



И.И. Мечников

ISSN 0206-4952 (Print)
ISSN 2412-1312 (Online)

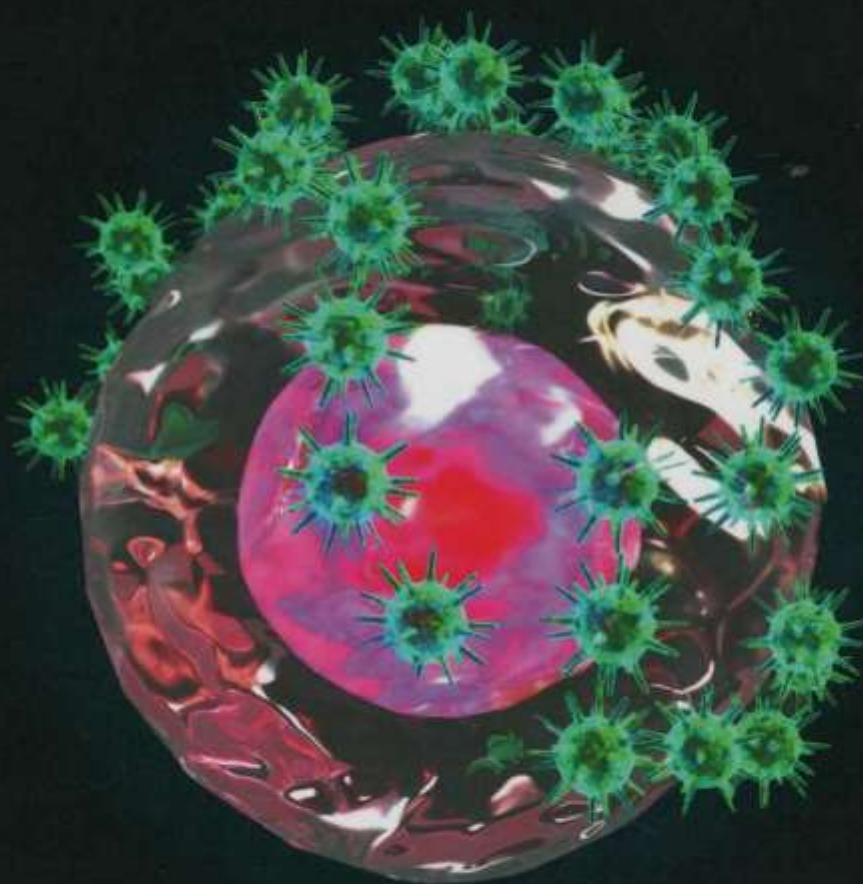
Том 40
2019

2

Volume 40, Number 2, 2019

ИММУНОЛОГИЯ

I M M U N O L O G I Y A



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»

www.geotar.ru

КУРС ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ

**«ЭФФЕКТИВНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ
В ЗДРАВООХРАНЕНИИ»**

Специальность: Организация здравоохранения и общественное здоровье (144 ак.ч.)

О КУРСЕ

Системный подход к управлению в сочетании с практическими инструментами. Лекторы курса — опытные руководители здравоохранения, делятся навыками эффективного управления и собственным опытом успешных преобразований в условиях ограниченных финансовых и кадровых ресурсов.

О ПРОГРАММЕ

- Системные знания по организации здравоохранения, ключевые балансы и принципы финансирования отрасли
- Углубленное изложение основ и практики стратегического и проектного управления в здравоохранении
- Управление качеством медицинской помощи, в том числе при прохождении аккредитации на соответствие международным стандартам (JCI)
- Пошаговый порядок добровольной сертификации на соответствие требованиям Росздравнадзора, аудит зон риска медицинских организаций
- Вопросы управления нацпроектом «Здравоохранение» в субъектах РФ
- Передовые методы управления медицинской организацией
- Разбор управленческих ситуаций по методике Гарвардского университета

ДАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ КУРСА В МОСКВЕ В 2019 г.

ФЕВРАЛЬ 04.02.19 – 24.02.19 дистанционно
25.02.19 – 04.03.19 очно

МАЙ 06.05.19 – 26.05.19 дистанционно
27.05.19 – 03.06.19 очно

СЕНТЯБРЬ 26.08.19 – 15.09.19 дистанционно
16.09.19 – 23.09.19 очно

НОЯБРЬ 01.11.19 – 24.11.19 дистанционно
25.11.19 – 02.12.19 очно

www.vshouz.ru

115035, г. Москва, ул. Садовническая, д. 13, стр. 11

+7 (985) 278 9235 +7 (495) 662 8096

vshouz@vshouz.ru



Российская академия наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического агентства



И.И. Мечников

Том 40
2019

2

Volume 40, Number 2, 2019

ИММУНОЛОГИЯ

Научно-практический рецензируемый журнал

Основан в 1980 г.

Журнал входит в Перечень российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных Министерством высшего образования и науки Российской Федерации для публикации результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук

Журнал индексируется в Scopus, Excerpta Medica, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, INIS Atomindex (International Nuclear Information System), Ulrich's International Periodicals Directory

**Главный редактор
академик РАН Хаитов Рахим Мусаевич**



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Акдис Ч., MD, профессор, Давос, Швейцария
Агаче И., MD, профессор, Брасов, Румыния
Атауллаханов Р.И., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Болдырева М.Н., доктор мед. наук, Москва, Россия
Валента Р., MD, профессор, Вена, Австрия
Гариф Ф.Ю., доктор мед. наук, профессор (научный редактор),
Москва, Россия
Гудима Г.О., доктор биол. наук, профессор (заместитель главного редактора),
Москва, Россия
Гущин И.С., член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Джонстон С., MD, профессор, Лондон, Великобритания
Ильина Н.И., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Кадагидзе З.Г., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Карамов Э.В., доктор биол. наук, профессор, Москва, Россия
Караулов А.В., академик РАН, доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Медуницын Н.В., академик РАН, доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Мураро А., MD, профессор, Падуя, Италия
Николаева И.А., доктор биол. наук, Москва, Россия
Пашенков М.В., доктор мед. наук, Москва, Россия
Петров Р.В., академик РАН, доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Пинегин Б.В., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Резников Ю.П., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия
Симбирцев А.С., член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор, Санкт-Петербург, Россия
Филатов А.В., доктор биол. наук, профессор, Москва, Россия
Ханитов М.Р., член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Емельянов А.В., доктор мед. наук, профессор (Санкт-Петербург, Россия)
Козлов В.А., академик РАН, доктор мед. наук, профессор (Новосибирск, Россия)
Сизякина Л.П., доктор мед. наук, профессор (Ростов-на-Дону, Россия)
Сотникова Н.Ю., доктор мед. наук, профессор (Иваново, Россия)
Тузанкина И.А., доктор мед. наук, профессор (Екатеринбург, Россия)
Фрейдлин И.С., член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор (Санкт-Петербург, Россия)
Черешнев В.А., академик РАН, доктор мед. наук, профессор (Екатеринбург, Россия)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Арипова Т.У., академик АН РУз, доктор мед. наук, профессор (Ташкент, Узбекистан)
Гамбаров С.С., доктор мед. наук, профессор (Ереван, Армения)
Потапов М.П., доктор мед. наук, профессор (Минск, Беларусь)
Титов Л.П., доктор мед. наук, профессор (Минск, Беларусь)

Научно-практический рецензируемый журнал
«Иммунология»
Том 40, № 2, 2019

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
№ 0110435 от 19.03.1993

Периодичность: 6 номеров в год.

