

DOI: 10.1134/S0869813918120105

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ
ГЕНА TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА-2
В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ**

© *Е. В. Тырнова*,¹ *Г. М. Алешина*,² *Ю. К. Янов*,¹ *В. Н. Кокряков*²

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт уха, горла, носа и речи МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: 7101755@mail.ru

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Проведена сравнительная оценка экспрессии гена Toll-подобного рецептора-2 (TLR2) в поверхностном эпителии различных анатомо-физиологических зон слизистой оболочки верхних дыхательных путей методом обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени. Исследовали 210 образцов операционного материала: слизистая оболочка носа и околоносовых пазух, барабанной и мастоидальной полости, гортани, аденоиды, небные миндалины. Экспрессия гена TLR2 детектирована во всех исследованных образцах. Самые низкие уровни экспрессии гена TLR2 выявлены в тканях зон с высоким бактериальным и вирусным обсеменением — аденоидах и небных миндалинах, гортани. Самые высокие уровни экспрессии гена TLR2 детектированы при отосклерозе в полости среднего уха, при котором стерильность полости не нарушена. Вероятно, низкие уровни экспрессии гена TLR2 в поверхностном эпителии высококолонизированной слизистой оболочки верхних дыхательных путей служат одним из способов защиты от развития избыточного локального воспаления.

Ключевые слова: Toll-подобный рецептор-2, слизистая оболочка верхних дыхательных путей, аденоиды, гортань, небные миндалины, отосклероз, хронический средний отит.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 12. С. 1503—1515. 2018

E. V. Tyrnova,¹ *G. M. Aleshina*,² *Yu. K. Yanov*,¹ *V. N. Kokryakov*.² COMPARATIVE EVALUATION OF TOLL-LIKE RECEPTOR 2 GENE EXPRESSION IN THE UPPER AIRWAY MUCOSA. ¹ Saint-Petersburg Research Institute of Ear, Nose, Throat and Speech, Saint Petersburg, Russia, e-mail: 7101755@mail.ru; ² Research Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia.

The aim of this study was to investigate the TLR2 gene expression in the surface epithelium of the upper airway mucosa. 210 surgical samples of nasal and sinonasal mucosa (inferior turbinate mucosa, the mucosa of the middle nasal passage, polyps), tympanic and mastoid cavity and laryngeal mucosa, adenoids, palatine tonsils were investigated. Estimation of TLR2 and beta-actin gene expression by levels of the corresponding mRNA synthesis was performed by real-time PCR. The expression of TLR2 gene was detected in the all mucosal tissue specimens. The lowest levels

of TLR2 gene expression was detected in the samples of adenoids and tonsillar epithelium ($p < 0.01$; Mann-Whitney test), laryngeal mucosa ($p < 0.02$). The highest levels of TLR2 gene expression was detected in sterile middle ear pathology — otosclerosis ($p < 0.02$). Probably, low levels of TLR2 gene expression in the surface epithelium of the highly colonized upper respiratory mucosa serve as one of the ways to protect against the development of excessive local inflammation.

Key words: Toll-like receptor-2, upper airway mucosa, adenoids, chronic otitis media, larynx, otosclerosis, tonsils.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 12. P. 1503—1515. 2018

Эпителиальные поверхности верхних дыхательных путей постоянно подвергаются воздействию множества разнообразных комменсальных микроорганизмов, являющихся облигатными компонентами микробиоты и одновременно потенциальной причиной некоторых заболеваний. Помимо выполнения функций механического барьера и мукоцилиарного клиренса, эпителиальные клетки реагируют на специфические микробные молекулы, получившие в литературе название патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, генерированием сигналов, которые иницируют защитные реакции, включая локальное воспаление [1]. Для детекции инфекционных агентов эпителиальные клетки используют несколько семейств паттерн-распознающих рецепторов, среди которых наиболее исследованными и значимыми являются Toll-подобные рецепторы (TLR). Экспрессированные антиген-представляющими клетками (макрофаги, дендритные клетки) и другими типами клеток, в том числе эпителиальными клетками дыхательных путей, TLR иницируют определенные реакции иммунной защиты организма после распознавания как специфических микробных патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP), так и эндогенных молекул опасности (угрозы) (DAMP — danger-associated molecular pattern) при повреждениях тканей [2]. При активации TLR иницируются иммунные реакции, в первую очередь врожденного иммунитета, выражающиеся в выработке провоспалительных цитокинов, хемокинов и антимикробных пептидов [2–4], которые в свою очередь инструктируют развитие адекватного адаптивного иммунитета к патогенам и обеспечивают защиту от осложнений, связанных с повреждением собственных клеток и тканей этими патогенами [3, 5].

Данные об идентификации, молекулярной характеристике и клонировании TLR2 впервые опубликованы в 1998 г. вместе с описанием таких рецепторов, как TLR1, TLR3, TLR4 и TLR5 [6]. TLR2 — трансмембранный рецептор I типа с внеклеточным богатым аминокислотой лейцином доменом и консервативным цитоплазматическим TIR доменом, состоит из приблизительно 784 аминокислот.

