

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов

ХИМИЧЕСКИЙ ШАПЕРОН TUDCA ИЗБИРАТЕЛЬНО ИНГИБИРУЕТ ПРОДУКЦИЮ АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE В НИЗКОДОЗОВОЙ МОДЕЛИ АЛЛЕРГИИ

Д.Б. Чудаков*, О.А. Шустова, О.Д. Коцарева, А.А. Генералов,
М.С. Стрельцова, Ю.Д. Вавилова, Г.В. Фаттахова

Государственный научный центр Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; * эл. почта: boris-chudakov@yandex.ru

Клеточный ответ на стресс эндоплазматического ретикула (ЭПР) сопровождается созреванием плазматических клеток и является одним из триггеров и кофакторов локальной воспалительной реакции. В качестве средств терапии связанных со стрессом ЭПР патологий предлагаются химические шапероны — низкомолекулярные вещества, устраняющие патологический стресс ЭПР. Целью работы была оценка эффекта и механизмов влияния химических шаперонов на гуморальный ответ в низкодозовой модели аллергии. Аллергический иммунный ответ индуцировали у мышей линии BALB/c путём многократного введения овальбумина в дозе 100 нг в течение 6 недель. Части животных вместе с антигеном вводили химические шапероны TUDCA (тауроурсодезоксихолевая кислота) и 4-РВА (4-фенилбутират). Введение TUDCA, но не 4-РВА, подавляло продукцию специфического IgE (уменьшение титров в 2,5 раза). Ни один из химических шаперонов не влиял на продукцию специфических IgG₁. Эффект TUDCA был связан с подавлением переключения на синтез IgE в региональных лимфатических узлах. Данное явление было связано с подавлением экспрессии генов цитокинов 2 типа иммунного ответа, особенно *Il4* и *Il9*, что в свою очередь могло быть вызвано подавлением высвобождения IL-33. Кроме того, TUDCA достоверно подавляла экспрессию цитокина APRIL, и в меньшей степени — BAFF. Таким образом, ингибирование TUDCA продукции специфического IgE обусловлено подавлением высвобождения IL-33 и уменьшением продукции цитокинов 2 типа иммунного ответа, а также подавлением экспрессии цитокинов APRIL и BAFF.

Ключевые слова: химический шаперон; тауроурсодезоксиколат; IgE; интерлейкин 4; интерлейкин 33; APRIL; BAFF

DOI: 10.18097/PBMC20247001005

ВВЕДЕНИЕ

В связи с неуклонным ростом частоты встречаемости заболеваний, обусловленных синтезом иммуноглобулинов класса Е (IgE) к безвредным аллергенам, усилия многих исследовательских групп направлены на поиск потенциальных средств этиотропной терапии, подавляющих формирование IgE-продуцирующих В-лимфоцитов и плазматических клеток [1]. Одной из наиболее перспективных групп мишеней для новых средств терапии являются различные сигнальные пути и молекулярные механизмы, активируемые при стрессе эндоплазматического ретикула (ЭПР), и сам стресс ЭПР как таковой. Причина этого, во-первых, в том, что избирательная активация части сигнальных путей, связанных со стрессом ЭПР, представляет

собой обязательную часть процесса дифференциации В-лимфоцитов в плазматические клетки [2]. Обычно активация стресса ЭПР происходит при накоплении в ЭПР клеток неправильно или не полностью свёрнутых белков. При этом активируются три основных сигнальных пути — сигнальный путь, связанный с IRE1 α эндонуклеазой, PERK-киназой и транскрипционным фактором ATF6 α [3]. Однако в В-лимфоцитах при их дифференцировке в плазматические клетки активируются в основном IRE1 α -XBP1- и ATF6 α -зависимые молекулярные механизмы, но не PERK-eIF2 α -ATF4 сигналинг [2–4]. Тем не менее, результаты недавних исследований позволяют предположить, что формирование локальной продукции IgE может быть связано также с активацией PERK-CHOP-зависимого сигналинга [5].

Принятые сокращения: 4-РВА — 4-phenylbutyric acid (4-фенилбутировая кислота); AICDA — activation induced cytidine deaminase (индуцируемая активацией цитидиндезаминаза); APRIL — A proliferation inducing ligand (индуцирующий пролиферацию лиганд); ATF6 α — activating transcription factor 6 alpha (фактор 6 альфа, активирующий транскрипцию); BAFF — B-cell activating factor of proliferation (фактор пролиферации, активирующий В-лимфоциты); BHQ-1 — black hole quencher 1 (тушитель флуоресценции “чёрная дыра 1”); CHOP — C/EBP homologous protein (белок, гомологичный белку C/EBP); Ig — иммуноглобулин; IL — интерлейкин; ILC2 — innate type 2 lymphoid cells (врождённые лимфоидные клетки 2-го типа); IRE1 α — inositol requiring enzyme 1 alpha (инозитол-требующий фермент 1 альфа); PERK — protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (киназа эндоплазматического ретикула, родственная протеинкиназе R); FAM — fluorescein amidite (флуоресцеин амидит); OVA — ovalbumin (овальбумин); PBS — phosphate buffer saline (фосфатно-солевой буфер); TACI — transmembrane activator and CAML interactor (трансмембранный активатор, взаимодействующий с CAML); TSLP — thymic stromal lymphopoietin (тимический стромальный лимфопоэтин); TUDCA — taurooursodeoxycholic acid (тауроурсодезоксихолевая кислота); XBP1 — X-box binding protein 1 (связывающий X-бокс белок 1); ИФА — иммуноферментный анализ; ПХ — пероксидаза хрена; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ФНО- α — фактор некроза опухоли альфа; ЭПР — эндоплазматический ретикулум.

Вторая причина, по которой сигнальные пути стресса ЭПР представляют собой привлекательную мишень для терапии IgE-зависимых патологий, состоит в том, что они напрямую связаны с регуляцией локального аллергического воспаления, например при астме [2]. Действительно, стресс ЭПР индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов, например IL-1 β и ФНО- α [6]. Под действием стресса ЭПР дифференцировка Т-хелперов 0 смещается в сторону Т-хелперов 2 [7].

Одними из наиболее эффективных ингибиторов стресса ЭПР являются так называемые “химические шапероны”. Это низкомолекулярные вещества, предотвращающие дефолдирование белков и образование их агрегатов. Различают два основных типа подобных веществ — осмолиты (такие как глицерин, метилрезорцины, таурин и триметиламино-N-оксид) и гидрофобные шапероны (такие как 4-фенилбутират и тауроурсодезоксихолевая кислота) [8, 9].

Целью настоящей работы была оценка эффекта введения химических шаперонов тауроурсодезоксихолевой кислоты (TUDCA) и 4-фенилбутирата (4-PBA) на синтез аллерген-специфических антител и оценка потенциальных механизмов такого влияния на примере TUDCA.

МЕТОДИКА

Животные

Мыши линии BALB/c (самки в возрасте 6–7 недель) были приобретены в Научном центре биомедицинских технологий (“Андреевка”, Россия). Животных содержали в клетках с использованием опилок в качестве подстилки и доступом к воде и корму *ad libitum* при 12-часовом цикле свет-темнота.

