

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ К IL-13, ГЕНОВ IL-13R
В БРОНХАХ КРЫС С ОВАЛЬБУМИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

© 2023 г. Л. Е. Блажевич¹*, О. Е. Смирнова¹, В. М. Кирилина¹, П. М. Маслюков²

¹Петрозаводский государственный университет, Республика Карелия, Петрозаводск, Россия

²Ярославский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Ярославль, Россия

*E-mail: lyu15041988@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.10.2022 г.

После доработки 12.02.2023 г.

Принята к публикации 14.02.2023 г.

В статье представлены результаты исследований уровней экспрессии гена рецепторов интерлейкина-13 (IL-13R) и уровней экспрессии IL-13R в бронхах контрольных крыс и крыс с овалальбумин-индуцированной астмой. Выбор этих рецепторов обусловлен большим значением данных структур в патогенезе аллергической бронхиальной астмы. Были исследованы биологические материалы 64 крыс линии Вистар при помощи метода ПЦР в режиме реального времени и иммуногистохимическим методом. Установлено, что в условиях развития астмы в тканях бронхов крыс происходит выраженная экспрессия генов *IL13R*, значительная экспрессия рецептора к IL-13. В участках бронхов, содержащих интрамуральные ганглии (область бифуркации), уровень экспрессии генов *IL13R* и уровень экспрессии рецептора IL-13R были значительно выше, чем в образцах трахеи без ганглиев. Кромогликат натрия, введенный в организм крыс через 5 ч после последней ингаляции овалальбумином, приводил к снижению содержания мРНК в бронхах животных по сравнению с животными, не получавшими обработку стабилизатором тучных клеток.

Ключевые слова: интерлейкин-13, модель овалальбумин-индуцированной бронхиальной астмы, рецептор, интрамуральный ганглий, кромогликат натрия

DOI: 10.31857/S0869813923040039, EDN: VIWGPC

ВВЕДЕНИЕ

Бронхиальная астма является гетерогенным хроническим воспалительным заболеванием дыхательных путей. Исследования молекулярных и клеточных механизмов бронхиальной астмы установили, что в ее патогенезе участвует широкий спектр иммунных (Т- и В-клетки, эозинофилы, нейтрофилы, макрофаги и др.) и структурных (эпителиальные и эндотелиальные) клеток [1].

Интерлейкин-13 (IL-13) и его рецептор являются важными участниками хронического воспаления дыхательных путей. В модели бронхиальной астмы у мышей отмечается повышенный уровень IL-13 в бронхоальвеолярной жидкости [2].

Цитокин IL-13 был идентифицирован в качестве терапевтической мишени при лечении астмы. Два различных человеческих моноклональных антитела против IL-13 (тралокинумаб и лебрикизумаб) блокируют этот цитокин и, соответственно, делают невозможной передачу сигналов IL-13 его рецепторам – IL-13Ra1 и IL-13Ra2 [3].

При блокаде рецепторов к IL-13 уменьшается бронхиальная гиперреактивность у мышей [3, 4]. Например, блокируют рецептор к IL-13 моноклональные антитела препарата дупилумаб [5]. Дупилумаб – это моноклональное антитело против α -субъединицы рецептора IL-13. Дупилумаб снижает частоту тяжелых обострений астмы, улучшает функцию легких и качество жизни. Важно отметить, что эти эффекты также наблюдаются при снижении поддерживающих доз пероральных кортикостероидов [6].

У многих пациентов с бронхиальной астмой хроническое воспаление дыхательных путей вызывается IL-13, продуцируемым Th2-клетками и тучными клетками [7].

Lentsch и соавт. в экспериментах на животных установили, что IL-13 способен вызывать аллергическую астму, острое воспалительное повреждение легких и образование легочной гранулемы [8]. IL-13 участвует в гиперсекреции слизи в нижних и верхних дыхательных путях, в развитии воспалительных реакций и гиперреактивности [9].

Первый тип рецепторов – IL-13Ra1. Рецептор этого типа состоит из субъединиц IL-4Ra в комплексе с IL-13Ra1 и обнаруживается во многих негемопоэтических клетках (например, эпителиальных клетках бронхов, гладкомышечных клетках, фибробластах, кератиноцитах). Через этот тип рецепторов опосредуют свои сигналы IL-13 и IL-4, что объясняется большим сходством между этими цитокинами на генетическом уровне. Munitz и соавт. обнаружили, что рецептору IL-13Ra1 принадлежит решающая роль в базовой продукции IgE, развитии гиперчувствительности, выработке слизи и продукции эотаксина [10].

IL-13Ra1 содержат богатые пролином области, которые могут связывать янускиназы JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2 [11, 12]. Связывание IL-13 с этим типом рецепторов активирует JAK1, JAK2 и TYK2. Следствием активации молекул JAK является фосфорилирование цитоплазматических тирозинов, что приводит к привлечению STAT6 и STAT3 к рецептору с последующим их фосфорилированием и активацией [13]. Фосфорилированные мономеры STAT6 и STAT3 димеризуются, а затем перемещаются в ядро, связываются со специфическими элементами ДНК для регуляции транскрипции [12]. Активация STAT6 является основным сигнальным событием в ответе на IL-13 [14]. Мыши, у которых отсутствовал STAT6, были защищены от гиперреактивности, индуцированной IL-13 [13]. Выяснено, что STAT1 и STAT3 также могут быть активированы IL-13 [8, 11, 12]. Цитоплазматический домен человеческого IL-13Ra1 содержит два остатка тирозина, которые могут служить сайтами стыковки для STAT3 [11].

IL-13Ra2 является *вторым типом рецепторов* для IL-13. Передача сигналов IL-13 через IL-13Ra2 приводит к фосфорилированию ERK1/2 и не зависит от STAT6. Результатом активации ERK1/2-сигнального пути является образование димерного фактора транскрипции AP-1. Фосфорилированный AP-1 транслоцируется в ядро и связывается со специфическими элементами ДНК.

С рецептором IL-13Ra2 связывается только IL-13, в то время как цитокин IL-4 не способен к взаимодействию с ним [15, 16]. Первоначально этот рецептор считался рецептором-приманкой [17], участвующим в удалении IL-13 путем интернализации [18, 19]. Хотя IL-13Ra2 не обладает стандартной сигнальной активностью JAK–STAT, эта гипотеза была поставлена под сомнение, поскольку несколько исследований показали, что при определенных обстоятельствах IL-13Ra2 может опосредовать передачу сигналов IL-13 [20, 21]. В дыхательных путях человека было обнаружено, что IL-13Ra2 участвует в передаче сигналов IL-13 через белок-активатор фактора транскрипции-1 (AP-1), индуцируя активацию TGF- β [22].