Основными лигандами TLR2, охарактеризованными к настоящему времени, являются липопотеины наружных мембран грамотрицательных бактерий и липопептиды, липотейхоевые кислоты и гликополимеры пептидогликанового слоя клеточной стенки грамположительных бактерий.

TLR2 — единственный из описанных к настоящему времени TLR, который формирует функциональные гетеродимеры более, чем с двумя другими типами TLR (TLR1, TLR6, возможно, TLR10). Образование гетеродимеров с TLR1 или TLR6 ведет к MyD88-зависимой активации NF- κ B и MAP киназы (MAPK), которые в свою очередь стимулируют транскрипцию множества провоспалительных цитокинов, включая IL-1 β , IL-6 и TNF- α , а также хемокинов, таких как IL-8 и MCP-1/CCL-2, и интерферона I типа IFN- β , и противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10 [3, 7, 8]. Гетеродимеризацию TLR2

рассматривают как фактор, потенциально детерминирующий последующие про- и противовоспалительные реакции: комплексы TLR2/1 преимущественно связаны с провоспалительными реакциями, в то время как комплексы TLR2/6 частично связаны с противовоспалительными реакциями [3]. TLR2 также взаимодействует с большим числом молекул, не относящихся к семейству TLR, что позволяет распознавать большой набор разнообразных по структуре PAMP. Это многообразие включает различные типы молекул всех видов микроорганизмов, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, микобактерии, грибы и паразиты (простейшие и гельминты) [1, 5], а также вирусы. Экспрессия TLR2 обнаружена в иммунных, эндотелиальных и эпителиальных клетках. Подобная повсеместная экспрессия согласуется с широким диапазоном функций TLR2 [5]. Функциональные полиморфизмы одиночного нуклеотида гена TLR2 (R753Q (rs5743708) и T16934A (rs4696480)) ассоциированы с предрасположенностью к микробным инфекциям [3] и некоторым неинфекционным заболеваниям, сопровождающихся нарушениями иммунной регуляции, такими как воспалительные заболевания кишечника, аллергическая астма и атопическая болезнь [9]. Вариант GA полиморфизма гена TLR2 Arg753Gln (rs5743708) считают фактором риска носительства *Staphylococcus aureus* в носовой полости [10].

Верхние дыхательные пути, подобно желудочно-кишечному тракту, обладают постоянно обитающей (резидентной) микробиотой, представленной комменсальными непатогенными бактериями. Следовательно, клетки верхних дыхательных путей должны быть в состоянии дифференцировать комменсалов и патогенных бактерий [4]. При заболеваниях респираторного тракта неспособность должным образом идентифицировать, уничтожать и освобождать дыхательные пути от патогенных бактерий может приводить к рецидивирующим бактериальным инфекциям, образованию биопленок и/или хроническому локальному воспалению [4].

Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка экспрессии гена Toll-подобного рецептора-2 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в поверхностном эпителии слизистой оболочки верхних дыхательных путей у пациентов с различными хроническими воспалительными заболеваниями, характерными для каждой анатомо-физиологической зоны: носа и околоносовых пазух, носоглотки, ротоглотки, среднего уха и гортани.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Операционный материал от больных хроническими воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей, полученный во время планового хирургического вмешательства в условиях общей анестезии, немедленно помещали в стабилизирующий раствор RNAlater (Ambion) в соотношении 1 : 5 и сохраняли при температуре -20°C до проведения молекулярно-генетических исследований.

Исследовано 210 образцов операционного материала от 201 больного. В качестве контрольной ткани (ткани без воспаления) служили нижние носовые раковины больных с искривлением перегородки носа, обычно используемые, по данным литературы, с этой целью. Также контролем служили образцы здоровой ткани слизистой оболочки среднего носового хода, полученные попутно в ходе операций. Для этих тканей характерен физиологический уровень бактериальной и вирусной обсемененности, они колонизированы микро-

организмами в норме. Степень обсемененности различных анатомо-физиологических зон определяли согласно Национальному руководству по оториноларингологии [11].

Хирургическое лечение проведено больным в период вне обострения заболевания.

Общую РНК выделяли согласно протоколу Gen Elute Mammalian Total RNA Miniprep Kit и On-Column DNase I Digestion Set (Sigma-Aldrich) из поверхностного эпителия исследуемых образцов ткани. Синтез первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) проводили с использованием обратной транскриптазы M-MLV (Promega) в присутствии oligo(dT) и dNTPs (Медиген). Амплификацию проводили с использованием специфических праймеров [12] (прямого 5'-ggccagcaaatctgtgtg-3' и обратного 5'-aggcggacatcctgaacct-3') и реактивов iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) методом ПЦР в режиме реального времени с помощью системы детекции продуктов ПЦР в реальном времени CFX96 Touch™ и программного обеспечения CFX Manager™ версия 2.1. Режим проведения реакции амплификации: инициальный нагрев 5 мин при T = 95 °C, затем 40 циклов: 10 с при T = 95 °C, 1 мин при T = 60 °C. Считывание проводили при 72 °C. Специфичность продуктов реакции оценивали по кривым плавления. Температура плавления продуктов амплификации — 82.5 °C для TLR2 и 88 °C для β-актина. Уровни экспрессии гена TLR2 стандартизовали относительно экспрессии гена внутреннего контроля β-актина (прямой праймер 5'-gggtcagaaggattcctatg-3', обратный 5'-ggctcaaacatgatctggg-3') с помощью программного обеспечения прибора.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 5. Достоверность различий между группами оценивали по U-критерию Манна—Уитни, различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия гена Toll-подобного рецептора 2 детектирована во всех исследованных образцах слизистой оболочки верхних дыхательных путей (см. таблицу).