Иммунизация и забор образцов

Иммунизацию животных производили по аналогии с нашей предыдущей работой [10] с той разницей, что период иммунизации составил 6 недель вместо 4. Это было сделано для того, чтобы оценить эффект вводимых с антигеном химических шаперонов в течение более длительного периода времени. Всего в эксперименте участвовало 34 мыши. Животным 3 раза в неделю в первые две недели и 2 раза в неделю в каждую из последующих недель вводили OVA в дозе 100 нг/мышь-инъекция. Положительным контролем служили животные, которым вводили антиген в отсутствие химических шаперонов ($n=8$). В качестве контроля использовали интактных животных ($n=8$), а также животных, иммунизированных физраствором ($n=6$). Части животных вместе с антигеном вводили 170 мг/кг TUDCA или 70 мг/кг 4-PBA ($n=6$ в каждой из этих двух групп).

По окончании иммунизации у мышей производили забор крови из подглазничного синуса для оценки титров специфических сывороточных антител и концентрации цитокинов, а также забор образцов ткани лёгких и клеток региональных лимфатических узлов для измерения экспрессии генов, как было описано в работе [11].

Иммуноферментный анализ

Анализ продукции специфических IgE и IgG₁ осуществлялся, как описано в [11]. Для выявления специфических IgE и IgG₁ использовали конъюгаты к IgE мыши, меченые пероксидазой хрена (ПХ) (клон 23G3, “Abcam”, Великобритания), и к IgG₁ мыши, меченые биотином (клон RMG1-1, “BioLegend”, США). В последнем случае в качестве вторичного конъюгата использовали конъюгат ПХ со стрептавидином (“BioLegend”).

Анализ концентрации IL-33 и TSLP проводили следующим образом. В лунки 96-луночных планшетов наносили раствор немеченых коммерческих антител к IL-33 (клон Poly5165) или TSLP (клон 28F12) в PBS в разведении 1:1000 и инкубировали в течение 18 ч при 4°C. После отмывки наносили образцы сывороток в блокирующем буфере (1% BCA в PBS) в разведении 1:2 и инкубировали в течение 24 ч при 4°C. После отмывки наносили биотинилированные антитела к IL-33 (клон Poly5165), TSLP (клон 65B12) в разведении 1:2000. Использовали следующие антитела: меченые биотином антитела к IL-1 α мыши; меченые биотином антитела к TSLP. Все коммерческие антитела для анализа цитокинов были получены от фирмы “BioLegend”. Для получения калибровочной кривой использовали стандартные образцы цитокинов той же фирмы. Проявление реакции осуществляли, как в случае детекции специфических антител.

Оценка уровня экспрессии генов

ПЦР в реальном времени проводили, как описано ранее, с использованием набора BioMaster HS-qPCR (“BioLabMix”, Россия), но с применением флуоресцентных зондов для детекции продуктов [10]. Выделение мРНК проводили с помощью реагента ExtractRNA согласно рекомендациям производителя. Последующий синтез первой цепи кДНК осуществляли с помощью набора OT M-MuLV-RH (“BioLabMix”) согласно инструкции производителя. Реакцию амплификации проводили в объёме 20 мкл в лунках 96-луночных планшетов на приборе CFX Connect (“BioRad”) по следующей схеме: первичная денатурация 5 мин при 95°C, 50 циклов денатурации (5 с, 95°C), совмещённой с отжигом-амплификацией (20 с, 64°C). Последовательность используемых прямых (F), обратных праймеров (R) и флуоресцентных зондов (Z) (последние содержали 6-FAM на 5'-конце в качестве флуорофора и BHQ-1 на 3'-конце в качестве гасителя) приведены в таблице. Экспрессию генов нормировали одновременно на экспрессию двух генов домашнего хозяйства — *Gapdh* и *Hprt*.

Статистика

Все результаты представлены в виде средних значений и соответствующих величин стандартного отклонения. Статистическую значимость различий между группами определяли с использованием теста ANOVA с поправкой на множественное сравнение по методу Sidak. Значения p по данному тесту, эквивалентные $p<0,05$ с поправкой на множественное сравнение, считали статистически достоверными.

Таблица. Последовательности используемых праймеров и зондов

| Ген | | Последовательность |
|-------------------|---|--|
| <i>Gapdh</i> | F | GGAGAGTGTTTCCTCGTCCC |
| | R | ACTGTGCCGTTGAATTTGCC |
| | Z | /6-FAM/-CGCCTGGTCACCAGGGCTGCCATTTGCAGT-/BHQ-1/ |
| <i>Hprt</i> | F | CAGTCCCAGCGTCGTGATTA |
| | R | TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA |
| | Z | /6-FAM/-TGGGAGGCCATCACATTGTGGCCCTCTGTGTG-/BHQ-1/ |
| <i>germline ε</i> | F | ACCTGGGATCAGACGATGGA |
| | R | TGCCCTCAGCTAAAAGTGGG |
| | Z | /6-FAM/-TCCAAGGCTGCTAAGGCCGGGGTTCCAC-/BHQ-1/ |
| <i>mIgE</i> | F | CAAGACCCAGGCCAGC |
| | R | AGCTCACACTGAGCAGGAAC |
| | Z | /6-FAM/-TATTGAAGAGGTGGAGGGCGAGGAGCTGGA /BHQ-1/ |
| <i>sIgE</i> | F | CAAGACCCAGGCCAGC |
| | R | CTGTCATCCACCTTCCCCAC |
| | Z | /6-FAM/-CAGCCCCGAGGTATATGTGTTCCACCAC-/BHQ-1/ |
| <i>Il4</i> | F | CCATATCCACGGATGCGACA |
| | R | AAGCACCTTGGAAGCCCTAC |
| | Z | /6-FAM/-CGGACGCCATGCACGGAGATGGATGTGCCA-/BHQ-1/ |
| <i>Il9</i> | F | TGCTACAGGGAGGGACTGTT |
| | R | TGGTCGGCTTTTCTGCCTTT |
| | Z | /6-FAM/-AGCCATGCAACCAGACCATGGCAGGCAACA-/BHQ-1/ |
| <i>Il13</i> | F | GTGTCTCTCCCTCTGACCCT |
| | R | TCTGGGTCCTGTAGATGGCA |
| | Z | /6-FAM/-GCCGCTGGCGGGTTCTGTGTAGCCCTGGAT-/BHQ-1/ |
| <i>Il33</i> | F | GGGCTCACTGCAGGAAAGTA |
| | R | TATTTTGCAAGGCGGGACCA |
| | Z | /6-FAM/-CCGGCAAAGTTCAGCAGCACCGCAGGCGAA-/BHQ-1/ |
| <i>Tslp</i> | F | GGGCTCACTGCAGGAAAGTA |
| | R | TATTTTGCAAGGCGGGACCA |
| | Z | /6-FAM/-CCGGCAAAGTTCAGCAGCACCGCAGGCGAA-/BHQ-1/ |
| <i>Tnfa</i> | F | TCTTCTCAAAATTCGAGTGACAAGC |
| | R | GATAGCAAATCGGCTGACGGT |
| | Z | /6-FAM/-GGCTGCCCGACTACGTGCTCCTCACCCAC-/BHQ-1/ |
| <i>April</i> | F | GGGGCGAAATCTCGGAGAAG |
| | R | GTTCCATGCGGAGAAAGGCT |
| | Z | /6-FAM/-GTGGGAGAGGCCTGGAGGCCAGGGAGACA-/BHQ-1/ |
| <i>Baff</i> | F | TGCCGCCATTCTCAACATGA |
| | R | GCAAAGATGGGGTCCGTGTA |
| | Z | /6-FAM/-TGCAGCTGATTGCAGACAGCGACACGCCGA-/BHQ-1/ |