У мышей с дефицитом IL-13Ra2 бронхиальная гиперчувствительность и воспаление в ответ на воздействие домашней пыли были ослаблены по сравнению с контрольными мышами [23].

Таким образом, рецепторы к IL-13 играют значительную роль в развитии астмы, и изучение их экспрессии относится к актуальным исследованиям. Исследований, выявляющих влияние стабилизации мембран тучных клеток кромогликатом натрия на степень экспрессии генов IL-13R, ранее не проводилось. При этом тучно-клеточные продукты, высвобождаемые при их дегрануляции, могут играть существенную роль в изменении экспрессии IL-13R. Также в литературе отсутствуют сведения о роли нейронов интрамурального ганглия в степени экспрессии этих рецепторов, в то время как нервные структуры способны участвовать в нейрогенном воспалении, внося вклад в развитие патологического процесса.

Целью данного исследования являлось изучение степени экспрессии генов IL-13R и количества IL-13R-содержащих клеток в бронхах с наличием интрамуральных метасимпатических ганглиев и без них у крыс в нормальных физиологических условиях и в условиях овальбумин-индуцированной бронхиальной астмы. Еще одной явилась оценка уровня экспрессии гена IL-13R в препаратах бронхов у крыс с астмой после обработки их кромогликатом натрия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Схема эксперимента

Исследования были проведены на 64 крысах линии Вистар, полученных из вивария Петрозаводского государственного университета. Возраст крыс – 2–3 мес., для экспериментов брались самцы и самки в период диэструса. Все эксперименты были проведены в соответствии с правилами проведения лабораторных исследований (ГОСТ 33215-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур от 01.07.2016”) [24]. Все животные были разделены на несколько групп: контрольная группа (получала физиологический раствор, $n = 8$), группа животных № 1 (взятие биологического материала после 72 ч с момента последней ингаляции овальбумином, $n = 8$), группа животных № 2 (забор биоматериала осуществляли после последней ингаляции овальбумином через 10 дней, $n = 8$), группа животных № 3 (взятие биологического материала производилось на 17-й день после последней ингаляции овальбумином, $n = 8$).

Для групп № 1, № 2 и № 3 были сформированы аналогичные группы животных, но получавшие кромогликат натрия, который способен снижать аллергический компонент воспаления ($n = 8$ для каждой из групп).

От каждого животного брали по 3 препарата с ганглиями (в области бифуркаций бронхов) и по 3 препарата без ганглиев (в прямых участках). Для данного исследования брались бронхи 2-го порядка во всех исследуемых образцах. Препараты бронхов были единообразны, выполненные по стандартной методике приготовления изолированных препаратов.

Виварий, где содержались животные, соответствовал требованиям СП 2.2.1.3218-14. С целью получения образцов респираторного тракта производилась декапитация с предварительной анестезией. Общую анестезию проводили при помощи инъекций золетила (Virbac S.A., Франция, 20 мг/кг, внутримышечно). Такой подход обеспечивал быструю эвтаназию животного (рекомендации по эвтаназии экспериментальных животных, Европейская комиссия).

Методика введения и расчет дозы кромогликата натрия

Для данного исследования важно было оценить, насколько стабилизация тучных клеток кромогликатом натрия повлияет на экспрессию исследуемых рецепторов [25]. Выбор препарата обоснован тем, что кромогликат натрия стабилизирует

мембраны тучных клеток, предотвращая их дегрануляцию с последующим выходом из них цитокинов, медиаторов, лейкотриенов, усиливающих воспаление в условиях аллергии.

Кромогликат натрия (Aventis Pharma Holmes Chapel, Великобритания) вводили ингаляционно в максимальной концентрации (0.2 мг на 1 кг массы тела), исходя из перерасчета дозы для человека, через 5 ч после последней ингаляции овальбумина. Количество ингаляций – 6 раз в сутки (также максимальное, исходя из инструкции по применению препарата), время каждой ингаляции – 15 мин.

Модель бронхиальной астмы

В исследовании применяли модифицированную методику, предложенную в работе Masakazu [26]. Модифицированная методика проходила верификацию в ранее проведенных научным коллективом сериях экспериментов, в которых исследования были проведены на контрольных крысах ($n = 30$ животных), на крысах, обработанных по методике Masakazu ($n = 30$ животных) и на крысах, обработанных по модифицированной методике ($n = 30$ животных). В тканях трахей и бронхов оценивали количество эозинофилов и тучных клеток, количество слизистого компонента в малых бронхах, количество тучных клеток в лаважной жидкости. Данные показатели в предложенной модификации статистически значимо не отличались от показателей, полученных в методике Masakazu. Поэтому было принято решение оставить предложенную в статье модифицированную методику, поскольку она вызвала развитие бронхиальной астмы у 98% животных (в то время как методика Masakazu вызвала развитие астмы у 86% животных).

Крысы были сенсибилизированы введением овальбумина (Sigma-Aldrich, Германия). Для одноразовой процедуры сенсибилизации 0.5 мг овальбумина растворяли в 1 мл физиологического раствора. Далее раствор овальбумина вводили подкожно по 0.1 мл в шею, спину, обе ступни, пах и 0.5 мл раствора овальбумина дополнительно вводили внутрибрюшинно (общий объем раствора овальбумина, вводимого одному животному, равнялся 1 мл). Процедуру сенсибилизации инъекциями овальбумина проводили на 1-, 14- и 21-й день.

Параллельно с инъекциями осуществляли ингаляцию овальбумином при помощи небулайзера на 14-, 16-, 18-, 21- и 24-й день. Для этого крыс помещали в экспозиционную камеру, подключенную к небулайзеру (Omron, NE C29-E, Япония). Овальбумин в количестве 1 г растворяли в 100 мл физиологического раствора. Раствор овальбумина распыляли в течение 30 мин с выходом 3 мл/мин и со средним размером частиц 3.2 мкм. Последняя ингаляция раствором овальбумина проводилась за 72 ч до эвтаназии животных. Несенсибилизированной группе вводили физиологический раствор внутрибрюшинно в качестве контроля [26].