Редакция журнала доводит до сведения читателей, что в издании соблюдаются принципы международной организации «Комитет по издательской этике» (Committee On Publication Ethics – COPE).

Никакая часть издания не может быть воспроизведена без согласия редакции. При перепечатке публикаций с согласия редакции ссылка на журнал «Иммунология» обязательна.

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

Адрес редакции:
115478, г. Москва,
Каширское шоссе, д. 24

Заведующая редакцией:
Гаврикова Галина Ивановна,
j.immunol@yandex.ru
(направлять корреспонденцию)

Журнал распространяется по подписке.
Подписка через Интернет: www.aks.ru; www.pressa-rl.ru
Индексы по каталогу «Пресса России»:
27877 – для индивидуальных подписчиков
27878 – для предприятий и организаций

Издатель
ООО Издательская группа
«ГЭОТАР-Медиа»:
115035, г. Москва,
ул. Садовническая, д. 11, стр. 12
Телефон: (495) 921-39-07
www.geotar.ru

Верстка: Мореева Т.М.
Корректор: Макеева Е.И.
Выпускающий редактор: Исаева А.В.,
isaeva@geotar.ru
Отдел рекламы: Туралина О.А.,
turalina@geotar.ru

Подписано в печать 15.03.2019.
Тираж 3000 экземпляров.
Формат 60 × 90 1/8.
Печать офсетная. Печ. л. 9.

Отпечатано в АО «Первая Образцовая типография». Филiaal «Чеховский Печатный Двор»: 142300, Московская область, г. Чехов, ул. Полиграфистов, д. 1. Заказ № 4562.

Все права защищены.

© ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2019.

Russian Academy of Sciences

National Research Center –
Institute of Immunology
Federal Medical-Biological Agency of Russia

IMMUNOLOGIYA

Scientific-Practical Peer Reviewed Journal

Since 1980

Indexed in Scopus, Excerpta Medica,
Biological Abstracts, INIS Atomindex
(International Nuclear Information System),
Ulrich's International Periodicals Directory,
Chemical Abstracts

Editor-in-Chief

**Rakhim Khaitov, academician
of Russian Academy of Sciences**

Immunologiya

Volume 40, N 2, 2019

Mass media registration certificate
N 0110435 from 19.03.1993

Periodicity: 6 issues per year.

Journal follows the standards of publication ethics
of international organization
«Committee On Publication
Ethics» (COPE).

No part of the publication can be reproduced
without the written consent of editorial
office. Any reprint of publications
with permission of editorial office should
obligatory contain the reference
to "Immunologiya" provided the work
is properly cited.

Responsibility for authenticity
information contained in the advertisement
materials are borne by advertisers.

Address of the editorial office:
Kashirskoe shosse, 24, Moscow, 115478, Russia

Head of the editorial office:

Gavrikova Galina,
j.immunol@yandex.ru
(send correspondence)

Publisher

GEOTAR-Media Publishing Group:
Sadovnicheskaya str., 11/12, Moscow,
115035, Russia

Phone: + 7 (495) 921-39-07

www.geotar.ru

Circulation of 3000 copies.

Format 60 × 90 1/8.

Offset printing 9 sh.

All rights reserved.

© GEOTAR-Media Publishing Group, 2019.

EDITORIAL BOARD

Akdis Cezmi, MD, PhD, prof., Davos, Switzerland

Agache Ioana, MD, PhD, prof., Brasov, Romania

Ataullakhanov Ravshan, MD, PhD, prof., Moscow, Russia

Boldyreva Margarita, MD, PhD, Moscow, Russia

Filatov Alexander, PhD, prof., Moscow, Russia

Garib Firuz, MD, PhD, prof. (Scientific Editor), Moscow, Russia

Gudima Georgii, PhD, prof. (Deputy Editor), Moscow, Russia

Gushchin Igor, corresponding member of RAS, MD, PhD, prof., Moscow, Russia

Ilina Natalia, MD, PhD, prof., Moscow, Russia

Johnston Sebastian, MD, PhD, prof., London, United Kingdom

Kadagidze Zaira, MD, PhD, prof., Moscow, Russia

Karamov Edward, PhD, prof., Moscow, Russia

Karaulov Alexander, academician of RAS, MD, PhD, prof., Moscow, Russia

Khaitov Musa, MD, PhD, prof., Moscow, Russia

Medunitsyn Nikolay, academician of RAS, MD, PhD, prof., Moscow, Russia

Muraro Antonella, MD, PhD, prof., Padova, Italy

Nikolaeva Irina, PhD, Moscow, Russia

Pashchenkov Mikhail, MD, PhD, Moscow, Russia

Petrov Rem, academician of RAS, MD, PhD, prof., Moscow, Russia

Pinegin Boris, MD, PhD, prof., Moscow, Russia

Reznikov Yuriy, MD, PhD, prof., Moscow, Russia

Simbirtsev Andrey, corresponding member of RAS, MD, PhD, prof.,
St. Petersburg, Russia

Valenta Rudolf, MD, PhD, prof., Vienna, Austria

EDITORIAL COUNCIL

Emel'yanov Alexander, MD, PhD, prof. (St. Petersburg, Russia)

Kozlov Vladimir, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Novosibirsk, Russia)

Sizyakina Ludmila, MD, PhD, prof. (Rostov-on-Don, Russia)

Sotnikova Natalia, MD, PhD, prof. (Ivanovo, Russia)

Tuzankina Irina, MD, PhD, prof. (Ekaterinburg, Russia)

Freydlin Irina, corresponding member of RAS, MD, PhD, prof. (St. Petersburg,
Russia)

Chereshnev Valery, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Ekaterinburg, Russia)

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD

Aripova Tamara, academician of AS RUZ, MD, PhD, prof. (Tashkent,
Uzbekistan)

Gambarov Spartak, MD, PhD, prof. (Yerevan, Armenia)

Potapnev Mikhail, MD, PhD, prof. (Minsk, Belarus)

Titov Leonid, MD, PhD, prof. (Minsk, Belarus)

Содержание

Иммуногенетика

Логина М.А., Парамонов И.В., Гусева И.А.,
Дубинина Т.В., Подряднова М.В., Эрдес Ш.Ф.,
Федоровская А.О., Немцов Б.Ф.

Аллельный профиль HLA-B*27 у больных
с анкилозирующим спондилитом

Врожденный иммунитет

Муругина Н.Е., Будихина А.С., Максимчик П.В.,
Дагиль Ю.А., Балисова Л.С., Муругин В.В., Чкадуа Г.З.,
Пинегин Б.В., Пашенков М.В.

Синергическое взаимодействие рецепторов NOD1
и TLR4 врожденного иммунитета: транскрипционные
и метаболические аспекты

Онкоиммунология

Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М.,
Михайлова М.Н.

Морфологические характеристики белой пульпы
и дендритных клеток селезенки при экспериментальном
канцерогенезе

Вакцины и вакцинация

Силкина М.В., Карцева А.С., Зенинская Н.А., Марин М.А.,
Рябко А.К., Мунтян Я.О., Фирстова В.В., Шемякин И.Г.,
Дятлов И.А.