Установлены достоверные различия уровней экспрессии гена TLR2 в исследованных тканях для различных анатомо-функциональных областей: I — нос и околоносовые пазухи (группы 1—7), II — аденоиды (группы 8, 9), III — небные миндалины (группы 10, 11), IV — среднее ухо (группы 12—16), V — гортань (группы 17, 18). Самые низкие уровни экспрессии гена TLR2 отмечены в тканях с высоким бактериальным и вирусным обсеменением — аденоидах и небных миндалинах, а также в слизистой оболочке гортани. По сравнению с контрольной тканью нижних носовых раковин (группа 2) уровни значимости различий (тест Манна—Уитни) составили: $p < 0.01$ с группами 8 и 9, $p < 0.001$ с группой 10, $p < 0.02$ с группами 17 и 18. По сравнению с контрольной тканью слизистой оболочки среднего носового хода (группа 1) уровни значимости различий: $p < 0.01$ с группами 8 и 9, $p < 0.05$ с группой 11, $p = 0.001$ с группой 10, $p < 0.05$ с группой 18. Уровни экспрессии гена TLR2 в аденоидах (группы 8, 9), небных миндалинах при хроническом тонзиллите (группа 10) ниже, чем в материале из среднего уха при всех видах патологии. В слизистой оболочке гортани (группы 17, 18) уровни экспрессии гена TLR2 ниже ($p < 0.05$ во всех случаях, кроме отосклероза — $p < 0.01$), чем в полости среднего уха, за исключением тимпаносклероза (группа 12).

Характеристика образцов слизистой оболочки верхних дыхательных путей

Номер группы	Операционный материал — слизистая оболочка	Количество образцов	Экспрессия гена TLR2 относительно гена β-актина, усл. ед.	Диагноз / Показания к операции	Степень колонизации микроорганизмами [11]	Анатомо-функциональная зона
1	Слизистая оболочка среднего носового хода (контроль 1, без воспаления, физиологический уровень колонизации)	13	0.00268 (0.00222—0.00473)	Киста лобной пазухи/сфеноидит/киста верхнечелюстной пазухи/искривление перегородки носа/эпифора/ликворея/инородное тело верхнечелюстной пазухи	Средняя степень колонизации (колониализованы микроорганизмами в норме)	I. Нос и околоносовые пазухи
2	Слизистая оболочка нижних носовых раковин (контроль 2, без воспаления, физиологический уровень колонизации)	13	0.00250# (0.00189—0.00344)	Искривление перегородки носа, гипертрофический ринит		
3	Слизистая оболочка гипертрофических нижних носовых раковин	13	0.00280# (0.00216—0.003345)	Иородное тело/кистоподобное образование верхнечелюстной пазухи		
4	Слизистая оболочка верхнечелюстной пазухи	14	0.00242# (0.00172—0.00471)	Хронический полипозный риносинусит		
5	Носовые хоанальные полипы	13	0.00255# (0.001465—0.00376)			
6	Полипы верхнечелюстной пазухи	6	0.00263# (0.00167—0.00452)			
7	Полипы среднего носового хода и решетчатого лабиринта	13	0.00192# (0.00111—0.00287)			
8	Аденоиды	13	0.00093*# (0.00053—0.00171)			
9	Аденоиды (ГНМ)	8	0.00098*# (0.000422—0.00106)			
				Обструктивная гипертрофия аденоидов, приводящая к назальной обструкции	Высокое бактериальное и вирусное обсеменение	II. Аденоиды
				Обструктивная гипертрофия аденоидов и гипертрофия небных миндалин (ГНМ), приводящие к затруднению носового дыхания и развитию секреторного отита		