Статистический анализ

Для оценки значимости различий между группами предварительно осуществляли проверку нормальности распределения данных с использованием W -критерия Шапиро–Уилка. Для оценки значимости различий количественных нормально распределенных признаков применяли параметрический t -критерий Стьюдента, а также критерий Фишера F в ходе однофакторного дисперсионного анализа.

Молекулярно-генетические методы

Для определения уровня транскриптов генов были использованы образцы тканей бронхов с ганглием и бронхов без ганглия. Выделение тотальной РНК осуществляли с помощью PureZOL™ RNA Isolation Reagent (Bio-Rad, США). После

центрифугирования (время 15 мин, при 4°C, 14000 g) осадок тотальной РНК промывали 80%-ным этанолом и снова центрифугировали (время 8 мин, при 4°C, 12000 g). Далее осадок тотальной РНК подсушивали. Количество и качество тотальной РНК определяли спектрофотометрически на приборе SmartSpecPlus (Bio-Rad, США). Далее синтезировалась первая комплементарная цепь ДНК (кДНК) при помощи набора MMLVRT kit (Евроген, Россия). Прибор LightCycler®96 (Roche, Швейцария) позволял оценить уровень экспрессии генов с помощью ПЦР в режиме реального времени. Для амплификации использовали наборы qPCRmix HS SYBR (Евроген, Россия). Протокол ПЦР был следующим: кДНК денатурировалась при 95°C в течение 5 мин на протяжении 35 циклов; далее денатурация продолжалась при 95°C в течение 15 с; после денатурации производился отжиг при 60°C в течение 15 с; последним этапом была элонгация при 72°C в течение 15 с. Программа Beacon Designer помогала конструировать праймеры для ПЦР.

Нуклеотидные последовательности и размер ПЦР-фрагментов для гена *IL13RA1* (CD231A1) был следующим: 5' ATGTGTCCTACTCCCCCATC 3' (exon 11) и 5' TTC-CCCCTCTCAAGCAAATAGG 3' (exon 11), 284 н. п. соответственно [27].

Иммуногистохимические методы

Для иммуногистохимических исследований с флуоресцентной меткой использовали парафиновые срезы бронхов, изготовленные по стандартной методике. Кусочки ткани после предварительной подготовки проходили дегидратацию в спиртах, далее помещались в ксилол и парафин и готовились срезы. Депарафинизацию, регидратацию и демаскировку антигенов проводили с применением раствора Trilogy™ (Cell Marque, Merck, США). Далее срезы промывались в дистиллированной воде и в фосфатно-солевом растворе (PBS). В исследовании использовались конъюгированные первичные кроличьи поликлональные антитела против рецепторов к IL-13 (антитела кроличьи поликлональные IL-13RA1, IL-13RA1 Polyclonal Antibody, Catalog # PA5-86354, Species Reactivity: Human, Mouse, Rat; BioVitrum, США). Препараты бронхов были оставлены для реакции с первичными антителами в течение 18 ч при 4°C. После этого образцы бронхов промывались в PBS и инкубировались со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США). Ядра всех клеток препарата окрашивались Hoechst 33342 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США). Флуоресцентный микроскоп Olympus (Япония) позволил визуализировать полученные результаты, а программа ImageJ – произвести их количественный анализ [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты иммуногистохимических исследований

Образцы бронхов для иммуногистохимического исследования брались по истечению 72 ч после последней ингаляции овальбумином (группа крыс с астмой № 1). В препаратах бронхов с ганглиями количество клеток в перерасчете на 100 клеток, экспрессирующих рецептор к IL-13, в группе животных с астмой увеличилось на 160.3% по сравнению с контрольной группой (ошибка среднего арифметического (m) составила 0.36; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$). В препаратах бронхов без ганглиев тоже наблюдались изменения в количестве IL-13R-содержащих клеток. Количество таких клеток увеличилось на 90.4% у животных с астмой по сравнению с контролем ($m = 0.38$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$) (рис. 1–4).

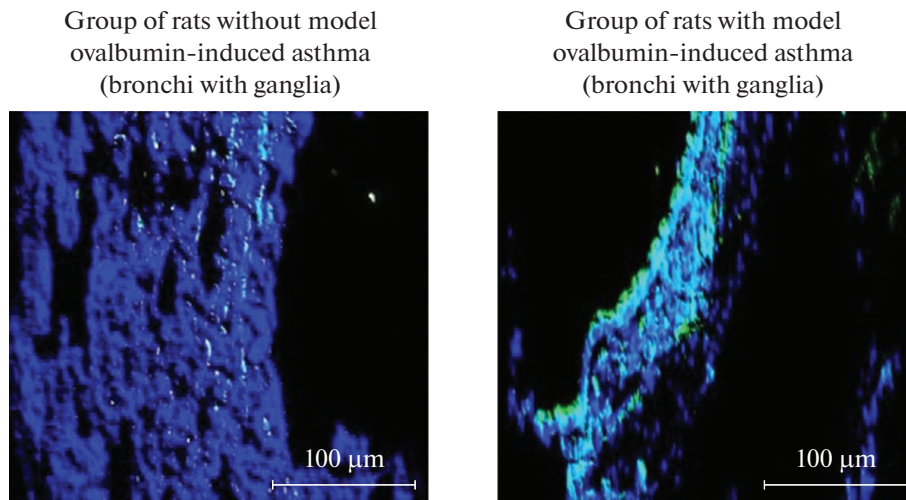


Рис. 1. Фотографии, полученные с помощью светового микроскопа. Зеленым свечением обозначены клетки, содержащие рецептор к IL-13.