Анализ содержания плазмбластов в крови людей в разные
сроки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой
сухой

Иммунология репродукции

Хонина Н.А., Андреева Е.А., Тихонова М.А., Баторов Е.В.,
Останин А.А., Пасман Н.М., Черных Е.Р.

Интерлейкин-6 как возможный регулятор интрафоллику-
лярных Foxp3⁺-регуляторных Т-клеток у женщин в цикле
экстракорпорального оплодотворения

Клиническая иммунология

Мокроносорова М.А., Желтикова Т.М.

Эффективность препарата Аква Марис Эктоин у пациентов
с аллергическим ринитом и сенсибилизацией к пыльцевым
аллергенам

Обзоры

Гущин И.С.

Аллергия – поздний продукт эволюции иммунной системы

Ганцев Ш.Х., Рустамханов Р.А., Ганцев К.Ш.,
Кзыргалин Ш.Р.

Третичные лимфоидные структуры (лимфоидный неогенез)

Жуков А.С., Лавров Н.В., Хайрутдинов В.Р., Самцов А.В.
Модели псориаза на лабораторных животных: современное
состояние проблемы

Некролог

Леонид Петрович АЛЕКСЕЕВ (1939–2019)

Contents

Immunogenetics

- 5 Loginova M.A., Paramonov I.V., Guseva I.A., Dubinina T.V.,
Podryadnova M.V., Erdes Sh.F., Fedorovskaya A.O.,
Nemtsov B.F.

Profiling of HLA-B*27 alleles in patients with ankylosing
spondylitis

Innate immunity

- 9 Murugina N.E., Budikhina A.S., Maksimchik P.V., Dagil Yu.A.,
Balyasova L.S., Murugin V.V., Chkadua G.Z., Pinegin B.V.,
Pashenkov M.V.

Synergistic interactions of NOD1 and TLR4 receptors of innate
immunity: transcriptional and metabolic aspects

Oncoimmunology

- 17 Arlashkina O.M., Struchko G.Yu., Merkulova L.M.,
Mikhaylova M.N.

Morphological characteristics of white pulp and spleen dendritic
cells at the experimental carcinogenesis

Vaccines and vaccination

- 23 Silkina M.V., Kartseva A.S., Zeninskaya N.A., Marin M.A.,
Ryabko A.K., Muntyan Ya.O., Firstova V.V., Shemyakin I.G.,
Dyatlov I.A.

Analysis of plasmablasts in the human blood at different times
after immunization with live anthrax vaccine

Immunology of reproduction

- 30 Khonina N.A., Andreeva E.A., Tikhonova M.A., Batorov E.V.,
Ostanin A.A., Pasman N.M., Chernykh E.R.

Interleukin-6 as a possible regulator of intrafollicular Foxp3⁺
T cells in women undergoing IVF treatment

Clinical immunology

- 38 Mokronosova A.M., Zheltikova T. M.

The effectiveness of Aqua Maris Ectoин in patients with allergic
rhinitis and sensitization to pollen allergens

Reviews

- 43 Gushchin I.S.

Allergy – late product of the immune system evolution

- 58 Gantsev Sh.Kh., Rustamkhanov R.A., Gantsev K.Sh.,
Kzyrgalin Sh.R.

Tertiary lymphoid structures (lymphoid neogenesis)

- 64 Zhukov A.S., Lavrov N.V., Khairutdinov V.R., Samtsov A.V.
Models of psoriasis on laboratory animals: current status of the
problem

Obituary

- 70 Leonid Petrovich ALEKSEEV (1939–2019)

© Коллектив авторов, 2019

Логинова М.А.¹, Парамонов И.В.¹, Гусева И.А.², Дубинина Т.В.²,
Подряднова М.В.², Эрдес Ш.Ф.², Федоровская А.О.³, Немцов Б.Ф.⁴

Аллельный профиль HLA-B*27 у больных с анкилозирующим спондилитом

¹ ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» ФМБА России, 610027, г. Киров, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», 115522, г. Москва, Россия

³ КОГБУЗ «Кировская областная клиническая больница», 610027, г. Киров, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России, 610998, г. Киров, Россия

Проведено исследование аллельного профиля локуса HLA-B у 121 пациента с анкилозирующим спондилитом. Ген HLA-B*27 выявлен у всех пациентов с анкилозирующим спондилитом, у 5 человек – в гомозиготном состоянии. Распределение аллелей HLA-B*27 – 27:05 (45,45%), 27:02 (6,20%), 27:04 (0,41%) – у пациентов с анкилозирующим спондилитом в российской популяции аналогично распределению этих аллелей среди больных европейской когорты.

Ключевые слова: анкилозирующий спондилит; аллели HLA-B*27; HLA-типирование в высоком разрешении; гомозиготность; ассоциативность

Статья поступила 18.03.2018. Принята в печать 16.06.2018.

Для цитирования: Логинова М.А., Парамонов И.В., Гусева И.А., Дубинина Т.В., Подряднова М.В., Эрдес Ш.Ф., Федоровская А.О., Немцов Б.Ф. Аллельный профиль HLA-B*27 у больных с анкилозирующим спондилитом. Иммунология. 2019; 40 (2): 5–8. doi: 10.2411/0206-4952-2019-12001.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Loginova M.A.¹, Paramonov I.V.¹, Guseva I.A.², Dubinina T.V.²,
Podryadnova M.V.², Erdes Sh.F.², Fedorovskaya A.O.³, Nemtsov B.F.⁴

Profiling of HLA-B*27 alleles in patients with ankylosing spondylitis

¹ Kirov Scientific-Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia, 610027, Kirov, Russia

² Research Institute of Rheumatology named after V.A. Nasonova, 115522, Moscow, Russia

³ Kirov Regional Clinical Hospital, 610027, Kirov, Russia

⁴ Kirov State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 610998, Kirov, Russia

A study was made of the allelic profile of the HLA-B locus in 121 patients with ankylosing spondylitis. The HLA-B*27 gene was detected in all patients with ankylosing spondylitis, in 5 people – in the homozygote. Distribution of HLA-B*27 alleles – 27:05 (45.45%), 27:02 (6.20%), 27:04 (0.41%) – in patients with ankylosing spondylitis in the Russian population, similar to the distribution of these alleles among patients of the European cohort.

Keywords: ankylosing spondylitis; HLA-B*27 alleles; high resolution HLA-typing; Homozygosity; association.

Received 18.03.2018. Accepted 16.06.2018.

For citation: Loginova M.A., Paramonov I.V., Guseva I.A., Dubinina T.V., Podryadnova M.V., Erdes Sh.F., Fedorovskaya A.O., Nemtsov B.F. Profiling of HLA-B*27 alleles in patients with ankylosing spondylitis. Immunologiya. 2019; 40 (2): 5–8. doi: 10.2411/0206-4952-2019-12001. (in Russian)

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Введение

Анкилозирующий спондилит (АС) – хроническое воспалительное заболевание из группы спондилоартритов, характеризующееся обязательным поражением крестцово-подвздошных суставов и/или позвоночника

с потенциальным исходом их в анкилоз, частым вовлечением в патологический процесс энтезисов и периферических суставов [1]. Хотя этиопатогенез заболевания изучен не полностью, роль генетических факторов в восприимчивости к АС неоспорима [2].