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для того, чтобы выяснить влияние химических шаперонов на продукцию аллерген-специфических антител, мыши линии BALB/c были иммунизированы в течение 6 недель низкой (100 нг) дозой антигена овальбумина в область холки. Анализ продукции антител в сыворотках иммунных животных показал, что TUDCA достоверно снижает продукцию

аллерген-специфических антител класса IgE (рис. 1А), но не IgG₁ (рис. 1Б). Отмечено значительное ингибирование продукции аллерген-специфических IgE, характеризующееся снижением титров в 2,5 раза. В то же время введение 4-РВА не оказывало достоверный эффект на продукцию аллерген-специфических антител (рис. 1). В связи с этим в ходе дальнейшей работы решено было сфокусироваться на изучении механизмов эффекта TUDCA.

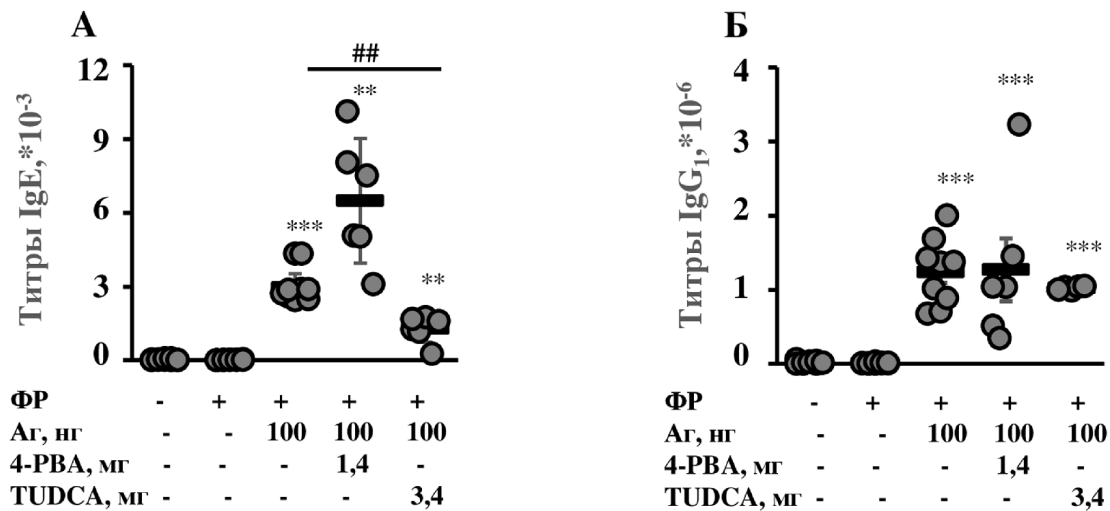


Рисунок 1. Химический шаперон TUDCA, но не 4-PBA, селективно ингибирует продукцию IgE, но не IgG₁. Мыши линии BALB/c были иммунизированы в течение 6 недель физиологическим раствором (ФР), антигеном OVA без химических шаперонов (Аг) и с дополнительным введением химических шаперонов 4-PBA (4-фенилбутирата) или TUDCA (тауроурседезоксихолиевой кислоты) в указанных дозах в область холки. В качестве дополнительного контроля использовали intactных животных. Содержание специфических антител класса IgE (А) и IgG₁ (Б) было измерено в сыворотках крови. */** – $p < 0,05/0,01$ достоверности разницы указанной группы в сравнении с группой intactных животных; ### – $p < 0,05/0,01$ достоверности разницы между группами животных, иммунизированных антигеном с введением химического шаперона и без него.

Для этого у иммунных мышей после забоя были взяты образцы ткани места иммунизации (подкожная жировая ткань области холки) и региональных лимфатических узлов, из которых выделили мРНК и проанализировали экспрессию различных генов и транскриптов методом ПЦР в реальном времени. Согласно полученным данным, на поздних стадиях антиген индуцировал экспрессию “зародышевых” транскриптов, являющихся маркерами запуска процесса переключения изотипов [12], в клетках региональных лимфатических узлов (рис. 2А-Г). Эти данные отличаются от полученных нами ранее [10], поскольку в настоящей работе продолжительность иммунизации была больше (6 недель вместо 4). TUDCA подавляла экспрессию данных транскриптов в региональных лимфатических узлах (рис. 2А-Г). Кроме того, в региональных лимфатических узлах, но не в ткани холки, под действием антигена ожидаемо увеличивалась экспрессия секреторной изоформы IgE, и эта экспрессия подавлялась TUDCA (рис. 2Ж,З). Напротив, ингибирующий эффект TUDCA в отношении мембранной изоформы IgE был достоверен в ткани холки (рис. 2Д), но не в лимфатических узлах (рис. 2Е). Введение антигена не оказывало достоверного эффекта на экспрессию мембранной изоформы IgE, вероятно, в связи с тем, что образующиеся под действием антигена IgE-продуценты быстро дифференцировались в IgE-продуцирующие плазматические клетки. Тем не менее, TUDCA достоверно подавляла базовую экспрессию мембранного IgE в ткани холки (рис. 2Д,Е).

Далее нами была измерена экспрессия генов цитокинов 2 типа иммунного ответа — *Il4*, *Il9* и *Il13*, а также экспрессия генов про-аллергических

“тканевых” цитокинов *Il33* и *Tslp*, имеющих большое значение в индукции 2 типа иммунного ответа [13]. При иммунизации аллергенами, нарушении целостности клеток и при клеточном стрессе *IL-33* и *TSLP* высвобождаются во внеклеточное пространство [14]. Нами была также измерена концентрация *IL-33* и *TSLP* в сыворотках крови иммунных мышей. Полученные данные указывают на индукцию экспрессии *Il4* в региональных лимфатических узлах и *Il13* в жировой ткани холки под действием антигена (рис. 3А,Б,Д,Е). TUDCA повышала экспрессию *Il4* в ткани области холки, но ингибировала индукцию его экспрессии в региональных лимфоузлах — месте, где на поздних стадиях происходило переключение изотипов (рис. 3А,Б). Под действием TUDCA подавлялась индукция экспрессии *Il13* в ткани области холки, но не в региональных лимфоузлах, при сравнении группы животных, иммунизированных антигеном в присутствии TUDCA, и группы животных, иммунизированных только антигеном (рис. 4Д,Е). Кроме того, химический шаперон снижал базовую экспрессию *Il9* как в региональных лимфоузлах, так и в ткани холки (рис. 3В,Г). Экспрессия тканевых цитокинов достоверно индуцировалась под действием антигена в ткани области холки, но не в региональных лимфоузлах (рис. 3Ж-К). TUDCA не оказывала статистически значимого эффекта на экспрессию *Il33* в ткани холки при сравнении групп животных, иммунизированных антигеном в присутствии химического шаперона и в его отсутствии. (рис. 3Ж). Однако была отмечена достоверная разница в экспрессии *Il33* между группой животных, иммунизированных одним антигеном, и intactными животными. Достоверной разницы экспрессии *Il33* между группой животных,