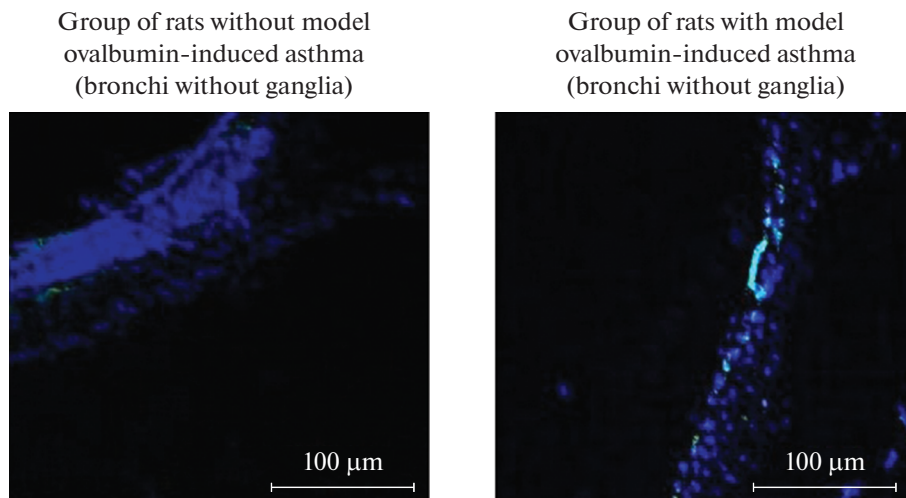


Рис. 2. Фотографии, полученные с помощью светового микроскопа. Зеленым свечением обозначены клетки, содержащие рецептор к IL-13.

Результаты молекулярно-генетических исследований

В препаратах бронхов с ганглиями экспрессия генов IL-13R была более выражена по истечению первых трех суток после последней ингаляции овальбумином. По сравнению с контрольными значениями содержание мРНК в группе крыс с астмой № 1 возрастало на 1.4 отн. ед. ($m = 0.03$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$), в группе крыс с астмой № 2 – на 1.1 отн. ед. ($m = 0.02$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$). К первоначальным значениям экспрессия генов IL-13R возвращалась на

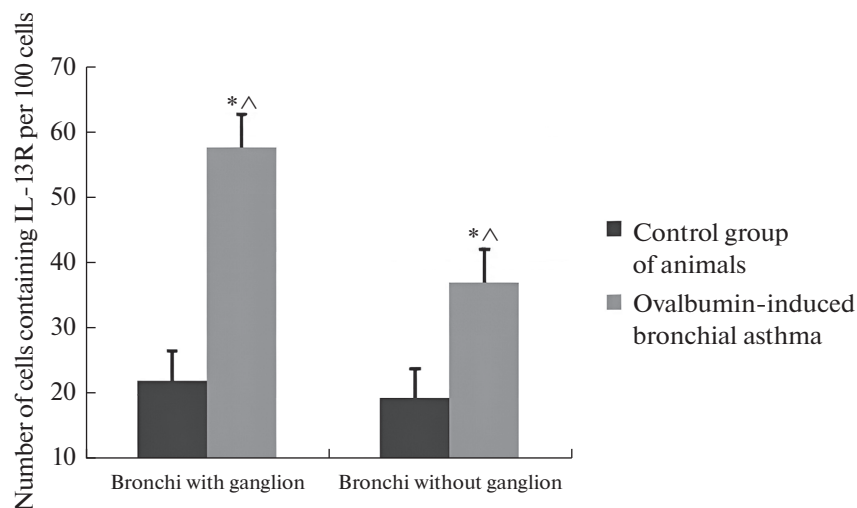


Рис. 3. Изменения в количестве IL-13R-содержащих клеток в контрольной и экспериментальной группах животных. По оси абсцисс обозначены биологические препараты. По оси ординат – количество клеток, содержащих IL-13R в перерасчет на 100 клеток. * – статистически значимое отличие в количестве клеток, содержащих рецептор к IL-13, между контрольными и экспериментальными препаратами. ^ – статистически значимое отличие в количестве клеток, содержащих рецептор к IL-13 между экспериментальными препаратами бронхов с ганглиями и бронхов без ганглиев.

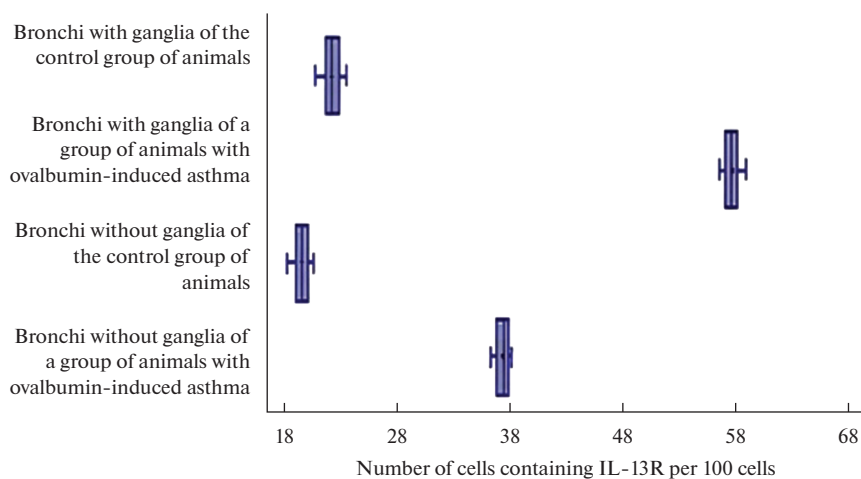


Рис. 4. Разброс данных, отражающих количество IL-13R-содержащих клеток в бронхах контрольной группы животных и группы животных с овальбумин-индуцированной астмой. По оси абсцисс обозначено количество клеток, содержащих IL-13R в перерасчет на 100 клеток. По оси ординат обозначены препараты контрольной группы животных и группы животных с овальбумин-индуцированной астмой.

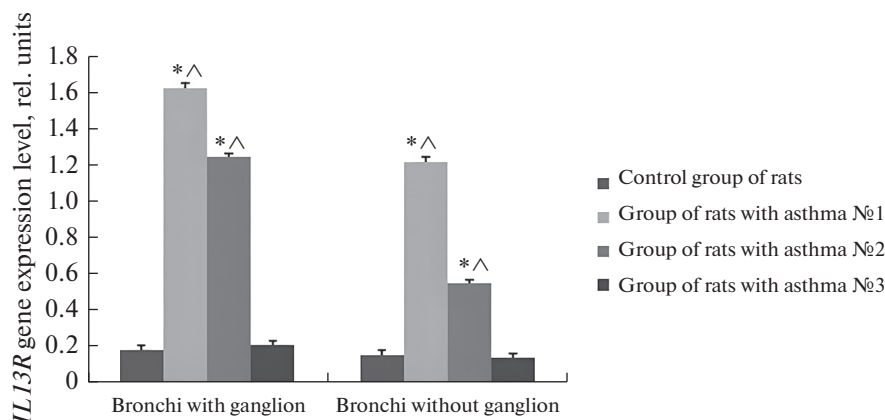


Рис. 5. Уровень экспрессии гена *IL13R* в препаратах бронхов контрольных крыс и крыс с овальбумин-индуцированной бронхиальной астмой. * – статистически значимое отличие в уровне экспрессии гена *IL13R* между контрольными и экспериментальными препаратами. ^ – статистически значимое отличие в уровне экспрессии гена *IL13R* между экспериментальными препаратами бронхов с ганглиями и бронхов без ганглиев.

