия для формирования Th иммунного ответа создает цитокиновое микроокружение. Важную роль в этом процессе играет интерлейкин-6 (IL-6) [63, 86]. Согласно данным литературы, повышенный системный уровень данного цитокина является отличительной чертой ХОБЛ и коррелирует со степенью воспаления нижних дыхательных путей и снижением легочной функции [34]. Известно, что функциональные свойства IL-6 меняются в зависимости от

рецепторного пути. В связи с этим изучение молекулярных механизмов действия IL-6 при ХОБЛ вызывает большой интерес.

Важными участниками системного воспалительного процесса при заболеваниях органов дыхания являются толл-подобные рецепторы (TLR). Активация этих рецепторов на эпителиальных и иммунных клетках способствует инициации и поддержанию воспалительного ответа через запуск каскада реакций, приводящих к продуцированию провоспалительных цитокинов [57]. Последние данные показали, что TLR сигналинг участвует в перепозиционировании типа Th иммунного ответа при различных патологиях [96, 126, 178]. Основными толл-подобными рецепторами, ответственными за поддержание воспалительных реакций при ХОБЛ, являются TLR2 и TLR4 [77, 117, 185].

Существующие данные о типах Th иммунного ответа при ХОБЛ довольно противоречивы и проблема формирования иммунной реактивности при этой патологии требует более глубокого изучения. Таким образом, изучение регуляторных механизмов, опосредующих развитие Th иммунного ответа при ХОБЛ, является актуальным направлением исследований на сегодняшний день.

Степень разработанности темы исследования

Результаты исследований, посвященных выявлению типа Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ, неоднозначны. В ряде исследований у пациентов с ХОБЛ было показано преобладание Th1 типа иммунного ответа, характеризующегося высокой концентрацией интерферона- γ (IFN- γ) и активацией альвеолярных макрофагов [73, 113, 153]. Существуют данные, свидетельствующие о Th2 типе воспаления, ассоциированном с высоким уровнем IL-4 и повышенным числом эозинофилов [163]. Результаты исследований последних лет указывают на усиление Th17 иммунного ответа при этом заболевании, что сопровождается повышением концентрации IL-17 и инфильтрацией легочной ткани нейтрофилами, которые разрушают паренхиму легких протеолитическими ферментами и тем самым снижают их функцию [55, 181]. Кроме того, есть свидетельства о нарушении

баланса между провоспалительными Th17-клетками и Т-регуляторными клетками (Treg), подавляющими воспалительный процесс при ХОБЛ [87, 104, 173].

Имеющиеся на сегодняшний день немногочисленные результаты исследований экспрессии рецептора к IL-6 (IL-6R), TLR2 и TLR4 на иммунных клетках крови довольно противоречивы. Данные об экспрессии этих рецепторов на циркулирующих Т-хелперах при ХОБЛ отсутствуют. Вклад сигнальных путей, опосредованных данными рецепторами, в развитие Th иммунного ответа при этом заболевании недостаточно изучен.

Цель исследования

Установить роль сигнальных путей интерлейкина-6 и толл-подобных рецепторов в формировании Т-хелперного иммунного ответа при хронической обструктивной болезни легких.

Задачи исследования

1. Определить концентрацию сывороточных цитокинов (IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-21, IFN- γ , фактора некроза опухоли- α (TNF- α), трансформирующего фактора роста- β 1 (TGF- β 1)) и выявить типы Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ разной степени тяжести.
2. Определить содержание Т-регуляторных клеток в крови при ХОБЛ разной степени тяжести в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа.
3. Изучить экспрессию IL-6R, TLR2 и TLR4 на мембране CD4⁺-клеток крови при ХОБЛ разной степени тяжести в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа.
4. Установить корреляционные связи между сывороточным цитокиновым профилем и экспрессией IL-6R, TLR2 и TLR4 на мембране CD4⁺-клеток крови при ХОБЛ разной степени тяжести.
5. Выявить биомаркеры развития системного воспаления при ХОБЛ.

Научная новизна исследования

Выявлено преобладание Th1 и Th17 типов иммунного ответа, поддерживаемых определенным пулом циркулирующих цитокинов, при ХОБЛ стабильного течения. Доказано, что утяжеление течения заболевания ассоциировано с развитием Th17 типа иммунного ответа, который обуславливает пролонгацию врожденного иммунного ответа и хронизацию воспалительного процесса. Установлено нарушение клеточно-опосредованных механизмов иммуносупрессии при ХОБЛ, что связано с конкурентным взаимодействием Treg и Th17 субпопуляций.

Впервые показан механизм формирования Th17 иммунного ответа при ХОБЛ через активацию IL-6R- и TLR2-опосредованных сигнальных путей в периферических CD4⁺-клетках. Выделены патогенетические маркеры прогрессирования ХОБЛ, такие как повышение уровня экспрессии IL-6R и TLR2 на циркулирующих CD4⁺-клетках, и определены пороговые значения данных параметров (>2% CD4⁺CD126⁺-клеток в крови; >1,4% CD4⁺CD282⁺-клеток в крови), превышение которых сопровождается увеличением риска прогрессирования ХОБЛ.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные знания о молекулярно-клеточных механизмах развития Т-хелперного иммунного ответа детализуют представления о системном воспалительном процессе, играющем важную роль в патогенезе ХОБЛ. Установлена роль IL-6, TLR2 и TLR4 сигнальных путей в формировании Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ. Расширены представления о вкладе ингибирования Т-регуляторного звена иммунитета в формирование воспалительного ответа при данном заболевании. Получены новые данные о взаимосвязи экспрессии IL-6R и TLR2 на мембране циркулирующих Т-хелперов с параметрами, характеризующими функциональное состояние органов дыхания (ОФВ1/ФЖЕЛ и ОФВ1), у пациентов с ХОБЛ.

Новые данные послужат основой для теоретического обоснования механизмов развития воспалительного процесса при ХОБЛ и разработки персонифицированного подхода к терапии ХОБЛ, повышения качества прогноза течения этого заболевания, создания целевых лекарственных препаратов. Выявленные в ходе исследования биомаркеры могут быть использованы в качестве дополнительных диагностических критериев при ХОБЛ.

По материалам исследования получено 2 свидетельства о государственной регистрации электронных баз данных. Разработан способ прогнозирования на ранних стадиях хронической обструктивной болезни легких риска прогрессирования заболевания (Патент РФ № RU2740071 от 31.12.2020).

Методы исследования

Настоящее исследование является самостоятельным фрагментом плановой научно-исследовательской работы Владивостокского филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательского института медицинской климатологии и восстановительного лечения (№ гос. регистрации 01201352123). Объектом исследования являлись сывороточные цитокины (IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-21, IFN- γ , TNF- α , TGF- β 1), Т-регуляторные клетки, IL-6R, TLR2 и TLR4 на мембране CD4⁺-клеток в крови пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести стабильного течения. Механизм формирования Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ исследовали на основе оценки сывороточных уровней цитокинов, экспрессии IL-6R, TLR2 и TLR4 на циркулирующих Т-хелперах и количества Т-регуляторных клеток в периферической крови с использованием высокоточных иммунологических методов – проточной цитофлюориметрии и мультиплексного количественного анализа. Статистическая обработка полученных данных включала оценку значимости различий между изучаемыми показателями, корреляционный анализ и receiver operating characteristic (ROC)-анализ.

Положения, выносимые на защиту

1. Прогрессирование ХОБЛ сопровождается формированием Th17 иммунного ответа, ассоциированного с высокими концентрациями IL-21, IL-6, IL-17A, TGF- β 1 и IL-10 в периферической крови.
2. Поляризация Th17 иммунного ответа происходит за счет усиления активации сигнальных путей, опосредованных толл-подобным рецептором 2 типа и мембраносвязанным рецептором к интерлейкину-6, супрессии сигнального пути мембранного толл-подобного рецептора 4 на Т-хелперах периферической крови и сдвига баланса Th17/Treg субпопуляций.
3. Высокое содержание CD4⁺CD126⁺- и CD4⁺CD282⁺-клеток в крови способствует утяжелению течения ХОБЛ и является биомаркером усиления системного воспалительного процесса при этой патологии.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается проведением всех этапов работы с учетом рекомендаций для медицинских и биологических исследований, использованием современных высокоточных методов исследования, достаточным количеством наблюдений в исследуемых группах, использованием сертифицированного оборудования и реактивов, проведением расчетов с помощью лицензированных программ. Выводы соответствуют поставленным целям и получены в результате комплексного анализа данных.

Основные положения исследования доложены и обсуждены на: региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам (Владивосток, 2015); 20-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2016); XVIII, XIX, XX Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной, профилактической и клинической медицины» (Владивосток, 2017, 2018, 2019); XIV, XVI Тихоокеанском медицинском конгрессе с международным участием (Владивосток,

2017, 2019); XXII, XXIII Международной научной конференции «Онкология – XXI век», VIII, IX Итало-российской научной конференции по онкологии и эндокринной хирургии, XXII, XXIII Международной научной конференции «Здоровье нации – XXI век» (Подгорица, Черногория, 2018, Баку, Азербайджанская Республика, 2019); 7th International Chronic Obstructive Pulmonary Disease Conference (Rome, Italy, 2018); VIII Съезде врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока с международным участием (Благовещенск, 2019); 24th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (Hanoi, Vietnam, 2019); XV Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2020).

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в аналитической обработке современной научной литературы, выполнение методик определения уровней цитокинов и числа CD4⁺-клеток с определенными функциональными маркерами в крови на проточном цитофлюориметре, апробации результатов исследования, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке публикаций по выполненной работе, оформлении текста диссертации.

Публикация результатов исследования

По результатам диссертационного исследования опубликовано 36 печатных работ, 8 в журналах, определенных перечнем Высшей Аттестационной Комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, из них 4 в журналах, входящих в международные базы научного цитирования Web of Science и Scopus. Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований («Аспиранты»), научный проект № 19-315-90029 «Роль Т-хелперных сигнальных путей в прогрессировании хронической обструктивной болезни легких» (2019-2021).

Благодарности

Автор выражает благодарность коллективу лаборатории биомедицинских исследований (заведующая д.б.н. Ю.К. Денисенко), д.б.н., профессору РАН Т.П. Новгородцевой, сотрудникам клинического отделения НИИМКВЛ (заведующая клиническим отделением, к.м.н. Л.А. Белик) за методическую и аналитическую помощь при выполнении диссертационного исследования.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, глав собственных исследований и обсуждения результатов исследования, выводов, списка сокращений и списка литературы. Диссертационное исследование содержит 16 рисунков и 16 таблиц. Список литературы включает 185 источников, из них 159 – зарубежных.

ГЛАВА 1. ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ Т-ХЕЛПЕРНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Роль Т-хелперного иммунного ответа в патогенезе хронической обструктивной болезни легких

В настоящее время хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) относится к широко распространенным хроническим воспалительным заболеваниям нижних дыхательных путей и является серьезной медико-социальной проблемой [71, 110]. По оценкам экспертов, распространенность ХОБЛ в Европе колеблется от 4% до 10% [121]. Согласно результатам популяционных эпидемиологических исследований, проведенных в 12 центральных регионах России, распространенность ХОБЛ среди лиц общей популяции составляет 15-22% [5]. С каждым годом заболеваемость ХОБЛ продолжает расти, что обуславливает необходимость поиска новых эффективных методов диагностики, прогноза течения и подходов к лечению этого заболевания. Кроме того, при ХОБЛ выявлены различия в клинических проявлениях и ответе на терапию, что свидетельствуют о существовании нескольких патофизиологических фенотипов этого заболевания [15, 26, 28, 37, 123]. Принимая во внимание все вышесказанное, можно говорить о том, что изучение клеточно-молекулярных механизмов, лежащих в основе развития ХОБЛ, является важным направлением современных исследований.

ХОБЛ – заболевание, характеризующееся персистирующими респираторными симптомами и ограничением воздушного потока (обструкцией), которые связаны с патологическими изменениями дыхательных путей (ремоделирование) и легких (эмфизема), вызванными вредными частицами или газами [71]. К основным этиологическим факторам ХОБЛ относят курение сигарет и загрязнение воздуха [5, 72, 115].

Ключевым компонентом патогенеза ХОБЛ является воспаление. Длительное раздражение дыхательных путей сигаретным дымом и твердыми взвешенными частицами, как основным патологическим компонентом загрязненного воздуха, в первую очередь оказывает влияние на эпителиальные клетки, нейтрофилы, альвеолярные макрофаги, дендритные клетки и др. В ответ на воздействие они выделяют провоспалительные медиаторы (цитокины и хемокины), тем самым, запуская воспалительную реакцию с привлечением из кровяного русла в легкие клеток как врожденного (нейтрофилов и моноцитов), так и адаптивного иммунитета (Т-лимфоцитов). В свою очередь, эти клетки способствуют дальнейшему развитию воспаления за счет секреции цитокинов и разрушения легочной ткани путем секреции протеолитических ферментов, цитотоксических белков и активных форм кислорода [18, 36, 48]. Таким образом, при ХОБЛ происходит активация адаптивного иммунитета, как результат развития врожденного иммунного ответа в легких [27, 42, 46, 76, 83, 117].

Постоянное воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды приводит к нарушению барьерной функции воспаления, что приводит к его переходу на системный уровень [12, 18, 116]. Системное воспаление характеризуется тотальной воспалительной реактивностью эндотелиоцитов, плазменных и клеточных факторов крови, соединительной ткани, а на заключительных этапах и микроциркуляторными расстройствами в жизненно важных органах и тканях [25]. По мере прогрессирования ХОБЛ интенсивность системной воспалительной реакции возрастает, о чем свидетельствует увеличение уровня провоспалительных медиаторов и активированных иммунных клеток в крови пациентов с данной патологией [20, 116]. Многие специалисты считают, что системное воспаление служит основой для развития сопутствующих заболеваний, не связанных с дыхательной системой, и влияет на развитие коморбидности [2, 14, 91].

Ключевую роль в развитии системного воспаления играют клетки иммунной системы. Среди иммунокомпетентных клеток, вовлеченных в системный

воспалительный процесс при ХОБЛ, особая роль принадлежит Т-хелперным лимфоцитам (Th-клетки).

Т-хелперы являются компонентом адаптивного иммунного ответа. Помимо Т-клеточного рецепторного комплекса (TCR), свойственного всем лимфоцитам, они несут на своей мембране корецепторные молекулы CD4 (CD4⁺-клетки), участвующие в распознавании антигена. Их основная функция – синтез цитокинов, биологически активных молекул, обеспечивающих межклеточные взаимодействия [141].

В настоящее время выделяют несколько основных субпопуляций Th-клеток: Th-клетки 1 типа (Th1), Th2, Th17, Т-регуляторные клетки (Treg), каждая из которых характеризуется своим цитокиновым профилем. В зависимости от преимущественной активации тех или иных субпопуляций Th-клеток происходит поляризация иммунного ответа с вовлечением разных типов эффекторных клеток (рисунок 1) [13, 23, 112, 141, 183].

Th1-клетки, как правило, продуцируют интерлейкин-2 (IL-2), IL-12, TNF- α , IFN- γ и участвуют в опосредованных макрофагами воспалительных реакциях, играют роль в противоинфекционном иммунном ответе (рисунок 1) [141].

Th2-лимфоциты преимущественно синтезируют IL-4, IL-5, IL-13 и способствуют развитию реакций гуморального иммунного ответа, к которым относятся стимуляция продукции антител В-клетками, аллергические реакции с вовлечением тучных клеток и эозинофилов (рисунок 1) [172].

Th17-клетки в больших количествах продуцируют IL-17. Основное действие этого цитокина заключается в усилении синтеза провоспалительных цитокинов клетками врожденного иммунитета и, как следствие, привлечении нейтрофилов в очаг воспаления. Th17-лимфоциты участвуют в патогенезе воспалительных и аутоиммунных заболеваний, а также в защите организма от бактериальных, грибковых и вирусных инфекций (рисунок 1) [10, 74, 161, 174].

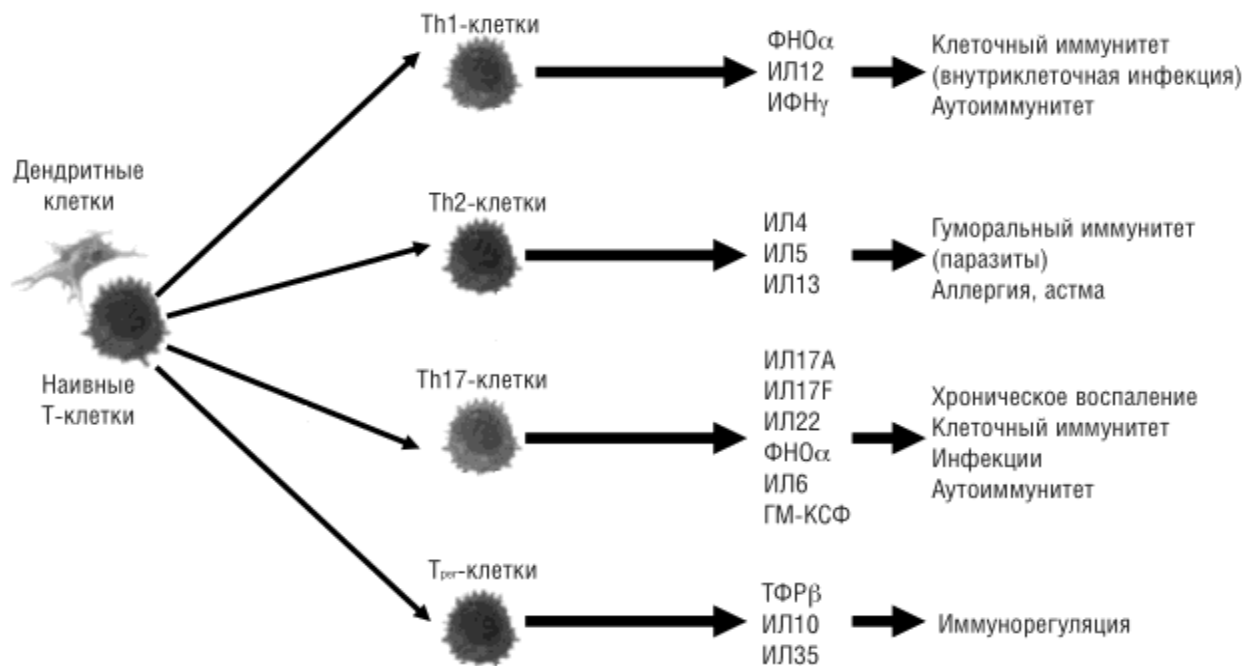


Рисунок 1 – Субпопуляции Т-хелперов и их участие в иммунном ответе [13]

Примечание: ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ИЛ – интерлейкин, ИФН- γ – интерферон- γ , ТФР β – трансформирующий фактор роста β , T_{рег} – T-регуляторная клетка, $\text{ФНО}\alpha$ – фактор некроза опухоли- α , Th1/2/17 – T-хелпер 1/2/17 типа.

Функция Т-регуляторных клеток (Treg) заключается в ингибировании чрезмерного иммунного ответа путем секреции противовоспалительных цитокинов (IL-10, TGF- β), которые подавляют активность эффекторных клеток, в том числе и Т-хелперов (рисунок 1) [105, 141].

Исследователи предполагают, что патофизиологические фенотипы ХОБЛ могут быть выделены на основе профилей CD4⁺ Т-клеток в крови и опосредуемых ими воспалительных реакций [149, 183]. Однако, существующие на настоящий момент сведения о типе Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ довольно противоречивы.

В ряде публикаций сообщается, что у пациентов с ХОБЛ развивается Th1 иммунный ответ. Эта модель воспалительного процесса характеризуется IFN- γ -

зависимой активацией альвеолярных макрофагов, которые в результате своего функционирования разрушают легочную ткань действием активных форм кислорода и матриксных металлопротеиназ [73, 113, 153].

В то же время другие группы исследователей выделяют Th2 фенотип при ХОБЛ, индуцированной действием микрочастиц загрязненного воздуха. Th2 тип воспаления опосредован высоким уровнем IL-4, повышенным числом эозинофилов и выражается в развитии гиперчувствительности дыхательных путей, увеличению производства слизи, ремоделировании дыхательных путей [163].

Большое количество работ свидетельствует об увеличении числа Th17 в малых дыхательных путях и периферической крови пациентов с ХОБЛ, что говорит об усилении Th17 иммунного ответа при этом заболевании [55, 61, 171, 173, 181]. Th17-клетки производят провоспалительный цитокин IL-17, который способствует активации легочных фибробластов, эпителиальных клеток и клеток гладкой мускулатуры бронхов. После активации эти клетки экспрессируют воспалительные медиаторы, вызывающие инфильтрацию дыхательных путей нейтрофилами и усиление их пролиферации. Нейтрофилы, в свою очередь, выделяют протеолитические ферменты (нейтрофильная эластаза, матриксные металлопротеиназы, активные формы кислорода и др.), разрушающие паренхиму легких, тем самым снижая их функцию [55, 173].

Информация, касающаяся Т-регуляторного звена иммунной системы при ХОБЛ, неоднозначна. В одних исследованиях описывается увеличение доли циркулирующих Treg-клеток у пациентов с этим заболеванием, свидетельствующее о высокой степени активации супрессорного пути регуляции иммунного ответа при ХОБЛ [7, 9, 137]. В других работах установлено снижение числа Treg-клеток в периферической крови пациентов с ХОБЛ в сравнении со здоровыми людьми [52, 173].

Согласно ряду исследований, при ХОБЛ происходит нарушение баланса числа циркулирующих Treg- и Th17-клеток, а также локальных и системных уровней связанных с ними транскрипционных факторов и эффекторных цитокинов пациентов с ХОБЛ и экспериментальных животных [87, 103, 104, 173]. Показана

связь дисбаланса Treg- и Th17-лимфоцитов в крови с ухудшением функции легких у пациентов с ХОБЛ средней и тяжелой степени тяжести [173].

Таким образом, механизмы формирования Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ требуют дальнейшей детализации. Исследование регуляции дифференцировки, развития и функционирования CD4⁺-клеток позволит улучшить понимание этого процесса. Особый интерес представляет изучение влияния различных компонентов сигнальных путей на функционирование этих клеток.

1.2. Особенности сигнальных путей в формировании Т-хелперного иммунного ответа при хронической обструктивной болезни легких

Роль цитокинов в формировании Т-хелперного иммунного ответа при хронической обструктивной болезни легких

Важными медиаторами системного воспалительного процесса являются цитокины. Они представляют собой полипептидные молекулы, которые регулируют взаимодействие, пролиферацию и функциональную активность клеток, участвующих в иммунных реакциях, путем запуска сигнальных каскадов [19]. Действие цитокина на клетку-мишень осуществляется за счёт связывания со специфическим мембранным рецептором, что чаще всего приводит к запуску janus kinase/signal transducer and activator of transcription (Jak/STAT) или mitogen-activated protein kinase (MAPK) сигнальных путей, завершающихся транскрипцией таргетных генов при участии провоспалительного транскрипционного фактора nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) [141].

Одной из основных функций цитокинов в развитии воспалительного процесса является их участие в дифференцировке и поляризации Th-клеток [64, 141, 184].

Предшественники Т-хелперных лимфоцитов образуются в костном мозге. В дальнейшем они подвергаются антиген-независимой дифференцировке в тимусе,

которая включает в себя приобретение TCR и различные специфических маркеров. В результате образуются наивные $CD4^+$ -клетки (Th0). Затем эти клетки мигрируют в лимфатические узлы, где проходят антиген-зависимую стадию дифференцировки, которая представляет собой важный этап в формировании эффекторных механизмов Т-клеточного иммунного ответа. На этом этапе происходит презентация антигена наивному Т-хелперу антиген-презентирующей клеткой (АПК), которая может являться дендритной клеткой или макрофагом. Антиген предварительно фрагментируется АПК и выводится на ее поверхность в связанном виде вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса II (MHCII). Распознавание антигена Th0-клеткой осуществляется с помощью TCR. Это рецепторное взаимодействие стимулирует дальнейшее развитие Th0-лимфоцит в клетку одной из Th субпопуляций, различающихся профилями цитокинов и эффекторными функциями [88, 184].

Во время антигенной стимуляции наивных $CD4^+$ -клеток большую роль играет цитокиновое микроокружение, именно оно создает условия для девиации Т-хелперного иммунного ответа (рисунок 2) [49, 141].

Дифференцировка Th1-клеток требует присутствия IL-12 и IFN- γ в микросреде. Эти цитокины активируют Jak/STAT сигнальный путь, в котором участвуют транскрипционные факторы STAT1 и STAT4, приводя к экспрессии транскрипционного фактора T-bet, определяющего эффекторные функции Th1-клеток (рисунок 2) [130, 141, 184].

Ключевым цитокином для формирования Th2-клеток является IL-4, который необходим для активации главного транскрипционного фактора этих клеток – GATA3. В данном цитокиновом сигнальном пути участвует белок STAT6 (рисунок 2) [130, 141, 184].

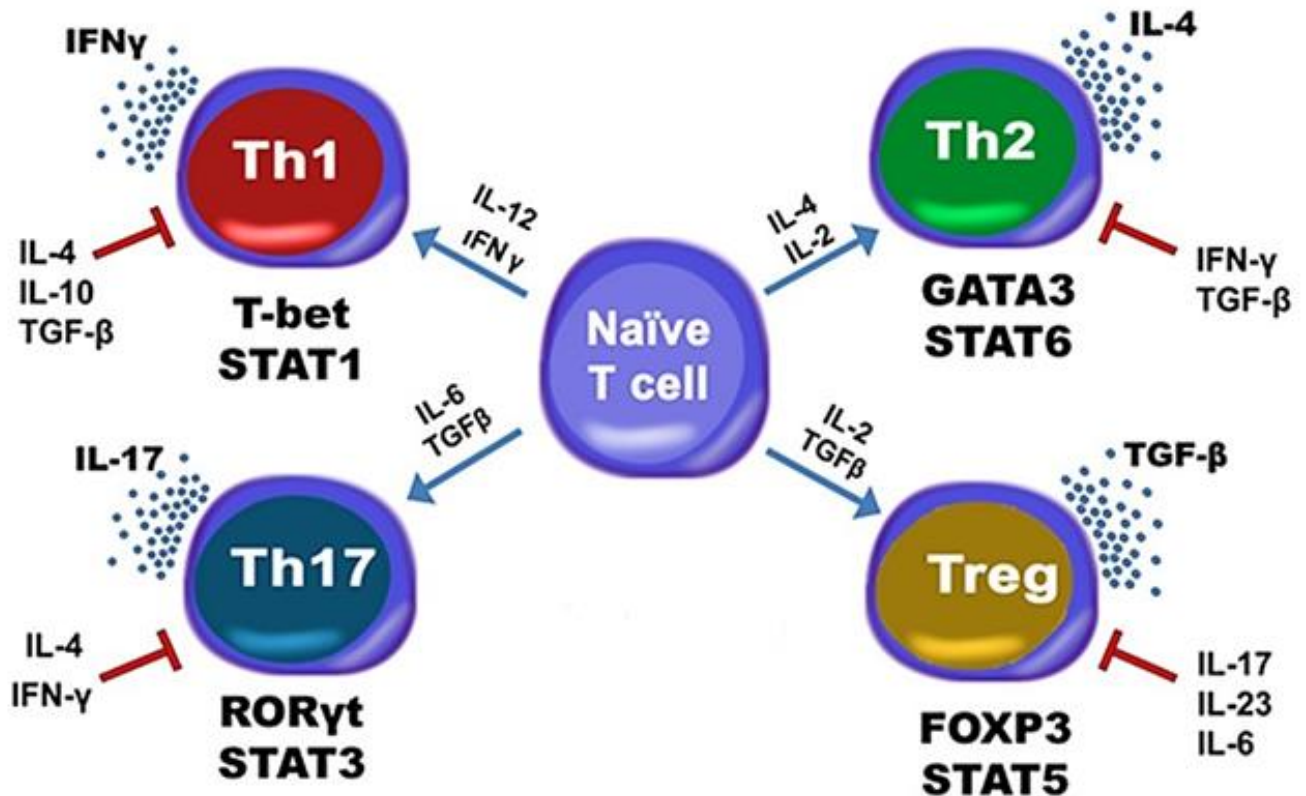


Рисунок 2 – Схема дифференцировки Т-хелперов [49]

Примечание: GATA3 – транскрипционный фактор Т-хелперов 2 типа, IFN- γ – интерферон- γ , IL – интерлейкин, Treg – Т-регуляторная клетка, naïve T cell – наивная Т-клетка, ROR γ t – транскрипционный фактор Т-хелперов 17 типа, STAT – транскрипционный фактор преобразователь сигналов и активатор транскрипции, T-bet – транскрипционный фактор Т-хелперов 1 типа, Th1/2/17 – Т-хелпер 1/2/17 типа, TGF β – трансформирующий фактор роста β .