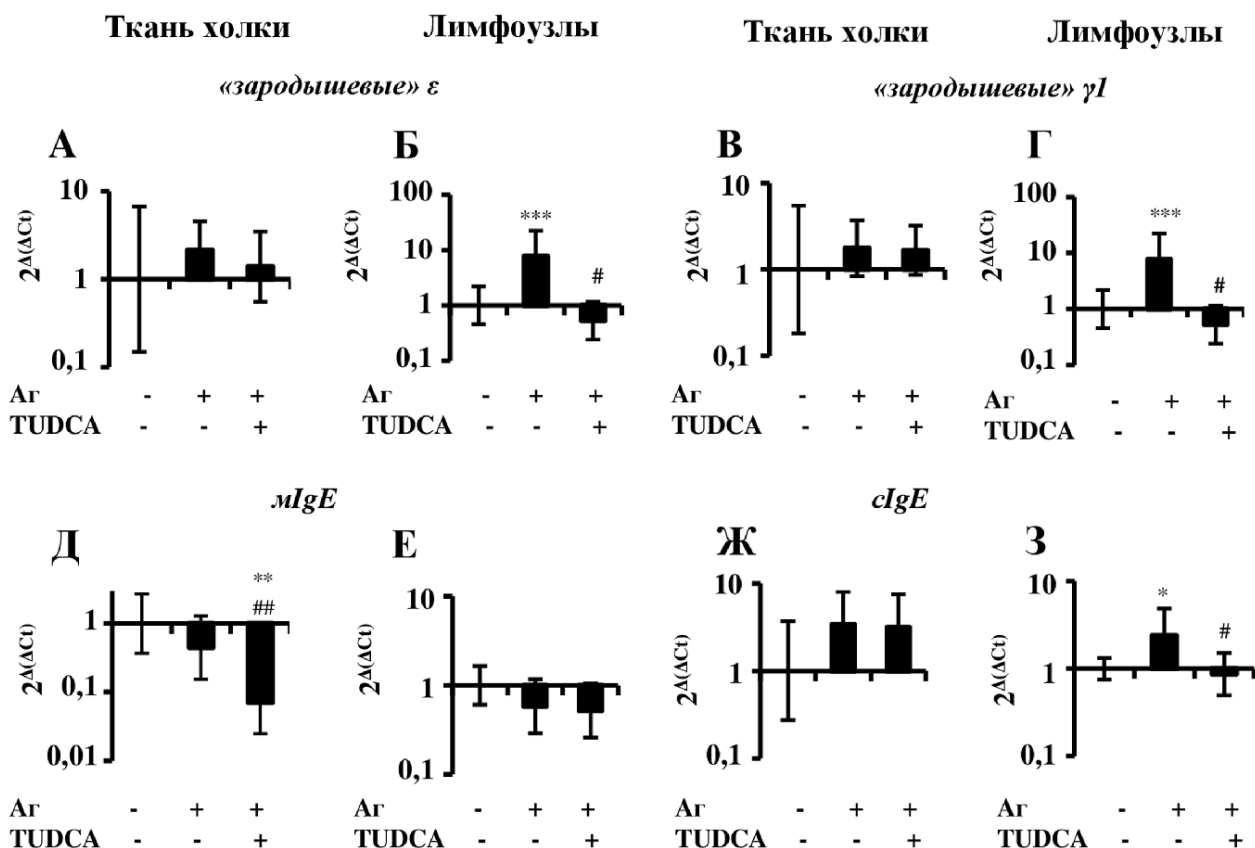


Рисунок 2. TUDCA ингибировала продукцию специфического IgE, оказывая влияние на переключение изотипов во вторичных лимфоидных органах, но не в ткани места иммунизации. Мыши линии BALB/c были иммунизированы физиологическим раствором (контроль), антигеном OVA без TUDCA или антигеном в присутствии TUDCA, в указанных дозах в течение 6 недель в область холки. Экспрессия «зародышевых» ε (А, Б), «зародышевых» γ1 (В, Г), мембранных (Д, Е) и секреторных IgE (Ж, З), в ткани места иммунизации (А, В, Д, Ж) и региональных лимфатических узлах (Б, Г, Е, З). */** – $p < 0,05/0,01$ достоверности разницы указанной группы в сравнении с группой интактных животных; ##/### – $p < 0,05/0,01$ достоверности разницы между группами животных, иммунизированных антигеном с введением химического шаперона и без него.

иммунизированных в присутствии TUDCA, и группой интактных животных не наблюдали. Это указывает на наличие небольшого эффекта подавления. Действительно, результаты ИФА по определению концентрации IL-33 достоверно показали, что его высвобождение блокируется под действием TUDCA (рис. 3Л). Эти результаты показывают, что эффект TUDCA на гуморальный иммунный ответ мог быть связан с блокированием высвобождения IL-33 и последующим подавлением экспрессии IL-4 и IL-9 в региональных лимфоузлах. Хотя результаты ПЦР неожиданно показали индукцию экспрессии гена *Tslp* под действием TUDCA в региональных лимфатических узлах (рис. 3К), такой индукции оказалось недостаточно для достоверного подъема концентрации TSLP в крови, тем не менее ингибирования высвобождения TSLP также не наблюдали (рис. 3М).

Цитокины семейства ФНО способны предоставлять В-лимфоцитам сигнал, заменяющий сигнал от CD40 рецептора при индукции переключения изотипов [12], и поэтому следующей задачей работы была проверка их экспрессии. Введение антигена индуцировало экспрессию генов *Tnfa* и *April*,

но не *Baff*, в ткани области холки, но не в клетках региональных лимфоузлов (рис. 4). Введение TUDCA достоверно блокировало индукцию *April* в ткани холки и снижало его базовую экспрессию в клетках региональных лимфоузлов (рис. 4В,Г). Под действием TUDCA происходило снижение экспрессии *Baff* в клетках региональных лимфоузлов (рис. 4Е), но не в подкожном жире области холки (рис. 4Д). Введение TUDCA не оказывало достоверного эффекта на экспрессию *Tnfa* (рис. 4А,Б). Таким образом, эффект TUDCA на гуморальный иммунный ответ мог быть связан и с влиянием на экспрессию цитокинов семейства ФНО APRIL и BAFF.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной задачей данной работы была проверка способности химических шаперонов TUDCA и 4-PBA подавлять продукцию аллерген-специфических антител. В ходе работы было выявлено, что именно TUDCA, но не 4-PBA, обладает выраженной способностью подавлять продукцию аллерген-специфических антител класса IgE. При этом достоверное влияние на продукцию