17-й день после последней ингаляции и равнялась 0.2 отн. ед. (группа крыс с астмой №3) ($m = 0.05$).

В препаратах бронхов без ганглиев по истечению 72 ч экспрессия увеличилась на 1.1 отн. ед. (группа крыс с астмой № 1) ($m = 0.03$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$), а по истечению 10 дней – на 0.4 отн. ед. (группа крыс с астмой № 2) ($m = 0.02$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$). К исходным значениям экспрессия генов IL-13R возвращалась на 17-й день (группа крыс с астмой № 3) ($m = 0.04$). Различия между препаратами бронхов с ганглиями и без них для групп крыс с астмой №1 и № 2 статистически значимы ($F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$) (рис. 5 и 6).

Группа экспериментальных животных с астмой, получавшая кромогликат натрия, продемонстрировала более низкие уровни экспрессии гена IL-13R по сравнению с группой крыс с астмой без обработки кромогликатом натрия. В препаратах бронхов с ганглиями у животных группы № 1, получавших кромогликат натрия, экспрессия гена *IL13R* была ниже на 0.2 отн. ед. ($m = 0.03$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$) по сравнению с группой крыс, не получавших кромогликат натрия. В группе животных № 2 это различие составляло 0.1 отн. ед. ($m = 0.04$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$) (рис. 7 и 8).

В препаратах без ганглиев разница между получавшими и не получавшими кромогликат животными по истечению первых трех суток составила 0.2 отн. ед. (группа № 1) ($m = 0.02$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$), по истечению 10 суток (группа № 2) – также 0.2 отн.ед. ($m = 0.03$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$) (рис. 9 и 10).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании была использована максимально выраженная и устойчивая модель астмы. Это связано с применяемой в исследовании методикой. Ингаляции овальбумином осуществляли в течение 30 мин, это определило возможность максимально равномерного оседания частиц овальбумина (исходя из принципа диффузии газа и размера частиц, растворенных в нем) на поверхности

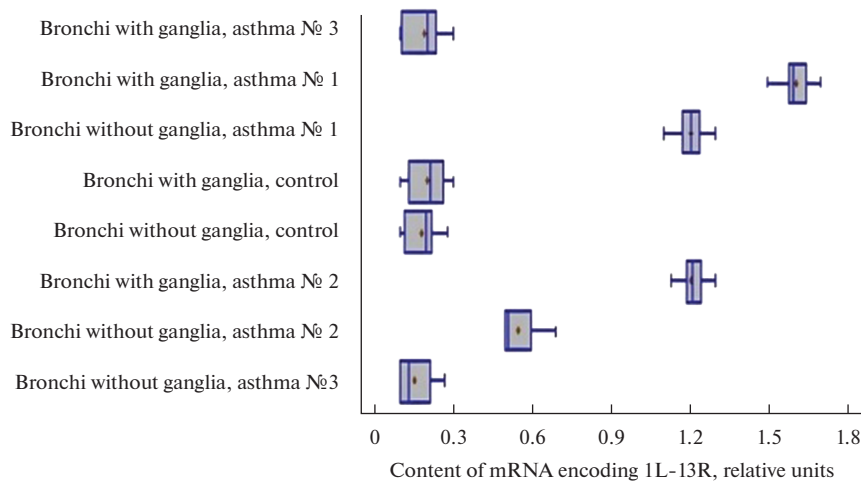


Рис. 6. Разброс данных, отражающих уровни экспрессии гена *IL13R* в бронхах контрольной группы животных и группы животных с овальбумин-индуцированной астмой. По оси абсцисс обозначено содержание мРНК, кодирующей IL-13R (в отн. ед.). По оси ординат обозначены препараты контрольной группы животных и группы животных с овальбумин-индуцированной астмой.

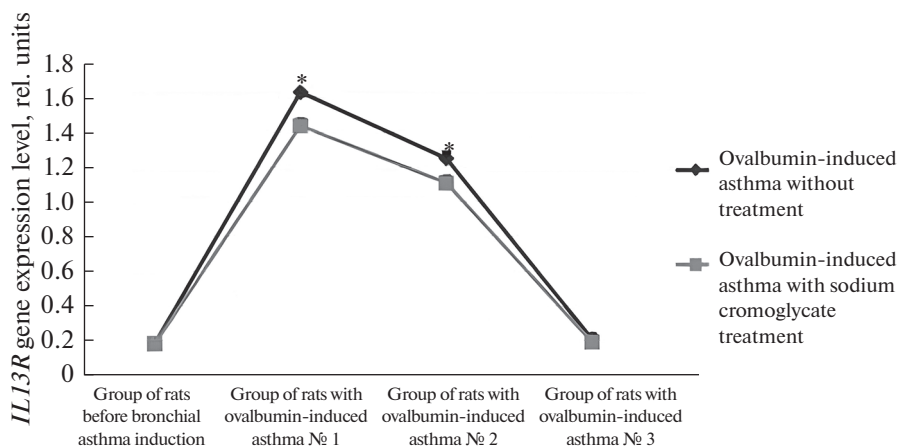


Рис. 7. Уровень экспрессии гена *IL13R* в препаратах бронхов с ганглиями контрольных крыс, крыс с астмой и крыс с астмой после лечения кромогликатом натрия. * – статистически значимое отличие в уровне экспрессии гена *IL13R* между животными с астмой без лечения и животными с лечением кромогликатом натрия.