Факторами дифференцировки Th17-клеток являются TGF- β и IL-6. Это сочетание цитокинов через фосфорилирование STAT3 индуцирует экспрессию retinoic acid-related orphan receptor γ (ROR γ t), определяющего транскрипционную программу IL-17-продуцирующих Т-клеток (рисунок 2) [130, 141, 184].

В присутствии IL-2 и TGF- β Th0-клетки начинают производить фактор транскрипции forkhead box P3 (FoxP3), который способствует возникновению иммуносупрессивных функций и формированию Treg-клеток. В запуске синтеза FoxP3 участвует транскрипционный фактор STAT5 (рисунок 2) [130, 141, 184].

Цитокины, являющиеся наиболее важными для формирования одних субпопуляций Th-клеток, ингибируют развитие других. Например, IFN- γ (Th1) и

IL-4 (Th2) ингибируют дифференцировку Th17-клеток, а развитие Th2-лимфоцитов подавляется Th1- и Th17-ассоциированными цитокинами, IFN- γ и TGF- β , соответственно (рисунок 2) [130, 141, 184].

Особый интерес представляет тот факт, что дифференцированные CD4⁺-клетки обладают фенотипической пластичностью. Существуют данные, указывающие на то, что фенотип зрелых Th17- и Treg-лимфоцитов может смещаться в сторону Th1/Th2 и Th17, соответственно, что выражается в продукции цитокинов, характерных для этих субпопуляций. Современные исследования свидетельствуют о том, что пластичностью уже сформировавшихся Т-хелперных субпопуляций управляют те же цитокины, которые участвуют в процессе дифференцировки Th-клеток во время презентации антигена [54, 64, 184].

Считается, что при различных заболеваниях, в том числе ХОБЛ, формируется уникальная цитокиновая микросреда, которая может инициировать поляризацию Th-клеток и, следовательно, Т-клеточного иммунного ответа в ту или иную сторону [54, 64, 87, 122].

Роль сигнального пути, опосредованного рецептором к интерлейкину-6, в формировании Т-хелперного иммунного ответа при хронической обструктивной болезни легких

Интерлейкин-6 (IL-6) представляет собой плеiotропный цитокин, обладающий про- и противовоспалительными свойствами. Он продуцируется как иммунными клетками (дендритные клетки, макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки, В- и Т-клетки), так и неиммунными клетками (кератиноциты, фибробласты, эпителиальные клетки и др.) [63, 94, 120, 167, 169].

Многочисленные отечественные и зарубежные исследования свидетельствуют о том, что системный уровень IL-6 возрастает по мере утяжеления течения ХОБЛ и обратно коррелирует с усилением обструкции нижних дыхательных путей и легочной функции [3, 4, 21, 32, 34, 43, 65, 67, 157, 162, 175]. Рядом исследователей показана значимость IL-6 в качестве предиктора смертности при этом заболевании [50, 118]. Результаты генетических исследований

свидетельствуют о том, что полиморфизмы гена *IL-6* связаны с риском развития и утяжеления течения ХОБЛ [80, 177].

В настоящее время *IL-6* рассматривается как важный медиатор адаптивного иммунного ответа. В этом контексте одной из его наиболее важных функций является регуляция дифференцировки Т-хелперов (рисунок 3) [70, 86, 138].

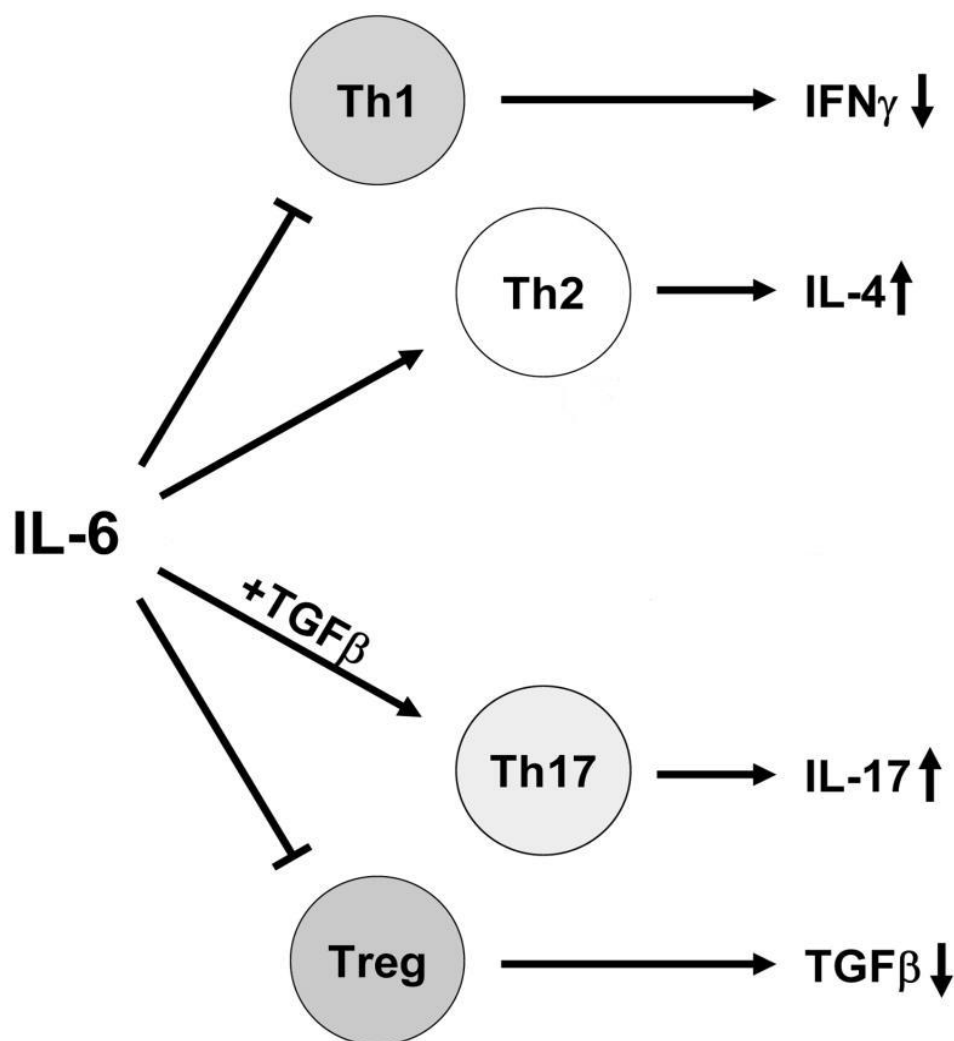


Рисунок 3 – Роль интерлейкина-6 в дифференцировке Т-хелперов [94]

Примечание: $IFN-\gamma$ – интерферон- γ , *IL* – интерлейкин, Treg –Т-регуляторная клетка, Th1/2/17 – Т-хелпер 1/2/17 типа, $TGF\beta$ – трансформирующий фактор роста β .

Во-первых, IL-6 способен сдвигать Th1/Th2 баланс в сторону Th2 двумя независимыми путями: либо путем запуска экспрессии IL-4 в наивных Т-хелперных клетках во время антигенной стимуляции, либо путем ингибирования передачи сигнала IFN- γ (фактор дифференцировки Th1) в этих клетках (рисунок 3) [59, 148].

Во-вторых, IL-6 является регулятором Th17/Treg баланса. Присутствие TGF- β и IL-6 в микроокружении во время представления антигена наивным Т-хелперам способствует их дифференцировке в Th17-клетки путем активации STAT3/ROR γ t сигнального каскада (рисунок 3) [59, 86, 93]. В ряде публикаций сообщается о том, что IL-6 ингибирует антиген-зависимую дифференцировку Т-регуляторных клеток [23, 81, 86, 93, 98]. Есть свидетельства в пользу того, что этот цитокин способен преобразовывать Treg-клетки в Th17-подобные клетки, подавляя в них экспрессию FoxP3 и активируя ROR γ t. Кроме того, были обнаружены FoxP3⁺ROR γ t⁺-клетки, экспрессирующие IL-17, но не проявляющие супрессивные свойства [60, 103, 105, 144]. Помимо вышеописанной функции, IL-6 также вносит вклад в развитии Th субпопуляций путем усиления выживаемости, миграции и пролиферации Т-клеток [59].

Биологическая активность IL-6 опосредована специфическим рецепторным комплексом, который состоит из субъединицы IL-6R, отвечающей за связывание цитокина, и субъединицы gp130, обеспечивающей запуск JAK/STAT или MAPK сигнальных каскадов (рисунок 4) [70, 86, 155, 176].

Согласно современным представлениям, биологические эффекты IL-6 во многом зависят от типа передачи сигнала в клетку. В настоящий момент выделяют три способа передачи IL-6 сигнала, которые опосредуют различные свойства этого плейотропного цитокина: классический сигналинг, транс-сигналинг и кластерный сингналинг (рисунок 5) [70, 86, 155, 176].

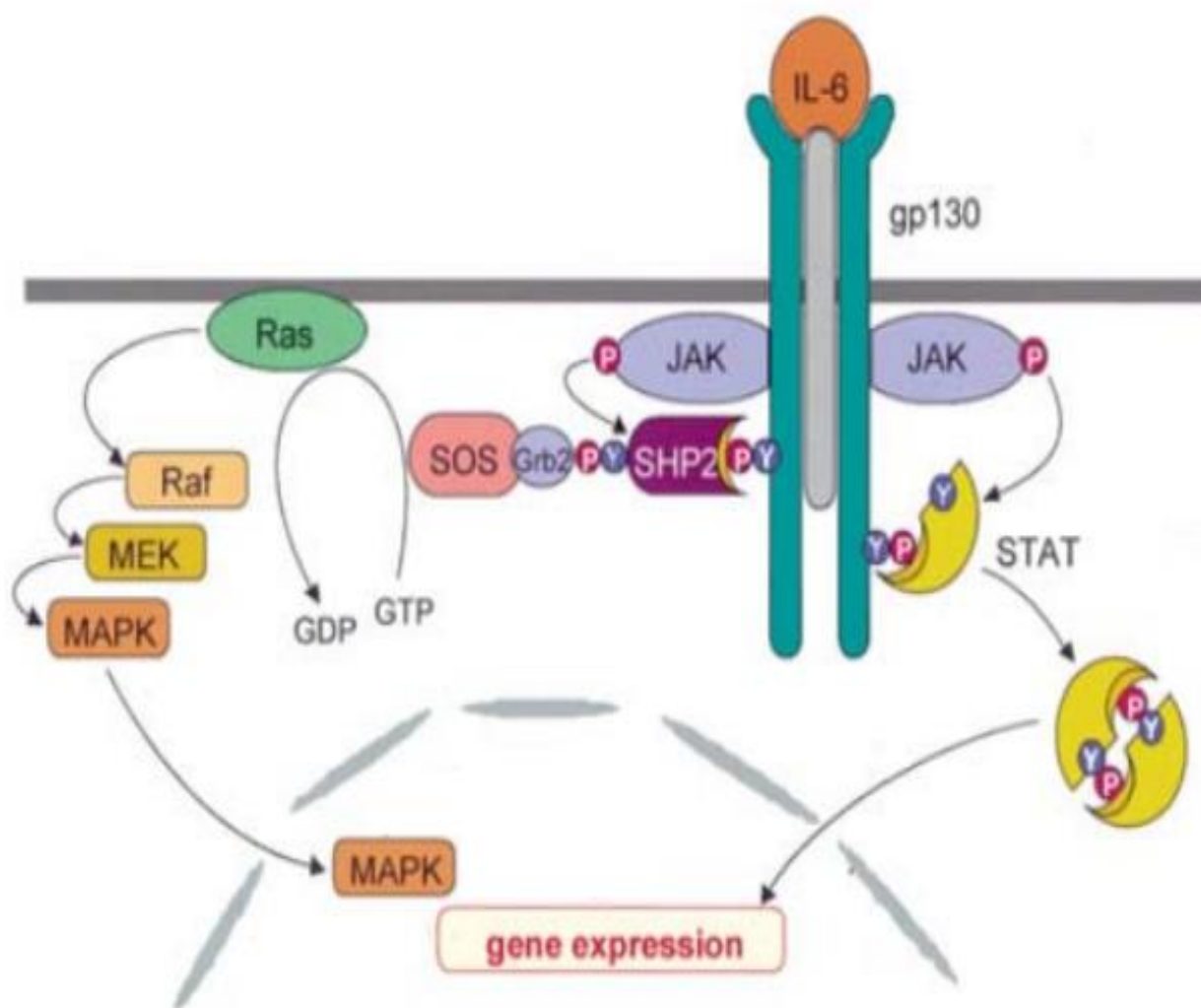


Рисунок 4 – Интерлейкин-6 сигнальный путь [82]

Примечание: GDP – гуанозин дифосфат, GTP – гуанозин трифосфат, gp130 – гликопротеин 130, IL-6 – интерлейкин-6, Jak – янус киназа, MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа, STAT – транскрипционный фактор преобразователь сигналов и активатор транскрипции; Ras, Raf, MEK, ERK, SOS, Grb2, SHP2 – адапторные белки MAPK сигнального пути.

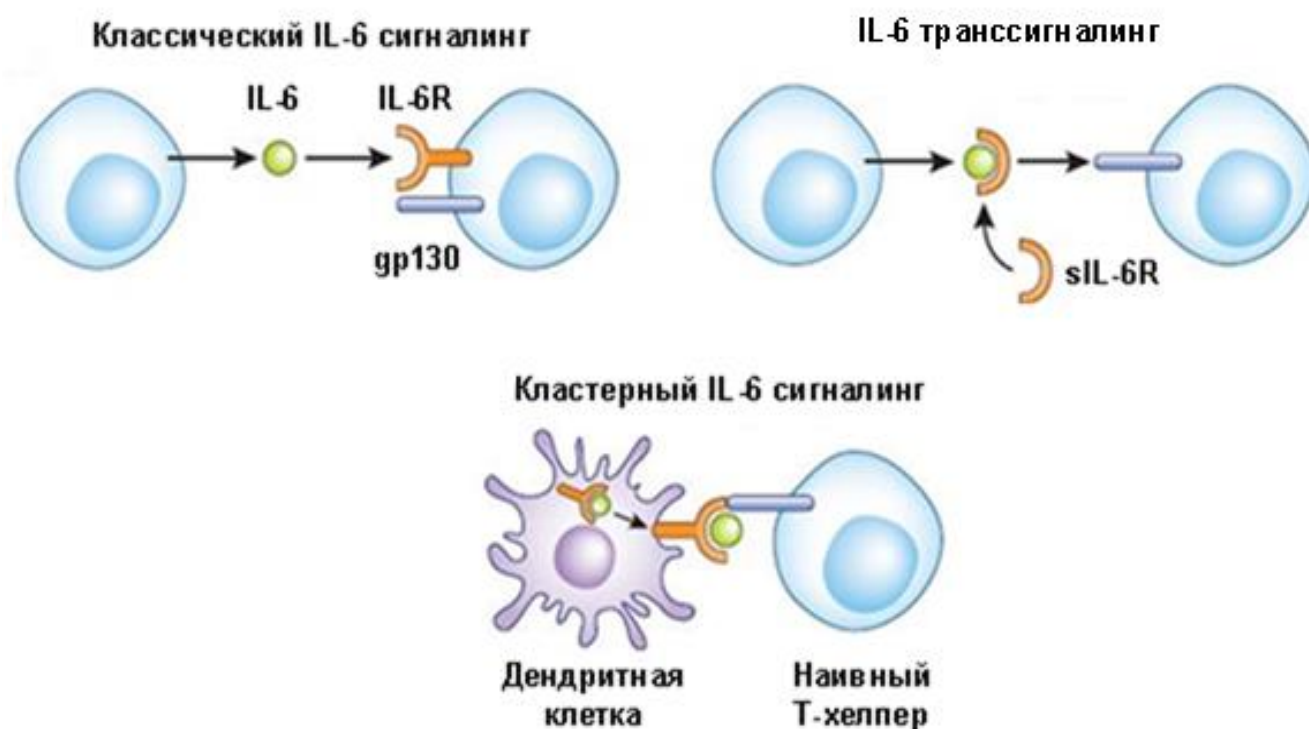


Рисунок 5 – Типы передачи интерлейкин-6 сигнала в клетку [138]

Примечание: gp130 – мембранный гликопротеин 130, IL – интерлейкин, IL-6R – мембранный рецептор к интерлейкину-6, sIL-6R – растворимый рецептор к интерлейкину-6.

В классическом сигналинге участвуют обе субъединицы рецептора, локализованные на мембране клетки, – IL-6R и gp130. Ряд исследователей сообщает, что этот тип передачи сигнала опосредует регенеративную и противовоспалительную активность IL-6. Следует отметить, что gp130 обнаруживается на многих типах клеток организма. Экспрессия мембранной формы IL-6R, напротив, ограничена только гепатоцитами и иммунными клетками, в связи с чем классический IL-6 сигналинг может быть инициирован только в этих клетках (рисунок 5) [148, 156].

Транс-сигналинг запускается в результате взаимодействия gp130 на поверхности клетки-мишени с циркулирующим комплексом IL-6 / растворимая форма IL-6R (sIL-6R) и преимущественно обеспечивает провоспалительное

действие IL-6. Растворимая форма рецептора образуется с помощью ограниченного протеолиза мембранного IL-6R с участием металлопротеиназ из семейства disintegrin and metalloproteinase (ADAM) или путем альтернативного сплайсинга. Учитывая распространенность экспрессии gp130 в организме, в транс-сигналинг может быть вовлечен широкий спектр клеток (рисунок 5) [148, 151, 156].

Кластерный сигналинг был обнаружен сравнительно недавно. Его механизм заключается во взаимодействии комплекса IL-6/IL-6R на мембране дендритной клетки, с молекулой gp130 на поверхности Т-клетки в момент представления антигена. Комплекс IL-6/IL-6R формируется во внутриклеточных компартментах дендритной клетки и затем выводится на цитоплазматическую мембрану (рисунок 5) [81, 138].

Анализируя современные данные, касающиеся участия различных типов IL-6 сигналинга в патофизиологических процессах при ХОБЛ, можно заключить, что наибольшее внимание уделяется изучению транс-сигналинга. В ряде исследований было установлено повышение уровня sIL-6R в крови и мокроте пациентов с ХОБЛ [79, 142]. Показано, что активация IL-6 транс-сигналинга в эндотелиальных клетках легочных сосудов, фибробластах, гладкомышечных клетках дыхательных путей инициирует миграцию лейкоцитов в легкие, ингибирует апоптоз Т-клеток в очаге воспаления, участвует в развитии эмфиземы и фиброза, ремоделировании малых дыхательных путей [68, 100, 150, 152].

В отличие от IL-6 транс-сигналинга, классический сигнальный путь этого цитокина слабо изучен. Исследования, касающиеся роли классического IL-6 сигнального пути в патогенезе ХОБЛ в целом и в формировании Т-хелперного иммунного ответа в частности, не встречаются.

Роль сигнальных путей, опосредованных толл-подобными рецепторами 2 и 4 типа, в формировании Т-хелперного иммунного ответа при хронической обструктивной болезни легких

Согласно данным литературы, многие реакции Т-клеточного иммунитета, включая цитокиновый ответ, опосредованы толл-подобными рецепторами [57].

Толл-подобные рецепторы относятся к семейству патоген-распознающих рецепторов, функция которых заключается в связывании молекулярных структур патогенов (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), продуктов повреждения клеток организма (damage-associated molecular patterns, DAMP) и обеспечении быстрой реакции клетки на микробную/вирусную инфекцию или нарушение гомеостаза тканей, соответственно, которая выражается в секреции цитокинов и других воспалительных медиаторов. Структура рецептора представлена тремя доменами: внеклеточный домен, содержащий лейцин-богатые повторы и отвечающий за распознавание лиганда, трансмембранный домен и внутриклеточный toll/interleukin-1 receptor (TIR) домен, обеспечивающий передачу сигнала в клетку [57, 92, 129].

На сегодняшний день у человека идентифицировано десять типов толл-подобных рецепторов, которые локализованы на мембранах органелл (TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9) и цитоплазматической мембране клетки (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и TLR10) [57].

Как показали исследования, наиболее важными для развития ХОБЛ являются TLR2 и TLR4, именно они обеспечивают инициацию воспалительного процесса при этом заболевании [35, 77, 111, 117, 154, 185]. Ряд генетических работ выявил связь полиморфизмов генов *TLR2* и *TLR4* с риском развития и прогрессирования ХОБЛ [31, 47, 106]. Кроме того, существуют свидетельства того, что сигаретный дым и твердые взвешенные частицы, основные факторы риска развития ХОБЛ, вызывают изменение экспрессии и активации TLR2 и TLR4 на иммунных и эпителиальных клетках легких и дыхательных путей, как у людей, так и у экспериментальных животных. Эти эффекты связаны с развитием основных клинических проявлений ХОБЛ – фиброза, эмфиземы и бронхиальной обструкции [29, 39, 61, 78, 101, 128, 131, 132, 135, 158, 159, 164]. Кроме того, есть данные, свидетельствующие о формировании TLR2/4-индуцированной толерантности альвеолярных макрофагов к бактериям, колонизирующим дыхательные пути пациентов с ХОБЛ, что ведет к развитию обострения заболевания [40, 95, 99, 119].

Однако, данные о направленности изменений уровня экспрессии TLR2 и 4 при ХОБЛ остаются противоречивыми.

Мембранные рецепторы TLR2 и TLR4 экспрессируются эпителиальными клетками кожных и слизистых покровов, эндотелиальными клетками, клетками врожденного (нейтрофилы, макрофаги, дендритные клетки) и адаптивного иммунитета (Т- и В-клетки) [57, 92].

TLR2 распознает РАРР грамположительных и грамотрицательных бактерий (липопептиды, гликолипиды, липотейхоиновая кислота, пептидогликан и др.). Показано, что этот рецептор может образовывать гетеродимеры с TLR1 (TLR2/1) и TLR6 (TLR2/6), которые способны связывать триацилированные липопептиды грамотрицательных бактерий и диацилированные липопептиды грамположительных бактерий, соответственно. Основным лигандом TLR4 является липополисахарид (ЛПС), главный компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, который нередко входит в состав частиц загрязненного воздуха и табачного дыма. В распознавание этого лиганда также участвуют молекулы CD14 и MD-2 (myeloid differentiation factor 2). Помимо патогенов, оба TLR способны связывать эндогенные лиганды (high-mobility group protein B1 (HMGPB1), белки теплового шока (HSP60, HSP70) и др.), выделяющиеся в результате гибели клеток под действием окислительного стресса, вызванного факторами внешней среды (таблица 1) [57, 85, 92].

После связывания лиганда с толл-подобным рецептором в клетке запускается один из двух ключевых сигнальных каскадов: MyD88- (myeloid differentiation primary response gene 88) или TRIF-зависимый (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β), которые опосредованы MyD88/TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein) и TRIF/TRAM (TRIF-related adaptor molecule) комплексами адаптерных белков, соответственно. Как и большинство толл-подобных рецепторов, TLR2 реализует свои функции посредством MyD88-зависимого сигналинга. В свою очередь, TLR4 может инициировать оба сигнальных пути. Результатом MyD88-зависимого сигнального каскада является активация ядерного транскрипционного фактора NF- κ B или запуск MAPK

сигнального пути с последующим синтезом цитокинов, ассоциированных с воспалением. Инициация TRIF-зависимого сигнального пути через TLR4, находящийся на мембране эндосомы, приводит к фосфорилированию транскрипционного фактора interferon regulatory factor 3 (IRF3), который регулирует экспрессию генов IFN I типа (рисунок 6) [57, 92].

Таблица 1 – Лиганды толл-подобных рецепторов 2 и 4 типа [56, 134]

Лиганды	TLR2	TLR4
PAMP	триацилированные липопептиды диацилированные липопептиды гликолипиды зимозан липотейхоиевая кислота пептидогликан	липополисахарид
DAMP	HMGPB1 дефензины белки теплового шока гиалуронан фибронектин	HMGPB1 100S белки дефензины фибриноген фибронектин сульфат гепарина гиалуроновая кислота

Примечание: DAMP – ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны, HMGPB1 – high-mobility group protein B1, PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны.