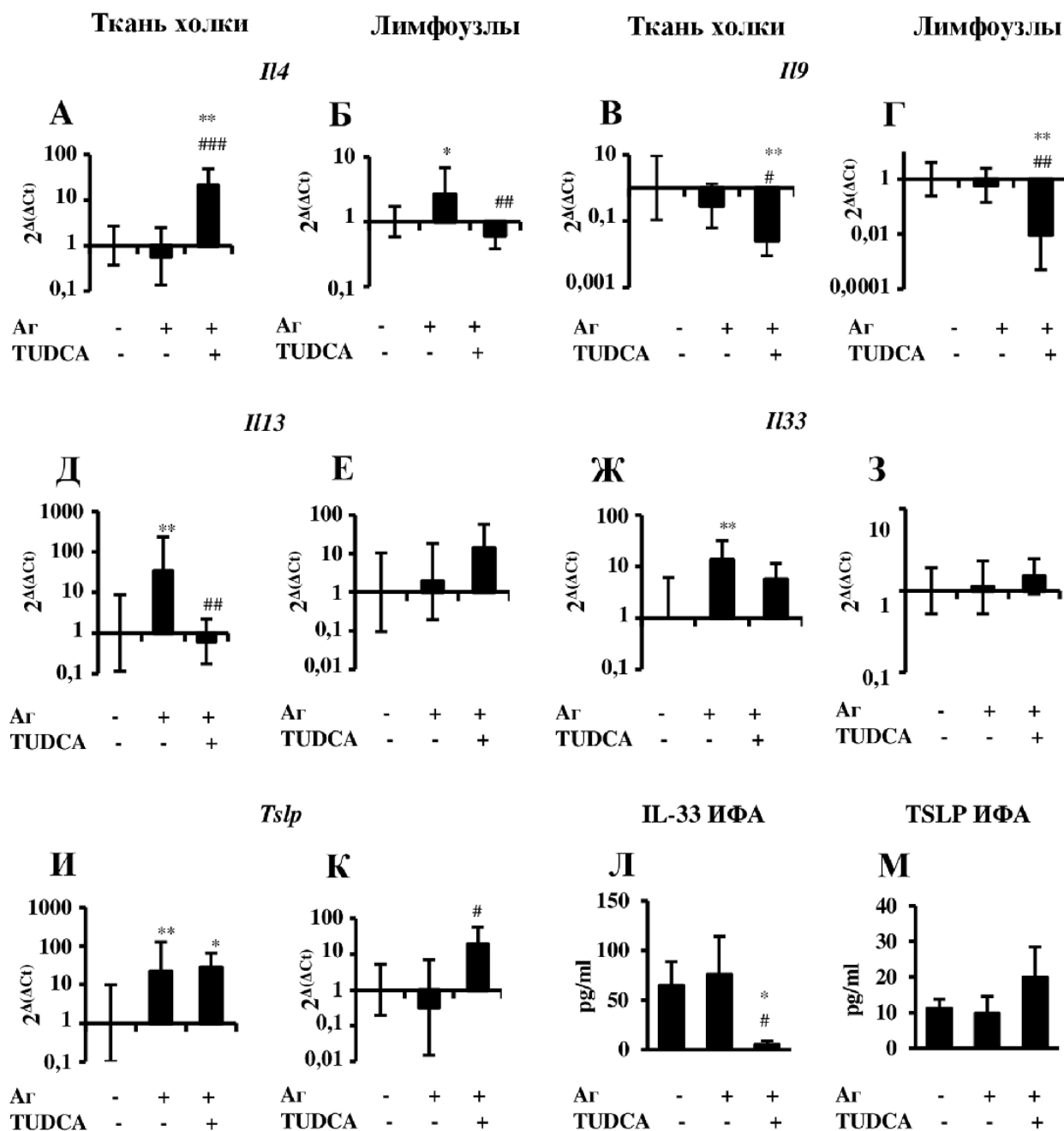


Рисунок 3. Эффект TUDCA на гуморальный иммунный ответ связан с подавлением экспрессии цитокинов 2 типа иммунного ответа в региональных лимфоузлах и с блокированием высвобождения IL-33. Мыши линии BALB/c были иммунизированы физиологическим раствором (контроль), антигеном OVA без TUDCA или антигеном в присутствии TUDCA, в указанных дозах в течение 6 недель в область холки. Экспрессия *IL4* (А, Б), *IL9* (В, Г), *IL13* (Д, Е), *IL33* (Ж, З), *Tslp* (И, К) в подкожном жире области холки (А, В, Д, Ж, И) и региональных лимфатических узлах (Б, Г, Е, З, К). Содержание цитокинов IL-33 (Л) и TSP (М) в крови иммунизированных животных. */** – $p < 0,05/0,01$ достоверности разницы указанной группы в сравнении с группой интактных животных; #/## – $p < 0,05/0,01$ достоверности разницы между группами животных, иммунизированных антигеном с введением химического шаперона и без него.

специфического IgG₁ отсутствовало. В случае TUDCA полученные результаты в целом согласуются с данными, полученными в работах, где TUDCA и другие конъюгированные желчные кислоты подавляли аллергическое воспаление и продукцию специфического IgE [15, 16]. При этом эффект TUDCA на продукцию IgE в интраназальной высокодозовой модели был связан именно с подавлением

активации ATF6α — сенсора стресса ЭПР [15]. В цитируемых работах обсуждалась роль TUDCA в развитии локального аллергического воспаления в ткани лёгких, но не было однозначно определено, связан ли эффект TUDCA с подавлением молекулярных механизмов переключения В-лимфоцитов на продукцию IgE в тканях или в региональных лимфатических узлах. Новизна