респираторного тракта. Продолжительность ингаляции по времени определила возможность равномерного распределения газовой смеси овальбумина по всему респираторному дереву. Также овальбумин дополнительно вводился подкожно и внутрибрюшинно, что является важным фактором, обуславливающим генерализацию аллергического процесса в организме. Для данного исследования важным было достижение именно максимально выраженной устойчивой аллергии. Поэтому

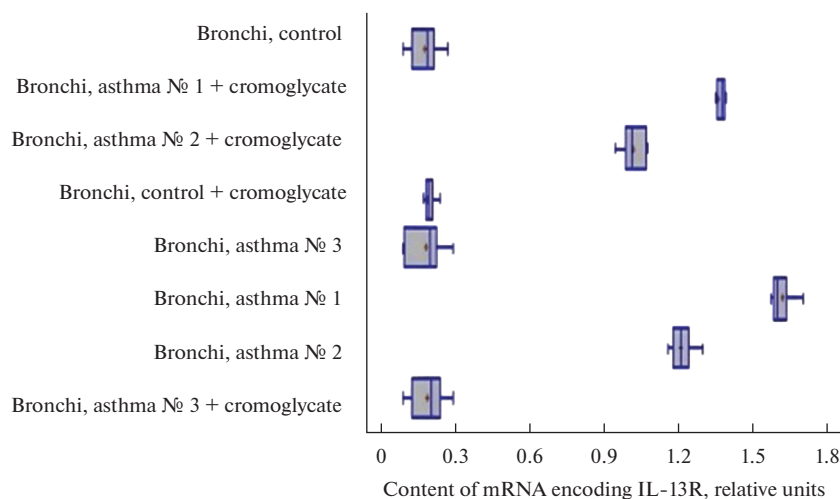


Рис. 8. Разброс данных, отражающих уровни экспрессии гена *IL13R* в бронхах с ганглиями контрольных крыс, крыс с астмой и крыс с астмой после введения кромогликата натрия. По оси абсцисс обозначено содержание мРНК, кодирующей IL-13R (в отн. ед.). По оси ординат обозначены препараты контрольной группы животных и группы животных с овальбумин-индуцированной астмой.

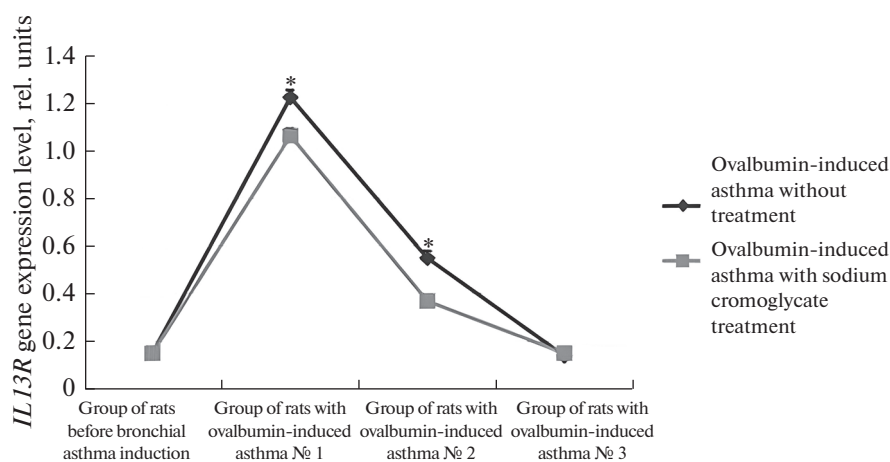


Рис. 9. Уровень экспрессии гена *IL13R* в препаратах бронхов без ганглиев контрольных крыс, крыс с астмой и крыс с астмой после лечения кромогликатом натрия. * – статистически значимое отличие в уровне экспрессии гена *IL13R* между животными с астмой без лечения и животными с лечением кромогликатом натрия.

можно предположить, что максимально возможный эффект действия овальбумина был достигнут, а лабораторные условия по оседанию овальбумина были схожими для всех исследуемых образцов респираторного тракта. Таким образом, дальнейшее обсуждение экспрессии гена *IL13R* и количества клеток, содержащих рецептор IL-13R, будет рассмотрено для модели астмы, характеризующейся выраженными проявлениями.

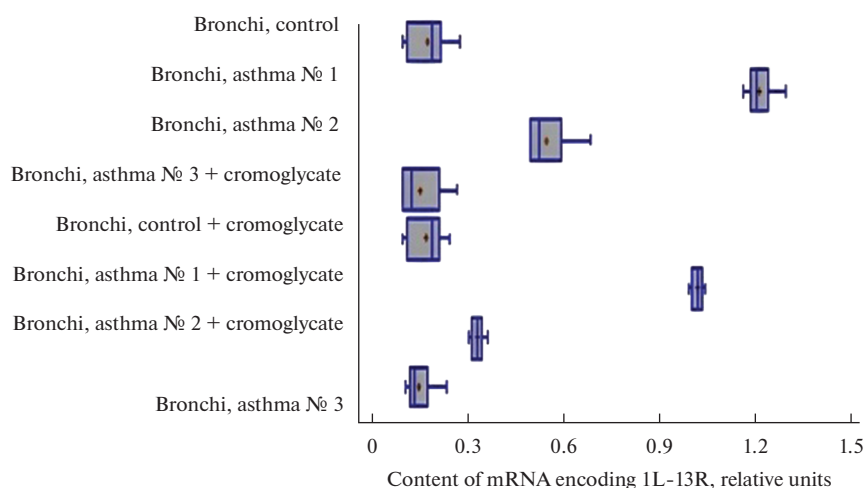


Рис. 10. Разброс данных, отражающих уровни экспрессии гена *IL13R* в бронхах без ганглиев контрольных крыс, крыс с астмой и крыс с астмой после введения кромогликата натрия. По оси абсцисс обозначено содержание мРНК, кодирующей IL-13R (в отн. ед.). По оси ординат обозначены препараты контрольной группы животных и группы животных с овальбумин-индуцированной астмой.

Экспрессия гена *IL13R* возрастала в препаратах бронхов крыс с овальбумин-индуцированной астмой по сравнению с контрольными животными. Максимальный уровень экспрессии был в препаратах с ганглиями группы животных № 1 (72 ч после последней ингаляции овальбумином). Затем экспрессия генов постепенно снижалась, и через 10 дней после последней ингаляции овальбумином содержание мРНК уменьшилось на 23.3% в препаратах бронхов с ганглиями и на 54.9% в препаратах бронхов без ганглиев.

Можно предположить, что присутствие интрамурального метасимпатического ганглия оказывает влияние на степень экспрессии гена *IL13R*. Это можно подтвердить данными Vochner о способности влияния цитокина IL-13 на сенсорные нейроны [29], а так же способностью нейронов мыши и человека экспрессировать IL-13Ra1 и IL-4Ra [30].