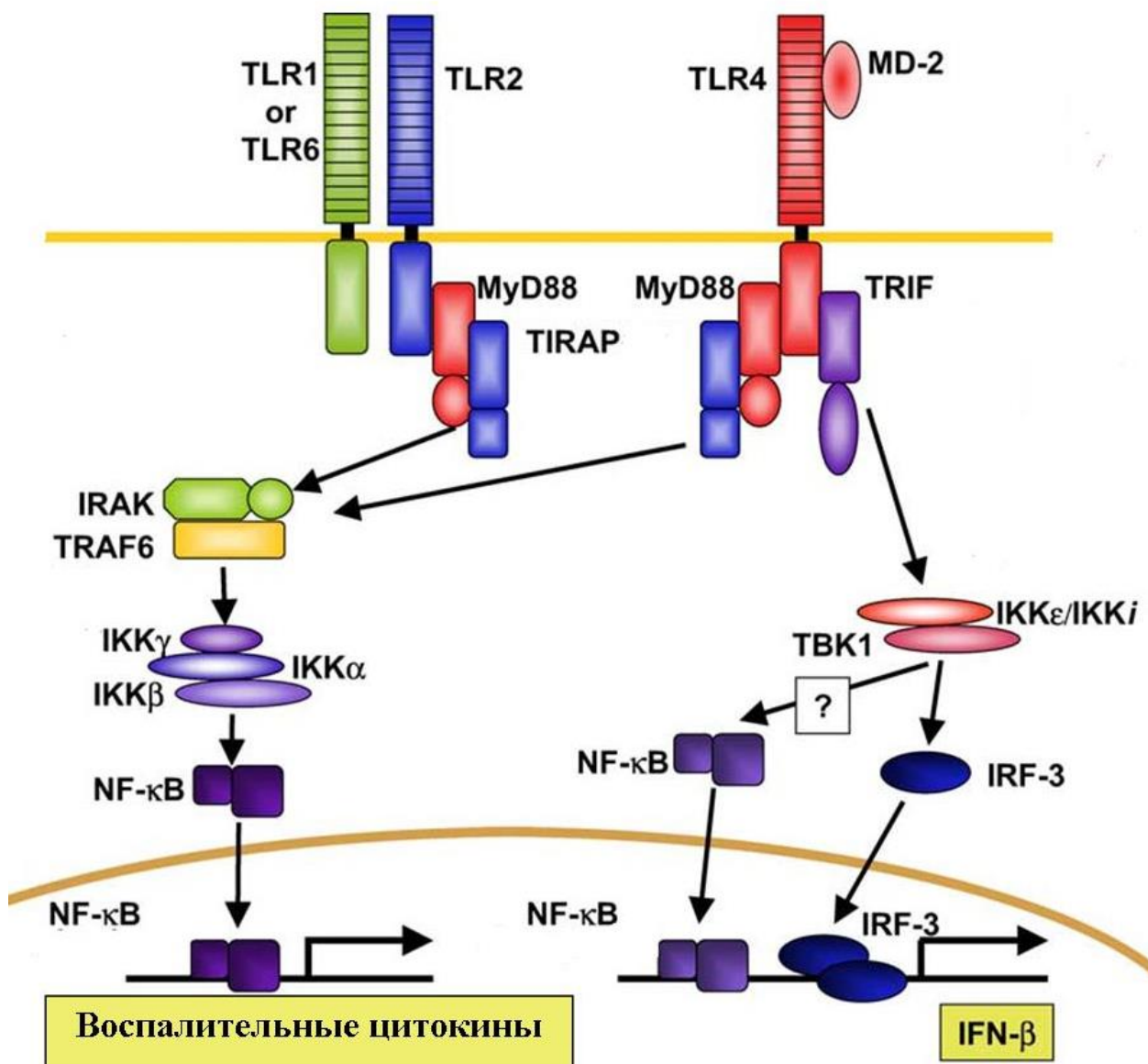


Рисунок 6 – Сигнальные пути, опосредованные толл-подобными рецепторами 2 и 4 типа [166]

Примечание: IFN- β – интерферон- β , IKK – I κ B киназа, IRAK – киназа ассоциированная с рецептором к интерлейкину-1, IRF-3 – регуляторный фактор интерферона 3, MD-2 – миелоидный фактор дифференцировки 2, MyD88 – белок миелоидной дифференцировки первичного ответа 88, NF- κ B – ядерный фактор κ B, TBK1 – киназа 1 связывающая TANK-ген, TIR – толл/интерлейкин-1 рецептор, TIRAP – адапторный белок, содержащий TIR-домен, TLR – толл-подобный рецептор, TRAF6 – фактор ассоциированный с рецептором к TNF, TRAM – TRIF-ассоциированная адапторная молекула, TRIF – адаптор содержащий TIR-домен и индуцирующий интерферон- β .

Накапливаясь в легких в ходе развития воспалительной реакции при ХОБЛ, лиганды толл-подобных рецепторов 2 и 4 типа могут попадать в кровяное русло и запускать соответствующие TLR сигнальные пути в иммунных клетках периферической крови. Однако, в настоящее время существует ограниченное число исследований, посвященных изучению экспрессии этих рецепторов на циркулирующих иммунокомпетентных клетках при ХОБЛ. Некоторые результаты исследований указывают на ингибирование TLR2-зависимой секреции цитокинов лейкоцитами на последних стадиях ХОБЛ [66]. Существуют данные, свидетельствующие о снижении числа циркулирующих моноцитов, несущих на мембране TLR2, и нарушении моноцит-зависимого иммунного ответа по мере прогрессирования ХОБЛ [66, 97]. Ряд исследователей отметил, что у пациентов с ХОБЛ наблюдается усиление TLR2-опосредованного синтеза цитокинов нейтрофилами крови [35, 168]. Данные об экспрессии TLR2 и 4 на CD4⁺-клетках крови при ХОБЛ практически отсутствуют в научной литературе. Роль TLR-опосредованных механизмов в развитии системного воспаления при ХОБЛ все еще недостаточно ясна в связи с противоречивостью результатов и использованием разных методологических подходов к их исследованию.

В настоящее время появляется все больше данных, свидетельствующих о вкладе толл-подобных рецепторов в формирование Т-хелперного иммунного ответа, и в регуляцию Th17/Treg баланса, в частности. Показано, что TLR лиганды могут оказывать как косвенное, так и прямое воздействие на Th-клетки [88].

Косвенное влияние TLR лигандов проявляется в активации АПК, приводящей к экспрессии ряда цитокинов, хемокинов и костимуляторных молекул необходимых для прайминга наивных CD4⁺-клеток в лимфатическом узле. Согласно современным представлениям, взаимодействие АПК и наивных CD4⁺-клеток определяет дальнейшее формирование Т-клеточного ответа [66, 90, 139]. Существуют свидетельства в пользу того, что активация дендритных клеток через TLR2-MyD88-опосредованный путь индуцирует дифференцировку Th17-клеток [88].

Представление о непосредственном участии TLR в модуляции Т-клеточной функции подтверждается тем фактом, что на Т-хелперах обнаруживаются практически все типы этих рецепторов. Результаты *in vitro* исследований показали, что TLR2 и 4, локализованные непосредственно на мембране CD4⁺-клеток, выступают в качестве ко-стимуляторных молекул при активации TCR и обеспечивают усиление пролиферации, выживаемости и рекрутинга Th-лимфоцитов [66].

Другой важной ролью TLR сигнальных путей в развитии Т-хелперного иммунного ответа является участие в дифференцировке и поляризации CD4⁺-клеток [88, 90, 139, 145, 146]. Несколько групп исследователей на моделях различных аутоиммунных, аллергических и вирусных заболеваний показали, что лиганды TLR2 запускают MyD88-зависимый путь, который в сочетании с активацией TCR непосредственно действует на важные для Th17 пути факторы транскрипции – ROR γ t, ROR α и RORC, активирующие синтез IL-17 [30, 109, 125, 145, 178, 182]. В ряде публикаций сообщается о влиянии активации TLR2 сигнального пути на супрессивные свойства Treg-клеток [53, 125, 127]. Однако, результаты исследований, касающихся этого вопроса, остаются довольно противоречивыми. Zanin-Zhorov et al. сообщили, что TLR2 лиганды могут модулировать Th1/Th2 баланс, снижая экспрессию Th1 транскрипционного фактора T-bet и повышая синтез Th2 транскрипционного фактора GATA3 в Т-клетках [179]. Хотя в других исследованиях влияние TLR2 лигандов на эти факторы транскрипции не выявлено [145, 182].

Встречаются единичные исследования роли TLR в развитии Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ. Knobloch J. et al. обнаружили, что у курильщиков с и без ХОБЛ происходило нарушение TLR4/MyD88/MAPK сигналинга в циркулирующих Th1-клетках, что, в свою очередь, вызывало подавление IL-2-зависимой пролиферации CD4⁺-клеток и синтеза IFN- γ , ключевого цитокина Th1-клеток [95, 96].

Таким образом, фундаментальные исследования последних лет внесли значительный вклад в понимание эффектов TLR2 и TLR4 сигнальных путей на

поляризацию Т-хелперного иммунного ответа. Однако, TLR-опосредованные механизмы, определяющие формирование Th иммунорегуляторного пути при ХОБЛ до сих пор остаются слабо изученными.

Обобщая все вышесказанное, можно заключить, что на современном этапе исследований патогенеза ХОБЛ принято считать, что данная патология характеризуется воспалением не только местного, но и системного характера. Несмотря на очевидную значимость системного воспалительного процесса в патогенезе ХОБЛ, клеточно-молекулярные взаимодействия, лежащие в его основе, все еще недостаточно изучены. Отсутствуют сведения об экспрессии IL-6R, TLR2 и TLR4 на Т-хелперных лимфоцитах крови при ХОБЛ. Исследование роли опосредованных этими рецепторами сигнальных путей в формировании Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ позволит углубить знания о механизмах регуляции иммунопатофизиологических реакций при этом заболевании и улучшить методы его диагностики и прогнозирования, разработать новые персонифицированные терапевтические подходы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика обследуемых

Исследование выполнено в рамках темы государственного задания, на базе клинического отделения Владивостокского филиала ДНЦ ФПД – НИИМКВЛ. Работа выполнена в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и правилами клинической практики в РФ (Приказ Министерства РФ № 200н от 1 апреля 2016 г.) с одобрения локального этического комитета (протокол № 4 от 23.11.2017 г.).

В исследование были включены пациенты с ХОБЛ разной степени тяжести стабильного течения. ХОБЛ диагностировали на основании данных анамнеза, объективного осмотра, пикфлоуметрии, спирографии с выполнением бронхолитического теста (спирограф «FUKUDA», Япония), рентгенологического и лабораторного исследования. Для оценки симптомов основного заболевания проводилось анкетирование с помощью валидизированных опросников: для оценки выраженности одышки – «Modified British Medical Research Council» (mMRC), для оценки влияния ХОБЛ на повседневную жизнь пациента и статус его здоровья – «COPD Assessment Test» (CAT).

Всего обследовано 165 пациентов с ХОБЛ стабильного течения, из них 48 человека с ХОБЛ легкой степени тяжести (GOLD I), 61 человек с ХОБЛ средней степени тяжести (GOLD II) и 56 человек с ХОБЛ тяжелой степени тяжести (GOLD III) [71]. Все пациенты были сопоставимы по возрасту и полу. Критериями исключения являлись: симптомы обострения ХОБЛ в течение последних 2 месяцев, острые патологические состояния и обострение хронических болезней. В контрольную группу вошли 52 условно здоровых лица, некурящих, с нормальной

функцией внешнего дыхания, средний возраст составлял $42,1 \pm 3,6$ года. Характеристика обследуемых представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика обследуемых

Показатель	Контрольная группа	ХОБЛ легкой степени тяжести	ХОБЛ средней степени тяжести	ХОБЛ тяжелой степени тяжести
Количество обследуемых	52	48	61	56
Пол, м/ж	35/17	31/17	33/28	29/27
Возраст, годы	$42,1 \pm 3,6$	$55,7 \pm 2,2$	$57,3 \pm 3,8$	$60,5 \pm 2,5$
Статус курения, курильщики / бывшие курильщики	-	37/11	44/17	36/20
Стаж курения, пачка/лет	-	$23,9 \pm 5,6$	$29,4 \pm 4,8$	$27,2 \pm 6,6$
ОФВ1/ФЖЕЛ, %	$81,2 \pm 1,3$	$66,1 \pm 1,5^{***}$	$60,7 \pm 1,8^{****\#}$	$44,26 \pm 2,0^{****\#}$
ОФВ1, % от должного	$104,8 \pm 2,1$	$90,1 \pm 1,9^{***}$	$73,9 \pm 2,6^{****\#}$	$48,6 \pm 1,7^{****\#\#}$
Опросник САТ, баллы	-	$4,5 \pm 1,0^{**}$	$8,4 \pm 0,9^{****\#}$	$12,6 \pm 0,3^{****\#}$
Опросник mMRC, баллы	-	$1,2 \pm 0,9^{***}$	$2,4 \pm 0,8^{****\#}$	$2,8 \pm 1,0^{****\#}$

Примечание: ОФВ1 – объем форсированного выдоха за 1 секунду; ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких. Данные (возраст, стаж курения, ОФВ1, ОФВ1/ФЖЕЛ, опросник mMRC и опросник САТ) представлены в виде средней и стандартного отклонения. Статистическая значимость различий в сравнении с группой контроля: ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$; статистическая значимость различий между группами пациентов с разными степенями тяжести ХОБЛ: # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,001$, (t-критерий Стьюдента).

2.2. Иммунологические методы

2.2.1. Анализ сывороточного цитокинового профиля

У здоровых лиц и пациентов с ХОБЛ делали забор венозной крови утром натощак с помощью вакутайнера («Univac», Россия), содержащего антикоагулянт ЭДТА. Для исследования цитокиновых профилей была использована сыворотка крови, полученная путем центрифугирования цельной крови в течение 10 мин при 3 тыс. оборотов/мин с использованием центрифуги (мультицентрифуга «СМ-6М», «ELMI», Латвия).

Уровни сывороточных цитокинов (IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ и TNF- α) диагностировали методом проточной цитометрии по принципу мультиплексного количественного анализа, в основе которого лежит принцип специфического связывания цитокинов с моноклональными антителами, присоединенными к микросферам, и с вторичными специфическими антителами, меченными флюорохромом PE (цитометр «BD FACS CantoII»; тест-система «Cytometric Bead Array – Human Th1/Th2/Th17 Kit», BD, США). Для обработки данных использовалась программа «FCAP 3.0» (BD, США). Концентрации циркулирующих TGF- β 1 и IL-21 измеряли методом иммуноферментного анализа (тест-системы «Human IL-21 DuoSet ELISA» и «Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA», «R&D Systems», США). Учет результатов иммуноферментного анализа осуществляли с помощью спектрофотометра «PowerWave» (BioTek, США) при длине волны 540 нм. Полученные величины выражались в пг/мл.

Для выделения типов Т-хелперного иммунного ответа у пациентов с ХОБЛ использовали результаты анализа сывороточных уровней цитокинов, ассоциированных с развитием Th1 и Th17 субпопуляций. Основным цитокином необходимым для дифференцировки Th1-лимфоцитов является IFN- γ , ключевым эффекторным цитокином Th17-клеток – IL-17A. Для выделения типов Т-хелперного иммунного ответа рассчитывали соотношение IFN- γ /IL-17A.

2.2.2. Анализ уровня поверхностной экспрессии рецепторов на циркулирующих Т-хелперах

Проводили анализ субпопуляций Т-хелперных лимфоцитов в цельной крови: количества Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^+CD127^-$); Т-хелперов, экспрессирующих мембранный рецептор к IL-6 ($CD4^+CD126^+$); Т-хелперов, экспрессирующих мембранный толл-подобный рецептор 2 ($CD4^+CD282^+$); Т-хелперов, экспрессирующих мембранный толл-подобный рецептор 4 ($CD4^+CD284^+$).

Перед началом анализа пробирку с кровью отстаивали при комнатной температуре 60 минут. Панель моноклональных антител, использованная для иммунофенотипирования и оценки функционального состояния Т-хелперных лимфоцитов («BD», США), приведена в таблице 3. Подбор комбинации антител, конъюгированных с флюорохромами, и анализ на проточном цитометре (цитометр «BD FACS CantoII», BD, США) проводили на основании принципов оптимизации многоцветного иммунофенотипического анализа, описанных в зарубежной и отечественной литературе [23, 114].

В ходе пробоподготовки к анализу числа $CD4^+CD25^+CD127^-$ -, $CD4^+CD126^+$ - и $CD4^+CD282^+$ -клеток путем электронного дозирования в чистые пробирки раскапывали антитела ($CD45$ (APC-H7), $CD3$ (FITC), $CD4$ (PE-Cy7), $CD25$ (PerCP Cy5.5), $CD127$ (FITC), $CD126$ (APC), $CD282$ (Alexa Fluor 488)) и добавляли в каждую по 100 мкл лейкоцитарно-плазменной взвеси. Затем пробирки с анализируемой смесью инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего удаляли эритроциты с помощью лизирующего раствора «BD FACS Lysing Solution» («BD», США) и инкубировали 15 минут при тех же условиях.

Таблица 3. Панель моноклональных антител, использованная для иммунофенотипирования и функционального анализа субпопуляций Т-хелперов периферической крови здоровых лиц и пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести

Поверхностные маркеры	мАТ к CD-маркерам	Клоны мАТ	Изотипы мАТ	Флюорохромы
CD-маркеры для иммунофенотипирования				
Маркер популяции лейкоцитов	CD45	2D1	мышиный IgG1, κ	APC-H7
Маркер субпопуляции зрелых Т-лимфоцитов	CD3	UCHL1	мышиный IgG1, κ	FITC
Маркер субпопуляции Т-хелперов	CD4	SK3	мышиный IgG1, κ	PE-Cy7
CD-маркеры для оценки функционального состояния Т-хелперов				
Маркер активации Т-лимфоцитов	CD25	М-А251	мышиный IgG1, κ	PerCP-Cy5.5
Маркер субпопуляции Т-регуляторных клеток	CD127	hIL-7R-M21	мышиный IgG1, κ	FITC
Маркер экспрессии IL-6R	CD126	М5	мышиный IgG1, κ	APC
Маркер экспрессии TLR2	CD282	11G7	мышиный IgG1, κ	Alexa Fluor 488
Маркер экспрессии TLR4	CD284	HTA125	мышиный IgG2a, κ	PE-Cy5.5 + Стрептавидин-PE- Cy5 (вторичное связывание)

Примечания: мАТ – моноклональное антитело, APC (алофикоцианин), APC-H7 (аналог комплекса алофикоцианина с цианином 7), FITC (изотиоцианат флуоресцеина), PE-Cy7 (комплекс фикоэритрина с цианином 7), PerCP (перидинин-хлорофилл протеин), PerCP-Cy5.5 (комплекс перидинин-хлорофилл протеина с цианином 5.5).

Методика определения количества CD4⁺CD284⁺-клеток требовала первичного внесения в пробирку антител к CD284 (PE-Cy5.5), лейкоцзвеси и инкубирования в течение 20 минут при температуре 4°C. После инкубации производили отмывку клеток с использованием раствора «Cell Wash» («BD», США) путем центрифугирования (центрифуга высокоскоростная с охлаждением «Z 383 K», «Hermle Labortechnik», Германия) 5 минут при скорости 200 g при температуре 4°C. Сливали супернатант и добавляли антитела CD45 (APC-H7), CD3 (FITC), CD4 (PE-Cy7) и антитела, меченные стрептавидином-PE-Cy5 для вторичного связывания с CD284. Инкубировали при тех же условиях. Осуществляли отмывку еще 2 раза. Непосредственно перед анализом на проточном цитометре инкубировали в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре.

Анализ окрашенных клеток проводился на проточном цитометре «BD FACS CantoII» (BD, США). Регистрировали 50 тыс. событий, для минорных субпопуляций – не менее 100 тыс. событий. Полученные данные обрабатывали с помощью программы FACS Diva (фирма «BD», США).

Стратегия гейтирования включала в себя следующие этапы: выделение субпопуляции лимфоцитов по маркеру CD45⁺; выделение субпопуляции Т-хелперов по маркеру CD4⁺; выделение субпопуляции Т-регуляторных клеток по маркерам CD25⁺ и CD127⁻; выделение субпопуляций Т-хелперов, экспрессирующих IL-6R (по маркеру CD126⁺), TLR2 (по маркеру CD282⁺) и TLR4 (по маркеру CD284⁺). Результаты анализа представлены в виде процентного содержания соответствующих субпопуляций Т-хелперных клеток, несущих на мембране исследуемые рецепторы, по отношению к гейтированным CD4⁺-лимфоцитам.

2.3. Статистические методы

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «Statistica 8.0 для Windows». Результаты статистической обработки представляли в виде медианы (Me), верхнего (Q_{25}) и нижнего квартилей (Q_{75}). Для проверки совпадения распределения исследуемых количественных показателей с нормальным в группах пользовались критерием согласия Колмогорова-Смирнова, для проверки гомогенности дисперсии – критерием Левена. Для решения проблемы множественных сравнений использована поправка Бонферрони. Статистическую значимость различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для определения диагностической значимости уровней экспрессии исследуемых рецепторов на циркулирующих Т-хелперах крови был проведен ROC-анализ с определением пороговых значений (cut-off point), чувствительности и специфичности данных биомаркеров. Площади под ROC-кривыми (area under ROC curve / AUC) были измерены для демонстрации возможностей диагностических тестов. Расчеты производились согласно рекомендациям, представленным в тематических публикациях [69, 75]. Степень взаимосвязи между исследуемыми параметрами оценивали посредством вычисления коэффициента корреляции Спирмена (r). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался при $p < 0,001$; 0,01; 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Выделение типов Т-хелперного иммунного ответа при хронической обструктивной болезни легких

ХОБЛ развивается в результате постоянного воздействия табачного дыма, либо других раздражающих веществ или газов, на респираторную систему человека, что приводит к возникновению хронического воспалительного процесса в нижних дыхательных путях, переходящего на системный уровень. Системный воспалительный процесс характеризуется повышением уровня провоспалительных цитокинов и активированных иммунных клеток в крови. Важными участниками системного воспалительного процесса при ХОБЛ являются Т-хелперы ($CD4^+$ /Th-клетки). Различные субпопуляции $CD4^+$ -клеток способны управлять развитием иммунного ответа, активируя соответствующие эффекторные клетки. В свою очередь, дифференцировка той или иной Th субпопуляции зависит от цитокинового микроокружения [36, 141].

С целью выделения типа Т-хелперного иммунного ответа у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести стабильного течения были определены уровни циркулирующих про- и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-21, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1). На основании расчета соотношения цитокинов, являющихся ключевыми для развития субпопуляций Th1- и Th17-клеток, у большинства пациентов с ХОБЛ легкой степени тяжести был выявлен Th1 тип иммунного ответа (67% пациентов), значительно реже отмечался Th17 иммунорегуляторный путь (33% пациентов). Среди пациентов с ХОБЛ средней и тяжелой степени тяжести преобладали лица с Th17 иммунным ответом – 54% и 75%, соответственно (рисунок 7).



Рисунок 7 – Распределение типов Т-хелперного иммунного ответа среди пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести

Проведен анализ цитокинового профиля пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа. Результаты представлены в таблицах 4, 5 и 6.

Показатели цитокинового профиля пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести с Th1 иммунорегуляторным путем представлены на рисунке 8.

У пациентов с *ХОБЛ легкой степени тяжести с Th1 типом иммунного ответа* отмечалось увеличение содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов IFN- γ на 214% ($p < 0,05$) и TNF- α на 101% ($p < 0,05$), а также снижение уровня противовоспалительного IL-4 на 42% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Уровни IL-6, IL-10, IL-17A, IL-21 и TGF- β 1 не имели статистически значимых различий в сравнении с контрольной группой (таблица 4, рисунок 8).

В группе пациентов с *ХОБЛ средней степени тяжести с Th1 иммунорегуляторным путем* было зарегистрировано повышение концентраций сывороточных цитокинов, обеспечивающих мобилизацию воспалительных клеток: IFN- γ – на 50% ($p < 0,05$) и TNF- α – на 29% ($p < 0,05$) в сравнении с контрольной группой. Были выявлены изменения уровней цитокинов, проявляющих

противовоспалительные свойства, – уровень IL-10 вырос на 84% ($p<0,05$), а уровень IL-4, наоборот, снизился на 28% ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой (таблица 5, рисунок 8).

Таблица 4 – Уровни цитокинов в сыворотке крови пациентов с *ХОБЛ легкой степени тяжести* в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа (Me, Q₂₅-Q₇₅)

Цитокины, пг/мл	Контроль (52 чел.)	Th1 тип иммунного ответа (32 чел.)	Th17 тип иммунного ответа (16 чел.)
Фактор некроза опухоли- α	46,4 (43,4-48,7)	93,1* (89,5-107,6)	59,2*# (49,3-69,1)
Интерферон- γ	103,6 (91,5-125,8)	325,2* (308,4-344,2)	125,8# (114,2-151,4)
Трансформирующий фактор роста- β 1	150,1 (118,5-180,9)	162,3 (88,2-184,3)	180,1*# (175,7-275,5)
Интерлейкин-4	77,8 (66,3-81,2)	45,5* (43,1-52,4)	59,4* (48,5-65,7)
Интерлейкин-6	38,1 (35,6-38,9)	40,2 (37,3-46,1)	78,0*# (64,6-80,2)
Интерлейкин-10	32,3 (31,5-33,6)	36,4 (29,1-41,2)	43,7* (36,2-46,4)
Интерлейкин-21	75,4 (74,3-82,5)	81,5 (72,4-92,5)	200,3*# (152,8-252,1)
Интерлейкин-17А	378,3 (360,5-395,2)	402,1 (352,3-412,7)	605,4*# (602,0-620,7)

Примечания: статистическая значимость различий в сравнении с *группой контроля*: * - $p<0,05$; статистическая значимость различий между группами пациентов с *ХОБЛ одной степени тяжести с разными типами Т-хелперного иммунного ответа*: # - $p<0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Таблица 5 – Уровни цитокинов в сыворотке крови пациентов с *ХОБЛ средней степени тяжести* в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа (Me, Q₂₅-Q₇₅)

Цитокины, пг/мл	Контроль (52 чел.)	Th1 тип иммунного ответа (28 чел.)	Th17 тип иммунного ответа (33 чел.)
Фактор некроза опухоли- α	46,4 (43,4-48,7)	59,8* (52,5-62,3)	55,6 (42,6-62,9)
Интерферон- γ	103,6 (91,5-125,8)	155,3* (126,0-187,4)	110,2 (107,6-138,1)
Трансформирующий фактор роста- β 1	150,1 (118,5-180,9)	158,7 (145,6-205,4)	204,6** (195,9-275,2)
Интерлейкин-4	77,8 (66,3-81,2)	56,3* (45,7-61,4)	62,5 (58,2-71,5)
Интерлейкин-6	38,1 (35,6-38,9)	43,7 (37,2-53,8)	90,2** (78,6-106,9)
Интерлейкин-10	32,3 (31,5-33,6)	59,7* (52,5-62,7)	59,0* (40,4-66,8)
Интерлейкин-21	75,4 (74,3-82,5)	68,1 (52,3-80,6)	208,4** (168,8-249,2)
Интерлейкин-17А	378,3 (360,5-395,2)	419,8 (337,5-502,2)	541,1** (508,3-725,1)

Примечания: Данные представлены в виде Me (Q₂₅-Q₇₅). Статистическая значимость различий показателей между группами определяли с помощью критерия Манна-Уитни: * - $p < 0,05$ – статистическая значимость различий в сравнении с *группой контроля*; # - $p < 0,05$ – статистическая значимость различий между группами пациентов с *ХОБЛ одной степени тяжести* с *разными типами Т-хелперного иммунного ответа*.