Номер группы	Операционный материал — слизистая оболочка	Количество образцов	Экспрессия гена TLR2 относительно гена β -актина, усл. ед.	Диагноз / Показания к операции	Степень колонизации микроорганизмами [11]	Анатомо-функциональная зона
10	Небные миндалины (ХТ)	13	0.00106*# (0.00076—0.00192)	Хронический декомпенсированный тонзиллит (ХТ)	Высокое бактериальное и вирусное обсеменение	III. Небные миндалины
11	Небные миндалины (ГНМ)	8	0.00197*# (0.00132—0.00257)	Обструктивная гипертрофия аденоидов и ГНМ, приводящие к затруднению носового дыхания и развитию секреторного отита		
12	Слизистая оболочка барабанной полости при тимпаносклерозе	13	0.00195# (0.00141—0.00541)	Хронический туботимпанальный средний отит, тимпаносклероз	Зона утрагала стериальность в результате перфорации барабанной перепонки	IV. Среднее ухо
13	Слизистая оболочка барабанной полости	13	0.00344 (0.00194—0.00452)	Хронический туботимпанальный средний отит, центральная перфорация		
14	Слизистая оболочка барабанной полости при холестеатоме	13	0.00259 (0.00173—0.00589)	Хронический гнойный эпипантальный средний отит, холестеатома		
15	Слизистая оболочка мастоидальной полости	14	0.00237# (0.00133—0.00378)	Хронический гнойный эпипантальный средний отит, холестеатома		
16	Слизистая оболочка суперструктур стремени	13	0.00373 (0.00300—0.00593)	Отосклероз, тугоухость	Стерильно	V. Гортань
17	Слизистая оболочка гортани	8	0.00078*# (0.00051—0.00254)	Фиброзно-сосудистый полип	Колонизация микроорганизмами и вирусами выше, чем в норме	
18	Слизистая оболочка гортани	9	0.00081*# (0.00063—0.00258)	Папилломатоз/киста/ангиофиброма/гипертрофический ларингит/стеноз		

Примечание. * $p < 0.05$ по сравнению с контрольными группами 1, 2 (физиологический уровень колонизации); # $p < 0.05$ по сравнению с группой 16 (стерильная полость среднего уха при отосклерозе). Подробное описание различий между группами приведено в тексте статьи. Данные по экспрессии гена TLR2 относительно гена β -актина (усл. ед.) представлены как медиана (нижний квартиль—верхний квартиль).

Самые высокие уровни экспрессии гена TLR2 наблюдали при патологическом процессе среднего уха — в слизистой оболочке суперструктур стремени, при котором стерильность полости не нарушена (группа 16): $p < 0.02$ по сравнению с группой 2 (контроль 2), $p < 0.01$ по сравнению с образцами слизистой оболочки носа при патологических процессах (группы 3, 5), $p < 0.05$ по сравнению с образцами слизистой верхнечелюстных пазух и полипами решетчатых пазух (группы 4, 6, 7), $p < 0.001$ по сравнению с аденоидами (группы 8, 9), небными миндалинами (группы 10, 11), $p < 0.01$ по сравнению со слизистой оболочкой гортани (группы 17, 18). В пределах анатомической области «нос и околоносовые пазухи» уровень экспрессии гена TLR2 снижен ($p < 0.05$) в полипах среднего носового хода и решетчатого лабиринта (группа 7) по сравнению с группой 1 (контроль 1). В обеих группах гипертрофированных аденоидов (группы 8, 9) экспрессия гена TLR2 отличалась от небных миндалин при гипертрофии небных миндалин (группа 11) ($p < 0.05$). В полости среднего уха выявлены различия между отосклерозом и хроническим средним отитом: экспрессия гена TLR2 в эпителии суперструктур стремени (группа 16) повышена по сравнению с тимпаносклерозом (группа 12) и слизистой оболочкой мастоидальной полости (группа 15) ($p < 0.05$, $p < 0.01$ соответственно). В пределах анатомических областей «аденоиды», «небные миндалины», «гортань» различия уровней экспрессии гена TLR2 при различных нозологических формах отсутствовали.

Защита верхних дыхательных путей от микробных инфекций является важной функцией иммунной системы. Микробы, колонизирующие поверхностные ткани сложных многоклеточных организмов, включают как безвредные виды (комменсалы), так и оппортунистические виды, способные при нарушении барьерной функции поверхности превращаться в проникающие патогены (условно-патогенные микроорганизмы). Адекватная детекция этих патогенов является первостепенной задачей клеток барьерного эпителия, обеспечивающих реализацию противомикробных защитных реакций [4]. Активация иммунной системы требует сбалансированного регулирования, чтобы обеспечить защиту от инфекции и в то же время предотвратить избыточное локальное воспаление, часто приводящее к повреждению клеток и тканей макроорганизма. Эта регуляция инициируется активацией Toll-подобных рецепторов, которые играют решающую роль в распознавании внедряющихся микробов [2].

Генетические, транскрипционные или трансляционные дефекты синтеза TLR2 могут компрометировать функциональную активность этого рецептора в слизистых оболочках верхних дыхательных путей, предрасполагая к бактериальной колонизации, развитию биопленок и стойкому течению хронических воспалительных ЛОР заболеваний у части пациентов. Регуляция синтеза и сортировки TLR2 является многофакторной, включает как пре-, так и посттранскрипционные регуляторные этапы [3].