Для корреспонденции

Логинова Мария Александровна – кандидат биологических наук, заведующая научно-исследовательской лабораторией прикладной иммуногенетики ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» ФМБА России, Киров, Россия
E-mail: mlogin2010@gmail.com
http://orcid.org/0000-0001-7088-3986

For correspondence

Loginova Maria A. – PhD, Head of Research Laboratory of Applied Immunogenetics of Kirov Scientific-Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia, Kirov, Russia
E-mail: mlogin2010@gmail.com
http://orcid.org/0000-0001-7088-3986

Человеческие лейкоцитарные антигены (Human leucocyte antigens – HLA) являются наиболее полиморфными локусами в геноме человека. По данным Комитета по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ (The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System), на декабрь 2018 г. HLA-локусы представлены 21 499 аллелем [3], многие из них ассоциированы со специфическими иммуноопосредованными заболеваниями.

Ассоциативная связь антигена HLA-B*27 с АС обнаружена более 40 лет назад. Однако из более чем 188 аллелей HLA-B*27, зарегистрированных на сегодняшний день, основные подтипы HLA-B*27, связанные с АС, различаются по частоте встречаемости в разных этнических группах [4, 5]. Так, HLA-B*27:02 зарегистрирован у европейских пациентов с АС, особенно часто в южно-европейских странах [6], HLA-B*27:03 – у африканцев [7], HLA-B*27 антиген – присутствует у больных АС большинства этнических групп [4, 5], тогда как HLA-B*27:07 и HLA-B*27:08 выявляются значительно реже у больных АС, в основном у европейцев [9, 10]. При этом есть исследования, показывающие, что некоторые редко встречающиеся HLA-B*27-аллели – 27:06 и 27:09 – не выявляются у больных АС, и даже, предположительно, играют протективную роль [9, 11].

В Российской Федерации практически отсутствуют данные по распределению аллелей HLA-B*27 у больных АС [12].

Цель данной работы – изучение профиля аллелей локуса HLA-B у больных с АС.

Материал и методы

В исследование был включен 121 больной: 100 – пациенты ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», 21 – пациенты КОГБУЗ «Кировская областная клиническая больница». Все пациенты соответствовали модифицированным Нью-Йоркским критериям (1984) АС. Статистический анализ проводили с использованием программы Epi Info (версия 7). Различия в распределении клинических проявлений как номинальных показателей между группами HLA-аллелей оценивали в четырехпольной таблице по величине критерия независимости χ^2 . При значении одного из показателей <5 использовали точный метод Фишера. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

Препараты ДНК для HLA-типирования получены из замороженных образцов цельной крови (антикоагулянт – ЭДТА) методом колоночной фильтрации с использованием наборов реагентов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия). Концентрация препаратов ДНК, которую определили на спектрофотометре TECAN Infinite 200 (TECAN, Швейцария), составляла в среднем 25–40 нг/мкл при соотношении $A_{260}/A_{280} = 1,75 \div 1,95$.

HLA-типирование образцов больных с диагнозом АС по локусу HLA-B проводили по технологии SBT (*Sequencing Based Typing*) с применением базовых наборов реагентов AlleleSEQR HLA Sequencing (Abbott, США). Чтобы избежать неоднозначности типирова-

ния, использовали реагенты для уточнения гетерозиготных неоднозначностей, в реакцию брали амплификаты на стадии амплификации при постановке HLA-типирования с базовыми наборами реагентов.

Капиллярный электрофорез осуществляли на 48-капиллярном генетическом анализаторе 3730 (Applied Biosystems, США), полученные сиквенсы просматривали в программе Sequencing Analysis (v.5.2), анализировали в программе SBTengine с использованием библиотеки HLA-аллелей – IMGT/HLA 3.25.0.

В качестве группы сравнения использовали когорту потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, включенных в регистр неродственных доноров ФГБНУ «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России» ($n = 29\ 253$).

Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», письменное информированное согласие получено от всех пациентов.

Результаты

При HLA-типировании образцов ДНК, выделенных от лиц с установленным диагнозом АС, результат типирования в высоком разрешении по локусу HLA-B получен для всех образцов. Аллельный вариант HLA-B*27 выявлен у каждого пациента с диагнозом АС, а в 5 случаях данный аллельный вариант встретился в гомозиготном состоянии. Не обнаружено различий в отношении активности АС и данных инструментальных обследований между пациентами с HLA-B*27 в гомозиготном состоянии и с HLA-B*27 в гетерозиготном состоянии.

Частота встречаемости аллелей локуса HLA-B у больных с АС представлена в табл. 1.

Из табл. 1 следует, что у исследуемого контингента лиц в ходе эксперимента обнаружены всего 3 аллеля HLA-B*27 – 27:05, 27:02 и 27:04. Из аллельного профиля локуса HLA-B следует, что ни одна другая аллельная группа не выявлена у большинства исследуемой выборки, а многие аллели получены лишь единожды.

Сравнительный анализ клинических проявлений АС (вариант дебюта, длительность заболевания, активность, функциональные нарушения, аксиальные, внеаксиальные и внескелетные проявления) и данных обследований у пациентов с АС с различными аллелями HLA-B*27 показал отсутствие статистически значимых различий ($p < 0,05$) между этими группами.

Частота встречаемости аллельного варианта HLA-B*27 у потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток в зависимости от региона их проживания представлена в табл. 2. В связи с тем, что все потенциальные доноры гемопоэтических стволовых клеток для включения в регистр типировались в разрешении от среднего к высокому, невозможно рассчитать указанную частоту встречаемости для конкретных аллелей HLA-B*27, это можно сделать только для всей аллельной группы. У лиц контрольной группы выявлены аллели HLA-B*27:05,

Таблица 1. Частота встречаемости аллелей локуса HLA-B у больных с анкилозирующим спондилитом

Аллель HLA-B	Выявленные случаи	Частота встречаемости, %	Аллель HLA-B	Выявленные случаи	Частота встречаемости, %
07:02	14	5,78	39:24	1	0,41
08:01	13	5,37	40:01	2	0,83
13:02	9	3,71	40:02	1	0,41
14:02	1	0,41	40:06	1	0,41
15:01	5	2,07	41:01	1	0,41
15:07	–	0,41	41:02	2	0,83
15:16	1	0,41	44:02	8	3,30
15:17	2	0,83	44:03	3	1,24
18:01	9	3,71	44:05	1	0,41
27:02	15	6,20	44:27	2	0,83
27:04	1	0,41	46:01	1	0,41
27:05	110	45,45	48:01	1	0,41
35:01	3	1,24	49:01	4	1,65
35:02	1	0,41	50:01	5	2,07
35:03	2	0,83	51:01	7	2,89
37:01	2	0,83	52:01	3	1,24
38:01	3	1,24	55:01	1	0,41
39:01	2	0,83	57:01	1	0,41
39:06	1	0,41	58:01	2	0,83

27:02, 27:04, 27:14, 27:07, 27:09, а также аллели 27:133 [13], 27:05:31 [14] и 27:07:05 [15], впервые обнаруженные и описанные у жителей Российской Федерации.