Таблица 6 – Уровни цитокинов в сыворотке крови пациентов с *ХОБЛ тяжелой степени тяжести* в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа (Me, Q₂₅-Q₇₅)

Цитокины, пг/мл	Контроль (52 чел.)	Th1 тип иммунного ответа (14 чел.)	Th17 тип иммунного ответа (42 чел.)
Фактор некроза опухоли-α	46,4 (43,4-48,7)	146,8* (145,8-147,9)	70,3*# (60,3-94,5)
Интерферон-γ	103,6 (91,5-125,8)	195,7* (191,6-209,7)	108,1# (102,1-161,4)
Трансформирующий фактор роста-β1	150,1 (118,5-180,9)	215,2* (210,6-220,3)	280,0*# (240,2-340,2)
Интерлейкин-4	77,8 (66,3-81,2)	64,2 (54,7-73,6)	81,3# (77,2-99,5)
Интерлейкин-6	38,1 (35,6-38,9)	60,4* (52,6-62,9)	79,1*# (69,3-84,7)
Интерлейкин-10	32,3 (31,5-33,6)	39,8 (33,5-43,4)	69,9*# (61,4-92,0)
Интерлейкин-21	75,4 (74,3-82,5)	51,6* (48,3-55,1)	254,1*# (250,3-276,6)
Интерлейкин-17А	378,3 (360,5-395,2)	364,5 (303,2-425,8)	640,2*# (526,2-705,4)

Примечания: статистическая значимость различий в сравнении с *группой контроля*: * - $p < 0,05$; статистическая значимость различий между группами пациентов с *ХОБЛ одной степени тяжести с разными типами Т-хелперного иммунного ответа*: # - $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

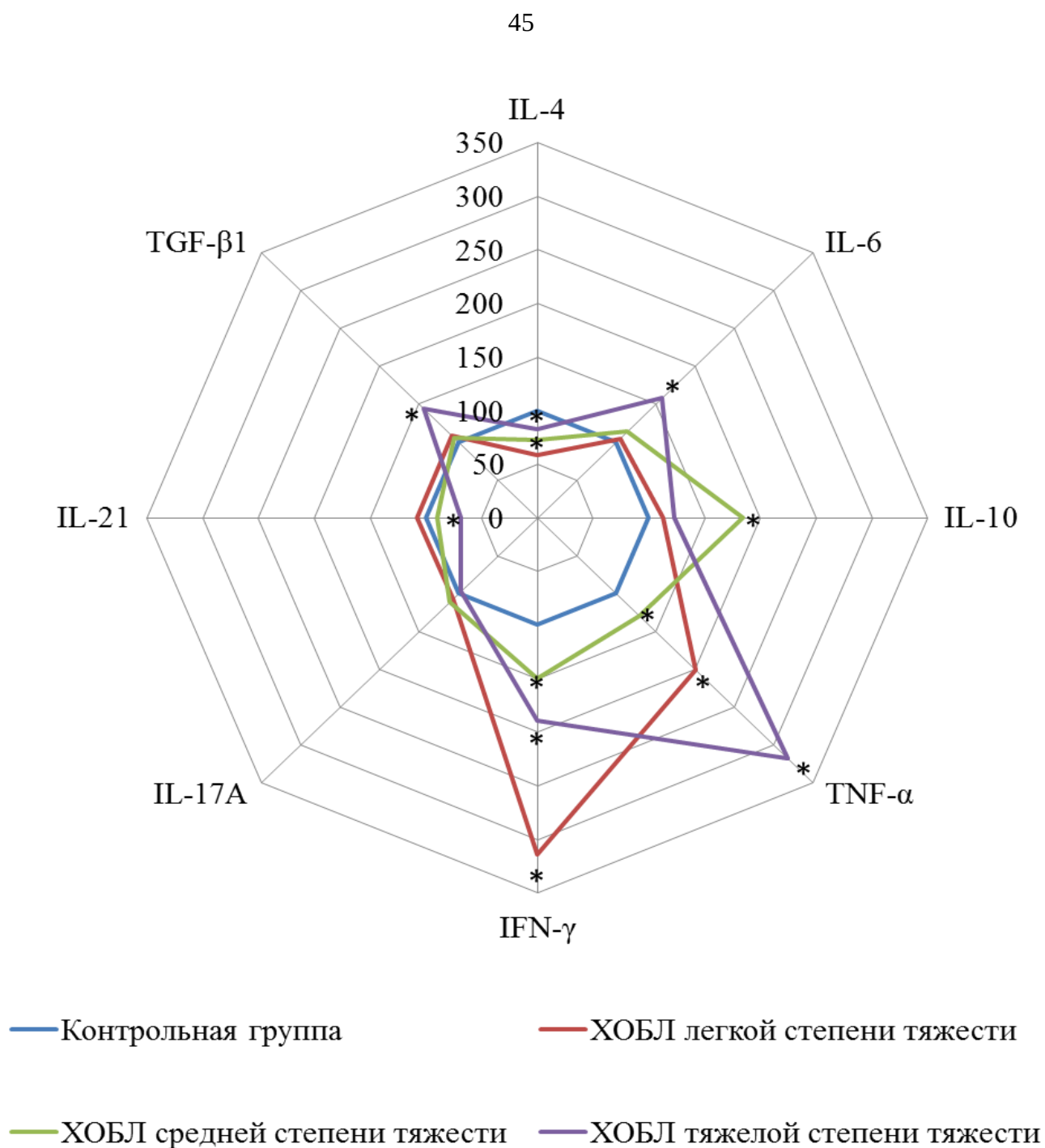


Рисунок 8 – Уровни цитокинов в сыворотке крови пациентов ХОБЛ разной степени тяжести с *Th1* типом иммунного ответа

Примечание: показатели посчитаны относительно группы контроля, взятой за 100%; статистическая значимость различий в сравнении с группой контроля: * - $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

В крови пациентов с *ХОБЛ тяжелой степени тяжести*, у которых *воспалительный процесс развивался по Th1 пути*, было диагностировано увеличение уровней TNF- α на 217% ($p<0,05$) и IFN- γ на 89% ($p<0,05$), повышение концентрации цитокинов, необходимых для дифференцировки Th17-клеток, – IL-6 (на 58%, $p<0,05$) и TGF- β 1 (на 43%, $p<0,05$), и снижение содержания IL-21 на 32% ($p<0,05$) относительно контрольных значений (таблица 6, рисунок 8).

Цитокиновый статус пациентов с *ХОБЛ* разной степени тяжести с Th17 типом иммунного ответа отображен на рисунке 9.

У пациентов с *ХОБЛ легкой степени тяжести с Th17 типом иммунного ответа* было установлено повышение интенсивности синтеза всех исследуемых цитокинов по сравнению с группой контроля: IL-21 (на 165%, $p<0,05$), IL-6 (на 104%, $p<0,05$), IL-17A (на 60%, $p<0,05$), IL-10 (на 35%, $p<0,05$), TNF- α (на 28%, $p<0,05$), IFN- γ (на 22%, $p<0,05$) и TGF- β 1 (на 20%, $p<0,05$); за исключением IL-4, его концентрация была снижена на 24% ($p<0,05$) относительно контроля. Кроме того, в этой группе пациентов наблюдались более высокие уровни IL-21 (выше на 145%, $p<0,05$), IL-6 (выше на 95%, $p<0,05$), IL-17A (выше на 51%, $p<0,05$), TGF- β 1 (выше на 11%, $p<0,05$) и более низкие уровни IFN- γ (ниже на 61%, $p<0,05$) и TNF- α (ниже на 36%, $p<0,05$) по сравнению с пациентами с Th1 типом иммунного ответа (таблица 4, рисунок 9).

У пациентов с *ХОБЛ средней степени тяжести с Th17-зависимым иммунным ответом* уровни провоспалительных цитокинов в крови значительно превышали показатели здоровых лиц: уровень IL-21 был повышен на 176% ($p<0,05$), IL-6 – на 136% ($p<0,05$), IL-17A – на 43% ($p<0,05$), TGF- β 1 – на 36% ($p<0,05$). Уровень противовоспалительного IL-10 был повышен на 82% ($p<0,05$) в сравнении с контрольной группой. Следует отметить, что в этой группе больных концентрации ряда исследуемых цитокинов были значительно выше, чем у пациентов с Th1 иммунорегуляторным путем, а именно: IL-21 (выше на 207%, $p<0,05$), IL-6 (выше на 107%, $p<0,05$), IL-17A (выше на 29%, $p<0,05$) и TGF- β 1 (выше на 29%, $p<0,05$) (таблица 5, рисунок 9).

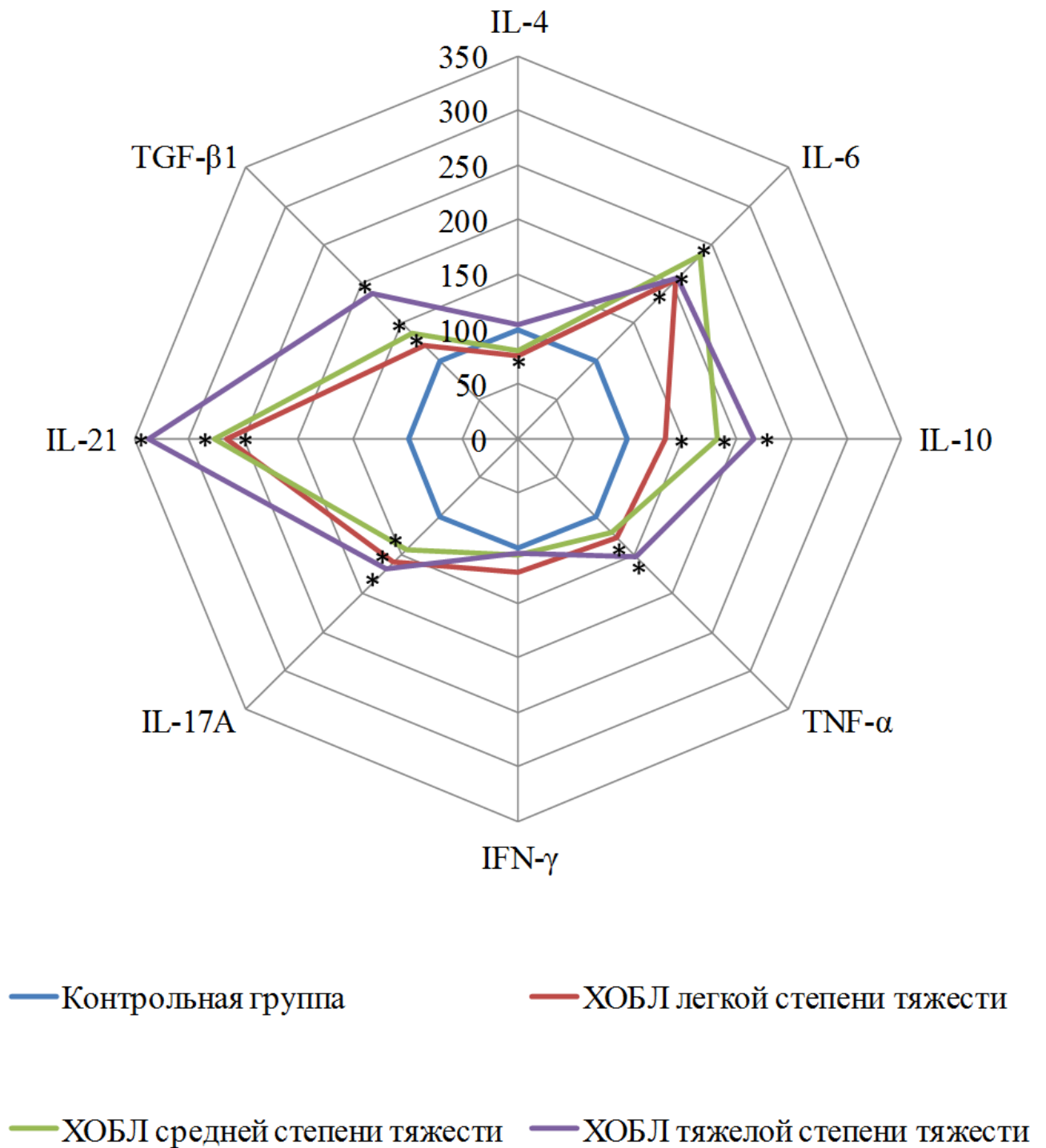


Рисунок 9 – Уровни цитокинов в сыворотке крови пациентов ХОБЛ разной степени тяжести с *Th17* типом иммунного ответа

Примечание: показатели посчитаны относительно группы контроля, взятой за 100%; статистическая значимость различий в сравнении с группой контроля: * - $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

У пациентов с *ХОБЛ тяжелой степени тяжести с Th17 типом иммунного ответа* диагностировали максимальное увеличение сывороточных уровней цитокинов по сравнению с контролем: IL-21 – на 236% ($p<0,05$), IL-6 – на 107% ($p<0,05$), TGF- β 1 – на 87% ($p<0,05$), IL-17A – на 69% ($p<0,05$), TNF- α – на 52% ($p<0,05$) и IL-10 – на 115% ($p<0,05$). В этой группе пациентов были выявлены более высокие уровни IL-6 (выше на 31%, $p<0,05$), IL-17A (выше на 76%, $p<0,05$), IL-21 (выше на 393%, $p<0,05$), TGF- β 1 (выше на 30%, $p<0,05$) и более низкие уровни TNF- α (ниже на 52%, $p<0,05$) и IFN- γ (ниже на 45%, $p<0,05$) в сравнении с пациентами с Th1 типом иммунного ответа (таблица 6, рисунок 9).

Таким образом, при *ХОБЛ* наблюдается формирование Th1 и Th17 типов иммунного ответа. У подавляющего большинства пациентов с *ХОБЛ легкой степени тяжести* преобладает Th1 иммунорегуляторный путь, характеризующийся повышенными уровнями в сыворотке крови провоспалительных цитокинов TNF- α , IFN- γ и низким содержанием IL-4, обладающего противовоспалительным эффектом. При среднетяжелом и тяжелом течении заболевания на первый план выходит Th17-ассоциированный иммунный ответ, который поддерживается высокими концентрациями IL-21, IL-6, IL-17A, TGF- β 1. Кроме того, при этом типе Т-хелперного иммунного ответа отмечается повышение уровня провоспалительного IL-10 в крови.

3.2. Содержание Т-регуляторных клеток в крови при хронической обструктивной болезни легких в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа

Т-регуляторные клетки ($CD4^+CD25^{+127^-}$) являются центральными регуляторами иммунного ответа, которые выполняют свои функции за счет супрессии функций других эффекторных клеток. Результаты оценки состояния Т-регуляторного клеточного звена у больных *ХОБЛ* в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа отображены в таблице 7 и на рисунке 10.

Таблица 7 – Количество (%) циркулирующих Т-регуляторных клеток у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа (Me, Q₂₅-Q₇₅)

Контроль (52 чел.)		7,44 (6,75-7,82)
ХОБЛ легкой степени тяжести (48 чел.)	Th1 тип иммунного ответа (32 чел.)	2,73*** (2,65-3,06)
	Th17 тип иммунного ответа (16 чел.)	2,61*** (2,47-2,89)
ХОБЛ средней степени тяжести (61 чел.)	Th1 тип иммунного ответа (28 чел.)	2,91*** (2,75-3,18)
	Th17 тип иммунного ответа (33 чел.)	1,74***# ^ (1,54-1,98)
ХОБЛ тяжелой степени тяжести (56 чел.)	Th1 тип иммунного ответа (14 чел.)	2,77*** (2,53-2,91)
	Th17 тип иммунного ответа (42 чел.)	1,24***## ^ (1,03-1,35)

Примечания: статистическая значимость различий в сравнении с *группой контроля*: *** - $p < 0,001$; статистическая значимость различий между группами пациентов с ХОБЛ одной степени тяжести с *разными типами Т-хелперного иммунного ответа*: # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$; статистическая значимость различий между группами пациентов с ХОБЛ *разной степени тяжести* с одним типом Т-хелперного иммунного ответа: ^ - $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

У пациентов с ХОБЛ легкой степени тяжести с *Th1 типом иммунного ответа* было диагностировано снижение относительного числа циркулирующих Т-регуляторных клеток на 63,5% ($p < 0,001$) в сравнении с группой контроля. При ХОБЛ средней степени тяжести, развивающейся в соответствии с Th1 иммунорегуляторным путем, процентное содержание CD4⁺CD25⁺127⁻-клеток оставалось ниже контрольного значения на 61% ($p < 0,001$). У больных ХОБЛ тяжелой степени тяжести с преобладающим Th1 цитокиновым профилем также было отмечено низкое относительное число Treg-клеток в сравнении с контролем (ниже на 63,5%, $p < 0,001$) (таблица 7, рисунок 10).

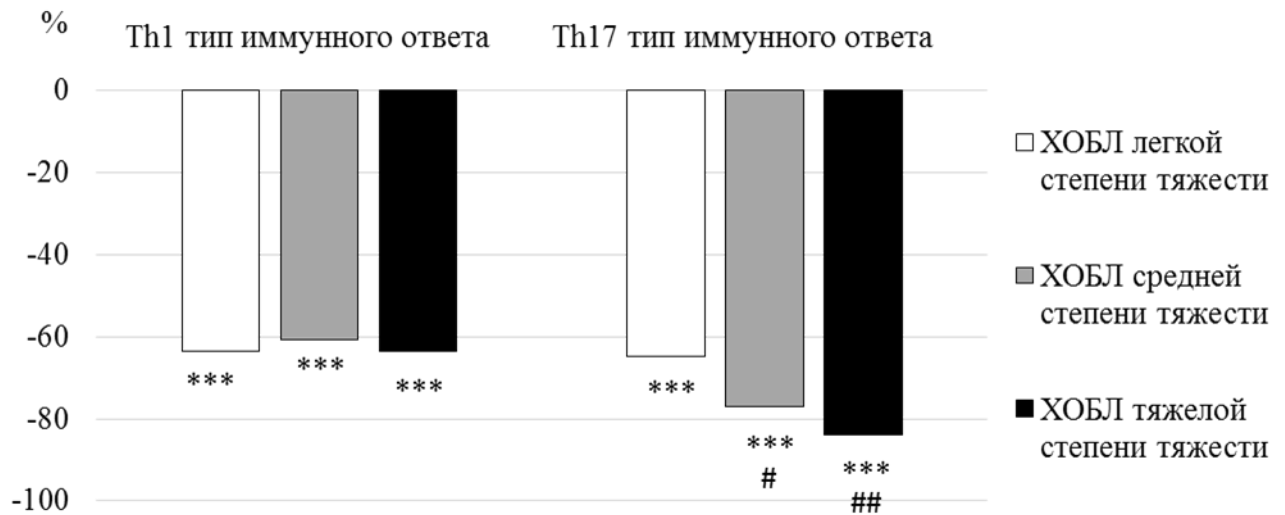


Рисунок 10 – Количество циркулирующих *T-регуляторных клеток* у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа

Примечания: показатели посчитаны относительно группы контроля, взятой за 0%; статистическая значимость различий в сравнении с *группой контроля*: *** - $p < 0,001$; статистическая значимость различий между группами пациентов с ХОБЛ одной степени тяжести с *разными типами Т-хелперного иммунного ответа*: # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$ (критерий Манна-Уитни).

В группе пациентов с ХОБЛ легкой степени тяжести с *Th17 типом иммунного ответа* относительное количество $CD4^+CD25^+127^-$ -клеток в крови было снижено на 65% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой. При ХОБЛ средней степени тяжести с превалированием Th17 цитокинового профиля наблюдалось снижение числа исследуемых клеток на 77% ($p < 0,001$) относительно контроля. В этой группе пациентов было выявлено более низкое значение исследуемого показателя (ниже на 41%, $p < 0,05$) по сравнению с пациентами с Th1 типом иммунного ответа. В группе пациентов с ХОБЛ тяжелой степени тяжести с Th17 типом иммунного ответа установлено снижение процента $CD4^+CD25^+127^-$ -клеток на 84% ($p < 0,001$) относительно группы здоровых лиц (таблица 7 рисунок 10). В этой группе пациентов было отмечено более низкое число Treg-клеток в крови (ниже на 44%, $p < 0,01$) относительно пациентов с Th1 типом иммунного ответа.

Было проведено сравнение показателя между группами пациентов с разными степенями тяжести ХОБЛ с Th17 типом иммунного ответа. В группе пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести количество Treg-клеток было ниже на 34,6% ($p < 0,05$) по сравнению с пациентами с ХОБЛ легкой степени тяжести. При ХОБЛ тяжелого течения отмечалось снижение показателя на 29,4% ($p < 0,05$) относительно пациентов со среднетяжелым течением заболевания.

Таким образом, прогрессирование системного воспаления при ХОБЛ характеризуется снижением пула циркулирующих Т-регуляторных клеток, что свидетельствует о нарушении Т-клеточных механизмов регуляции воспаления при ХОБЛ. При этом, наиболее низкие значения этого параметра отмечаются у пациентов с ХОБЛ с Th17 иммунорегуляторным путем.

3.3. Экспрессия рецептора к интерлейкину-6, толл-подобных рецепторов 2 и 4 типа на мембране CD4⁺-клеток крови при хронической обструктивной болезни легких в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа

В настоящее время показано, что сигнальные пути, опосредуемые рецептором к интерлейкину-6, толл-подобными рецепторами 2 и 4 типа, участвуют в модуляции функций CD4⁺-клеток. Для оценки их вклада в патогенез ХОБЛ был проведен анализ уровней экспрессии IL-6R, TLR2 и TLR4 на циркулирующих CD4⁺-клетках у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести стабильного течения в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа. Полученные данные отображены в таблицах 8, 9, 10.

Исследование экспрессии *IL-6R* на популяции CD4⁺-клеток крови пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести показало различия в значениях этого показателя в зависимости от превалирующего Th-ассоциированного цитокинового профиля (таблицы 8, 9, 10, рисунок 11).

Таблица 8 – Количество циркулирующих Т-хелперов, экспрессирующих IL-6R, TLR2 и TLR4, у пациентов с *ХОБЛ легкой степени тяжести* в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа (Me, Q₂₅-Q₇₅)

Группы	Т-хелперы, экспрессирующие IL-6R, %	Т-хелперы, экспрессирующие TLR2, %	Т-хелперы, экспрессирующие TLR4, %
Контроль (52 чел.)	1,77 (1,63-1,80)	1,10 (0,80-1,30)	1,02 (0,85-1,29)
Th1 тип иммунного ответа (32 чел.)	2,41 (2,27-2,73)	1,22 (0,96-1,42)	0,95 (0,82-1,01)
Th17 тип иммунного ответа (16 чел.)	2,59* (2,14-2,72)	1,57 (1,11-1,72)	0,94 (0,75-1,02)

Примечания: статистическая значимость различий в сравнении с *группой контроля*: * - $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Таблица 9 – Количество циркулирующих Т-хелперов, экспрессирующих IL-6R, TLR2 и TLR4, у пациентов с *ХОБЛ средней степени тяжести* в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа (Me, Q₂₅-Q₇₅)

Группы	Т-хелперы, экспрессирующие IL-6R, %	Т-хелперы, экспрессирующие TLR2, %	Т-хелперы, экспрессирующие TLR4, %
Контроль (52 чел.)	1,77 (1,63-1,80)	1,10 (0,80-1,30)	1,02 (0,85-1,29)
Th1 тип иммунного ответа (28 чел.)	1,51* (1,32-2,14)	1,86* (1,65-2,07)	0,82 (0,71-0,97)
Th17 тип иммунного ответа (33 чел.)	3,80***## (2,54-4,16)	2,66***## (2,49-2,90)	0,79 (0,66-0,85)

Примечания: статистическая значимость различий в сравнении с *группой контроля*: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$; статистическая значимость различий между группами пациентов с ХОБЛ одной степени тяжести с *разными типами Т-хелперного иммунного ответа*: ## - $p < 0,01$ (критерий Манна-Уитни).

Таблица 10 – Количество циркулирующих Т-хелперов, экспрессирующих IL-6R, TLR2 и TLR4, у пациентов с *ХОБЛ тяжелой степени тяжести* в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа (Me, Q₂₅-Q₇₅)

Группы	Т-хелперы, экспрессирующие IL-6R, %	Т-хелперы, экспрессирующие TLR2, %	Т-хелперы, экспрессирующие TLR4, %
Контроль (52 чел.)	1,77 (1,63-1,80)	1,10 (0,80-1,30)	1,02 (0,85-1,29)
Th1 тип иммунного ответа (14 чел.)	3,71*** (3,42-4,22)	2,12* (1,93-2,28)	0,68* (0,59-0,77)
Th17 тип иммунного ответа (42 чел.)	6,76**# (5,51-8,53)	3,95***### (3,42-4,31)	0,51** (0,42-0,54)

Примечания: статистическая значимость различий в сравнении с *группой контроля*: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$; статистическая значимость различий между группами пациентов с ХОБЛ одной степени тяжести с *разными типами Т-хелперного иммунного ответа*: # - $p < 0,05$, ### - $p < 0,001$ (критерий Манна-Уитни).

У пациентов с ХОБЛ легкой степени тяжести с *Th1 типом иммунного ответа* наблюдалась тенденция к увеличению относительного количества CD4⁺CD126⁺-клеток (повышение на 37%) по сравнению с группой контроля (таблица 8, рисунок 11). В группе пациентов с ХОБЛ среднетяжелого течения, имеющих Th1-ассоциированный цитокиновый профиль, было отмечено снижение числа CD126⁺ Т-хелперов на 14% ($p < 0,05$) относительно здоровых лиц (таблица 9, рисунок 11). У пациентов с ХОБЛ тяжелого течения с Th1 иммунным путем уровень CD4⁺CD126⁺-клеток превышал контрольное значение на 111% ($p < 0,001$) (таблица 10, рисунок 11).

У больных ХОБЛ легкой степени тяжести с *Th17 иммунорегуляторным путем* было обнаружено увеличение количества Th-клеток, экспрессирующих IL-6R, на 47% ($p < 0,05$) относительно контроля (таблица 8, рисунок 11). В группе пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести, обладающих Th17-ассоциированным

цитокиновым профилем было отмечено увеличение процентного соотношения Th-клеток с маркером CD126⁺ на 117% ($p<0,01$) по сравнению со здоровыми добровольцами (таблица 9, рисунок 11). У пациентов с ХОБЛ тяжелой степени, имеющих Th17 тип иммунного ответа, уровень CD4⁺CD126⁺-клеток был повышен на 286% ($p<0,01$) относительно контрольной группы (таблица 10, рисунок 11).