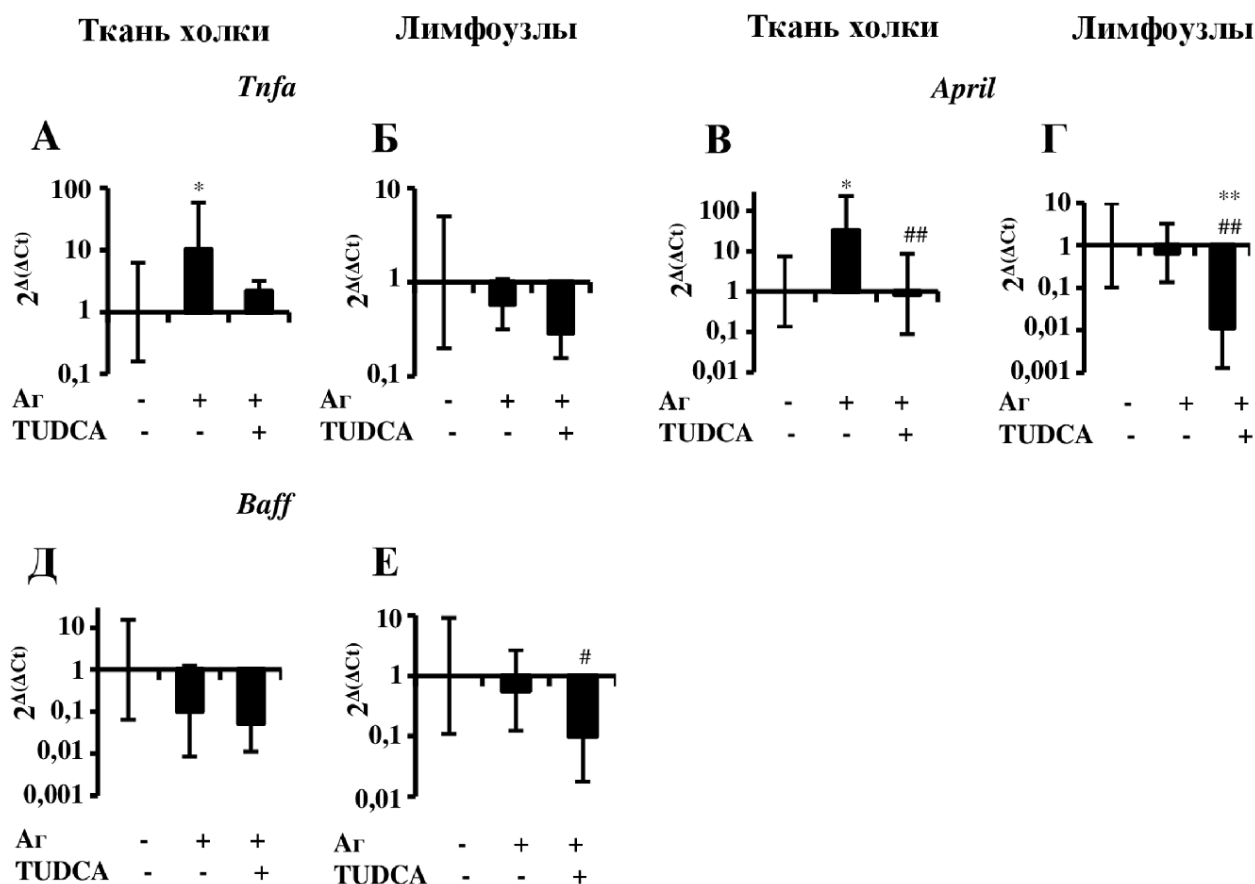


Рисунок 4. Эффект TUDCA на гуморальный иммунный ответ связан с подавлением экспрессии цитокинов семейства ФНО. Мыши линии BALB/c были иммунизированы физиологическим раствором (контроль), антигеном OVA без TUDCA или антигеном в присутствии TUDCA, в указанных дозах в течение 6 недель в область холки. Экспрессия цитокинов *Tnfa* (А, Б), *April* (В, Г), *Baff* (Д, Е) в подкожном жире области холки (А, В, Д) и региональных лимфатических узлов (Б, Г, Е). $^{***} - p < 0,05/0,01$ достоверности разницы указанной группы в сравнении с группой интактных животных; $^{###} - p < 0,05/0,01$ достоверности разницы между группами животных, иммунизированных антигеном с введением химического шаперона и без него.

настоящей работы заключается не только в использовании безадыювантной низкодозовой модели аллергии с картиной гуморального ответа, более соответствующей клиническим случаям, но и с оценкой эффекта отдельно на локальное и системное переключение. Методом ПЦР в реальном времени удалось показать, что, несмотря на то, что на ранних стадиях переключение В-лимфоцитов на синтез IgE в используемой модели осуществляется локально [11], на относительно поздних стадиях (после 6 недель иммунизации) TUDCA подавляет продукцию IgE, влияя именно на системные процессы, происходящие в региональных лимфатических узлах. Под действием TUDCA происходило подавление экспрессии “зародышевых” транскриптов, соответствующих запуску процесса переключения изотипов [12] в клетках региональных лимфатических узлов, но не в ткани места иммунизации (жировая ткань холки). Происходило подавление также экспрессии транскриптов, соответствующих секреторному IgE (плазматические клетки и плазмабласты), в региональных лимфоузлах. С другой стороны, подавление экспрессии мембранной изоформы IgE, характерной для недавно

переключившихся В-лимфоцитов [12], наблюдали именно в ткани холки. Из этого можно сделать вывод, что на относительно поздних стадиях иммунизации системная продукция IgE играет более важную роль. В этом состоит основное отличие от результатов нашей предыдущей работы, полученных при взятии материала на более ранних сроках иммунизации, где ведущую роль играло локальное переключение [10].

Второй используемый химический шаперон (4-РВА) не оказал достоверного влияния на продукцию аллерген-специфических антител, вероятно, в связи с более слабой его активностью. Как было показано в работе [17], именно TUDCA, но не 4-РВА, предотвращает не только дефолдирование белков, но и их агрегацию, и в условиях *in vitro* лучше способствует выживаемости клеток, подвергнутых стрессу ЭПР.

В исследованиях [15, 16] предложен один из возможных механизмов действия TUDCA, а именно, подавление ассоциации между ATF6 α и медиаторами стресса ЭПР Grp78 и, следовательно, его протеолизу, что коррелировало с ингибированием аллергического воспаления и продукции IgE.

Известно, что транслокация ATF6 в аппарат Гольджи и его последующий протеолиз приводят к активации транскрипционных факторов, которые запускают экспрессию генов *Atf6*, *Erp57*, *Xbp1*, *Chop*, *Grp78*. TUDCA приводила к подавлению экспрессии этих генов [16]. XBP1 играет ключевую роль в IL-4-опосредованном созревании активированных В-клеток в Ig-продуцирующие, плазматические клетки [18].

В региональных лимфатических узлах TUDCA ингибировала экспрессию цитокина IL-4, являющегося основным цитокином, запускающим переключение В-лимфоцитов на синтез IgE [12], и IL-9, необходимого для формирования В-лимфоцитов памяти [19], а также являющегося аутокринным фактором, поддерживающим выживание ILC2 клеток [20], играющих важную роль в аллергическом воспалении. При этом экспрессия IL-4 в холке, напротив, активировалась. Однако поскольку на изучаемых поздних стадиях переключения В-лимфоцитов под действием антигена на синтез IgE происходило в основном в региональных лимфоузлах, вышеупомянутое явление в ткани холки не имело большого значения. Действительно, согласно ряду данных, для переключения на синтез IgE на поздних стадиях воспаления наиболее важен тот IL-4, который вырабатывают непосредственно Т-хелперы, участвующие в формировании иммунологических синапсов с соответствующими В-лимфоцитами [21].

Эффект TUDCA на экспрессию цитокинов 2 типа хорошо согласуется с данными, согласно которым активация сигнальных путей, связанных со стрессом ЭПР, требовалась для дифференциации Т-х2 и продукции ими IL-4, IL-5 и IL-13 [7]. Эффект мог объясняться прямым отрицательным влиянием TUDCA на активацию стресса ЭПР в Т-хелперах. Но эффект можно объяснить и косвенным влиянием на экспрессию *Il4*, связанным с регуляцией высвобождения цитокина IL-33 — одного из цитокинов с функцией аларминов, запускающего 2-й тип иммунного ответа [22]. Хотя TUDCA не влияла на экспрессию гена *Il33* ни в ткани холки, ни в региональных лимфоузлах, её введение сопровождалось снижением высвобождения IL-33, что согласуется с экспериментальными результатами работы [15]. Данные о связи стресса ЭПР и продукции IL-33 являются достаточно новыми.