Влияние ганглия прослеживается как на начальных этапах патогенеза аллергической астмы, так и на более поздних сроках (группа животных № 2, забор биоматериала 10 дней спустя последней ингаляции овальбумином). Полученные результаты можно объяснить участием нервных структур в нейрогенном воспалении в патогенезе астмы. Снижение экспрессии мРНК до значений, сопоставимых с контрольными, наблюдалось в группе животных № 3, у которых взятие биологического материала производилось на 17-й день после последней ингаляции овальбумином.

Воздействие кромогликатом натрия приводило к снижению экспрессии гена *IL13R*. По истечению 72 ч после последней ингаляции овальбумином в образцах бронхов с ганглиями, полученных от крыс, обработанных кромогликатом натрия, содержание мРНК снизилось на 11.7% по сравнению с аналогичными препаратами, полученными от крыс, не получавших кромогликат. В группе животных, у которых биологический материал брался по истечению 10 суток, также наблюдалась разница в экспрессии между препаратами. В препаратах крыс, получавших кромогликат натрия, уровень экспрессии был на 11.2% ниже, чем в бронхах крыс, не прошедших обработку кромогликатом.

В бронхах без ганглиев также наблюдался эффект кромогликата натрия. В группе крыс, эвтаназия которых производилась 72 ч спустя после последней ингаляции овальбумином, содержание мРНК на 13.1% было меньше, чем у тех крыс, которым вводили кромогликат натрия. В группе крыс, эвтаназия которых производилась спустя 10 суток после последней ингаляции овальбумином, воздействие кромогликата натрия приводило к снижению экспрессии исследуемого гена на 32.7%.

Таким образом, в бронхах с ганглиями и без них кромогликат натрия оказывал подавляющий эффект на экспрессию гена *IL13R*. Эффект препарата направлен на стабилизацию мембран тучных клеток и предотвращение тучно-клеточной дегрануляции с высвобождением медиаторов аллергии, лейкотриенов и цитокинов. Высвобождение этих веществ в организме индуцирует аллергическую реакцию в патогенез астмы и определяет один из основных ее этапов. IL-13 — один из высвобождаемых тучными клетками цитокинов, и вероятнее всего, появление его в тканях способствует индукции экспрессии адекватных ему рецепторов — IL-13R. Косвенно этот результат подтверждается работой Трулева и соавт. [31], которая свидетельствует о высвобождении IL-13 тучными клетками при их дегрануляции и роли тучно-клеточных продуктов в воспалении.

В нашем исследовании кромогликат натрия поступал в организм животных довольно поздно (после фактической индукции аллергии) по сравнению с рекомендациями по его применению (рекомендации предполагают стабилизацию мембран лаброцитов преимущественно до развития аллергической реакции). Тем не менее, даже при позднем введении кромогликата натрия в организм крыс, содержание мРНК в бронхах животных снижалось по сравнению с животными, не получавшими обработку тучно-клеточным стабилизатором (различие было статистически значимым). Такой результат может свидетельствовать о продолжительности тучно-клеточной дегрануляции на поздних этапах модели индуцирования аллергической астмы, а также о роли тучно-клеточных продуктов (в первую очередь IL-13) в индукции экспрессии генов IL-13R.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации. Все эксперименты были проведены в соответствии с правилами проведения лабораторных исследований (ГОСТ 33215-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур от 01.07.2016”) [24]. Тема исследования была утверждена на заседании Комитета по медицинской этике при Министерстве здравоохранения Республики Карелия и Петрозаводском государственном университете (протокол № 46 от 23.09.2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено на внебюджетные средства Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Петрозаводский государственный университет”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Л.Е.Б., О.Е.С., В.М.К., сбор данных – О.Е.С., Л.Е.Б., обработка данных – Л.Е.Б., О.Е.С., В.М.К., написание и редактирование статьи – Л.Е.Б., О.Е.С., редактирование статьи – П.М.М.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nikolskii AA, Shilovskiy IP, Barvinskaya ED, Korneev AV, Sundukova MS, Khaitov MR* (2021) Role of STAT3 Transcription Factor in Pathogenesis of Bronchial Asthma. *Biochemistry (Mosc)* 86(11): 1489–1501.
<https://doi.org/10.1134/S0006297921110122>
2. *Duan W, Aguinaldo AM, Leung BP, Vlahos CJ, Wong WS* (2005) An anti-inflammatory role for a phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002 in a mouse asthma model. *Int Immunopharmacol J* 5: 495–502.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.10.015>
3. *Marone G, Granata F, Pucino V, Pecoraro A, Heffler E, Loffredo S, Scadding GW, Varricchi G* (2019) The Intriguing Role of Interleukin 13 in the Pathophysiology of Asthma. *Front Pharmacol* 10: 1387.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01387>
4. *Eum SY, Maghni K, Tolloczko B, Eidelman DH, Martin JG* (2005) IL-13 may mediate allergen-induced hyperresponsiveness independently of IL-5 or eotaxin by effects on airway smooth muscle. *Am Physiol Lung Cell Mol Physiol* J 288: 576–584.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00380.2003>
5. *Harb H, Chatila Talal A* (2019) Mechanisms of Dupilumab. *Clin Exp Allergy* 50(1): 5–14.
<https://doi.org/10.1111/cea.13491>
6. *Moran A, Pavord ID* (2020) Anti-IL-4/IL-13 for the treatment of asthma: the story so far. *Expert Opin Biol Ther* 20(3): 283–294.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1714027>
7. *Hammad H, Lambrecht BN* (2021) The basic immunology of asthma. *Cell Epub* 184(6): 1469–1485.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.016>
8. *Lentsch AB, Czermak BJ, Jordan JA, Ward PA* (1999) Regulation of acute lung injury by endogenous IL-13. *J Immunol* 162: 1071–1076. PMID: 9916735
9. *Amin K, Janson C, Boman G, Venge P* (2005) The extracellular deposition of mast cell products is increased in hypertrophic airways smooth muscles in allergic asthma but not in nonallergic asthma. *Allergy J* 60: 1241–1247.
<https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00823.x>
10. *Munitz A, Brandt EB, Mingler M, Finkelman FD, Rothenberg ME* (2008) Different roles of IL-13 and IL-4 via IL-13 alpha1 receptor and L-4 type II receptor in the pathogenesis of asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7240–7245.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0802465105>
11. *Hershey GK* (2003) IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol* 111: 677–690.
<https://doi.org/10.1067/mai.2003.1333>
12. *Bhattacharjee A, Shukla M, Yakubenko VP, Mulya A, Kundu S, Cathcart MK* (2013) IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radic Biol Med* 54: 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.553>
13. *Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z* (2002) Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med* 8: 885–889.
<https://doi.org/10.1038/nm734>
14. *Cao H, Zhang J, Liu H, Wan L, Zhang H, Huang Q* (2016) IL-13/STAT6 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *Oncotarget* 7: 61183–61198.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11282>
15. *Wang IM, Lin H, Goldman SJ, Kobayashi M* (2004) STAT-1 is activated by IL-4 and IL-13 in multiple cell types. *Mol Immunol* 41: 873–884.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.04.027>
16. *Pham TH, Bak Y, Oh JW, Hong J, Lee S, Hong JT* (2019) Inhibition of IL-13 and IL-13Ralpha2 Expression by IL-32theta in Human Monocytic Cells Requires PKCdelta and STAT3. *Assoc Int J Mol Sci* 20: 19–49.
<https://doi.org/10.3390/ijms20081949>
17. *Chen W, Sivaprasad U, Tabata Y, Gibson AM, Stier MT, Finkelman FD* (2009) IL-13R alpha 2 membrane and soluble isoforms differ in humans and mice. *J Immunol* 183: 7870–7876.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901028>