Из табл. 2 следует, что наибольшей частотой встречаемости HLA-B*27 характеризуются жители Республик Чувашия (9,87%) и Марий Эл (7,96%), которые, вероятно, будут характеризоваться наибольшей распространенностью AC [16, 17]. Наименьшими частотами встречаемости HLA-B*27 характеризуются жители Приморского края и регионов Северного Кавказа.

Обсуждение

Генетическая ассоциация HLA-B*27 с AC впервые обнаружена в начале 1970-х гг. и с тех пор не раз подтверждалась в дальнейших исследованиях.

Молекула HLA-B*27 является уникальной молекулой человеческих лейкоцитарных антигенов I класса не только в силу ее высокой ассоциативности с AC, но и из-за особенного аминокислотного состава. Наличие В-кармана и свободной тиольной группы Cys67 – две важнейшие структурные особенности, отличающие HLA-B*27 от других HLA-антигенов [18]. Свободный тиоловый остаток Cys67 способствует формированию гомодимера молекулы HLA-B*27 во внеклеточном домене, что оказывает большое влияние на его физиологическую роль [19].

Установлено неравномерное распределение гена HLA-B*27 в мире. Наибольшей распространенностью HLA-B*27 и самым высоким показателем выявления спондилоартропатий характеризуются эскимосы и коренные американцы, проживающие в приполярной области и на севере Канады [4, 20]. Известно, что распределение HLA-B*27 имеет тенденцию к градиентному снижению распространенности с севера на юг, что, предположительно, отражает генетический отбор лучшей сопротивляемости инфекциям. В нашем исследовании это подтверждается распределением HLA-B*27 в группе сравнения – минимальными значениями частоты встречаемости характеризуются наиболее южные из изучаемых регионов страны: Приморский край (2,5%), Чеченская Республика (3,14%) и Республика Дагестан (3,27%).

На сегодняшний день описано 188 подтипов HLA-B*27, большинство из них отличаются нуклеотидными заменами в экзонах 2 и 3, отвечающих за формирование пептид связывающего сайта [5]. HLA-B*27:05 является наиболее распространенным подтипом и присутствует практически в каждой мировой популяции. Считается, что HLA-B*27:05 был «родительским» подтипом, из которого могли образоваться все остальные подтипы путем точечных мутаций (HLA-B*27:03), рекомбинации (HLA-B*27:06, 27:09) и генетической конверсии (HLA-B*27:01, HLA-B*27:02, HLA-B*27:04).

Следует отметить, что аллели HLA-B*27, а также их ассоциативность с AC существенно различаются у представителей различных этнических групп. Помимо HLA-B*27:05, доказана ассоциированность с AC следующих аллелей HLA-B*27:01, HLA-B*27:02,

Таблица 2. Частота встречаемости аллельного варианта HLA-B*27 у потенциальных доноров гемопозитических стволовых клеток

Регион	Частота встречаемости HLA-B*27, %	Регион	Частота встречаемости HLA-B*27, %
Кировская область	5,16	Пермский край	6,55
Республика Татарстан	4,70	Республика Чувашия	9,87
Республика Марий Эл	7,96	Амурская область	4,33
Костромская область	5,86	Республика Дагестан	3,27
Нижегородская область	4,57	Чеченская Республика	3,14
Республика Башкортостан	6,02	Ставропольский край	3,40
Республика Удмуртия	6,72	Приморский край	2,50
Новосибирская область	5,57	Другие	5,39
Свердловская область	6,45	Средняя	5,56

HLA-B*27:03, HLA-B*27:04, HLA-B*27:10, HLA-B*27:13, HLA-B*27:14, HLA-B*27:15 [21, 22]. Остальные аллели обнаруживаются с очень низкой частотой встречаемости, и их связь с АС, как правило, неизвестна.

Среди европеоидов преобладающим является аллель HLA-B*27:05, частота встречаемости которого обычно составляет $\geq 70\%$ от всех HLA-B*27-позитивных лиц [4, 21]. Также его считают наиболее распространенным аллелем, ассоциированным с АС, на втором месте находится аллель HLA-B*27:02 [4, 21]. Полученное в нашем исследовании распределение аллелей HLA-B*27 у пациентов с АС совпадает с их распределением среди лиц европейского происхождения. Аллель HLA-B*27:04, выявленный только у одного пациента изученной выборки, является основным аллелем, ассоциированным с АС в китайской популяции [23].

Аллель HLA-B*27:14, ассоциированность которого с АС подтверждена несколькими исследованиями, нами выявлен только в группе сравнения. Обнаружение аллеля HLA-B*27:09 только в группе сравнения свидетельствует в пользу гипотезы о его защитной роли [11].

С момента открытия высокой ассоциации HLA-B*27 с АС предложено несколько гипотез, объ-

ясняющих роль HLA-B*27 в патогенезе заболевания. Первоначально акцент был сделан на уровень экспрессии гена HLA-B*27 при проявлении заболевания, предполагалось, что уровень мРНК коррелирует с активностью клинического течения АС. Однако влияние гомозиготности HLA-B*27 так и осталось спорным [4, 21, 22]. В нашем исследовании не обнаружено различий в отношении активности АС между пациентами с HLA-B*27 в гомозиготном и гетерозиготном состояниях.

Выводы

1. Впервые определен аллельный профиль локуса HLA-B у лиц с диагнозом АС, проживающих на территории Российской Федерации. Аллели HLA-B*27:05 и HLA-B*27:02 определены как два основных аллеля, ассоциированных с АС.

2. Установлено, что особенности клинического течения АС среди пациентов российской популяции не ассоциируются с аллелями HLA-B*27.

3. Гомозиготный HLA-B*27 выявлен не только при АС, но и среди лиц группы сравнения, что свидетельствует о полигенном контроле заболевания.

Литература

1. Эрлес Ш.Ф., Балокин В.В., Боцкова А.Г., Бугрова О.В. и др. О терминологии спондилоартритов. Науч.-практ. ревматология. 2015; 53 (6): 657–60.
2. Van der Linden S., van der Heijde D. Ankylosing spondylitis. Clinical features. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1998; 24 (4): 663–76.
3. HLA alleles numbers. URL: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>. (date of access December 7, 2017)
4. Tsai W.-Ch. HLA-B27 and ankylosing spondylitis. In: J. Bruges-Armas (ed.), *Clinical and Molecular Advances in Ankylosing Spondylitis*. InTech. URL: <http://www.intechopen.com/books/clinical-and-molecular-advances-in-ankylosing-spondylitis/hla-b27-and-ankylosing-spondylitis>.
5. The Allele Frequency Net Database. URL: <http://www.allele-frequencies.net/>.
6. Эрлес Ш., Гусева И.А., Крылов М.Ю., Беневоленская Л.И. Спондилоартропатии и субтипы HLA-B27 в некоторых популяциях севера России. *Тер. арх.* 1997; 5: 41–3.