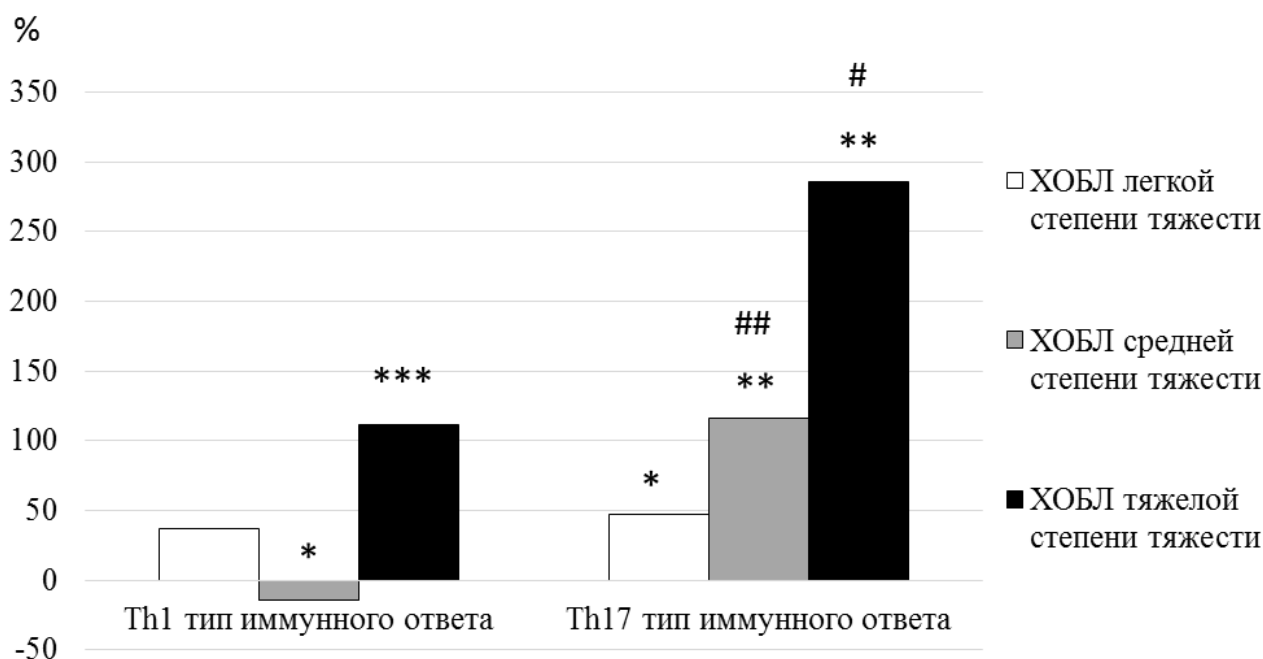


Рисунок 11 – Количество *циркулирующих Т-хелперов, экспрессирующих IL-6R*, у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа

Примечания: показатели посчитаны относительно группы контроля, взятой за 0%; статистическая значимость различий в сравнении с *группой контроля*: * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$; статистическая значимость различий между группами пациентов с ХОБЛ одной степени тяжести с *разными типами Т-хелперного иммунного ответа*: # - $p<0,05$, ## - $p<0,01$ (критерий Манна-Уитни).

В ходе исследования у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести с преобладающими Th1 или Th17 цитокиновыми профилями были обнаружены различия в экспрессии *TLR2* на циркулирующих CD4⁺-клетках при прогрессировании заболевания (таблицы 8, 9, 10, рисунок 12).

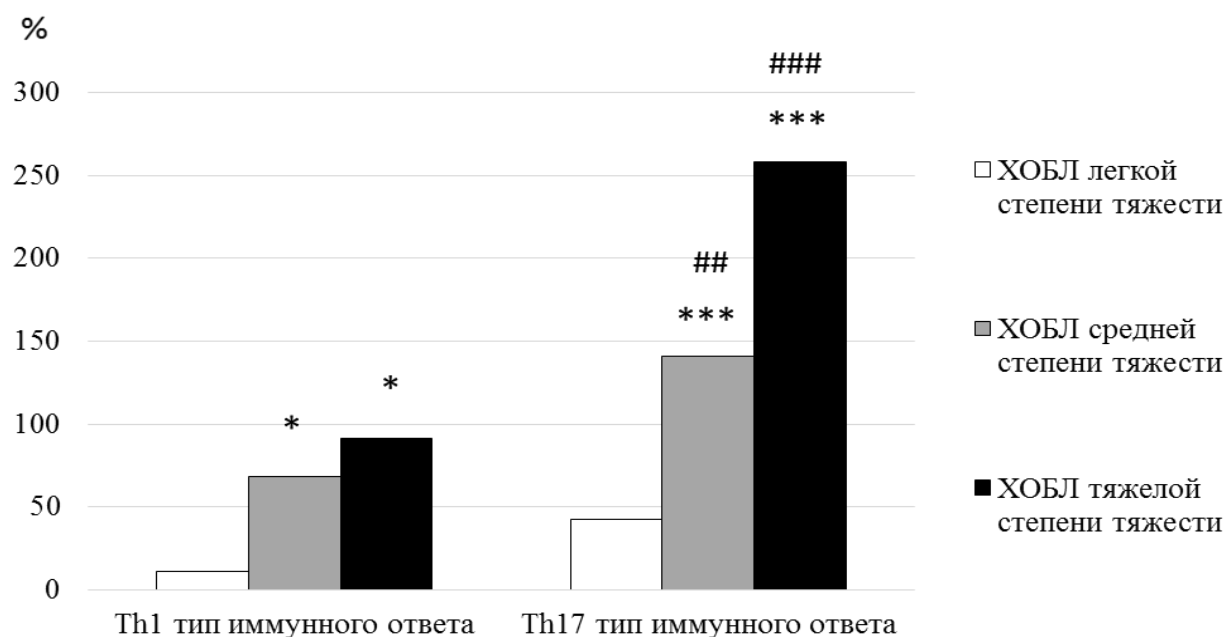


Рисунок 12 – Количество циркулирующих *T*-хелперов, экспрессирующих *TLR2*, у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести в зависимости от типа *T*-хелперного иммунного ответа

Примечания: показатели посчитаны относительно группы контроля, взятой за 0%; статистическая значимость различий в сравнении с *группой контроля*: * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$; статистическая значимость различий между группами пациентов с ХОБЛ одной степени тяжести с *разными типами T-хелперного иммунного ответа*: ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,01$ (критерий Манна-Уитни).

В группе пациентов с ХОБЛ легкой степени тяжести с *Th1* типом иммунного ответа отмечалась тенденция к увеличению числа $CD4^+$ -клеток, экспрессирующих *TLR2*, на 11% относительно контроля (таблица 8, рисунок 12). У пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести с преобладанием *Th1* иммунорегуляторного пути было статистически значимо повышено процентное содержание $CD4^+CD282^+$ -клеток на 68% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными значениями (таблица 9, рисунок 12). Больные ХОБЛ тяжелой степени тяжести с преобладанием *Th1* иммунорегуляторного пути демонстрировали статистически значимое повышение количества *T*-хелперов, несущих на мембране *TLR2*, на 92% ($p < 0,05$) относительно контрольных значений (таблица 10, рисунок 12).

У пациентов с ХОБЛ легкой степени тяжести с *Th17* типом иммунного ответа наблюдалась тенденция к возрастанию числа $CD4^+CD282^+$ -клеток на 43% относительно контроля (таблица 8, рисунок 12). У пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести с *Th17*-ассоциированным цитокиновым профилем было выявлено статистически значимое возрастание процентного содержания $CD4^+CD282^+$ -клеток на 141% ($p<0,001$) по сравнению с контрольной группой (таблица 9, рисунок 12). В группе пациентов с ХОБЛ тяжелой степени с *Th17* иммунным ответом отмечалось статистически значимое повышение частоты встречаемости $CD4^+CD282^+$ -клеток на 258% ($p<0,001$) в сравнении со значениями здоровых лиц (таблица 10, рисунок 12).

Результаты исследования динамики экспрессии *TLR4* на циркулирующих $CD4^+$ -клетках при прогрессировании ХОБЛ у пациентов с *Th1* и *Th17* типами иммунного ответа представлены в таблицах 8, 9, 10 и на рисунке 13.

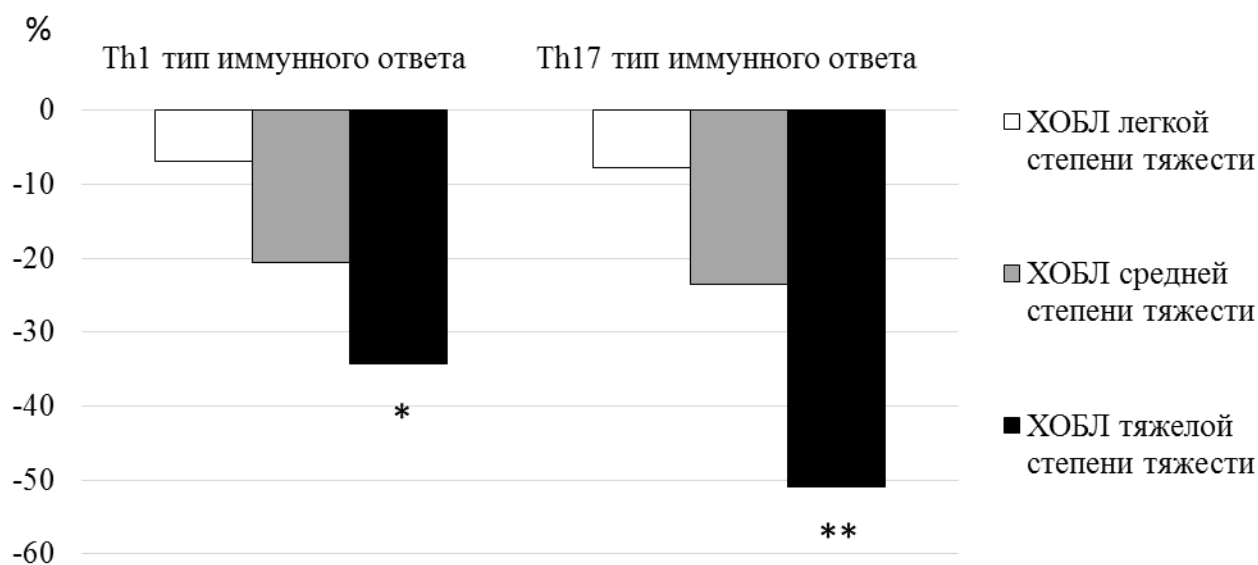


Рисунок 13 – Количество циркулирующих *T*-хелперов, экспрессирующих *TLR4*, у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести в зависимости от типа *T*-хелперного иммунного ответа

Примечания: показатели посчитаны относительно группы контроля, взятой за 0%; статистическая значимость различий в сравнении с группой контроля: * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$ (критерий Манна-Уитни).

У пациентов с ХОБЛ легкой и средней степени тяжести с *Th1* типом иммунного ответа отмечалась тенденция к снижению процентного содержания CD4⁺CD284⁺-клеток на 8% и 21%, соответственно, относительно контрольной группы (таблицы 8, 9, рисунок 13). У пациентов с ХОБЛ тяжелого течения с данным типом иммунного ответа выявлялось статистически значимое уменьшение относительного числа CD4⁺CD284⁺-клеток на 34% ($p < 0,05$) в сравнении с контролем (таблица 10, рисунок 13).

В группах пациентов с ХОБЛ легкой и средней степени тяжести с преобладающим *Th17* цитокиновым ответом наблюдалась тенденция к уменьшению количества циркулирующих CD4⁺CD284⁺-клеток на 8% и 23,5%, соответственно, относительно контроля (таблица 8, 9, рисунок 13). При ХОБЛ тяжелого течения процентное содержание исследуемых клеток было статистически значимо ниже контрольного значения на 51% ($p < 0,01$) (таблица 10, рисунок 13).

Таким образом, при прогрессировании ХОБЛ происходит повышение экспрессии IL-6R и TLR2 на Т-хелперах крови, которое наиболее выражено при Th17 типе иммунного ответа. Можно заключить, что сигнальные пути, опосредованные исследуемыми рецепторами, вносят значительный вклад в поляризацию Т-хелперного иммунного ответа в сторону Th17 иммунорегуляторного пути и, как следствие, в развитие системной воспалительной реакции при этом заболевании. В то же время, при утяжелении течения ХОБЛ наблюдается ингибирование экспрессии TLR4.

3.4. Взаимосвязи между сывороточным цитокиновым профилем и экспрессией рецептора к интерлейкину-6, толл-подобных рецепторов 2 и 4 типа на мембране CD4⁺-клеток крови при хронической обструктивной болезни легких

Проведен корреляционный анализ между показателями сывороточного цитокинового профиля и количеством Т-регуляторных клеток, Т-хелперов, экспрессирующих IL-6R, TLR2, TLR4, в периферической крови при ХОБЛ разной степени тяжести.

Результаты корреляционного анализа между сывороточным цитокиновым профилем и количеством *Т-регуляторных клеток* в периферической крови при ХОБЛ разной степени тяжести представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Корреляционные связи между сывороточными уровнями цитокинов и количеством циркулирующих *Т-регуляторных клеток* при ХОБЛ разной степени тяжести

Цитокины, пг/мл	Т-регуляторные клетки, %		
	ХОБЛ легкой степени тяжести	ХОБЛ средней степени тяжести	ХОБЛ тяжелой степени тяжести
Интерлейкин-6	-	-	-0,42
Интерлейкин-10	0,57	-	-0,63
Интерлейкин-17А	0,67	-	-0,63
Фактор некроза опухоли-α	0,49	-	-
Интерферон-γ	0,69	-	-
Трансформирующий фактор роста-β1	-	-0,82	-0,54

Примечание: данные представлены в виде значений коэффициента корреляции Спирмена (r); различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

У пациентов с ХОБЛ легкой степени тяжести выявлены положительные корреляционные связи средней силы между относительным числом циркулирующих Treg-клеток и концентрациями в крови IFN- γ ($r=0,69$; $p<0,05$), IL-17A ($r=0,67$; $p<0,05$), IL-10 ($r=0,57$; $p<0,05$), а также слабая положительная корреляционная связь с сывороточным уровнем TNF- α ($r=0,49$; $p<0,05$). При ХОБЛ средней степени тяжести содержание Treg-лимфоцитов в крови сильно отрицательно коррелировало с уровнем TGF- $\beta 1$ ($r=-0,82$; $p<0,05$). В группе пациентов с тяжелой ХОБЛ описаны отрицательные слабые и средние корреляционные связи между количеством Treg-клеток и концентрациями IL-10 ($r=-0,63$; $p<0,05$), IL-17A ($r=-0,63$; $p<0,05$), TGF- $\beta 1$ ($r=-0,54$; $p<0,05$), IL-6 ($r=-0,42$; $p<0,05$) (таблица 11).

Результаты корреляционного анализа между сывороточным цитокиновым профилем и *уровнем экспрессии IL-6R на циркулирующих Th-клетках* при ХОБЛ разной степени тяжести отображены в таблице 12.

При ХОБЛ легкой степени тяжести относительное число циркулирующих CD4⁺CD126⁺-клеток средне положительно коррелировало с концентрацией в крови TGF- $\beta 1$ ($r=0,69$; $p<0,05$) и слабо – с уровнем IL-6 ($r=0,49$; $p<0,05$). При ХОБЛ средней степени тяжести установлены как положительные, так и отрицательные корреляционные связи средней и слабой силы между относительным количеством CD4⁺CD126⁺-клеток и концентрациями TGF- $\beta 1$ ($r=-0,51$; $p<0,05$), TNF- α ($r=0,41$; $p<0,05$) и IFN- γ ($r=0,39$; $p<0,05$). В группе пациентов с ХОБЛ тяжелой степени тяжести выявлены отрицательные и положительные корреляционные связи, различающиеся по силе, между количеством CD4⁺CD126⁺-клеток и уровнями следующих цитокинов: IL-4 ($r=-0,68$; $p<0,05$) IL-6 ($r=0,97$; $p<0,05$), IL-10 ($r=0,84$; $p<0,05$), IL-17A ($r=0,98$; $p<0,05$), IL-21 ($r=-0,84$; $p<0,05$), IFN- γ ($r=-0,88$; $p<0,05$) и TGF- $\beta 1$ ($r=0,78$; $p<0,05$) (таблица 12).

Таблица 12 – Корреляционные связи между сывороточными уровнями цитокинов и количеством циркулирующих *T*-хелперов, экспрессирующих *IL-6R*, при ХОБЛ разной степени тяжести

Цитокины, пг/мл	Т-хелперы, экспрессирующие <i>IL-6R</i> , %		
	ХОБЛ легкой степени тяжести	ХОБЛ средней степени тяжести	ХОБЛ тяжелой степени тяжести
Интерлейкин-4	-	-	-0,68
Интерлейкин-6	0,49	-	0,97
Интерлейкин-10	-	-	0,84
Интерлейкин-17А	-	-	0,98
Интерлейкин-21	-	-	-0,84
Фактор некроза опухоли- α	-	0,41	-
Интерферон- γ	-	0,39	-0,88
Трансформирующий фактор роста- $\beta 1$	0,69	-0,51	0,78

Примечание: данные представлены в виде значений коэффициента корреляции Спирмена (r); различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Результаты корреляционного анализа между сывороточным цитокиновым профилем и уровнем экспрессии *TLR2* на циркулирующих $CD4^+$ -клетках при ХОБЛ разной степени тяжести представлены в таблице 13.

При ХОБЛ легкой степени тяжести были установлены сильные положительные корреляционные связи между относительным числом циркулирующих Th-клеток, экспрессирующих *TLR2*, и сывороточными уровнями *IL-21* ($r=0,78$; $p<0,05$), *IL-17A* ($r=0,78$; $p<0,05$), *IL-6* ($r=0,72$; $p<0,05$). Кроме того, процентное содержание $CD4^+CD282^+$ -клеток в этой группе пациентов отрицательно коррелировало с сывороточной концентрацией *IL-10* ($r=-0,64$;

$p < 0,05$). При ХОБЛ средней степени тяжести отмечалась сильная положительная корреляционная связь между относительным количеством исследуемых клеток в крови и сывороточным уровнем IL-21 ($r = 0,86$; $p < 0,05$), а также положительные взаимосвязи средней силы между процентным содержанием этих клеток и сывороточными концентрациями IL-6 ($r = 0,68$; $p < 0,05$), IL-17A ($r = 0,68$; $p < 0,05$), IL-10 ($r = 0,54$; $p < 0,05$). При ХОБЛ тяжелой степени тяжести выявлены сильные и очень сильные прямые корреляционные связи между числом $CD4^+CD282^+$ -клеток и сывороточным содержанием IL-17A ($r = 0,97$; $p < 0,05$), IL-21 ($r = 0,95$; $p < 0,05$), IL-6 ($r = 0,88$; $p < 0,05$) (таблица 13).

Таблица 13 – Корреляционные связи между сывороточными уровнями цитокинов и количеством циркулирующих *T*-хелперов, экспрессирующих TLR2, при ХОБЛ разной степени тяжести

Цитокины, пг/мл	Т-хелперы, экспрессирующие TLR2, %		
	ХОБЛ легкой степени тяжести	ХОБЛ средней степени тяжести	ХОБЛ тяжелой степени тяжести
Интерлейкин-6	0,72	0,68	0,88
Интерлейкин-10	-0,64	0,54	-
Интерлейкин-17А	0,78	0,68	0,97
Интерлейкин-21	0,78	0,86	0,95

Примечание: данные представлены в виде значений коэффициента корреляции Спирмена (r); различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Результаты корреляционного анализа между сывороточным цитокиновым профилем и *уровнем экспрессии TLR4 на T-хелперах* периферической крови при ХОБЛ разной степени тяжести представлены в таблице 14.

У пациентов с ХОБЛ легкой степени тяжести была установлена прямая корреляционная связь между содержанием в крови CD4⁺CD284⁺-клеток и сывороточными уровнями IL-17A ($r=0,48$; $p<0,05$), TNF- α ($r=0,53$; $p<0,05$), IL-10 ($r=0,54$; $p<0,05$). В группе пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести была выявлена прямая связь между количеством CD4⁺CD284⁺-клеток и уровнем IL-4 ($r=0,55$; $p<0,05$) и обратная связь с уровнем IL-21 ($r=-0,53$; $p<0,05$). В группе пациентов с ХОБЛ тяжелого течения число CD4⁺CD284⁺-клеток обратно коррелировало с уровнями IL-6 ($r=-0,64$; $p<0,05$), IL-17A ($r=-0,78$; $p<0,05$) и TNF- α ($r=-0,42$; $p<0,05$) (таблица 14).

Таблица 14 – Корреляционные связи между сывороточными уровнями цитокинов и количеством циркулирующих *T*-хелперов, экспрессирующих TLR4, при ХОБЛ разной степени тяжести

Цитокины, пг/мл	Т-хелперы, экспрессирующие TLR4, %		
	ХОБЛ легкой степени тяжести	ХОБЛ средней степени тяжести	ХОБЛ тяжелой степени тяжести
Интерлейкин-4	-	0,55	-
Интерлейкин-6	-	-	-0,64
Интерлейкин-10	0,54	-	-
Интерлейкин-17А	0,48	-	-0,78
Интерлейкин-21	-	-0,53	-
Фактор некроза опухоли - α	0,53	-	-0,42

Примечание: данные представлены в виде значений коэффициента корреляции Спирмена (r); различия считались статистически значимыми при $p<0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Таким образом, корреляционный анализ между исследуемыми параметрами цитокинового и рецепторного звеньев иммунитета при ХОБЛ легкой степени тяжести показал наличие сильных взаимосвязей между числом циркулирующих CD4⁺-клеток, несущих на мембране TLR2, и содержанием в сыворотке крови Th17-ассоциированных цитокинов, таких как IL-6, IL-17A и IL-21. Эти данные свидетельствуют о том, что TLR2 сигнальный каскад играет роль в формировании Th17 типа иммунного ответа на ранней стадии развития ХОБЛ.

При ХОБЛ средней степени тяжести была выявлена сильная корреляция между числом Т-хелперов, экспрессирующих TLR2, и уровнями IL-6, IL-17A и IL-21, необходимых для функционирования Th1-клеток, что свидетельствует об участии TLR2 в развитии Th17 типа иммунного ответа при прогрессировании патологии. Была установлена сильная обратная корреляционная связь между числом Treg-лимфоцитов и уровнем TGF- β 1, посредством которого эти клетки реализуют свои свойства, что говорит о нарушении супрессивной функции Treg-клеток.

При ХОБЛ тяжелого течения повышенная экспрессия IL-6R на Th-клетках положительно коррелировала с высокими уровнями цитокинов, ассоциированных с развитием Th17 фенотипа (IL-17A и TGF- β 1), и отрицательно – с уровнем Th1-цитокина IFN- γ и Th2-цитокина IL-4. Это связано с тем, что классический IL-6 сигналинг способствует поляризации Т-хелперного иммунного ответа в сторону Th17 при прогрессировании ХОБЛ. Установлены очень сильные взаимосвязи между числом Т-хелперов, экспрессирующих TLR2, и содержанием в крови IL-6, IL-21 и IL-17A, что говорит об участии этого рецептора в развитии Th17 иммунного ответа в ходе прогрессирования ХОБЛ. Выявлена корреляционная связь между низким содержанием в крови Т-хелперов, экспрессирующих TLR4, и высокими уровнями в сыворотке крови Th17-цитокинов – IL-6 и IL-17A, что свидетельствует о супрессии TLR4-опосредованного сигнального пути при развитии Th17 типа иммунного ответа при ХОБЛ. Корреляционный анализ показал наличие отрицательной взаимосвязи между процентным содержанием Treg-клеток и уровнями IL-6, IL-10, TGF- β 1, IL-17A. Согласно полученным результатам, убыль

числа циркулирующих Treg-лимфоцитов связана с ингибирующим влиянием Th17-ассоциированных цитокинов, уровень которых возрастает по мере прогрессирования патологии.

3.5. Определение диагностической значимости уровней экспрессии рецептора к интерлейкину-6 и толл-подобного рецептора 2 типа на мембране CD4⁺-клеток крови при хронической обструктивной болезни легких

Принимая во внимание полученные результаты о динамике экспрессии рецептора к интерлейкину-6 и толл-подобного рецептора 2 типа на циркулирующих CD4⁺-клетках при прогрессировании ХОБЛ, была осуществлена оценка диагностической значимости этих параметров. С этой целью был проведен корреляционный анализ между показателями рецепторного звена и клиническими параметрами, характеризующими функцию внешнего дыхания пациентов с ХОБЛ (ОФВ1, ОФВ1/ФЖЕЛ) и ROC-анализ с определением пороговых значений данных биомаркеров, их чувствительности и специфичности (таблицы 15, 16).

Таблица 15 – Корреляционные связи между количеством циркулирующих Т-хелперов, экспрессирующих IL-6R и TLR2, и клиническими показателями у пациентов с ХОБЛ

Показатель	CD4 ⁺ CD126 ⁺ , %	CD4 ⁺ CD282 ⁺ , %
ОФВ1, % от должного	-0,72	-0,68
ОФВ1/ФЖЕЛ, %	-0,84	-0,87

Примечание: Примечание: данные представлены в виде значений коэффициента корреляции Спирмена (r); различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Корреляционный анализ показал обратную связь между повышенной экспрессией TLR2 на Th-клетках и клиническими параметрами, характеризующими бронхиальную обструкцию, – ОФВ1/ФЖЕЛ ($r=-0.87$, $p<0,05$) и ОФВ1 ($r=-0.68$, $p<0,05$). Высокий уровень экспрессии IL-6R на CD4⁺-клетках обратно коррелировал с ОФВ1/ФЖЕЛ ($r=-0,84$, $p<0,05$) и ОФВ1 ($r=-0,72$, $p<0,05$) (таблица 15). Эти данные свидетельствуют о важной роли TLR2 сигнального пути в утяжелении течения ХОБЛ, которое сопровождается ухудшением функции легких.

Таблица 16 – Результаты ROC-анализа для оценки диагностической значимости уровней экспрессии IL-6R и TLR2 на циркулирующих Т-хелперах при ХОБЛ

Параметры ROC-анализа	CD4 ⁺ CD126 ⁺ , %	CD4 ⁺ CD282 ⁺ , %
AUC	0,804	0,952
Пороговое значение	>2,0%	>1,4%
Чувствительность	77,3%	86,7%
Специфичность	100%	100%
Качество модели	хорошее	отличное

Примечание: AUC – площадь под ROC-кривой; результаты считались статистически значимыми при $p<0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Результаты ROC-анализа показали, что пороговое значение *уровня экспрессии IL-6R* на циркулирующих Т-хелперах (относительного содержания CD4⁺CD126⁺-клеток в крови) для верификации ХОБЛ было равно >2% ($p<0,05$). Данный биомаркер характеризовался чувствительностью 77,3% и специфичностью 100% ($p<0,05$). Площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,804 ($p<0,05$), что

указывает на диагностическую ценность этого показателя (таблица 16, рисунок 14). Качество модели хорошее.