18. *Chen W, Sivaprasad U, Gibson AM, Erickson MB, Cunningham CM, Bass SA* (2013) IL-13 receptor alpha2 contributes to development of experimental allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 132: 951–958.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.016>
19. *Ingram JL, Kraft M* (2012) IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol* 130: 829–842.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.06.034>
20. *Lupardus PJ, Birnbaum ME, Garcia KC* (2010) Molecular basis for hared cytokine recognition revealed in the structure of an unusually high affinity complex between IL-13 and IL-13Ralpha2. *Structure* 18: 332–342.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2010.01.003>
21. *Kasaian MT, Raible D, Marquette K, Cook TA, Zhou S, Tan XY* (2011) IL-13 antibodies influence IL-13 clearance in humans by modulating scavenger activity of IL-13Ralpha2. *J Immunol* 187: 561–569.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100467>
22. *Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A* (2006) IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* 12: 99–106.
<https://doi.org/10.1038/nm1332>
23. *Fujisawa T, Joshi B, Nakajima A, Puri RK* (2009) A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 69: 8678–8685.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2100>
24. ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур от 01.07.2016. [GOST 33215-2014 Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for equipping premises and organizing procedures dated 01.07.2016. (In Russ)].
25. *Close B, Banister K, Baumans V, Warwick C* (1997) Recommendations for euthanasia of experimental animals. Part 2 DGXT of the Eur Commission Lab Animals J 31: 1–32.
<https://doi.org/10.1258/002367797780600297>
26. *Masakazu Y, Osamu S, Kenji N, Tetsuji M, Koji S* (2006) Propofol Attenuates Ovalbumin-Induced Smooth Muscle Contraction of the Sensitized Rat Trachea: Inhibition of Serotonergic and Cholinergic Signaling. *Anesthesia & Analgesia J* 3: 594–600.
27. *Akin Yilmaz, Hacer Ilke Onen, Ebru Alp, Sevda Menevse* (2012) Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. *INTECH* 12: 229–254.
<https://doi.org/10.5772/37356>
28. *Masuda N, Mantani Y, Yoshitomi C, Yuasa H, Nishida M, Aral M, Kawano J, Yokoyama T, Hoshi N, Kitagawa H* (2018) Immunohistochemical study on the secretory host defense system with lysozyme and secretory phospholipase A2 throughout rat respiratory tract. *J Vet Med Sci* 80(2): 323–332.
<https://doi.org/10.1292/jvms.17-0503>
29. *Bochner BS, Klunk DA, Sterbinsky SA, Coffman RL, Schleimer RP* (1995) IL-13 selectively induces expression of the vascular cell adhesion molecule-1 in human endothelial cells. *J Immunol* 154: 799–803.
30. *Oetjen LK, Mack MR, Feng J, Whelan TM, Niu H, Guo CJ* (2017) Sensory neurons co-opt classical immune signaling pathways to mediate chronic pruritus. *Cell* 171: 217–228.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.006>
31. *Трулев АС, Кудрявцев ИВ, Назаров ПГ* (2012) Факторы острой фазы воспаления как модуляторы взаимодействия тучных клеток и фибробластов. Бюл ВСНЦ СО РАМН 85(3): 319–322. [Trulev AS, Kudryavtsev IV, Nazarov PG (2012) Factors of the acute phase of inflammation as modulators of the interaction between mast cells and fibroblasts. *Bull VSNC SO RAMS* 85(3): 319–322. (In Russ)].

Research of the Expression of IL-13 Receptors and IL-13R Genes in the Bronch of Rats with Ovalbumin-Induced Bronchial Asthma

L. E. Blazhevich^{a, *}, O. E. Smirnova^a, V. M. Kirilina^a, and P. M. Maslyukov^b

^aPetrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

^bYaroslavl State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Yaroslavl, Russia

*e-mail: lyu15041988@yandex.ru

This article presents the results of studies of the levels of expression of the *IL13R* gene and the levels of expression of the molecular IL13R in the bronchi of control rats and rats with ovalbumin-induced asthma. The choice of these receptors is due to the great

importance of these structures in the pathogenesis of allergic bronchial asthma. Biological materials of 64 Wistar rats were studied using real-time PCR and immunohistochemical methods. As a result of the studies, it was found that under conditions of asthma development in the tissues of the bronchi of rats, a pronounced expression of the *IL13R* genes, a significant expression of the molecular receptor for interleukin-13, occurs. In bronchi with an intramural ganglion (bifurcation zone), the level of *IL13R* gene expression and the level of expression of the IL13R molecular receptor were significantly higher than in tracheal samples without ganglia. Sodium cromoglycate, administered to rats 5 hours after the last inhalation of ovalbumin, led to a decrease in the mRNA content in the bronchi of animals compared to animals that did not receive mast cell stabilizer treatment.

Keywords: interleukin-13, model of ovalbumin-induced bronchial asthma, intramural ganglion, sodium cromoglycate