Полученные нами данные об экспрессии гена TLR2 в барьерном эпителии слизистой оболочки верхних дыхательных путей больных хроническими воспалительными заболеваниями носа и околоносовых пазух, носоглотки, среднего уха и гортани согласуются с экспериментальными данными о дифференцированной экспрессии рецептора на уровнях мРНК и белка [13] в слизистой туботимпанума, носоглотки и ротовой полости крыс. При нормальной физиологии туботимпанума и верхнего воздуховодо-пищеварительного тракта экспрессия TLR2 в среднем ухе крыс была больше, чем в других барьерных анатомических областях [13]. Экспериментально показано у мышей, что инфекции среднего уха и менингиты, вызванные *Streptococcus pneumoniae*,

служащего основной причиной среднего отита, пневмонии и септицемии (сепсиса) у человека, обостряются в отсутствие TLR2 [5], т. е. в отсутствие адекватного распознавания патогенов. При активации TLR инициируются транскрипция и/или трансляция антимикробных пептидов и белков муцинов, которые образуют слой слизи на поверхности дыхательных путей и захватывают патогены [4]. Показано, что сигнальный путь TLR2/1, сопряженно индуцируя рецептор витамина D (VDR), инициирует активацию сигнального каскада, приводящего к выработке кателицидина hCAP-18 — предшественника антимикробного пептида первой линии защиты макроорганизма LL-37 [14]. В настоящей работе самые высокие уровни экспрессии гена TLR2 детектированы в слизистой оболочке суперструктур стремени барабанной полости при отосклерозе, для которого этиологическая роль микробных факторов не установлена. Ранее нами было показано, что в барабанной полости в тех же образцах эпителия самая высокая экспрессия гена LL-37 выявлена также при отосклерозе (46.15 % случаев) [15]. Можно предположить, что стерильность барабанной полости обеспечивается в том числе и активностью исследованных факторов врожденного иммунитета. Отсутствие различий экспрессии гена TLR2 в слизистой оболочке барабанной и мастоидальной полостей при хроническом среднем отите и контрольных тканях слизистой оболочки носа, по-видимому, свидетельствует о том, что при перфорации барабанной перепонки в результате взаимодействий организма и микробов в полости среднего уха формируется состояние патобиоза [3] в отличие от комменсализма, наблюдаемого в носовой полости.

В литературе ранее описано, что бактериальные и вирусные лиганды TLR2, обнаруживаемые в очагах инфекции или воспаления, меняют экспрессию связывающих TLR. В условиях планового хирургического лечения, проводящегося в период ремиссии заболеваний, мы не наблюдали микробной стимуляции экспрессии гена TLR2. Известно, что TLR2 является рецептором для множества лигандов, включая встроенные в пептидогликан липотейхоевые кислоты, ди- и триацилированные липопептиды, липопротеины, различные варианты липополисахарида, зимозан грибов, липоарабиноманнан микобактерий, муцин гликозилфосфатидил инозитол *Trypanosoma cruzi* [5], гемагглютинин вируса кори, оболочечные белки других ДНК-вирусов [16], фосфолипоманнан *Candida albicans* [3]. Аденоиды постоянно подвергаются воздействию вирусных и бактериальных агентов, а также аллергенов. Они играют главную роль в становлении иммунитета верхних дыхательных путей, служат исполнительными органами адаптивного иммунитета системного и слизистого типов. Вследствие как их иммунологической функции, так и их специфической локализации аденоиды рассматривают в качестве резервуара вирусов и бактерий [17]. В ротовой полости здорового человека идентифицировано свыше 700 неродственных видов микроорганизмов [18]. Предполагают, что небные миндалины обладают основной ролью в иммунном распознавании присутствующих в воздухе и проглатываемых антигенов, связанных с бактериями и вирусами [19]. Инфицированные миндалины часто служат убежищем бактерий и вирусов. Миндалины являются участком высокой антигенной нагрузки, который постоянно подвергается воздействию бактерий, вирусов, грибов и других вдыхаемых и проглатываемых веществ [20]. Специфическое расположение небных миндалин способствует непосредственному контакту с потенциально вредными вдыхаемыми и проглатываемыми веществами в их природной форме. Эпителий миндалин выполняет не только защитную роль, но также осуществляет отбор антигенов [21]. Тем не менее самые низкие уровни экспрессии гена TLR2 нами обнаружены в об-

разцах эпителия небных миндалин и аденоидов лимфоэпителиального глоточного кольца, а самые высокие — в стерильном среднем ухе. Известный в литературе феномен высокого содержания белка TLR2 при очень низких уровнях мРНК в тканях лимфоэпителиального глоточного кольца связывают с вероятным недостатком естественных лигандов для TLR2, транскрипционным контролем, а также периодом полураспада мРНК и белка [20]. Можно предположить, что отсутствие инфекционно-зависимых изменений на уровне экспрессии гена TLR2 в поверхностном эпителии лимфоэпителиальных ЛОР-органов частично связано с их участием в формировании пероральной толерантности к антигенам. Значительную степень невосприимчивости эпителиальных клеток кишечника к стимуляции TLR2, несмотря на экспрессию в них TLR2, считают адаптивным механизмом для предотвращения неконтролируемого избыточного воспаления в ответ на постоянное взаимодействие лигандов с TLR2, источником которых являются грамположительные комменсалы [9]. По-видимому, схожий механизм невосприимчивости имеет место и при хроническом тонзиллите, при котором микробные инфекции, формирующие микробиом хронического тонзиллита, не стимулируют экспрессию гена TLR2 в клетках поверхностного эпителия выше определенного уровня.