References

1. Jerdes Sh.F., Badokin V.V., Bochkova A.G., Bugrova O.V., et al. About the terminology of spondylitis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2015; 53 (6): 657–60. (in Russian)
2. Van der Linden S., van der Heijde D. Ankylosing spondylitis. Clinical features. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1998; 24 (4): 663–76.
3. HLA alleles numbers. URL: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>. (date of access December 7, 2017)
4. Tsai W.-Ch. HLA-B27 and ankylosing spondylitis. In: J. Bruges-Armas (ed.), *Clinical and Molecular Advances in Ankylosing Spondylitis*. InTech. URL: <http://www.intechopen.com/books/clinical-and-molecular-advances-in-ankylosing-spondylitis/hla-b27-and-ankylosing-spondylitis>.
5. The Allele Frequency Net Database. URL: <http://www.allele-frequencies.net/>.
6. Jerdes Sh., Guseva I.A., Krylov M.Yu., Benevolenskaya L.I. Spondyloarthropathies and subtypes of HLA-B27 in some populations of the north of Russia. *Terapevticheskiy arkhiv*. 1997; 5: 41–3. (in Russian)

7. Loginova M., Paramonov I. Identification of a new HLA-B*27 allele, B*27:133, in a Russian individual. *Tissue Antigens*. 2015; 86: 211–2.
8. Loginova M. Identification of a new HLA-B*27 allele, B*27:05:31, in a Russian individual. *Immunogenetics: Open Access*. 2016; 1 (1): 1000101.
9. The IPD-IMGT/HLA Database. URL: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/allele.html>.
10. Балабанова Р.М., Дубинина Т.В., Эрлес Ш.Ф. Динамика заболеваемости ревматическими заболеваниями взрослого населения России за 2010–2014 гг. Науч.-практ. ревматология. 2016; 3 (54): 266–70.
11. Эрлес Ш., Гусева И.А., Беневоленская Л.И. Взаимосвязь анкилозирующего спондилоартрита и HLA-B27 в некоторых этнических группах России. *Тер. арх.* 2001; 1: 27–30.
12. Lin Yi, Jiucun Wang, Xinjian Guo, Maribel G. Espitia et al. Profiling of HLA-B alleles for association studies with ankylosing spondylitis in the Chinese population. *Open Rheumatol. J.* 2013; 7: 51–4.

7. Loginova M., Paramonov I. Identification of a new HLA-B*27 allele, B*27:133, in a Russian individual. *Tissue Antigens*. 2015; 86: 211–2.
8. Loginova M. Identification of a new HLA-B*27 allele, B*27:05:31, in a Russian individual. *Immunogenetics: Open Access*. 2016; 1 (1): 1000101.
9. The IPD-IMGT/HLA Database. URL: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/allele.html>.
10. Balabanova R.M., Dubinina T.V., Jerdes Sh.F. The dynamics of the incidence of rheumatic diseases of the adult population of Russia in 2010–2014. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2016; 3 (54): 266–70. (in Russian)
11. Jerdes Sh., Guseva I.A., Benevolenskaya L.I. The relationship between ankylosing spondylitis and HLA-B27 in some ethnic groups in Russia. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2001; 1: 27–30. (in Russian)
12. Lin Yi, Jiucun Wang, Xinjian Guo, Maribel G. Espitia, et al. Profiling of HLA-B alleles for association studies with ankylosing spondylitis in the Chinese population. *Open Rheumatol. J.* 2013; 7: 51–4.

Муругина Н.Е.¹, Будихина А.С.¹, Максимчик П.В.², Дагиль Ю.А.¹,
Балясова Л.С.¹, Муругин В.В.¹, Чкадуа Г.З.³, Пинегин Б.В.¹, Пашенков М.В.¹

Синергическое взаимодействие рецепторов NOD1 и TLR4 врожденного иммунитета: транскрипционные и метаболические аспекты

¹ Лаборатория клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115522, г. Москва, Россия

² Лаборатория изучения механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва, Россия

³ Лаборатория экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва, Россия

Агонисты рецепторов NOD1 и TLR4 синергически активируют ряд функций макрофагов, в частности продукцию фактора некроза опухолей (TNF). В работе впервые изучены изменения метаболизма глюкозы в макрофагах при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4. Агонисты каждого названного рецептора (N-ацетил-D-мурамил-L-аланил-D-изоглутамил-мезо-диаминопимелиновая кислота и липополисахарид, соответственно) увеличивали основные параметры гликолиза: скорость закисления внеклеточной среды, потребление глюкозы, высвобождение лактата. Изменения этих показателей при сочетанной стимуляции не превышали сумму изменений при отдельной стимуляции (аддитивные и инфрааддитивные взаимодействия). Наряду с этим при сочетанной стимуляции наблюдалось синергическое увеличение экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов в точках 4 и 9 ч после начала стимуляции. Таким образом, можно предположить, что метаболическая перестройка поддерживает синергическое увеличение синтеза цитокинов при одновременной стимуляции NOD1 и TLR4, однако первопричина этого синергизма заключается в увеличении длительности и/или амплитуды экспрессии генов цитокинов.

Ключевые слова: макрофаги; гликолиз; NOD1; TLR4; фактор некроза опухолей

Статья поступила 28.01.2019. Принята в печать 16.02.2019.

Для цитирования: Муругина Н.Е., Будихина А.С., Максимчик П.В., Дагиль Ю.А., Балясова Л.С., Муругин В.В., Чкадуа Г.З., Пинегин Б.В., Пашенков М.В. Синергическое взаимодействие рецепторов NOD1 и TLR4 врожденного иммунитета: транскрипционные и метаболические аспекты. Иммунология. 2019; 40 (2): 9–16. doi: 10.2411/0206-4952-2019-12002.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 16-15-10314.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Murugina N.E.¹, Budikhina A.S.¹, Maximchik P.V.², Dagil Yu.A.¹,
Balyasova L.S.¹, Murugin V.V.¹, Chkadua G.Z.³, Pinegin B.V.¹, Pashenkov M.V.¹

Synergistic interactions of NOD1 and TLR4 receptors of innate immunity: transcriptional and metabolic aspects

¹ Laboratory of Clinical Immunology, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, 115522, Moscow, Russia

² Laboratory for Study of Apoptosis Mechanisms of Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia

³ Laboratory of Experimental Diagnostics and Biotherapy of Tumors, Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology, N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, 115478, Moscow, Russia

Agonists of NOD1 and TLR4 receptors synergistically activate a number of macrophage functions, particularly production of tumor necrosis factor (TNF). Here, we provide a first characteristics of glucose metabolism alterations upon combined stimulation of NOD1 and TLR4. Agonists of either receptor (N-acetyl-D-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-meso-diaminopimelic acid and lipopolysaccharide, respectively) enhanced main parameters of glycolysis including extracellular acidification rate, glucose consumption and lactate release. Alterations of these parameters upon combined stimulation did not exceed the sum of alterations upon stimulation of each individual receptor (additive and infra-additive interactions). At the same time, the combined stimulation synergistically enhanced pro-inflammatory cytokine mRNA expression at 4–9 h after addition of

Для корреспонденции
Пашенков Михаил Владимирович –
доктор медицинских наук,
и. о. заведующего лабораторией
клинической иммунологии
ФГБУ «ГНЦ Институт
иммунологии» ФМБА России,
Москва, Россия
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

For correspondence
Pashenkov Mikhail V. – MD,
Acting Head of Clinical
Immunology Laboratory, NRC
Institute of Immunology FMBA
of Russia, Moscow, Russia
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

stimuli. It can be assumed that metabolic reprogramming supports synergistic enhancement of cytokine production upon simultaneous stimulation of NOD1 and TLR4; however, the origin of this synergy lies in the increased duration and/or amplitude of cytokine gene expression.