Для индукции переключения В-лимфоцитов на синтез антител необходима активация не только BCR и не только присутствие “направляющих” цитокинов, но и сигналинг от CD40, который в принципе может заменить активация рецепторов семейства ФНО [12]. В настоящей работе TUDCA не влиял достоверно на экспрессию ФНО-α в ткани холки и в региональных лимфатических узлах при сравнении группы животных, иммунизированных антигеном с химическим шапероном, и группы животных, иммунизированных одним антигеном. Тем не менее в группе, иммунизированной антигеном с химическим шапероном, не наблюдали достоверного подъёма экспрессии ФНО-α в сравнении с интактной группой, в отличие от группы, иммунизированной без TUDCA.

В то же время наблюдалось достоверное подавление экспрессии APRIL в ткани холки и региональных лимфоузлах, и BAFF в региональных лимфоузлах. Большее влияние TUDCA на экспрессию BAFF и APRIL может объясняться отличием в механизмах регуляции экспрессии этих цитокинов от механизмов экспрессии ФНО-α. Эти цитокины связываются с рецептором TACI и индуцируют сигнальный каскад, активирующий в конечном итоге NF-κB-зависимую транскрипцию фактора НохС4, являющегося регулятором транскрипции AICDA [23]. В ряде работ показано, что нарушение передачи сигнала по оси APRIL/BAFF-TACI и препятствовало переключению изотипов антител [24]. Кроме того показано, что снижение интенсивности NF-κB сигналинга, которое может наблюдаться при снижении концентрации APRIL/BAFF, особенно критично влияет на переключение В-лимфоцитов на изотип IgE, но не IgG₁, поскольку ингибитор NF-κB в системе *ex vivo* подавлял в основном первый процесс [25].

Ранее была показана корреляция продукции этих цитокинов с параметрами аллергического воспаления и продукцией IgE у больных [26, 27]. Результаты настоящей работы косвенно подтверждают связь продукции IgE экспрессией этих двух цитокинов во вторичных лимфоидных органах и с экспрессией APRIL в ткани места иммунизации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение TUDCA, но не 4-РВА, ингибировало продукцию IgE в используемой низкодозовой модели аллергии. Влияния на продукцию IgG₁ обнаружено не было. Указанное влияние TUDCA связано с подавлением системного, но не локального, переключения на синтез IgE, а также с подавлением высвобождения IL-33, снижением экспрессии цитокинов 2 типа иммунного ответа *Il4* и *Il9* в региональных лимфатических узлах. Влияние TUDCA на продукцию аллерген-специфических антител могло быть также обусловлено снижением экспрессии цитокинов APRIL и BAFF, способных индуцировать переключение изотипов в целом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при поддержке проекта РНФ № 23-25-10044 и поддержке Бюджета города Москвы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC) Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (протокол № 147/2021).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Hellman L. (2007) Regulation of IgE homeostasis, and the identification of potential targets for therapeutic intervention. *Biomed. Pharmacother.*, **61**(1), 34-49. DOI: 10.1016/j.biopha.2006.10.001
- Gass J.N., Gunn K.E., Sriburi R., Brewer J.W. (2004) Stressed-out B cells? Plasma-cell differentiation and the unfolded protein response. *Trends Immunol.*, **25**(11), 17-24. DOI: 10.1016/j.it.2003.11.004
- Меситов М.В., Московцев А.А., Кубатиев А.А. (2013) Молекулярная логика сигнальных путей при стрессе эндоплазматического ретикулума: система UPR (Unfolded Protein Response). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, **57**(4), 97-108. [Mesitov M.V., Moskovcev A.A., Kubatiev A.A. (2013) Molecular logic of signaling pathways during endoplasmic reticulum stress: the UPR (Unfolded Protein Response) system. *Pathological physiology and experimental therapy. Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*, **57**(4), 97-108.]
- Ma Y., Shimizu Y., Mann M.J., Hendershot L.M. (2010) Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. *Cell Stress Chaperones*, **15**(3), 281-293. DOI: 10.1007/s12192-009-0142-9
- Liu J.-X., Zhen Z., Chen A.-N., Guo C.-L., Shi K.-T., Wang H., Xu K., Yao Y., Wang H., Liao B., Liu Z. (2021) Endoplasmic reticulum stress promotes local immunoglobulin E production in allergic rhinitis. *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.*, **6**(6), 1256-1266.
- Kim S., Joe Y., Surh Y.-J., Chung H.T. (2018) Differential regulation of toll-like receptor-mediated cytokine production by unfolded protein response. *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2018**, 9827312. DOI: 10.1155/2018/9827312
- Kemp K.L., Lin Z., Zhao F., Gao B., Song J., Zhang K., Fang D. (2013) The serine-threonine kinase inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) promotes IL-4 production in T helper cells. *J. Biol. Chem.*, **288**(46), 33272-33282. DOI: 10.1074/jbc.M113.493171
- Cortez L., Sim V. (2014) The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion*, **8**(2), 197-202. DOI: 10.4161/pri.28938
- Михайлова В.В., Еронина Т.Б., Чеботарева Н.А., Курганов Б.И. (2023) Влияние химических шаперонов на процессы агрегации белков, протекающие в различных кинетических режимах. *Биохимия*, **88**(1), 83-96. [Mihajlova V.V., Eronina T.B., Chebotareva N.A., Kurganov B.I. (2023) The influence of chemical chaperones on protein aggregation processes occurring in various kinetic regimes. *Biochemistry (Moscow)*, **88**(1), 83-96.] DOI: 10.31857/S0320972523010062
- Chudakov D.B., Kotsareva O.D., Konovalova M.V., Tsaregorotseva D.S., Schevchenko M.A., Sergeev A.A., Fattakhova G.V. (2022) Early IgE production is linked with extrafollicular B- and T-cell activation in low-dose allergy model. *Vaccines*, **10**(6), 969. DOI: 10.3390/vaccines10060969
- Chudakov D.B., Rysantsev D.Yu., Tsaregorotseva D.S., Kotsareva O.D., Fattakhova G.V., Svirshchevskaya E.V. (2020) Tertiary lymphoid structure related B-cell IgE isotype switching and secondary lymphoid organ linked IgE production in mouse allergy model. *BMC Immunology*, **21**(1), 45. DOI: 10.1186/s12865-020-00376-7
- Xu Z., Zan H., Pone E.J., Mai T., Casali P. (2012) Immunoglobulin class-switch DNA recombination: Induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.*, **12**(7), 517-531. DOI: 10.1038/nri3216
- Labmrecht B.N., Hammad H. (2014) Allergens and the airway epithelium response: Gateway to allergic sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **134**(3), 499-507. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.06.036
- Chan B.C.L., Lam C.W.K., Tam L.-S., Wong C.K. (2019) IL33: Roles in allergic inflammation and therapeutic perspectives. *Front. Immunol.*, **10**, 364. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00364
- Nakada E.M., Bhakta N.R., Korwin-Michavics B.R., Kumar A., Chamberlain N., Bruno S.R., Chapman D.G., Hoffman S.M., Daphtary N., Aliyeva M., Irvin C.G., Dixon A.E., Woodruff P.G., Amin S., Poynter M.E., Desai D.H., Anathy V. (2019) Conjugated bile acids attenuate allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness by inhibiting UPR transducers. *JCI Insight.*, **4**(9), E98101. DOI: 10.1172/jci.insight.98101
- Siddesha J.M., Nakada E.M., Michavicks B.R., Hoffman S.M., Rattu G.K., Chamberlain N., Cahoon J.M., Lahue K.G., Daphtary N., Aliyeva M., Chapman D.G., Desai D.H., Poynter M.E., Anathy V. (2016) Effect of a chemical chaperone, tauroursodeoxycholic acid, on HDM-induced allergic airway disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **310**(11), 1243-1259. DOI: 10.1152/ajplung.00396.2015
- Uppala J.K., Gani A.R., Ramaiah K.V.A. (2017) Chemical chaperone, TUDCA unlike PBA, mitigates protein aggregation efficiently and resists ER and non-ER stress induced HepG2 cell death. *Sci. Rep.*, **7**(1), 3831. DOI: 10.1038/s41598-017-03940-1
- Tsukamoto Y., Uehara S., Mizoguchi C., Sato A., Horikawa K., Takatsu K. (2005) Requirement of 8-mercaptoguanosine as a costimulus for IL-4-dependent μ to γ 1 class switch recombination in CD38-activated B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **336**, 625-633. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.08.141
- Wang Y., Shi J., Yan J., Xiao Z., Hou X., Lu P., Hou S., Mao T., Liu W., Ma Y., Zhang L., Yang X., Qi H. (2017) Germinal-center development of memory B cells driven by IL-9 from follicular helper T cells. *Nat. Immunol.*, **18**(8), 921-930. DOI: 10.1038/ni.3788
- Turner J.-E., Morrison P.J., Wilhelm C., Wislon M., Ahifors H., Renaud J.-C., Panzer U., Helmbly H., Stockinger B. (2013) IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *J. Exp. Med.*, **210**(13), 2951-2965. DOI: 10.1084/jem.20130071
- Meli A.P., Fontes G., Soo C.L., King I.L. (2017) T follicular helper cell-derived IL-4 is required for IgE production during intestinal helminth infection. *J. Immunol.*, **199**(1), 244-252. DOI: 10.4049/jimmunol.1700141
- Хаитов М.Р., Гайсина А.Р., Шиловский И.П., Смирнов В.В., Раменская Г.В., Никонова А.А., Хаитов Р.М. (2018) Роль интерлейкина 33 в патогенезе бронхиальной астмы. Новые экспериментальные данные. *Биохимия*, **83**(1), 19-33. [Khaitov M.R., Gaisina A.R., Shilovskiy I.P., Smirnov V.V., Ramenskaia G.V., Nikonova A.A., Khaitov R.M. (2018) The role of interleukin-33 in pathogenesis of bronchial asthma. New experimental data. *Biochemistry (Moscow)*, **83**(1), 13-25.] DOI: 10.1134/S0006297918010029
- Zan H., Casali P. (2013) Regulation of *Aicda* expression and AID activity. *Autoimmunity*, **46**(2), 86-101. DOI: 10.3109/08916934.2012.749244