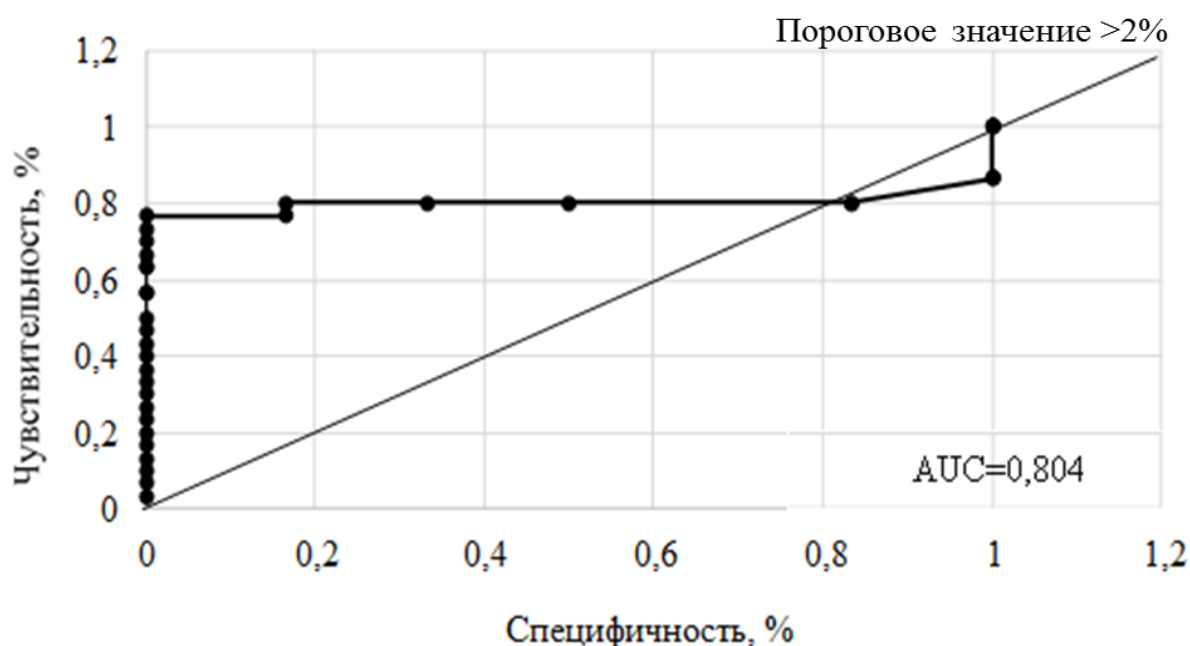


Рисунок 14 – ROC-кривая уровня экспрессии IL-6R на циркулирующих CD4⁺-клетках как диагностического биомаркера ХОБЛ

Примечание: AUC – площадь под ROC-кривой; результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Пороговое значение уровня экспрессии TLR2 на периферических Th-клетках для выделения пациентов с ХОБЛ среди здоровых лиц соответствовало $>1,4\%$ ($p < 0,05$) CD4⁺CD282⁺-клеток в крови. Чувствительность и специфичность данного биомаркера 86,7% и 100% ($p < 0,05$), соответственно. Значение AUC для данного показателя составляло 0,952 ($p < 0,05$), что свидетельствует о его высокой диагностической ценности при ХОБЛ (таблица 16, рисунок 15). Качество модели отличное.

Исходя из приведенных результатов, можно заключить, что, уровни экспрессии IL-6R и TLR2 на циркулирующих CD4⁺-клетках могут рассматриваться как дополнительные диагностические маркеры при ХОБЛ.

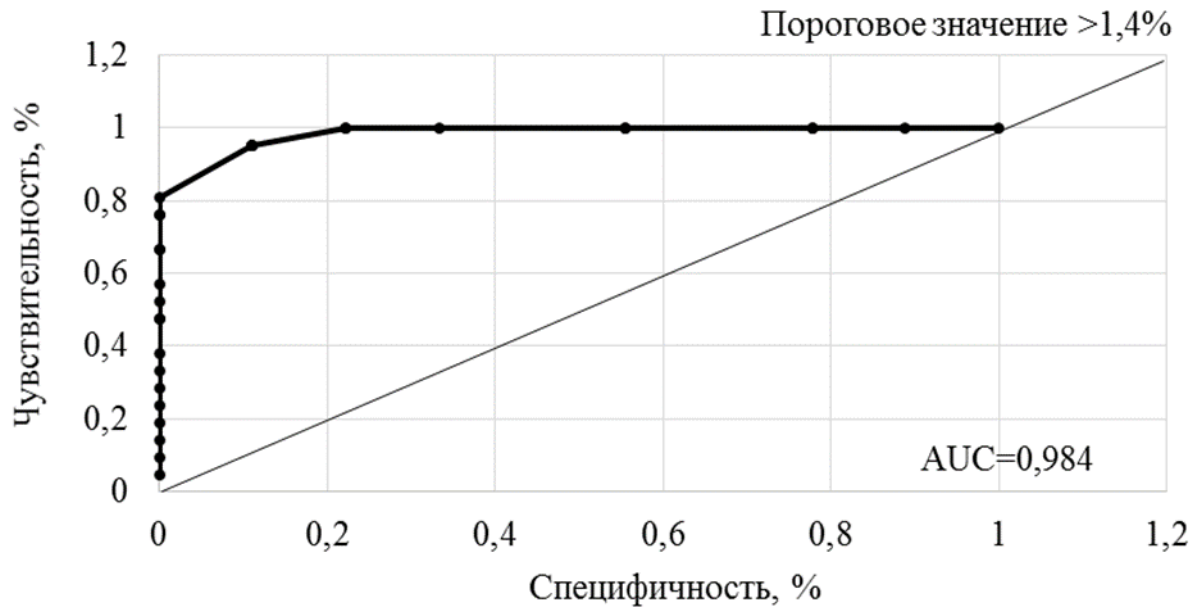


Рисунок 15 – ROC-кривая уровня экспрессии TLR2 на циркулирующих CD4⁺-клетках как диагностического биомаркера ХОБЛ

Примечание: AUC – площадь под ROC-кривой; результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

В ходе настоящего исследования выявлены преобладающие типы Т-хелперного ответа при ХОБЛ; проанализирована динамика параметров, непосредственно влияющих на развитие системного воспалительного процесса при этой патологии, в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа: изменение баланса сывороточных цитокинов, числа циркулирующих Т-регуляторных клеток и уровня экспрессии IL-6R, TLR2 и TLR4 на Т-хелперах периферической крови; установлена взаимосвязь между сывороточным цитокиновым профилем и экспрессией IL-6R, TLR2 и TLR4 на циркулирующих Т-хелперах при ХОБЛ; показана диагностическая значимость уровней экспрессии IL-6R и TLR2 на Т-хелперах периферической крови при ХОБЛ.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

ХОБЛ представляет собой гетерогенное заболевание, которое характеризуется различными клиническими проявлениями и патофизиологическими реакциями. Однако, в настоящее время диагностика и лечение этой патологии осуществляется только на основе оценки клинических параметров (уровень ограничения скорости воздушного потока, симптомы и частота обострений и т.д.) [26, 71]. Согласно современным взглядам, также необходимо учитывать иммунологические механизмы, лежащие в основе патогенеза этого заболевания [15, 28, 37]. На основе этих механизмов и связанных с ними биомаркеров могут быть выделены патофизиологические фенотипы ХОБЛ, что позволит перейти к персонифицированной диагностике и терапии этого заболевания.

Основываясь на современных представления о том, что патофизиологические фенотипы ХОБЛ могут быть дифференцированы на основе Th-ассоциированных цитокинов профилей [87, 149, 170, 183], мы выделили преобладающие типы Т-хелперного иммунного ответа у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести путем расчета соотношений уровней сывороточных цитокинов, являющихся ключевыми для развития Th1 и Th17 субпопуляций.

Рассматривая типы Т-хелперного иммунного ответа в динамике развития ХОБЛ, мы обнаружили, что при легкой степени тяжести заболевания доминирует Th1-ассоциированный иммунный ответ (67% пациентов). Полученные нами результаты согласуются с литературными данными, в которых отмечается увеличение числа Th1-клеток в малых дыхательных путях и периферической крови пациентов с ХОБЛ [73, 113, 153]. Основными эффекторными клетками Th1 иммунного пути являются макрофаги. Они активируются ключевым цитокином Th1-клеток IFN- γ и в ходе своего функционирования способствуют разрушению легочной ткани, воздействуя на нее активными формами кислорода и протеолитическими ферментами [73, 153].

Согласно полученным нами результатам, при средней (54% пациентов) и тяжелой (75% пациентов) степенях тяжести ХОБЛ превалирует Th17 тип иммунного ответа. Эти наблюдения подтверждаются данными из научной литературы. В работах ряда исследователей было выявлено, что высокие значения показателей, характеризующих развитие Th17 иммунорегуляторного пути (число Th17-клеток, концентрации Th17-цитокинов и их мРНК в крови и легочной ткани), коррелируют с ухудшением легочной функции пациентов с ХОБЛ [55, 58, 102, 162, 171, 173, 181]. Кроме того, результаты исследований последних лет показали, что частые обострения ХОБЛ связаны с развитием Th17-опосредованного воспаления [8, 21, 24]. Th17-клетки реализуют свои эффекторные функции путем секреции провоспалительного цитокина IL-17. Он активирует клетки врожденного иммунитета, которые в свою очередь синтезируют цитокины и хемокины, вызывающие усиление пролиферации нейтрофилов и их рекрутинг в дыхательных путях (IL-6, IL-8 и гранулоцитарно-колониестимулирующий фактор (G-CSF)). Выполнив свои эффекторные функции, нейтрофилы погибают, высвобождая большое количество биологически активных веществ (нейтрофильная эластаза, катепсин G, протеиназа 3 и матриксные металлопротеиназы), повреждающих легочную ткань и повышающих хемотаксис иммунных клеток в очаг воспаления [13, 55, 62, 74, 86, 161, 173, 174]. Следует отметить, что Th-клетки, продуцируя провоспалительные цитокины, способны подавлять дифференцировку Th1-клонов, тем самым способствуя формированию собственного иммунорегуляторного пути [184].

Исходя из полученных нами результатов и литературных данных, можно заключить, что элиминации патогена на ранней стадии ХОБЛ за счет воспалительной реакции, развивающейся по Th1 пути, оказывается неэффективной и на более поздних стадиях заболевания на первый план выходят Th17-клетки. Таким образом, развитие Th17-ассоциированного воспаления ведет к пролонгации врожденного (нейтрофильного) иммунного ответа и, как следствие, к прогрессированию воспалительного процесса при ХОБЛ.

Результаты исследования уровней цитокинов в периферической крови пациентов с ХОБЛ с Th1 типом иммунного ответа показали увеличение содержания IFN- γ и TNF- α на всех стадиях заболевания. Повышение уровня IFN- γ и TNF- α в сыворотке крови при ХОБЛ отмечается во многих работах [1, 3, 4, 6, 11, 16, 24]. Цитокин IFN- γ является главным воспалительным медиатором Th1-клеток, в свою очередь TNF- α продуцируется не только Th1-лимфоцитами, но и активированными моноцитами и эндотелиальными клетками. Эти цитокины обладают схожим действием на клетки-мишени – обеспечивают активацию макрофагов, натуральных киллеров (NK) и цитотоксических Т-клеток (CD8⁺) [3, 4]. В дополнение к вышеперечисленным функциям, IFN- γ обеспечивает дифференцировку Th1-клеток через запуск ключевого транскрипционного фактора этих клеток T-bet, тем самым осуществляя самоподдержание данной субпопуляции. Наряду с повышением уровней провоспалительных цитокинов, на всех стадиях ХОБЛ был выявлен низкий уровень IL-4, ключевого фактора дифференцировки Th2-клеток и ингибитора развития Th1-лимфоцитов. Высокий уровень IFN- γ и дефицит IL-4 указывают на активацию дифференцировки наивных Т-лимфоцитов в Th1-клетки, ответственные за формирование соответствующего типа иммунного ответа [141, 184].

Следует отметить, что у пациентов с ХОБЛ легкой степени тяжести с Th1 типом иммунного ответа установлено максимальное содержание IFN- γ наряду с более низким содержанием TNF- α , что говорит о том, что этому цитокину принадлежит ведущая роль на данном этапе заболевания. При ХОБЛ средней степени тяжести заметно снижался уровень вышеупомянутых цитокинов. По-видимому, это связано с возрастанием концентрации секретируемого Treg-клетками противовоспалительного цитокина IL-10, который способен подавлять продукцию IFN- γ Th1-клетками и ингибировать секрецию TNF- α моноцитами [173]. В противоположность ХОБЛ легкой степени тяжести, при тяжелом течении ХОБЛ TNF- α превышал уровень IFN- γ в несколько раз. Так как клетки врожденного иммунитета являются основными продуцентами TNF- α , полученные

результаты можно объяснить усилением роли этого вида иммунитета на поздних стадиях ХОБЛ.

Согласно результатам исследования, у пациентов с ХОБЛ, имеющих выраженный Th17 тип иммунного ответа, на всех стадиях наблюдалась гиперпродукция IL-6, IL-17A, IL-21, TGF- β 1, IL-10 и TNF- α . Наибольшие отклонения от нормы уровней этих цитокинов были выявлены у пациентов с ХОБЛ тяжелой степени тяжести. Повышенное содержание этих цитокинов также отмечено многими исследователями [1, 3, 6, 16, 24, 173]. Цитокин IL-17 опосредует основные эффекторные функции Th17-клеток [74, 161, 174]. Цитокины IL-21, IL-6 и TGF- β 1 являются важнейшими факторами дифференцировки и развития Th17 субпопуляции [161, 173]. Высокое содержание в микроокружении TGF- β и IL-6 во время контакта наивного Т-хелпера с антигеном индуцирует экспрессию ключевого фактора транскрипции Th17-клеток ROR γ t через активацию JAK/STAT3 сигнального каскада. Вместе с тем, IL-21 также вносит свой вклад в этот процесс за счет инициирования альтернативного пути формирования Th17-лимфоцитов [161]. Кроме того, субпопуляция Th17-клеток поддерживает сама себя через петлю обратной связи, производя провоспалительный цитокин IL-17, который, способствует синтезу IL-6 антиген-презентирующими клетками [93]. Повышенные сывороточные уровни вышеописанных цитокинов создают условия для роста числа Th17-клеток. Усиление выработки IL-10 по мере утяжеления течения ХОБЛ, развивающейся согласно Th17 типу иммунного ответа, по-видимому, служит компенсаторным механизмом, направленным на восстановление баланса про- и противовоспалительных цитокинов. Однако, он оказывается малоэффективным при данной патологии.

В ходе исследования было обнаружено низкое процентное содержание Т-регуляторных клеток в периферической крови во всех группах пациентов с ХОБЛ. Сведения из научной литературы, касающиеся уровня Treg-клеток в крови при ХОБЛ, весьма противоречивы [84]. Однако, существуют данные, свидетельствующие о снижении количества этих клеток в кровяном русле больных ХОБЛ [23, 137, 173], что согласуется с полученными нами результатами. Роль Treg-

лимфоцитов заключается в контроле силы и продолжительности иммунного ответа через подавление функциональной активности и пролиферации эффекторных клеток, в частности, $CD4^{+}$ -, $CD8^{+}$ -, NK-клеток, дендритных клеток и моноцитов. Т-регуляторные клетки осуществляют свою функцию с помощью секреции IL-10, TGF- β , а также путем связывания IL-2, лимитирующего фактора роста Т-клеток [13, 93]. Проведенный в данном исследовании статистический анализ данных показал обратную корреляционную связь между числом циркулирующих $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$ -клеток и сывороточными уровнями Treg-ассоциированных цитокинов TGF- β 1 (при ХОБЛ средней и тяжелой степени тяжести) и IL-10 (при ХОБЛ тяжелой степени тяжести). Исходя из описанных выше результатов, можно заключить, что прогрессирование ХОБЛ сопровождается нарушением клеточно-опосредованных механизмов иммуносупрессии.

Низкое число циркулирующих Т-регуляторных клеток было отмечено у пациентов с ХОБЛ как с Th1, так и с Th17 типом иммунного ответа. Однако, уменьшение количества этих клеток по мере прогрессирования ХОБЛ прослеживалось только у пациентов с Th17 иммунорегуляторным путем. В ходе корреляционного анализа в группе пациентов с ХОБЛ тяжелого течения была выявлена отрицательная взаимосвязь между процентным содержанием Treg-клеток и уровнями Th17-цитокинов, таких как IL-6 и IL-17A. На данный момент накоплено значительное количество данных, свидетельствующих о том, что Th17 и Treg субпопуляции подавляют друг друга с точки зрения дифференциации и функций, конкурируя на молекулярном уровне [86, 98]. Как уже упоминалось выше, присутствие в микроокружении IL-6 в сочетании с TGF- β является необходимым условием для дифференцировки и функционирования Т-хелперных лимфоцитов, синтезирующих IL-17, посредством активации JAK/STAT3/ROR γ t сигнального каскада. В то время как в среде богатой IL-2 и TGF- β 1 в Th0-клетках запускается JAK/STAT5 сигнальный путь, приводящий к экспрессии FoxP3, фактора транскрипции, способствующего появлению иммунорегуляторных функций у этих клеток. Таким образом, высокий сывороточный уровень IL-6 способствует переключению иммунного ответа из толерантного состояния, поддерживаемого

Трег-клетками, в состояние Th17-опосредуемого воспаления. Выявленная в данном исследовании убыль числа Трег-клеток при ХОБЛ, по-видимому, связана с ингибирующим влиянием провоспалительной субпопуляции Th17-клеток, возрастающей по мере прогрессирования патологии.

В настоящее время IL-6 рассматривается в качестве одного из наиболее важных маркеров системного воспаления и предполагаемой терапевтической мишени при ХОБЛ [34, 43, 162]. Выделяют два основных IL-6 сигнальных пути, которые обуславливают различные патофизиологические эффекты этого многофункционального цитокина, – классический сигналинг (через мембранную форму IL-6R) и транс-сигналинг (через растворимую форму IL-6R) [70, 86, 155, 169, 176]. Недавно был открыт третий тип IL-6 сигналинга – кластерный, но он все еще остается слабо изученным [138]. Большая часть исследований IL-6 сигнальных путей при ХОБЛ посвящена изучению транссигналинга [79, 143]. Данные о вкладе классического сигналинга в патогенез этого заболевания практически отсутствуют.

Известно, что IL-6 принадлежит важная роль в регуляции развития и дифференцировки Т-хелперных лимфоцитов [59, 70, 86]. Однако, несмотря на значительный интерес исследователей к биологии этого цитокина, механизмы участия разных типов IL-6 сигналинга в формировании Т-хелперного иммунного ответа до сих пор слабо изучены.

В данном исследовании мы установили, что прогрессирование ХОБЛ у пациентов с превалирующим Th17-ассоциированным пулом цитокинов сопровождается увеличением сывороточного уровня IL-6 и возрастанием числа циркулирующих Т-хелперов, несущих на мембране IL-6R. Следовательно, классический IL-6 сигналинг вовлечен в регуляцию развития Th17-клеток при ХОБЛ. Эти данные подтверждаются результатами исследований при других патологиях, связанных с Th17 иммунным ответом. Так, Chen et al. выявили корреляционную связь между подавлением Th17 ответа, которое наблюдалось у пациентов с туберкулезом, и снижением экспрессии IL-6R на CD4⁺-клетках [51]. Zhang et al. показали, что повышенная экспрессия IL-6R на Т-хелперах играет роль в усилении Th17 типа иммунного ответа у пациентов с хроническим гепатитом В

[180]. Согласно результатам исследований, проведенных на экспериментальной модели ревматоидного артрита, классический сигнальный путь вовлечен в системные реакции Т-клеточного ответа, в то время как транс-сигналинг управляет местными эффектами IL-6 в очаге воспаления [107]. Существует мнение, что передача сигнала в CD4⁺-клетках через мембранную форму рецептора необходима для управления эффекторными характеристиками циркулирующих наивных Т-клеток и Т-клеток памяти, тогда как регуляция посредством растворимой формы рецептора служит для поддержания Th17-ассоциированного профиля цитокинов в очаге воспаления [89]. Следует отметить, что циркулирующие CD4⁺-клетки, несущие IL-6R на своей мембране, могут быть источником sIL-6R, который образуется в результате ограниченного протеолиза с помощью металлопротеазы ADAM17 [44]. Тем самым, эти клетки могут вносить вклад в развитие локального Th17-ассоциированного воспаления при ХОБЛ.

В ходе корреляционного анализа, проведенного в данном исследовании, было установлено, что при ХОБЛ тяжелой степени тяжести повышенная экспрессия IL-6R на CD4⁺-клетках положительно коррелировала с высокими концентрациями сывороточных цитокинов, ассоциированных с развитием Th17 фенотипа (IL-17A и TGF- β 1), и отрицательно – с уровнем ключевого Th1-цитокина IFN- γ и Th2-цитокина IL-4. Из литературных данных известно, что IL-6 является ключевым фактором дифференцировки Th17-клеток, оказывает супрессорную активность по отношению к Th1 и Treg субпопуляциям, а также способен подавлять апоптоз Т-клеток посредством индукции антиапоптотического регулятора Bcl-2 [34, 55, 59, 63, 86, 104, 167, 173]. В нашем исследовании также было выявлено, что Th1-зависимый иммунный ответ при ХОБЛ характеризуется статистически значимым усилением синтеза IL-6 и экспрессии IL-6R на CD4⁺-клетках крови при тяжелом течении заболевания. Это может быть связано с переключением Th1 фенотипа на Th17 иммунный ответ при прогрессировании заболевания. Таким образом, основываясь на полученных нами результатах и данных литературы можно предположить, что активация классического IL-6 сигналинга в периферических CD4⁺-клетках обуславливает развитие Th17 иммунного ответа при

ХОБЛ за счет ингибирования апоптоза CD4⁺-лимфоцитов и их поляризации в сторону Th17-клеток.

Согласно результатам многочисленных исследований, важную роль в патогенезе ХОБЛ играют сигнальные пути, опосредуемые мембранными рецепторами врожденного иммунитета, такими как толл-подобные рецепторы 2 и 4 типа [77, 117, 154, 185]. Данные рецепторы вовлечены в процессы локального и системного воспаления, развития обострения при этой патологии [35, 77, 111, 117, 185]. Изменение уровня экспрессии TLR2 и TLR4 в тканях дыхательных путей было обнаружено как у пациентов с ХОБЛ, так и у экспериментальных животных [29, 39, 40, 58, 78, 95, 99, 101, 119, 128, 131, 132, 135, 158, 159, 164]. Генетические исследования показали, что полиморфизм генов *TLR2* и *TLR4* связан с риском развития и прогрессирования ХОБЛ [31, 47, 106].

Лигандами для TLR2 и TLR4 при ХОБЛ могут быть PAMP бактерий, колонизирующих нижние дыхательные пути пациентов, страдающих этим заболеванием (*Streptococcus pneumonia*, нетипируемая *Haemophilus influenza* (NTHi), *Moraxella catarrhalis* и *Pseudomonas aeruginosa*), а также DAMP, образующимися при воздействии таких негативных факторов, как курение и загрязнение воздуха (HMGPB1, белки теплового шока (HSP60, HSP70), β -дефензин и др.) [38, 41, 45, 56, 85, 128, 159]. Связывание лиганда с TLR2/4 на мембране клетки-мишени приводит к запуску MyD88-зависимого сигнального пути, завершающегося активацией транскрипционных факторов MAPK сигнального пути или NF- κ B, которые участвуют в регуляции воспаления, и последующими синтезом и секрецией провоспалительных медиаторов, таких как TNF- α , IL-6, IL-8, chemokine C-C motif receptor 5 (CCL5) и др. [57, 128].

Согласно исследованиям, лиганды TLR2 и 4, наряду с цитокинами, участвуют в регуляции дифференцировки и эффекторных функций Т-хелперов. Результаты экспериментальных исследований показали, что активация TLR2 и 4 сигнальных путей в TCR-активированных CD4⁺-клетках усиливает их пролиферацию, выживаемость и хемотаксис, модулирует синтез цитокинов и другие эффекторные функции этих клеток [88, 139, 179]. PAMP и DAMP могут

попадать из легких в кровяное русло и запускать активацию TLR сигнальных каскадов в циркулирующих CD4⁺-клетках. На данный момент роль TLR2 и TLR4 сигнальных путей в формировании Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ слабо изучена.

В ходе настоящего исследования был проведен анализ динамики экспрессии TLR2 на циркулирующих CD4⁺-клетках при ХОБЛ разной степени тяжести в зависимости от типа Т-хелперного иммунного ответа. В результате было установлено, что у пациентов с ХОБЛ средней и тяжелой степени тяжести как с Th1, так и с Th17 цитокиновым профилем, было статистически значимо повышено число CD4⁺CD282⁺-клеток в крови. В то же время, у пациентов с Th17 цитокиновым профилем был отмечен более высокий уровень экспрессии TLR2, что указывает на участие сигнального каскада, опосредуемого этим рецептором, в формировании данного иммунорегуляторного пути.

Несмотря на повышенный уровень экспрессии TLR2 на Т-хелперах у пациентов с ХОБЛ с Th1 цитокиновым профилем, статистически значимых корреляционных связей между относительным количеством циркулирующих CD4⁺-клеток, экспрессирующих TLR2, и уровнем Th1-связанных цитокинов не установлено. Повышенная экспрессия TLR2 на Т-хелперах у пациентов с Th1 цитокиновым профилем может быть связана с механизмами регуляции общих функций Т-клеток (пролиферация, выживаемость) во время развития воспаления [88, 139].

В ходе корреляционного анализа у пациентов с ХОБЛ легкой, средней и тяжелой степеней тяжести были выявлены корреляционные связи между относительным содержанием циркулирующих CD4⁺CD282⁺-клеток и сывороточными уровнями Th17-цитокинов – IL-6, IL-17A и IL-21. Ряд исследователей сообщил, что стимуляция CD4⁺-клеток TLR2 лигандами приводит к активации ключевых факторов транскрипции Th17-клеток – ROR γ t, ROR α , RORC и, как следствие, производству эффекторных Th17 цитокинов, таких как IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-22 и IL-21 [30, 109, 125, 145, 182]. Следовательно, TLR2/MyD88 сигнальный путь вовлекается в формирование Th17 иммунорегуляторного пути на

ранней стадии развития ХОБЛ и участвует в закреплении Th17 иммунного ответа при утяжелении течения заболевания. Таким образом, мы можем говорить о значимом вкладе TLR2 в прогрессирование ХОБЛ, ассоциированное с закреплением Th17 иммунного ответа. Наши данные согласуются с накопленными на сегодняшний день результатами *in vitro* исследований, которые подтверждают, что активация TLR2 сигнального пути на CD4⁺-клетках способствует развитию Th17 иммунного ответа при ряде патологий, таких как рассеянный энцефаломиелит [145], рассеянный склероз [126], системная красная волчанка [109], гиперчувствительный пневмонит [30], гепатит В [178, 182].

Корреляционный анализ показал, что у пациентов с ХОБЛ легкой степени тяжести число циркулирующих Th-клеток, экспрессирующих TLR2, обратно коррелировало с содержанием в крови IL-10, который является одним из важных цитокинов, продуцируемых Treg-клетками. При ХОБЛ средней степени тяжести процентное содержание CD4⁺CD282⁺-клеток положительно коррелировало с концентрацией этого цитокина. Можно предположить, что в этом случае усиление уровня IL-10 служит компенсаторным механизмом, направленным на поддержание баланса про- и противовоспалительных медиаторов при утяжелении течения патологии [160]. В настоящее время, появляется все больше сведений о том, что лиганды TLR2 участвуют в прямом модулировании функций Т-регуляторных лимфоцитов. Однако, данные полученные в ходе исследований разнятся. В частности, показано, что стимуляция TLR2 снижает супрессивную активность активированных Treg-клеток с помощью механизмов, которые до конца не изучены [108, 124, 165]. Nyirenda et al. в своих исследованиях показали, что стимуляция Treg-клеток TLR2 лигандами приводила к их поляризации в сторону Th17-подобного фенотипа через усиление синтеза IL-6, который аутокринно воздействовал на эти клетки и способствовал переключению Jak/STAT5/FoxP3 сигнального пути на Jak/STAT3/RORC путь [125, 126]. Таким образом, согласно современным представлениям, TLR2 может быть ответственным за снижение подавляющей функции Treg, регулируя Treg/Th17 баланс [125, 126, 140]. В то же время, Zanin-Zhorov et al. показали противоположный эффект активации Treg

эндогенными TLR2 лигандами, которая приводила к усилению супрессивного действия этих клеток, опосредованного продукцией IL-10 [179]. Таким образом, по-видимому, TLR2 сигналинг вовлечен в регуляцию баланса Th17 и Treg субпопуляций при ХОБЛ, однако, необходима детализация этого механизма.