Keywords: macrophages; muramyl peptides; NOD1; TLR4; tumor necrosis factor

Received 28.01.2019. **Accepted** 16.02.2019.

For citation: Muragina N.E., Budikhina A.S., Maximchik P.V., Dagil Yu.A., Balyasova L.S., Muragin V.V., Chkadua G.Z., Pinegin B.V., Pashenkov M.V. Synergistic interactions of NOD1 and TLR4 receptors of innate immunity: transcriptional and metabolic aspects. *Immunologiya*. 2019; 40 (2): 9–16. doi: 10.2411/0206-4952-2019-12002. (in Russian)

Acknowledgments. The work is executed at financial support of Russian Science Foundation grant No. 16-15-10314.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Врожденная иммунная система определяет микробную инвазию с помощью паттерн-распознающих рецепторов (ПРР), агонистами которых являются консервативные структуры микробов – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП). Механизмы функционирования отдельно взятых ПРР за последние 20 лет изучены достаточно подробно, однако патогены, как правило, содержат несколько ПАМП, которые активируют несколько типов ПРР. Характер врожденного иммунного ответа при инфекциях определяется именно взаимодействиями ПРР [1].

Одним из распространенных вариантов взаимодействия между ПРР является синергизм, при котором ответ на сочетанную стимуляцию двух ПРР превышает сумму ответов на стимуляцию каждого ПРР по отдельности. В частности, хорошо описан синергизм между толл-подобными рецепторами (TLR), распознающими различные ПАМП бактериального и вирусного происхождения [2], и двумя представителями семейства NOD-подобных рецепторов – NOD1 и NOD2 (оба распознают фрагменты пептидогликана бактерий – мурамилпептиды) [3]. В совокупности эти рецепторы вносят основной вклад в распознавание бактериальных патогенов. Синергическая индукция цитокинов сочетаниями агонистов NOD1/NOD2 и TLR продемонстрирована как на моделях человеческих и мышиных клеток *in vitro* [4–11], так и на экспериментальных животных [12–14]. Введение мышам комбинации агониста NOD1 (лауроил-изоглутамил-мезо-диаминопимелиновой кислоты) и TLR5 (фрагмента белка флагеллина) дает 80% защиту от летальной дозы высоковирулентной бактерии *S. typhimurium*, в то время как каждый компонент в отдельности защитным эффектом не обладает [14]. Кроме того, синергизм может играть роль и в патогенезе сепсиса, когда в тканевые жидкости и в кровоток высвобождаются чрезмерные количества агонистов TLR и NOD1/NOD2 [15]; синергическое взаимодействие этих агонистов может быть одной из причин гиперпродукции цитокинов, ведущей к развитию системного воспалительного синдрома в первой (гипервоспалительной) фазе сепсиса. Эти данные подчеркивают практическую значимость синергизма NOD–TLR. Однако необходимо отметить, что механизмы синергического взаимодействия NOD–TLR во многом остаются неясными.

При активации клеток врожденной иммунной системы происходит перестройка их метаболизма, или метаболическое репрограммирование, которое является базисом для других процессов, протекающих в активированных клетках [16, 17]. В частности, при активации макрофагов и дендритных клеток липополисахаридом (ЛПС), который является агонистом TLR4, наблюдается интенсификация гликолиза с переходом клеток на так называемый аэробный гликолиз [16, 18]. При аэробном гликолизе, несмотря на достаточное поступление кислорода в клетку, основным источником энергии является гликолиз (который не требует присутствия кислорода). Несмотря на более низкую энергоэффективность, реакции гликолиза генерируют АТФ быстрее, чем реакции окислительного фосфорилирования, а также являются поставщиками метаболитов в биосинтетические процессы, необходимые для синтеза регуляторных и эффекторных молекул [19, 20]. Аэробный гликолиз считается метаболической основой воспаления [16]. Однако вклад метаболического репрограммирования в синергические взаимодействия ПРР, в частности взаимодействия NOD–TLR, пока не известен.

Мы впервые изучили изменения метаболизма глюкозы в макрофагах при раздельной и сочетанной стимуляции агонистом рецептора NOD1 (N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамил-мезо-диаминопимелиновой кислоты, или М-триДАП [3]) и агонистом TLR4 (ЛПС). Для более полного описания эффектов сочетанной стимуляции измеряли также секрецию TNF и экспрессию мРНК основных провоспалительных цитокинов.

Материал и методы

Реактивы. Рекombинантный человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колоннестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) был закуплен у фирмы Miltenyi Biotec (ФРГ), М-триДАП – у Invivogen (США), ЛПС *E. coli* O111:B4, 2-дезоксиглюкоза (2-ДГ) и олигомицин – у Sigma (США). Полная культуральная среда (ПКС) представляла собой RPMI-1640 (Life Technologies, Великобритания) с добавлением 2 mM L-глутамин (Life Technologies) и 10% фетальной телячьей сыворотки (РАА, Австрия).

Получение и стимуляция макрофагов. Культуры макрофагов были получены путем 6-суточного культивиро-

вания моноцитов крови доноров с ГМ-КСФ, как описано ранее [21]. По истечении 6 сут клетки трипсинизировали, отмывали и подсчитывали. Для оценки продукции TNF клетки помещали в 96-луночные плоскодонные планшеты (SPL Life Sciences, Республика Корея) по 20 тыс. клеток на лунку, давали клеткам прикрепиться, после чего добавляли М-триДАП и/или ЛПС в различных концентрациях в дублях. Через 3 и 24 ч собирали супернатанты, в которых определяли уровни TNF, используя наборы реактивов для иммуноферментного анализа фирмы «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия).

Исследование потребления глюкозы и высвобождения лактата. Трипсинизированные макрофаги помещали в 24-луночные планшеты в количестве 250 тыс. клеток в 500 мкл ПКС на лунку, после чего добавляли растворы М-триДАП и ЛПС, приготовленные на ПКС. В лунки отрицательного контроля добавляли чистую ПКС. Планшеты инкубировали 24 ч при 37 °C в атмосфере 5% CO₂, после чего собирали супернатанты. Концентрацию глюкозы в супернатантах и в ПКС определяли на биохимическом анализаторе Synchron CX5 Pro (Beckman Coulter, США). Потребление глюкозы одной клеткой за 24 ч рассчитывали по формуле $ПГ = (C_{ПКС} - C_{супернатант}) \cdot 5 \cdot 10^{-4} / 250\,000$, где $5 \cdot 10^{-4}$ – объем культуры (в литрах), 250 000 – количество клеток в культуре. Результаты нормализовали по количеству клеточного белка, принимая количество белка в нестимулированной лунке в данном опыте за 100%. Концентрации лактата измеряли колориметрическим методом с помощью набора реактивов фирмы Biovision (США). Высвобождение лактата в расчете на клетку вычисляли аналогично потреблению глюкозы.