TUDCA СЕЛЕКТИВНО ПОДАВЛЯЕТ ПРОДУКЦИЮ IgE

24. Castigli E., Wilson S., Scott S., Dedeoglu F., Xu S., Lam K.-P., Bram R., Jabara H., Geha R. (2005) TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J. Exp. Med.*, **201**(1), 35-39. DOI: 10.1084/jem.20032000
25. Janssen E., Ozcan E., Liadaki K., Jabara H.H., Manis J., Ullas S., Akira S., Fitzgerald K.A., Golenbock D.T., Geha R.S. (2014) TRIF signaling is essential for TLR4-driven IgE class switching. *J. Immunol.*, **192**(6), 2651-2658. DOI: 10.4049/jimmunol.1300909
26. Diladaer T., Zheng Y., Liu Z., Hu X., Zhang J., Hu L., Han M., Wang D., Li H. (2017) Increased BAFF expression in nasal polyps is associated with local IgE production, Th2 response and concomitant asthma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, **274**(4), 1883-1890. DOI: 10.1007/s00405-016-4435-1
27. Matsushita T., Fujimoto M., Echigo T., Matsushita Y., Shimada Y., Hasegawa M., Takehara K., Sato S. (2008) Elevated serum levels of APRIL, but not BAFF, in patients with atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.*, **17**(3), 197-202. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2007.00642.x

Поступила в редакцию: 28. 10. 2023.
После доработки: 18. 12. 2023.
Принята к печати: 19. 12. 2023.

CHEMICAL CHAPERONE TUDCA SELECTIVELY INHIBITS PRODUCTION OF ALLERGEN-SPECIFIC IgE IN A LOW-DOSE MODEL OF ALLERGY

**D.B. Chudakov*, O.A. Shustova, O.D. Kotsareva, A.A. Generalov,
M.S. Streltsova, Yu.D. Vavilova, G.V. Fattakhova**

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
16/10 Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117997 Russia; *e-mail: boris-chudakov@yandex.ru

The cellular response to endoplasmic reticulum (ER) stress accompanies plasma cell maturation and is one of triggers and cofactors of the local inflammatory response. Chemical chaperones, low-molecular substances that eliminate pathological ER stress, are proposed as means of treating pathologies associated with ER stress. The aim of this study was to evaluate the effect and mechanisms of influence of chemical chaperones on the humoral response in a low-dose model of allergy. The allergic immune response was induced in BALB/c mice by repeated administration of ovalbumin at a dose of 100 ng for 6 weeks. Some animals were injected with both the antigen and the chemical chaperones, TUDCA (tauroursodeoxycholic acid) or 4-PBA (4-phenylbutyrate). Administration of TUDCA, but not 4-PBA, suppressed production of allergen-specific IgE (a 2.5-fold decrease in titer). None of the chemical chaperones affected the production of specific IgG₁. The effect of TUDCA was associated with suppression of the switch to IgE synthesis in regional lymph nodes. This phenomenon was associated with suppressed expression of genes encoding cytokines involved in type 2 immune response, especially *Il4* and *Il9*, which in turn could be caused by suppression of IL-33 release. In addition, TUDCA significantly suppressed expression of the cytokine APRIL, and to a lesser extent, BAFF. Thus, TUDCA inhibition of the allergy-specific IgE production is due to suppression of the release of IL-33 and a decrease in the production of type 2 immune response cytokines, as well as suppression of the expression of the cytokines APRIL and BAFF.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: chemical chaperone; taurodeoxycholate; IgE; interleukin 4; interleukin 33; APRIL; BAFF

Funding. This project was supported by the Russian Science Foundation (project No. 23-25-10044) and by the budget of Moscow.

Received: 28.10.2023; revised: 18.12.2023; accepted: 19.12.2023.