В ходе исследования у пациентов с ХОБЛ тяжелого течения с Th1 и Th17 типом иммунного ответа, было выявлено статистически значимое снижение относительного числа циркулирующих CD4⁺-клеток, имеющих TLR4 на своей мембране. Таким образом, уменьшение числа CD4⁺CD284⁺-клеток в крови указывает на подавление TLR4/MyD88 сигналинга в этих клетках при прогрессировании ХОБЛ.

Выявлена корреляционная связь между низким содержанием в крови Т-хелперов, экспрессирующих TLR4, и высокими уровнями в сыворотке крови Th17-цитокинов – IL-6 и IL-17A, что свидетельствует о супрессии TLR4-опосредованного сигнального пути при Th17-ассоциированном утяжелении течения ХОБЛ. Кроме того, в данной группе пациентов отмечена слабая взаимосвязь между процентным содержанием периферических CD4⁺CD284⁺-клеток и концентрацией TNF- α , цитокина, участвующего в развитии Th1 иммунного ответа. Knobloch J. et al. показали, что TLR4/MyD88/MAPK сигнальный путь вносит вклад в функционирование Th1-клеток при ХОБЛ. Согласно результатам, полученным этим коллективом исследователей, у курильщиков с и без ХОБЛ наблюдается снижение ЛПС-индуцированной экспрессии TLR4 на циркулирующих Th1-клетках, что приводит к нарушению Th1-опосредованной иммунной реакции. В свою очередь, пониженная экспрессия гена TLR4 вызывала подавление синтеза IFN- γ , ключевого цитокина Th1-клеток, опосредующего дифференцировку и эффекторные функции этих клеток. Данная группа исследователей также выявила дефект TLR4 передачи сигнала на Т-хелперах при ХОБЛ. Он выражался в переключении MyD88 сигнального пути, который опосредован поверхностным TLR4, на TRIF-зависимый путь, активируемый с помощью эндосомальной формы этого рецептора, что приводило к подавлению IL-2-зависимой пролиферации CD4⁺-клеток и ингибированию развития Th1

иммунного ответа [95, 96]. Таким образом, ингибирование сигнального пути, опосредуемого мембранным TLR4, по всей видимости, вносит вклад в переключение Th1 иммунного ответа на Th17 иммунорегуляторный путь при утяжелении течения ХОБЛ.

Учитывая полученные нами данные, указывающие на важную роль IL-6R и TLR2 в развитии иммунного ответа при ХОБЛ, была проведена оценка диагностической ценности этих параметров. Выявлены обратные корреляционные связи между высокими уровнями экспрессии IL-6R и TLR2 на циркулирующих Th-клетках и клиническими параметрами, характеризующими бронхиальную обструкцию (ОФВ1/ФЖЕЛ и ОФВ1). Эти данные подтверждают наше предположение о важной роли сигнальных путей, инициируемых через эти рецепторы, в прогрессировании ХОБЛ. В результате ROC-анализа были определены пороговые значения уровней экспрессии на циркулирующих Th-клетках IL-6R ($>2\%$ CD4⁺CD126⁺-клеток в крови, AUC=0,804, чувствительность 77,3%, специфичность 100%, $p<0,05$) и TLR2 ($>1,4\%$ CD4⁺CD282⁺-клеток в крови, AUC=0,952, чувствительность 86,7%, специфичность 100%, $p<0,05$), превышение которых сопровождается увеличением риска развития ХОБЛ. Таким образом, уровни экспрессии IL-6R и TLR2 на Т-хелперах крови следует рассматривать в качестве дополнительных диагностических маркеров при ХОБЛ. Следует отметить, что процент CD4⁺CD282⁺-клеток обладает большей диагностической ценностью для верификации ХОБЛ среди здорового населения по сравнению с CD4⁺CD126⁺-лимфоцитами.

На основании полученных результатов была сформирована концептуальная схема (рисунок 16).

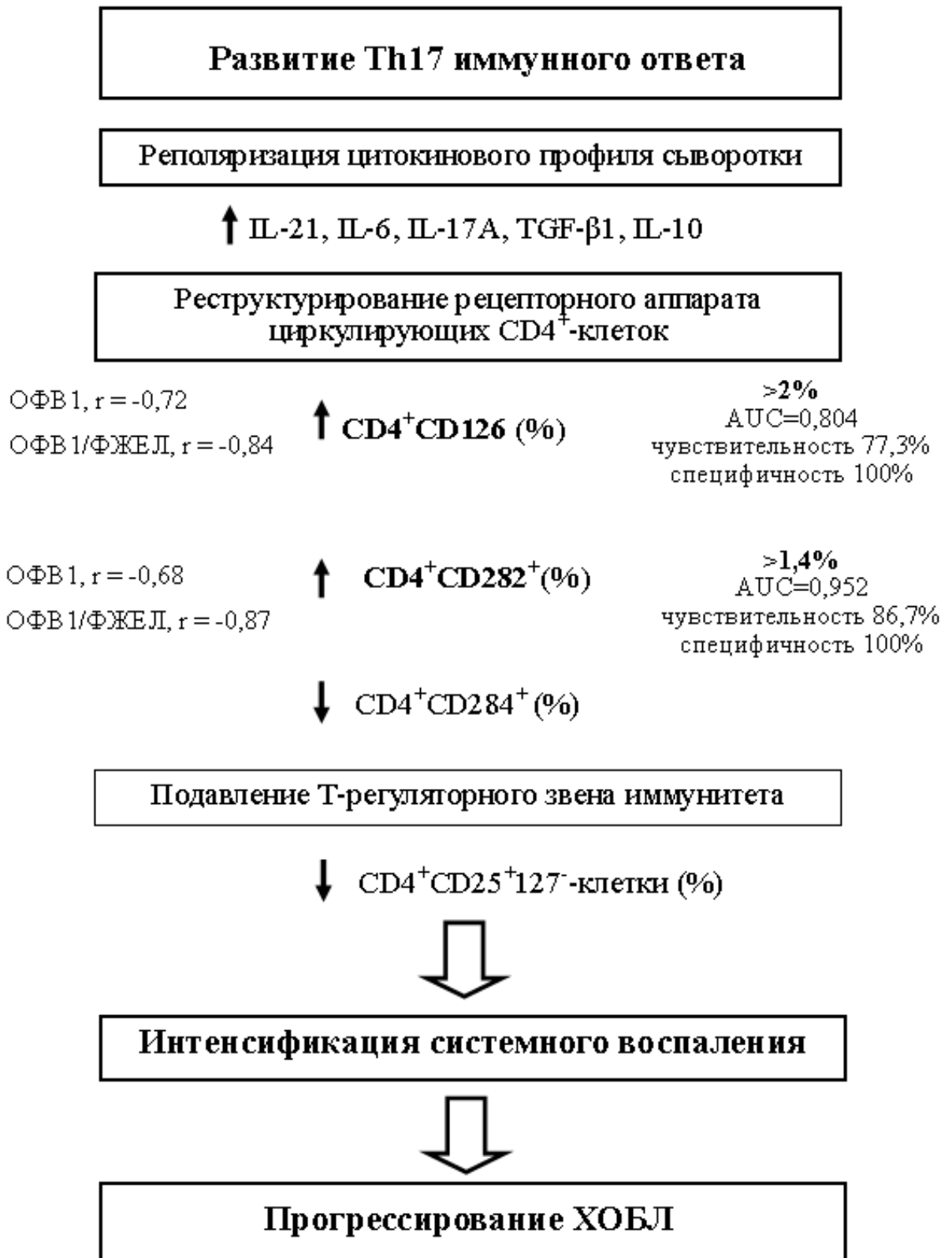


Рисунок 16 – Концептуальная схема патофизиологического механизма формирования Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ

Можно заключить, что высокая концентрация в сыворотке крови Th17-ассоциированных цитокинов (IL-21, IL-10, IL-6, IL-17A, TGF- β 1), уменьшение числа Treg-клеток, усиление экспрессии IL-6R, TLR2 и снижение синтеза TLR4 на циркулирующих CD4⁺-клетках способствует сдвигу баланса Т-хелперных субпопуляций в сторону Th17-лимфоцитов, что, в конечном итоге, ведет к интенсификации системного воспаления и прогрессированию ХОБЛ (рисунок 16). Уровни экспрессии IL-6R и TLR2 на CD4⁺-клетках крови могут быть использованы в качестве диагностических критериев при ХОБЛ. Полученные новые сведения о клеточно-молекулярных механизмах прогрессирования ХОБЛ могут стать теоретическим обоснованием для понимания патофизиологических закономерностей формирования системного воспаления, позволят повысить качество диагностики и прогнозирования, разработать новые персонализированные подходы к адресной медикаментозной терапии ХОБЛ.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с ХОБЛ стабильного течения выделены Th1 и Th17 типы иммунного ответа. На начальной стадии заболевания выражен Th1 иммунный ответ (67% пациентов), при прогрессировании ХОБЛ превалирует Th17 иммунный ответ (54% пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести; 75% пациентов с ХОБЛ тяжелого течения), ведущий к хронизации воспаления при ХОБЛ.

2. Развитие иммунного ответа при ХОБЛ по Th1 иммунорегуляторному пути характеризуется увеличением сывороточных уровней ($p < 0,05$) провоспалительных цитокинов TNF- α , IFN- γ и их перераспределением. Прогрессирование патологии, связанное с формированием Th17 иммунного ответа, сопровождается повышением уровней ($p < 0,05$) провоспалительных цитокинов IL-21, IL-6, IL-17A, TGF- β 1 и противовоспалительного цитокина IL-10 в сыворотке крови.

3. По мере развития ХОБЛ происходит снижение содержания T-регуляторных клеток в периферической крови (на 65-84%, $p < 0,001$), что обуславливается конкурентным взаимодействием Treg и Th17 субпопуляций, способствуя поляризации Th17 иммунного ответа.

4. Повышение уровня экспрессии TLR2 (на 68-258%, $p < 0,05$) и IL-6R (на 47-286%, $p < 0,05$), опосредующего классический IL-6 сигналинг, и снижение уровня экспрессии мембранного TLR4 (на 34-52%, $p < 0,05$) на циркулирующих CD4⁺-клетках являются механизмами усиления Th17-опосредованного ответа при прогрессировании ХОБЛ.

5. Выявленная отрицательная взаимосвязь между уровнями экспрессии IL-6R и TLR2 на циркулирующих Т-хелперах и показателями респираторной функции (IL-6R-ОФВ1, $r = -0,72$; IL-6R-ОФВ1/ФЖЕЛ, $r = -0,84$; TLR2-ОФВ1, $r = -0,68$; TLR2-ОФВ1/ФЖЕЛ, $r = -0,87$; $p < 0,05$) у пациентов с ХОБЛ свидетельствует о значимом вкладе данных параметров в утяжеление течения этого заболевания.

6. Установлены диагностические маркеры при ХОБЛ: уровни экспрессии на циркулирующих Т-хелперах IL-6R (пороговое значение $> 2\%$ CD4⁺CD126⁺-клеток

в крови, AUC=0,804, чувствительность 77,3%, специфичность 100%) и TLR2 (пороговое значение $>1,4\%$ CD4⁺CD282⁺-клеток в крови, AUC=0,952, чувствительность 86,7%, специфичность 100%). Относительное содержание CD4⁺CD282⁺-клеток в крови имеет более высокую диагностическую значимость при этом заболевании.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПК – антиген-презентирующая клетка

ЛПС – липополисахарид

мАТ – моноклональное антитело

ОФВ1 – объем форсированного выдоха за 1 секунду

ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

ADAM – disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein (белок, содержащий дизинтегриновый и металлопротеиназный домены)

AUC – area under ROC curve (площадь под ROC-кривой)

CCL5 – chemokine C-C motif receptor 5 (хемокиновый рецептор, содержащий мотив C-C 5)

CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

DAMP – damage-associated molecular patterns (ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны)

FoxP3 – forkhead box P3

GATA3 – транскрипционный фактор Т-хелперов 2 типа

G-CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор)

gp130 – glycoprotein 130 (мембранный гликопротеин 130)

HMGPB1 – high-mobility group protein B1

HSP – heat shock protein (белок теплового шока)

IFN- γ – interferon- γ (интерферон- γ)

IL – interleukin (интерлейкин)

IL-6R –interleukin-6 receptor (мембранный рецептор к интерлейкину-6)

IRF3 – interferon regulatory factor 3 (регуляторный фактор интерферона 3)

Jak – janus kinase (янус киназа)

МАРК – mitogen-activated protein kinase (митоген-активируемая протеинкиназа)

- MD-2 – myeloid differentiation factor 2 (миелоидный фактор дифференцировки)
- MHCII – major histocompatibility complex class II (белок главного комплекса гистосовместимости II класса)
- MyD88 – myeloid differentiation primary response protein 88 (белок миелоидной дифференцировки первичного ответа 88)
- NF-κB – nuclear factor κB (ядерный фактор κB)
- NTHi – non-typeable *Haemophilus influenza* (нетипируемая *Haemophilus influenza*)
- PAMP – pathogen-associated molecular patterns (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны)
- ROC – receiver operating characteristic (построение кривой операционной характеристики)
- RORγt/α/C – retinoic acid-related orphan receptor γб/α/C (рецептор ассоциированный с ретиноевой кислотой γб/α/C)
- sIL-6R – soluble interleukin-6 receptor (растворимый рецептор к интерлейкину-6)
- STAT – signal transducer and activator of transcription (транскрипционный фактор преобразователь сигналов и активатор транскрипции)
- T-bet – транскрипционный фактор Т-хелперов 1 типа
- TCR – T cell receptor (рецептор Т-клеток)
- TGF-β – transforming growth factor-β (трансформирующий фактор роста-β)
- Th0 – naive T-helper (наивный Т-хелпер)
- Th1/2/17 – T-helper type 1/2/17 (Т-хелпер 1/2/17 типа)
- TIR – toll/interleukin-1 receptor (толл/интерлейкин-1 рецептор)
- TIRAP – TIR-domain-containing adaptor protein (адапторный белок, содержащий TIR-домен)
- TLR – toll-like receptor (толл-подобный рецептор)
- TNF-α – tumor necrosis factor-α (фактор некроза опухоли-α)
- TRAM – TRIF-related adaptor molecule (TRIF-ассоциированная адапторная молекула)
- Treg – T regulatory cell (Т-регуляторная клетка)

TRIF – TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β (адаптор содержащий TIR-домен и индуцирующий интерферон- β)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдурахманова, И.С. Характер экспрессии провоспалительных цитокинов у больных хронической обструктивной болезнью легких / И.С. Абдурахманова // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 6, № 2. – С. 314-317.
2. Акпарова, А.Ю. Особенности патогенеза хронической обструктивной болезни легких и ее коморбидных состояний / А.Ю. Акпарова, Б.М. Абдрахманова, А.К. Иманбай [и др.] // Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2019. – № 1. – С. 280-284.
3. Атякшин, Д.А. Показатели иммунного статуса при хронической обструктивной болезни легких / Д.А. Атякшин, Л.Н. Цветикова, Н.В. Лобеева [и др.] // Медицинские науки. – 2015. – Т. 14. – С. 195-197.
4. Будневский, А.В. Диагностическое значение биомаркеров системного воспаления при хронической обструктивной болезни легких / А.В. Будневский, Е.С. Овсянников, А.В. Чернов [и др.] // Клиническая медицина. – 2014. – Т. 92, № 9. – С.16-21.
5. Васильева, О.С. Хроническая обструктивная болезнь легких как профессиональное заболевание: факторы риска и проблема медико-социальной реабилитации больных / О.С. Васильева, Н.Ю. Кравченко // Российский медицинский журнал. – 2015. – Т. 21, № 5. – С. 22-26.
6. Ефремов, А.В. Содержание про- и противовоспалительных цитокинов в крови больных хронической обструктивной болезнью легких на разных стадиях заболевания / А.В. Ефремов, Р.Е. Тулеутаева, И.Д. Сафронов // Медицина и образование в Сибири. – 2014. – № 6.
7. Кадушкин, А.Г. Особенности количественного изменения регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А.Г. Кадушкин, Т.В. Шман, В.П. Новиков [и др.] // Пульмонология. – 2013. – № 3. – С. 25-30.

8. Калинина, Е.П. Клинико-иммунологическое сопоставление при Th-зависимых механизмах иммунного ответа у больных хронической обструктивной болезнью легких / Е.П. Калинина, Т.И. Виткина, В.В. Кнышова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20, № 6. – С. 855-864.
9. Кириллова, Н.А. Субпопуляции Т-регуляторных клеток при бронхиальной астме и гетерогенных фенотипах хронической обструктивной болезни легких / Н.А. Кириллова, И.А. Деев, Е.Э. Кремер [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 48-54.
10. Кологривова, И.В. Молекулярные аспекты функционирования Т-хелперов 17-го типа / И.В. Кологривова, Е.Н. Кологривова, Т.Е. Суслова // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 4. – С. 93-99.
11. Кострова, Т.О. Патогенетическая значимость нарушения баланса цитокинов у лиц с хроническими неспецифическими заболеваниями легких / Т.О. Кострова, Г.В. Лисаченко, Л.Ф. Коломендина [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2007. – Т. 22, № 4. – С. 30-35.
12. Кубышева, Н.И. Системное воспаление: перспектива исследований, диагностики и лечения хронической обструктивной болезни легких / Н.И. Кубышева, Л.Б. Постникова // Клиническая геронтология. – 2007. – № 7. – С. 50-55.
13. Насонов, Е.Л. Интерлейкин 17 – новая мишень для антицитокиновой терапии иммуновоспалительных ревматических заболеваний / Е. Л. Насонов, Л. Н. Денисов, М. Л. Станислав // Научно-практическая ревматология. – 2013. – № 5. – С. 545-552.
14. Никитин, В.А. Роль системного воспаления в развитии коморбидности при хронической обструктивной болезни легких / В.А. Никитин, Л.В. Васильева, Е.М. Толстых [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95, № 6. – С. 61-66.
15. Новиков, Д.К. Иммунологические фенотипы хронической обструктивной болезни легких: перспективы иммунокоррекции / Д.К. Новиков, О.В. Смирнова // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2014. – Т. 13, № 4. – С. 102-109.

16. Павленко, В.И. Роль цитокинов в формировании иммунологической недостаточности у больных хронической обструктивной болезнью легких / В.И. Павленко // Международный журнал по иммунореабилитации. – 2010. – Т. 12, № 2.
17. Пронина, Е.Ю. Вершина айсберга: эпидемиология ХОБЛ / Е.Ю. Пронина // Вестник современной клинической медицины. – 2011. – Т. 4, № 3. – С. 18-23.
18. Рекалова, Е.М. Иммунопатогенез хронического обструктивного заболевания легких / Е.М. Рекалова // Украинский пульмонологический журнал. – 2012. – № 2. – С. 35-37.
19. Симбирцев, А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека / А.С. Симбирцев // Медицинский академический журнал. – 2013. – Т. 13, № 3. – С. 18-41.
20. Симонова, И.Н. К вопросу о системном воспалении при хронической обструктивной болезни легких стабильного течения / И.Н. Симонова, М.В. Антонюк, Л.В. Веремчук [и др.] // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2016. – № 4, вып. 67. – С. 44-54.
21. Трушина, Е.Ю. Роль цитокинов IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 в иммунопатогенезе хронической обструктивной болезни легких / Е.Ю. Трушина, Е.М. Костина, Б.А. Молотиллов [и др.] // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21, № 1. – С. 89-98.
22. Хайдуков, С.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 7-16.
23. Хайдуков, С.В. стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (проект) / С.В. Хайдуков, Л.А. Байдун, А.В. Зурочка [и др.] // Проблемы стандартизации в здравоохранении. – 2012. – № 5(6). – С. 28-44.
24. Цветикова, Л.Н. Анализ факторов, влияющих на клиническое течение хронической обструктивной болезни легких / Л.Н. Цветикова, А.В. Будневский,

Ю.Г. Жусина [и др.] // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2016. – Т. 19, № 3. – С. 74-81.

25. Черешнев, В.А. Системное воспаление—миф или реальность? / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев, Л.Н. Юрченко // Вестник Российской академии наук. – 2004. – Т. 74, № 3. – С. 219 – 227.

26. Чучалин, А.Г. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких / А.Г. Чучалин, З.Р. Айсанов, С.Н. Авдеев [и др.] // Русский медицинский журнал. – 2014. – Т. 4. – С. 331-348.

27. Aghapour, M. Airway epithelial barrier dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: role of cigarette smoke exposure / M. Aghapour, P. Raee, S.J. Moghaddam [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2018. – Vol. 58, № 2. – P. 157-169.

28. Agusti, A. What does endotyping mean for treatment in chronic obstructive pulmonary disease? / A. Agusti, B. Celli, R. Faner // Lancet. – 2017. – Vol. 390, № 10098. – P. 980-987.

29. An, C.H. TLR4 deficiency promotes autophagy during cigarette smoke-induced pulmonary emphysema / C.H. An, X.M. Wang, H.C. Lam [et al.] // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. – 2012. – Vol. 303, № 9. – P. L748-L757.

30. Andrews, K. TLR2 regulates neutrophil recruitment and cytokine production with minor contributions from TLR9 during hypersensitivity pneumonitis / K. Andrews, H. Abdelsamed, A.K. Yi [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 8.

31. Apostolou, A. Association between TLR2/TLR4 gene polymorphisms and COPD phenotype in a Greek cohort / A. Apostolou, T. Kerenidi, A. Michopoulos [et al.] // Herz. – 2017. – Vol. 42, № 8. – P. 752-757.

32. Ardestani, M.E. Role of serum interleukin 6, albumin and C-reactive protein in COPD patients / M.E. Ardestani, O. Zaerin // Tanaffos. – 2015. – Vol. 14, № 2. – P. 134-140.

33. Arora, S. TLRs in pulmonary diseases / S. Arora, S. Ahmad, R. Irshad [et al.] // Life Sci. – 2019. – Vol. 233.

34. Bade, G. Serum cytokine profiling and enrichment analysis reveal the involvement of immunological and inflammatory pathways in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease / G. Bade, M.A. Khan, A.K. Srivastava [et al.] // *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* – 2014. – Vol. 9. – P. 759-773.
35. Baines, K.J. Innate immune responses are increased in chronic obstructive pulmonary disease / K.J. Baines, J.L. Simpson, P.G. Gibson // *PloS One.* – 2011. – Vol. 6, № 3.
36. Barnes, P.J. Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease / P.J. Barnes, M.G. Cosio // *PLoS Med.* – 2004. – Vol. 1, № 1.
37. Barnes, P.J. Inflammatory endotypes in COPD / P.J. Barnes // *Allergy.* – 2019. – Vol. 74, № 7. – P. 1249-1256.
38. Bauer, R.N. Effects of air pollutants on innate immunity: the role of Toll-like receptors and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors / R.N. Bauer, D. Diaz-Sanchez, I. Jaspers // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2012. – Vol. 129, № 1. – P. 14-24.
39. Becker, S. Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: further mechanistic studies / S. Becker, S. Mundandhara, R.B. Devlin [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 207, № 2. – P. 269-275.
40. Berenson, C.S. Impaired innate immune alveolar macrophage response and the predilection for COPD exacerbations / Berenson C.S., Kruzel R.L., Eberhardt E. [et al.] // *Thorax.* – 2014. – Vol. 69. – P. 811–818.
41. Bezemer, G.F.G. Dual role of Toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease / G.F.G. Bezemer, S. Sagar, J. van Bergenhenegouwen [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2012. – Vol. 64, № 2. – P. 337-358.
42. Bhat, T.A. Immune dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease / T.A. Bhat, L. Panzica, S.G. Kalathil [et al.] // *Ann. Am. Thorac. Soc.* – 2015. – Vol. 12, suppl. 2. – P. S169-S175.

43. Bradford, E. The value of blood cytokines and chemokines in assessing COPD / E. Bradford, S. Jacobson, J. Varasteh [et al.] // *Respir. Res.* – 2017. – Vol. 18, № 1.
44. Briso, E.M. Cutting edge: soluble IL-6R is produced by IL-6R ectodomain shedding in activated CD4 T cells / E.M. Briso, O. Dienz, M. Rincon // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180, № 11. – P. 7102-7106.
45. Brusselle, G.G. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease / G.G. Brusselle, G.F. Joos, K.R. Bracke // *Lancet.* – 2011. – Vol. 378, № 9795. – P. 1015-1026.
46. Bu, T. How Do Innate Immune Cells Contribute to Airway Remodeling in COPD Progression? / T. Bu, L.F. Wang, Y.Q. Yin // *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* – 2020. – Vol. 15. – P. 107-116.
47. Budulac, S.E. Toll-like receptor (TLR2 and TLR4) polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease / S.E. Budulac, H.M. Boezen, P.S. Hiemstra [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 8.
48. Caramori, G. COPD immunopathology / G. Caramori, P. Casolari, A. Barczyk [et al.] // *Semin. Immunopathol.* – 2016. – Vol. 38, № 4. – P. 497-515.
49. Carbo, A. Systems modeling of molecular mechanisms controlling cytokine-driven CD4⁺ T cell differentiation and phenotype plasticity / A. Carbo, R. Hontecillas, B. Kronsteiner [et al.] // *PLoS Comp. Biol.* – 2013. – Vol. 9, № 4.
50. Celli, B.R. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease / B.R. Celli, N. Locantore, J. Yates [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2012. – Vol. 185, № 10. – P. 1065–1072.
51. Chen, X. Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4⁺ T Cells / X. Chen, M. Zhang, M. Liao [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. – Vol. 181, № 7. – P. 734-742.
52. Chiappori, A. CD4⁺ CD25 high CD127-regulatory T-cells in COPD: smoke and drugs effect / A. Chiappori, C. Folli, F. Balbi [et al.] // *World Allergy Organization J.* – 2016. – Vol. 9, № 1.