Многочисленные исследования микробиома различных отделов верхних дыхательных путей здоровых людей и больных заболеваниями ЛОР-органов не выявили каких-либо специфических видов микроорганизмов в качестве причин болезненного состояния. Однако показано, что имеет место дисбиоз или микробный дисбаланс в дополнение к ассоциированному с заболеванием сниженному микробному разнообразию [4]. Предполагают, что когда местное воспаление является результатом дисбиоза бактериального сообщества, это указывает, что естественное равновесие (природный баланс) микроорганизмов является иммуномодулирующим [4].

Полученные нами данные об экспрессии гена TLR2 в слизистой оболочке носа и околоносовых пазух согласуются с гипотезой, что факторы бактериальной вирулентности лучше переносимы в носу, чем в стерильных в норме участках и в альвеолярном эпителии. Эпителиальные клетки носа имеют относительно ограниченный репертуар рецепторов реагирования на воспалительные стимулы и характеризуются относительно ограниченной реактивностью назальных цитокинов при взаимодействии лигандов с TLR [22].

Хронический риносинусит рассматривают как гетерогенное многофакторное заболевание, характеризующееся нарушенной регуляцией персистирующего воспаления. Считают, что нисходящий сигнальный путь с TLR может активировать, вероятно, избыточные механизмы, приводящие к секреции провоспалительных цитокинов. При хроническом риносинусите без носовых полипов выделение IFN-гамма способствует поляризации адаптивного иммунного ответа Th1 типа, фиброзу, тканевому ремоделированию и накоплению нейтрофилов. При хроническом риносинусите с носовыми полипами TSLP, IL-25 и IL-33 действуют на врожденные лимфоидные клетки ILC2 и дендритные клетки, поддерживая Th2-зависимые T и B клеточные реакции, секреция IL-5 приводит к накоплению эозинофилов и продукции IgE, который индуцирует выделение протеаз из тучных клеток, имеет место мобилизация макрофагов M2 типа, выделение IL-13 стимулирует дополнительную секрецию слизи, сурфактантов и антимикробных пептидов, таких как α -дефенсина человека, а также кислой хитиназы млекопитающих, лизоцима, лактоферрина, компонентов комплемента и кателицидинов [23]. В нашей работе в поверхностном эпителии различной локализации анатомической обла-

сти «нос и околоносовые пазухи» в норме и при разных патологических процессах, в том числе ятрогенных, обнаружено единственное различие: снижение экспрессии гена TLR2 ($p < 0.05$) в полипах среднего носового хода и решетчатого лабиринта (группа 6) по сравнению со слизистой оболочкой среднего носового хода (группа 18). Вероятно, на уровне барьерного эпителия носа и околоносовых пазух сигнальный путь TLR2 не отвечает за механизмы, поддерживающие персистирующее воспаление при хроническом риносинусите.

TLR играют решающую роль в инициации иммунных реакций против внедряющихся патогенов и вызывают формирование неотложных воспалительных реакций в период заражения [3]. Со стороны макроорганизма необходим тщательный контроль для предотвращения избыточного воспаления, которое может приводить к тканевым повреждениям и даже сепсису [2]. Для предупреждения избыточных и длительных воспалительных процессов в эволюции сформировались разнообразные эндогенные регуляторные механизмы, позволяющие держать под контролем уровень повреждающих факторов очага воспаления.

В происхождении относительной толерантности эпителия носа к микробным паттернам и антигенам может играть значимую роль взаимосвязь экспрессии TLR2 и эндогенного ингибитора сигнальных путей TLR Toll-взаимодействующего белка TOLLIP. Этот белок считают ключевым регулятором воспалительных реакций в толстой кишке, подавляющим реакции TLR на микроб-ассоциированные молекулярные паттерны (MAMP) обширного сообщества комменсальных микроорганизмов. В респираторном эпителии TOLLIP конститутивно экспрессируется повсеместно на всем протяжении дыхательного тракта. TOLLIP связывается с IL-1 рецептор-ассоциированной киназой (IRAK-1), предотвращая провоспалительный сигнальный путь. Показано, что экспрессия TOLLIP на уровнях экспрессии гена и белка в эпителиальных клетках носа выше, чем в альвеолярных эпителиальных клетках, а чувствительность эпителиальных клеток носа к пептидогликану ниже, чем альвеолярных эпителиальных клеток [21].

Оригинальный механизм, посредством которого иммунная система может различать жизнеспособные и нежизнеспособные грамотрицательные бактерии, регулируя иммунные реакции и тем самым ограничивая возможные повреждения организма и риск сепсиса, обеспечивает кателицидин LL-37. Кателицидины, включая LL-37, прочно связываясь с липопротеинами и липополисахаридом наружной оболочки убитых ими бактерий, ингибируют активацию TLR2 и TLR4 макрофагов грамотрицательными бактериями при потере бактериями жизнеспособности [2], снижая местное воспаление при заражении грамотрицательными бактериями.

Верхние дыхательные пути постоянно подвергаются воздействию микробов, и микроорганизмы в высококолонизированных верхних дыхательных путях реализуют разнообразные механизмы иммунного уклонения. Взаимодействие организма-хозяина со своим микробиомом на уровне поверхностного эпителия ЛОР-органов, т. е. зоны первичного контакта иммунной системы с инфекционными агентами, является решающим этапом, позволяющим дифференцированно отвечать на молекулярные паттерны, ассоциированные с комменсалами или патогенами [3]. У здоровых людей имеются многочисленные механизмы, защищающие колонизированные слизистые оболочки верхних дыхательных путей от респираторных инфекций и поддерживающие стерильные в норме участки свободными от микробной инфекции [4]. Считают, что относительно низкие уровни экспрессии и экспозиции некоторых TLR в

кишечнике, а также преимущественно базолатеральное расположение других TLR в клетках барьерных эпителиев позволяет не только эффективно распознавать и реагировать на вторгающиеся патогены, но и обеспечивает относительную толерантность в отношении комменсалов микробиоты без инициации защитных реакций с воспалительным компонентом [24]. По-видимому, участие TLR2 в регулировании видового профиля нормальной микробиоты верхних дыхательных путей и предупреждении дисбиоза [3] подчиняется рассматриваемым закономерностям, характерным для биотопов, колонизированных комменсальными микроорганизмами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях планового хирургического лечения на фоне ремиссии заболевания экспрессия гена TLR2 детектирована во всех образцах поверхностного эпителия слизистой оболочки верхних дыхательных путей больных хроническими воспалительными заболеваниями носа и околоносовых пазух, носоглотки, ротоглотки, среднего уха и гортани.

Впервые был исследован уровень экспрессии гена TLR2 в образцах поверхностного эпителия слизистой оболочки гортани (полипы, узелки, папилломы) и полости среднего уха при хроническом среднем отите и отосклерозе у человека. Полученные данные позволили подтвердить закономерность функциональной модуляции факторов врожденного иммунитета в функционально-анатомических областях слизистой оболочки верхних дыхательных путей, что было ранее показано на экспериментальных животных [13]. В частности, показано, что уровень экспрессии гена паттерн-распознающего рецептора TLR2 может не зависеть от наличия воспалительного процесса, что наблюдается для такой функционально-анатомической зоны, как нос и околоносовые пазухи. В то же время он отражает степень бактериальной и вирусной обсемененности ткани — самые низкие уровни экспрессии гена TLR2 выявлены в тканях зон с высоким обсеменением (аденоидах и небных миндалинах, гортани), а самые высокие уровни при отосклерозе в полости среднего уха, при котором стерильность полости не нарушена.

Возможно, низкие уровни экспрессии гена TLR2 в поверхностном эпителии высококолонизированной слизистой оболочки верхних дыхательных путей служат одним из способов защиты от развития избыточного локального воспаления, снижая подобным образом формирование на уровне анализируемых биотопов проявления болезненного состояния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] *Ratner A. J., Lysenko E. S., Paul M. N., Weiser J. N.* Synergistic proinflammatory responses induced by polymicrobial colonization of epithelial surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(9): 3429—3434. 2005.

[2] *Coorens M., Schneider V. A. F., de Groot A. M., van Dijk A., Meijerink M., Wells J. M., Scheenstra M. R., Veldhuizen E. J. A., Haagsman H. P.* Cathelicidins inhibit *Escherichia coli*-induced TLR2 and TLR4 activation in a viability-dependent manner. *J. Immunol.* 199(4): 1418—1428. 2017.

[3] *Li J., Lee D. S., Madrenas J.* Evolving bacterial envelopes and plasticity of TLR2-dependent responses: basic research and translational opportunities. *Front. Immunol.* 4: A. 347. eCollection 2013. www.frontiersin.org/ 2013.

[4] *Hariri B. M., Cohen N. A.* New insights into upper airway innate immunity. *Am. J. Rhinol. Allergy.* 30 : 319—323. 2016.