53. Cohen, I.R. Signaling via TLR2 and TLR4 directly down-regulates T cell effector functions: the regulatory face of danger signals / I.R. Cohen, A. Zanin-Zhorov // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol. 4.
54. Cosmi, L. T helper cells plasticity in inflammation / L. Cosmi, L. Maggi, V. Santarlasci [et al.] // *Cytometry Part A.* – 2014. – Vol. 85, № 1. – P. 36-42.
55. Cosmi, L. Th17 regulating lower airway disease / L. Cosmi, F. Liotta, F. Annunziato // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 1-6.
56. D'Anna, S.E. Bacterial-viral load and the immune response in stable and exacerbated COPD: significance and therapeutic prospects / S.E. D'Anna, B. Balbi, F. Cappello [et al.] // *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* – 2016. – Vol. 11. – P. 445-453.
57. De Nardo, D. Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation / D. De Nardo // *Cytokine.* – 2015. – Vol. 74, № 2. – P. 181-189.
58. Di Stefano, A. Bronchial inflammation and bacterial load in stable COPD is associated with TLR4 overexpression / A. Di Stefano, F.L.M. Ricciardolo, G. Caramori [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2017. – Vol. 49, № 5.
59. Dienz, O. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses / O. Dienz, M. Rincon // *Clin. Immunol.* – 2009. – Vol. 130, № 1. – P. 27-33.
60. Diller, M.L. Balancing inflammation: the link between Th17 and regulatory T cells / M.L. Diller, R.R. Kudchadkar, K.A. Delman [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2016. – Vol. 2016.
61. Di Stefano, A. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients / A. Di Stefano, G. Caramori, I. Gnemmi [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 2009. – Vol. 157. – P. 316–324.
62. Doe, C. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD / C. Doe, M. Bafadhel, S. Siddiqui [et al.] // *Chest.* – 2010. – Vol. 138, № 5. – P. 1140-1147.
63. Drutskaya, M.S. Interleukin-6: from molecular mechanisms of signal transduction to physiological properties and therapeutic targeting / M.S. Drutskaya, M.A. Nosenko, K S. Atretkhany [et al.] // *Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 49, № 6. – P. 837-842.

64. DuPage, M. Harnessing the plasticity of CD4⁺ T cells to treat immune-mediated disease / M. DuPage, J.A. Bluestone // *Nat. Rev. Immunol.* – 2016. – Vol. 16, № 3. – P. 149.
65. Emami, A.M. Role of Serum Interleukin 6, albumin and C-reactive protein in COPD patients / A.M. Emami, O. Zaerin // *Tanaffos.* – 2015. – Vol. 14, № 2. – P. 134–140.
66. Fan, V.S. COPD disease severity and innate immune response to pathogen-associated molecular patterns / V.S. Fan, S.A. Gharib, T.R. Martin [et al.] // *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* – 2016. – Vol. 11. – P. 467-467.
67. Ferrari, R. Three-year follow-up of Interleukin 6 and C-reactive protein in chronic obstructive pulmonary disease / R. Ferrari, S.E. Tanni, L.M.O. Caram [et al.] // *Respir. Res.* – 2013. – Vol. 14, № 24.
68. Fielding, C.A. Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation / C.A. Fielding, G.W. Jones, R.M. McLoughlin [et al.] // *Immunity.* – 2014. – Vol. 40, №1. – P. 40-50.
69. Flach, P.A. ROC Analysis. Encyclopedia of Machine Learning and Data Mining / P.A. Flach. – Springer, 2016. – 1335 p.
70. Garbers, C. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition / C. Garbers, S. Aparicio-Siegmund, S. Rose-John // *Curr. Opin. Immunol.* – 2015. – Vol. 34. – P. 75-82.
71. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases (GOLD). Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (updated 2019) [Electronic resource]. – 2019. – Available at: https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2018/11/GOLD-2019-POCKET-GUIDE-FINAL_WMS.pdf
72. Golpe, R. Differences in systemic inflammation between cigarette and biomass smoke-induced COPD / R. Golpe, I. Martín-Robles, P. Sanjuán-López [et al.] // *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* – 2017. – Vol. 12. – P. 2639-2646.

73. Grumelli, S. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema / S. Grumelli, D.B. Corry, L.Z. Song, [et al.] // *PLoS Med.* – 2004. – Vol. 1, № 1.
74. Gurczynski, S.J. IL-17 in the lung: the good, the bad, and the ugly / S.J. Gurczynski, B.B. Moore // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2018. – Vol. 314, № 1. – P. L6-L16.
75. Hajian-Tilaki, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation / K. Hajian-Tilaki // *Caspian J. Intern. Med.* – 2013. – Vol. 4, № 2. – P. 627–635.
76. Hallstrand, T.S. Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation / T.S. Hallstrand, T.L. Hackett, W.A. Altemeier [et al.] // *Clin. Immunol.* – 2014. – Vol. 151, № 1. – P. 1-15.
77. Hansbro, P.M. Toll-like receptors in COPD / P.M. Hansbro, T.J. Haw, M.R. Starkey [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2017. – Vol. 49.
78. Haw, T.J. Toll-like receptor 2 and 4 have opposing roles in the pathogenesis of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease / T.J. Haw, M.R. Starkey, S. Pavlidis [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2017. – Vol. 314, № 2. – P. L298-L317.
79. Hawkins, G. Serum soluble IL6 receptor levels are elevated in subjects with COPD and are associated with the il6r coding variation Asp358Ala / G. Hawkins, M.B. Robinson, W.C. Moore [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care.* – 2014. – Vol. 189.
80. He, J.Q. Associations of IL6 polymorphisms with lung function decline and COPD / J.Q. He, M.G. Foreman, K. Shumansky [et al.] // *Thorax.* – 2009. – Vol. 64, № 8. – P. 698-704.
81. Heink, S. Trans-presentation of interleukin-6 by dendritic cells is required for priming pathogenic Th17 cells / S. Heink, N. Yogev, C. Garbers, [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2017. – Vol. 18, №1. – P. 74-85.
82. Heinrich, P.C. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation / P.C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan [et al.] // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 374, № 1. – P. 1-20.

83. Holtzman, M.J. The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease / M.J. Holtzman, D.E. Byers, J. Alexander-Brett [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – Vol. 14, № 10. – P. 686-698.
84. Hou, J. Role of regulatory T cells in disturbed immune homeostasis in patients with chronic obstructive pulmonary disease / J. Hou, Y. Sun // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11.
85. Hulina-Tomašković A. Pro-inflammatory effects of extracellular Hsp70 and cigarette smoke in primary airway epithelial cells from COPD patients / A.Hulina-Tomašković, I.H. Heijink, M.R. Jonker [et al.] // *Biochimie.* – 2019. – Vol. 156. – P. 47-58.
86. Hunter, C.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease / C.A. Hunter, S.A. Jones // *Nature immunology.* – 2015. – Vol. 16, № 5. – P. 448-457.
87. Ito, J.T. Th17/Treg imbalance in COPD progression: A temporal analysis using a CS-induced model / J.T. Ito, D.A.B. Cervilha, J.D. Lourenco [et al.] // *PloS One.* – 2019. – Vol. 14, № 1.
88. Jin, B. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation / B. Jin, T. Sun, X.H. Yu [et al.] // *Clin. Develop. Immunol.* – 2012. – Vol. 2012.
89. Jones, G.W. Loss of CD4⁺ T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells / G.W. Jones, R.M. McLoughlin, V.J. Hammond [et al.] // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184, № 4. – P. 2130-2139.
90. Kabelitz, D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes / D. Kabelitz // *Curr. Opin. Immunol.* – 2007. – Vol. 19, № 1. – P. 39-45.
91. Kalinina, E. The mechanisms of the regulation of immune response in patients with comorbidity of chronic obstructive pulmonary disease and asthma / E. Kalinina, Yu. Karaman, T. Vitkina [et al.] // *Can. Respir. J.* – 2016. – Vol. 2016.
92. Kawasaki, T. Toll-like receptor signaling pathways / T. Kawasaki, T. Kawai // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5.

93. Kimura, A. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance / A. Kimura, T. Kishimoto // *European journal of immunology*. – 2010. – Vol. 40, № 7. – P. 1830-1835.
94. Kishimoto, T. IL-6: from its discovery to clinical applications / T. Kishimoto // *Int. Immunol.* – 2010. – Vol. 22, № 5. – P. 347-352.
95. Knobloch, J. The T-helper cell type 1 immune response to gram-negative bacterial infections is impaired in COPD / J. Knobloch, K. Schild, D. Jungck [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 183, № 2. – P. 204-214.
96. Knobloch, J. A systemic defect in toll-like receptor 4 signaling increases lipopolysaccharide-induced suppression of IL-2-dependent T-cell proliferation in COPD / J. Knobloch, S.J. Chikosi, S. Yanik [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2015. – Vol. 310, № 1. – P. L24–L39.
97. Knobloch, J. The monocyte-dependent immune response to bacteria is suppressed in smoking-induced COPD / J. Knobloch, S. Panek, S.D. Yanik [et al.] // *J. Mol. Med.* – 2019. – Vol. 97, № 6. – P. 817-828.
98. Lane, N. Regulation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of regulatory T-cells and Th17 cells / N. Lane, R. A. Robins, J. Corne [et al.] // *Clin. Sci.* – 2010. – Vol. 119. – P. 75-86.
99. Lea, S.R. The effects of repeated Toll-like receptors 2 and 4 stimulation in COPD alveolar macrophages / S.R. Lea, S.L. Reynolds, M. Kaur [et al.] // *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* – 2018. – Vol. 13. – P. 771-780.
100. Le, T.T.T. Blockade of IL-6 trans signaling attenuates pulmonary fibrosis / T.T.T. Le, H. Karmouty-Quintana, E. Melicoff [et al.] // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 193, №7. – P. 3755-3768.
101. Lee, S.W. The association of downregulated toll-like receptor 4 expression with airflow limitation and emphysema in smokers / Lee S.W., Kim D.R., Kim T.J. [et al.] // *Respir. Res.* – 2012. – Vol. 13.
102. Le Rouzic, O. Th17 cytokines: novel potential therapeutic targets for COPD pathogenesis and exacerbations / O. Le Rouzic, M. Pichavant, E. Frealle [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2017. – Vol. 50, № 4.

103. Li, H. Disruption of th17/treg balance in the sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease / H. Li, Q. Liu, Y. Jiang [et al.] // *Am. J. Med. Sci.* – 2015. – Vol. 349, № 5. – P. 392-397.
104. Li, X.N. Imbalances of Th17 and Treg cells and their respective cytokines in COPD patients by disease stage / X.N. Li, X. Pan, D. Qiu // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 7, № 12. – P. 5324-5329.
105. Li, Z. FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation / Z. Li, D. Li, A. Tsun [et al.] // *Cell. Mol. Immunol.* – 2015. – Vol. 12, № 5. – P. 558-565.
106. Li, Z. Functional variations of the TLR4 gene in association with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary tuberculosis / Z. Li, X. Mao, Q. Liu [et al.] // *BMC Pulm. Med.* – 2019. – Vol. 19.
107. Lissilaa, R. Although IL-6 trans-signaling is sufficient to drive local immune responses, classical IL-6 signaling is obligate for the induction of T cell-mediated autoimmunity / R. Lissilaa, V. Buatois, G. Magistrelli [et al.] // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185, № 9. – P. 5512-5521.
108. Liu, G. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4+CD25+ T cells / G. Liu, Y. Zhao // *Immunol.* – 2007. – Vol. 122, № 2. – P. 149-156.
109. Liu, Y. Increased expression of TLR2 in CD4+ T cells from SLE patients enhances immune reactivity and promotes IL-17 expression through histone modifications / Y. Liu, M. Zhao, H. Wu [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2015. – Vol. 45, № 9. – P. 2683-2693.
110. Lortet-Tieulent, J. International trends in COPD mortality, 1995–2017 / J. Lortet-Tieulent, I. Soerjomataram, J.L. Lopez-Campos [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2019. – Vol. 54, № 6.
111. Lucas, K. Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway / K. Lucas, M. Maes // *Mol. Neurobiol.* – 2013. – Vol. 48, № 1. – P. 190-204.

112. Luckheeram, R.V. CD4⁺ T cells: differentiation and functions / R.V. Luckheeram, R. Zhou, A.D. Verma [et al.] // Clin. Develop. Immunol. – 2012. – Vol. 2012.
113. Majori, M. Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease / M. Majori, M. Corradi, A. Caminati [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 1999. – Vol. 103, № 3. – P. 458-462.
114. Mahnke, Y.D. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay / Y.D. Mahnke, M. Roederer // Clin. Lab. Med. – 2007. – Vol. 27, № 3. – P. 469-485.
115. Mannino, D.M. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends / D.M. Mannino, A.S. Buist // Lancet. – 2007. – Vol. 370, № 9589. – P. 765–773.
116. Mantoo, S. Systemic Inflammatory Markers as Predictor of Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) A Case-Control Study / S. Mantoo, U.H. Khan, M.A. Shah [et al.] // Int. J. Contemp. Med. Res. – 2017. – Vol. 4, № 1. – P. 241-245.
117. McGrath, J.J.C. The immune system as a victim and aggressor in chronic obstructive pulmonary disease / J.J.C. McGrath, M.R. Stampfli // J. Thorac. Dis. – 2018. – Vol. 10, suppl. 17. – P. S2011-S2017.
118. Mehrotra, N. Predictors of mortality in elderly subjects with obstructive airway disease: the PILE score / N. Mehrotra, A.X. Freire, D.C. Bauer [et al.] // Ann. Epidemiol. – 2010. – Vol. 20, № 3. – P. 223–232.
119. Metcalfe, H.J. Effects of cigarette smoke on Toll-like receptor (TLR) activation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) macrophages / H.J. Metcalfe, S. Lea, D. Hughes [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 2014. – Vol. 176, № 3. – P. 461-472.
120. Mihara, M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions / M. Mihara, M. Hashizume, H. Yoshida // Clin. Sci. – 2012. – Vol. 122, № 4. – P. 143-159.
121. Miravitlles, M. A review of national guidelines for management of COPD in Europe / M. Miravitlles, C. Vogelmeier, N. Roche [et al.] // Eur. Respir. J. – 2016. – Vol. 47, № 2. – P. 625-637.

122. Muranski, P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity / P. Muranski, N.P. Restifo // *Blood*. – 2013. – Vol. 121, № 13. – P. 2402-2414.
123. Novgorodtseva, T.P. Regulatory signal mechanisms of systemic inflammation in respiratory pathology / T.P. Novgorodtseva, T.A. Gvozdenko, T.I. Vitkina [et al.] // *Russ. Open Med. J.* – 2019. – Vol. 8, № 1.
124. Nyirenda, M.H. Modulation of regulatory T cells in health and disease: role of toll-like receptors / M.H. Nyirenda, K. O'Brien, L. Sanvito // *Inflamm. Allergy Drug Targets*. – 2009. – Vol. 8, №2. – P. 124–129.
125. Nyirenda, M.H. TLR2 stimulation drives human naive and effector regulatory T cells into a Th17-like phenotype with reduced suppressive function / M.H. Nyirenda, L. Sanvito, P.J. Darlington [et al.] // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187, № 5. – P. 2278-2290.
126. Nyirenda, M.H. TLR2 stimulation regulates the balance between regulatory T cell and Th17 function: a novel mechanism of reduced regulatory T cell function in multiple sclerosis / M.H. Nyirenda, E. Morandi, U. Vinkemeier [et al.] // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 194, № 12. – P. 5761-5774.
127. Oberg, H.H. Regulation of T cell activation by TLR ligands / H.H. Oberg, M. Juricke, D. Kabelitz [et al.] // *Eur. J. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 90, № 6(7). – P. 582-592.
128. Olloquequi, J. Biomass smoke as a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease: effects on innate immunity / J. Olloquequi, O.R. Silva // *Innate Immunity*. – 2016. – Vol. 22, № 5. – P. 373-381.
129. Opitz, B. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung / B. Opitz, V. van Laak, J. Eitel [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. – Vol. 181, № 12. – P. 1294-1309.
130. O'Shea, J.J. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells / J.J. O'Shea, W.E. Paul // *Sci.* – 2010. – Vol. 327, № 5969. – P. 1098-1102.

131. Pace, E. Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells / E. Pace, M.S.L. Ferraro, M. Melis [et al.] // *Immunol.* – 2008. – Vol. 124, № 3. – P. 401-411.
132. Pace, E. TLR4 up-regulation and reduced Foxp3 expression in mechanically ventilated smokers with obstructive chronic bronchitis / E. Pace, M. Ferraro, A. Giarratano [et al.] // *COPD: J. Chronic Obst. Pulm. Dis.* – 2013. – Vol. 10, № 2. – P. 147-155.
133. Pons, J. Expression of Toll-like receptor 2 is up-regulated in monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease / J. Pons, J. Saulea, V. Regueiro [et al.] // *Respir. Res.* – 2006. – Vol. 7, № 1.
134. Pouwels, S.D. DAMPs activating innate and adaptive immune responses in COPD / S.D. Pouwels, I.H. Heijink, N.H.T ten Hacken [et al.] // *Muc. Immunol.* – 2014. – Vol. 7, № 2. – P. 215-226.
135. Pouwels, S.D. Susceptibility for cigarette smoke-induced DAMP release and DAMP-induced inflammation in COPD / S.D. Pouwels, L. Hesse, A. Faiz [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2016. – Vol. 311, № 5. – P. L881-L892.
136. Pouwels, S.D. Increased neutrophil expression of pattern recognition receptors during COPD exacerbations / S.D. Pouwels, W.H. van Geffen, M.R. Jonker [et al.] // *Respirology.* – 2017. – Vol. 22, № 2. – P. 401-404.
137. Quan, Q. Expressions of CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells and foxp3 in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease / Q. Quan, F. Wang, X. Wang // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2016. – Vol. 9, № 9. – P. 18026-18032.
138. Quintana, F.J. Old dog, new tricks: IL-6 cluster signaling promotes pathogenic Th17 cell differentiation / F.J. Quintana // *Nat. Immunol.* – 2017. – Vol. 18, №1. – P.8-10.
139. Rahman, A.H. The contribution of direct TLR signaling to T cell responses / A.H. Rahman, D.K. Taylor, L.A. Turka // *Immunol. Res.* – 2009. – Vol. 45, № 1. – P. 25-36.

140. Rai, G. TLR-2 expression and dysregulated human Treg/Th17 phenotype in *Aspergillus flavus* infected patients of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis / G. Rai, S. Das, M.A. Ansari [et al.] // *Microb. Cell Factories*. – 2020. – Vol. 215.
141. Raphael, I. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases / I. Raphael, S. Nalawade, T.N. Eagar [et al.] // *Cytokine*. – 2015. – Vol. 74, № 1. – P. 5-17.
142. Ravi, A.K. Increased levels of soluble interleukin-6 receptor and CCL3 in COPD sputum / A.K. Ravi, S. Khurana, J. Lemon [et al.] // *Respir. Res.* – 2014. – Vol. 15.
143. Ravi, A.K. COPD monocytes demonstrate impaired migratory ability / A.K. Ravi, J. Plumb, R. Gaskell [et al.] // *Respir. Res.* – 2017. – Vol. 18. – № 1.
144. Ren, J. The functional stability of FOXP3 and ROR γ t in Treg and Th17 and their therapeutic applications / J. Ren, B. Li // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* – 2017. – Vol. 107. – P. 155-189.
145. Reynolds, J.M. Toll-like receptor 2 signaling in CD4⁺ T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease / J.M. Reynolds, B.P. Pappu, J. Peng [et al.] // *Immunity*. – 2010. – Vol. 32, № 5. – P. 692-702.
146. Reynolds, J.M. Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation / J.M. Reynolds, G.J. Martinez, Y. Chung [et al.] // *PNAS*. – 2012. – Vol. 109, № 32. – P. 13064-13069.
147. Riethmueller, S. Proteolytic origin of the soluble human IL-6R in vivo and a decisive role of N-glycosylation / S. Riethmueller, P. Somasundaram, J.C. Ehlers [et al.] // *PLoS Biol.* – 2017. – Vol. 15, № 1.
148. Rincon, M. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases / M. Rincon, C.G. Irvin // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 8, № 9. – P. 1281-1290.
149. Roberts, M.E.P. CD4⁺ T-cell profiles and peripheral blood ex-vivo responses to T-cell directed stimulation delineate COPD phenotypes / M.E.P. Roberts, B.W. Higgs, P. Brohawn [et al.] // *Chronic Obstr. Pulm. Dis.* – 2015. – Vol. 2, № 4. – P. 268.

150. Robinson, M.B. IL-6 trans-signaling increases expression of airways disease genes in airway smooth muscle / M.B. Robinson, D.A. Deshpande, J. Chou [et al.] // *Am. J. Physiol. – Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2015. – Vol. 309, №2. – P. L129-L138.
151. Rose-John, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6 / S. Rose-John // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 8, № 9. – P. 1237-1247.
152. Ruwanpura, S.M. Interleukin-6 promotes pulmonary emphysema associated with apoptosis in mice / S.M. Ruwanpura, L. McLeod, A. Miller [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 45, № 4. – P. 720-730.
153. Sarc I. T-cell pathways in lung tissue of patients with advanced COPD and IPF requiring lung transplantation / I. Sarc, M. Silar, A. Mitterbauer [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2016. – Vol. 48, suppl. 60.
154. Sarir, H. Cells, mediators and Toll-like receptors in COPD / H. Sarir, P.A.J. Henricks, A.H. van Houwelingen [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 585, №2(3). – P. 346-353.
155. Schaper, F. Interleukin-6: biology, signaling and strategies of blockade / F. Schaper, S. Rose-John // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2015. – Vol. 26, 5. – P. 475-487.
156. Scheller, J. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 / J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* – 2011. – Vol. 1813, № 5. – P. 878-888.
157. Selvarajah, S. Multiple circulating cytokines are coelevated in chronic obstructive pulmonary disease / S. Selvarajah, I. Todd, P.J. Tighe [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2016. – Vol. 2016.
158. Shoenfelt, J. Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter / J. Shoenfelt, R.J. Mitkus, R. Zeisler [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2009. – Vol. 86, № 2. – P. 303-312.

159. Silva, R. Pathogenic mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke exposure / R. Silva, M. Oyarzún, J. Olloquequi // Arch. Bronconeumol. – 2015. – Vol. 51, № 6. – P. 285-292.
160. Silva, B.S.A. Severity of COPD and its relationship with IL-10 / B.S.A. Silva, F.S. Lira, D. Ramos [et al.] // Cytokine. – 2018. – Vol. 106. – P. 95-100.
161. Singh, B. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells / B. Singh, J. Schwartz, C. Sandrock [et al.] // Indian J. Med. Res. – 2013. – Vol. 138, № 5. – P. 591-594.
162. Singh, S. Correlation of severity of chronic obstructive pulmonary disease with potential biomarkers / S. Singh, S.K. Verma, S. Kumar [et al.] // Immunol. Lett. – 2018. – Vol. 196.
163. Solleiro-Villavicencio, H. Chronic obstructive pulmonary disease induced by exposure to biomass smoke is associated with a Th2 cytokine production profile / H. Solleiro-Villavicencio, R. Quintana-Carrillo, R. Falfán-Valencia [et al.] // Clin. Immunol. – 2015. – Vol. 161, № 2. – P. 150-155.
164. Sussan, T.E. Source of biomass cooking fuel determines pulmonary response to household air pollution Source of biomass cooking fuel determines pulmonary response to household air pollution / T.E. Sussan, V. Ingole, J.H. Kim [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2014. – Vol. 50, № 3. – P. 538-548.
165. Suttmuller, R.P. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells / Suttmuller, R.P., den Brok M.H., Kramer M. // J. Clin. Invest. – 2006. – Vol. 116, № 2. - P. 485–494.
166. Takeda, K. TLR signaling pathways / Takeda K., Akira S. // Semin. Immunol. – 2004. – Vol. 16, № 1. – P. 3-9.
167. Tanaka, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease / T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2014. – Vol. 6, № 10.
168. Tripathi, P.M. Expression of toll-like receptor 2 and 4 in peripheral blood neutrophil cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease / P.M. Tripathi, S. Kant, R.S. Yadav [et al.] // Oman Med. J. – 2017. – Vol. 32, № 6. – P. 477.

169. Unver, N. IL-6 family cytokines: key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets / N. Unver, F. McAllister // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2018. – Vol. 41. – P. 10-17.

170. Uzeloto, J.S. Systemic Cytokine Profiles of CD4⁺ T Lymphocytes Correlate with Clinical Features and Functional Status in Stable COPD / J.S. Uzeloto, A.C. Toledo-Arruda, B.S.A. Silva [et al.] // *Int. J. Chronic Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2020. – Vol. 15. – P. 2931-2940.

171. Vargas-Rojas, M.I. Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease / M.I. Vargas-Rojas, A. Ramirez-Venegas, L. Limon-Camacho [et al.] // *Respir. Med.* – 2011. – Vol. 105. – № 11. – P. 1648-1654.

172. Walker, J.A. Th2 cell development and function / J.A. Walker, A.N. McKenzie // *Nat. Rev. Immunol.* – 2018. – Vol. 18, № 2. – P. 121-133.

173. Wang, H. Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease / H. Wang, H. Ying, S. Wang [et al.] // *Clin. Respir. J.* – 2015. – Vol. 9, № 3. – P. 330-341.

174. Weaver, C.T. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin / C.T. Weaver, C.O. Elson, L.A. Fouser [et al.] // *Annu. Rev. Pathol.* – 2013. – Vol. 8. – P. 477-512.

175. Wei, J. Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis / J. Wei, X. Xiong, Y. Lin [et al.] // *PeerJ.* – 2015.

176. Wolf, J. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system / J. Wolf, S. Rose-John, C. Garbers // *Cytokine.* – 2014. – Vol. 70, № 1. – P. 11-20.

177. Xie, X.M. Interleukin-6 gene-174G>C polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis / X.M. Xie, R. Ke, Y.H. Zhang [et al.] // *Genet. Mol. Res.* – 2015. – Vol. 14, № 3. – P. 8516-8525.

178. Xu, C. TLR2 expression in peripheral CD4⁺ T cells promotes Th17 response and is associated with disease aggravation of hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure / C. Xu, Y. Lu, X. Zheng [et al.] // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8.

179. Zanin-Zhorov, A. Signaling via TLR2 and TLR4 directly down-regulates T cell effector functions: the regulatory face of danger signals / A. Zanin-Zhorov, I.R. Cohen // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol. 4.
180. Zhang, F. Elevated IL-6 receptor expression on CD4⁺ T cells contributes to the increased Th17 responses in patients with chronic hepatitis B / F. Zhang, S. Yao, J. Yuan [et al.] // *Viol. J.* – 2011. – Vol. 8, № 1. – C. 270.
181. Zhang, J. Increased expression of CD4⁺ IL-17⁺ cells in the lung tissue of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and smokers / J. Zhang, S. Chu, X. Zhong [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2013. – Vol. 15, № 1. – P. 58-66.
182. Zhao, R.R. Toll-like receptor 2 promotes T helper 17 cells response in hepatitis B virus infection / R.R. Zhao, X.F. Yang, J. Dong [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2015. – Vol. 8, № 5. – P. 7315-7323.
183. Zhu, J. T helper cell differentiation, heterogeneity, and plasticity / J. Zhu // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2018. – Vol. 10, № 10.
184. Zhu X. Peripheral T cell functions correlate with the severity of chronic obstructive pulmonary disease / X. Zhu, A.S. Gadgil, R. Givelber [et al.] // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182, №5. – P. 3270-3277.
185. Zuo, L. Molecular regulation of toll-like receptors in asthma and COPD / L. Zuo, K. Lucas, C.A. Fortuna [et al.] // *Front. Physiol.* – 2015. – Vol. 6.