- [5] *Oliveira-Nascimento L., Massari P., Wetzler L. M.* The role of TLR2 in infection and immunity. *Front Immunol.* 3: 79. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00079>. 2012.
- [6] *Rock F. L., Hardiman G., Timans J. C., Kastelein R. A., Bazan J. F.* A family of human receptors structurally related to *Drosophila* toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 588—593. 1998.
- [7] *Landais J., Pelton C., Streblov D., DeFilippis V., McWeeney S., Nelson J. A.* Human cytomegalovirus miR-UL112-3p targets TLR2 and modulates the TLR2/IRAK1/NFκB signaling pathway. *PLoS Pathog.* 11(5): e1004881. doi: 10.1371/journal.ppat.1004881. eCollection 2015. 2015.
- [8] *Mistry P., Laird M. H., Schwarz R. S., Greene S., Dyson T., Snyder G. A., Xiao T. S., Chauhan J., Fletcher S., Toshchakov V. Y., MacKerell A. D., jr., Vogel S.N.* Inhibition of TLR2 signaling by small molecule inhibitors targeting a pocket within the TLR2 TIR domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112(17): 5455—5460. 2015.
- [9] *Tunis M. C., Marshall J. S.* Toll-like receptor-2 as a regulator of oral tolerance in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm.* 2014: 606383. doi: 10.1155/2014/606383. 2014.
- [10] *Żukowski M., Taryma-Leśniak O., Kaczmarczyk M., Kotfis K., Szydłowski Ł., Ciechanowicz A., Brykczyński M., Żukowska A.* Relationship between toll-like receptor 2 R753Q and T16934A polymorphisms and *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Anaesthesiol. Intensive Ther.* 49(2): 110—115. doi: 10.5603/AIT.a2017.0027. 2017.
- [11] *Пальчун В. Т.* Оториноларингология: национальное руководство (под ред. В. Т. Пальчуна). М. ГЭОТАР-Медиа. 2016. [*Pal'chun V. T.* Otorinolaringologia: natsional'noe rukovodstvo. Otorhinolaryngology: a national guide (Ed. by Pal'chun V. T.). Moscow. GEOTAR-Media. 2016. (In Russ.)].
- [12] *Тырнова Е. В., Алешина Г. М., Янов Ю. К., Кокряков В. Н.* Изучение экспрессии гена толл-подобного рецептора TLR2 в слизистой оболочке верхних дыхательных путей. *Рос. оторинолар.* 6(73): 86—93. 2014. [*Tyrnova E. V., Aleshina G. M., Yanov Yu. K., Kokryakov V. N.* Studying of Toll-like receptor 2 gene expression in the upper airway mucosa. *Russ. otorhinolaryngology.* 6(73): 86—93. 2014. (In Russ.)].
- [13] *Song J. J., Cho J. G., Woo J. S., Lee H. M., Hwang S. J., Chae S. W.* Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in rat middle ear. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 73(6): 821—824. doi: 10.1016/j.ijporl.2009.02.017. 2009.
- [14] *Meyer V., Saccone D. S., Tugizimana F., Asani F. F., Jeffery T. J., Bornman L.* Methylation of the vitamin D receptor (VDR) gene, together with genetic variation, race, and environment influence the signaling efficacy of the Toll-like receptor 2/1-VDR pathway. *Front Immunol.* 8: A. 1048. doi: 10.3389/fimmu.2017.01048. eCollection 2017. 2017.
- [15] *Тырнова Е. В., Алешина Г. М., Янов Ю. К., Кокряков В. Н.* Оценка экспрессии генов кателицидина LL-37 и бета-дефенсинов-1, -2, -3 человека в слизистой оболочке среднего уха при хронических воспалительных заболеваниях. *Соврем. пробл. науки и образования.* 5. 106. 2017 [*Tyrnova E. V., Aleshina G. M., Yanov Yu. K., Kokryakov V. N.* Estimation of cathelicidin LL-37 and human beta-defensins-1, -2, -3 gene expressions in the middle ear mucosa in the chronic inflammatory diseases. *Modern problems of science and education.* 5. 106. 2017. (In Russ.)]. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=2690>.
- [16] *Saeed U., Mazoor S., Jalal N., Zahid Piracha Z.* Contemplating the importance of Toll-like receptors I and II regarding human viral pathogenesis. *Jundishapur J. Microbiol.* 8(1): e13348. doi: 10.5812/jjm.13348. eCollection 2015. 2014.
- [17] *Marseglia G. L., Caimmi D., Pagella F., Matti E., Labo E., Licari A., Salpietro A., Pelizzo G., Castellazzi A. M.* Adenoids during childhood: the facts. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 24(4): 1—5. 2011.
- [18] *Aas J. A., Paster B. J., Stokes L. N., Olsen I., Dewhirst F. E.* Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5721—5732. 2005.
- [19] *Mansson A., Adner M., Cardell L. O.* Toll-like receptors in cellular subsets of human tonsil T cells: altered expression during recurrent tonsillitis. *Respir. Res.* 7: 36. 2006.
- [20] *Mansson A., Adner M., Höckerfelt U., Cardell L. O.* A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by PamCSK, R-837 and CpG-2006 stimulation. *Immunology.* 118(4): 539—548. 2006.
- [21] *Lange M. J., Lasiter J. C., Misfeldt M. L.* Toll-like receptors in tonsillar epithelial cells. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 73(4): 613—621. 2009.
- [22] *Moncayo-Nieto O. L., Wilkinson T. S., Brittan M., McHugh B. J., Jones R. O., Conway Morris A., Walker W. S., Davidson D. J., Simpson A. J.* Differential response to bacteria, and

TOLLIP expression, in the human respiratory tract. *BMJ Open Respir. Res.* 1(1): e000046. doi: 10.1136/bmjresp-2014-000046. eCollection 2014.

[23] *London N. R., jr., Tharakan A., Ramanathan M., jr.* The role of innate immunity and aeroallergens in chronic rhinosinusitis. *Adv. Otorhinolaryngol.* 79: 69—77. 2016. doi: 10.1159/000445132.

[24] *Abreu M. T.* Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 131—144. 2010.

Поступила в редакцию 25.06.2018

После доработки 08.11.2018

Принята к публикации 05.12.2018