Анализ клеточного метаболизма в реальном времени. Скорость закисления внеклеточной среды (extracellular acidification rate – ECAR) и скорость потребления кислорода (oxygen consumption rate – OCR) измеряли на приборе Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent Technologies, США). ECAR и OCR отражают интенсивность, соответственно, гликолиза и митохондриального дыхания. Изменения pH и содержания кислорода фиксируются чувствительными датчиками в тонком слое среды, прилегающем к клеточному монослою. Макрофаги высевали в планшеты Seahorse XF96 (Agilent) в количестве 16 000 клеток на лунку в 80 мкл ПКС. Наутро производили замену ПКС на специальную среду, представляющую собой XF base medium (Agilent) с добавлением 2 mM L-глутамина, 11 mM D-глюкозы (Sigma) и 10% фетальной телячьей сыворотки. После уравнивания pH в инкубаторе с атмосферным воздухом планшеты переносили в прибор. ECAR и OCR измеряли каждые 9 мин (продолжительность измерений – 3 мин). После 3 базальных измерений впрыскивали стимуляторы (растворы М-триДАП, ЛПС или среду) и делали еще 22 измерения. Результаты нормализовали по клеточному белку. Вычисляли площади под кривыми «время–ответ» (AUC) после добавления стимуляторов.

Исследование экспрессии генов с помощью полимеразной цепной реакции обратного транскрипта в ре-

альном времени (ПЦР-РВ). Экспрессию генов *TNF*, *ИЛ-6* и *ИЛ-1β*, в соответствии с международной номенклатурой генов в макрофагах анализировали с помощью ПЦР-РВ, как описано ранее [21]. Относительную экспрессию (ОЭ) генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Референс-образцами, в которых ОЭ всех генов равнялась 1, служили нестимулированные клетки данного донора. В качестве нормировочного гена использовали GAPDH.

Вестерн-блоттинг. Методика подробно описана ранее [21]. Для определения фосфорилированных форм протеинкиназ Akt (pT308 и pS473), p70-S6K (pT389), p38 (pT180/pY182), MNK (pT197/pT202) и фосфорилированной формы фактора инициации трансляции eIF4E (pS209) использовали поликлональные кроличьи антитела производства Cell Signaling Technologies (США), для определения фосфорилированной ERK1/2 (pT202/pY204) – мышиные моноклональные антитела той же фирмы. А-тубулин определяли с помощью мышиных моноклональных антител (клон DM1A) производства Novus Biologicals (США). Денситометрический анализ выполняли с помощью программы ImageJ (США). Интенсивности специфических полос нормализовали по α-тубулину. Относительные уровни белков рассчитывали как отношение нормализованных интенсивностей полос в стимулированных и в нестимулированных клетках.

Обработка данных и статистический анализ. Для оценки взаимодействия двух агонистов вычисляли индексы синергизма (ИС) по формуле:

$$ИС = \text{Ответ} (C1, C2) / [\text{Ответ} (C1) + \text{Ответ} (C2)],$$

где Ответ (C1, C2) – ответ клеток на стимуляцию сочетанием агонистов 1 и 2 в концентрациях C1 и C2 соответственно, Ответ (C1) и Ответ (C2) – ответы на стимуляцию агонистом 1 в концентрации C1 и агонистом 2 в концентрации C2. Взаимодействие считали синергическим при $ИС > 1$ с достоверностью $p < 0,05$ в *t*-тесте Стьюдента. Взаимодействие считали аддитивным при отсутствии достоверного отличия ИС от 1 (простая суммация эффектов агонистов). Взаимодействие считали инфрааддитивным, если эффект сочетания агонистов был меньше, чем сумма эффектов одиночных агонистов ($ИС < 1$ при $p < 0,05$), но не меньше, чем эффект любого одиночного агониста. Для статистического анализа использовали программу GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, США).

Результаты

Продукция TNF при сочетанной стимуляции макрофагов агонистами NOD1 и TLR4. Уровни TNF в супернатантах макрофагов определяли через 3 и 24 ч после добавления М-триДАП и ЛПС в различных концентрациях отдельно и в сочетаниях. Как видно из рис. 1, А и табл. 1, через 3 ч после начала стимуляции имеет место простая суммация эффектов двух агонистов (аддитивное взаимодействие, ИС достоверно не отличаются от 1). Однако через 24 ч синергический эффект очевиден

Таблица 1. Индексы синергизма (по продукции TNF) при сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС в указанных концентрациях ($M \pm \sigma$; $n = 4$)

ЛПС, нг/мл	3 ч			24 ч		
	М-триДАП, мкг/мл			М-триДАП, мкг/мл		
	0,1	1	10	0,1	1	10
0,1	$0,62 \pm 0,2$	$1,04 \pm 0,41$	$1,31 \pm 0,36$	$0,99 \pm 0,52$	$2,48 \pm 0,98$	$2,36 \pm 0,68^*$
1	$0,68 \pm 0,32$	$1,07 \pm 0,68$	$1,19 \pm 0,2$	$1,61 \pm 0,29^*$	$4,18 \pm 1,16^*$	$3,87 \pm 0,56^{**}$
10	$0,71 \pm 0,21$	$0,75 \pm 0,31$	$1,32 \pm 0,32$	$1,43 \pm 0,32$	$3,81 \pm 1,49^*$	$3,82 \pm 0,76^{**}$
100	$0,88 \pm 0,22$	$0,92 \pm 0,58$	$1,01 \pm 0,17$	$1,39 \pm 0,17^*$	$3,83 \pm 0,29^{***}$	$3,66 \pm 0,71^{**}$

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – отличие от 1, $p < 0,05$; ** – отличие от 1, $p < 0,01$; *** – отличие от 1, $p < 0,001$.

(ИС в большинстве случаев > 2 ; см. табл. 1). Таким образом, судя по продукции TNF, агонисты NOD1 и TLR4 взаимодействуют синергически, однако синергизм проявляется на относительно поздних сроках активации клетки.

Экспрессия TNF, ИЛ-6, ИЛ-1 β – при сочетанной стимуляции агонистами NOD1 и TLR4. Далее изучали экспрессию мРНК TNF, ИЛ-6 и ИЛ-1 β – в макрофагах при стимуляции М-триДАП, ЛПС и их сочетании. М-триДАП и ЛПС использовали в концентрациях, соответственно, 10 мкг/мл и 10 нг/мл (концентрации, дающие выраженный синергический эффект по продукции TNF, – см. рис. 1, А и табл. 1). Как видно из рис. 1, Б и табл. 2, через 1 ч после добавления стимуляторов синергическая индукция мРНК еще отсутствует, наблюдается простая сумма эффектов двух агонистов. Однако

в более поздних точках (4 и 9 ч) наблюдается синергическое взаимодействие агонистов (см. табл. 2).

Таким образом, данные по экспрессии мРНК согласуются с данными по продукции TNF, учитывая, что наработка и секреция белкового продукта гена запаздывает по сравнению с экспрессией мРНК.

Изменения метаболизма глюкозы при стимуляции М-триДАП и ЛПС. В процессе гликолиза 1 молекула глюкозы расщепляется до 2 молекул пирувата. Последний частично или полностью превращается в лактат, который высвобождается из клетки, вызывая закисление внеклеточной среды. Динамику скорости закисления среды (ECAR) измеряли в течение ≈ 3 ч с момента добавления М-триДАП и ЛПС. Оба агониста вызывали дозозависимое повышение (ECAR) (рис. 2, А, Б).

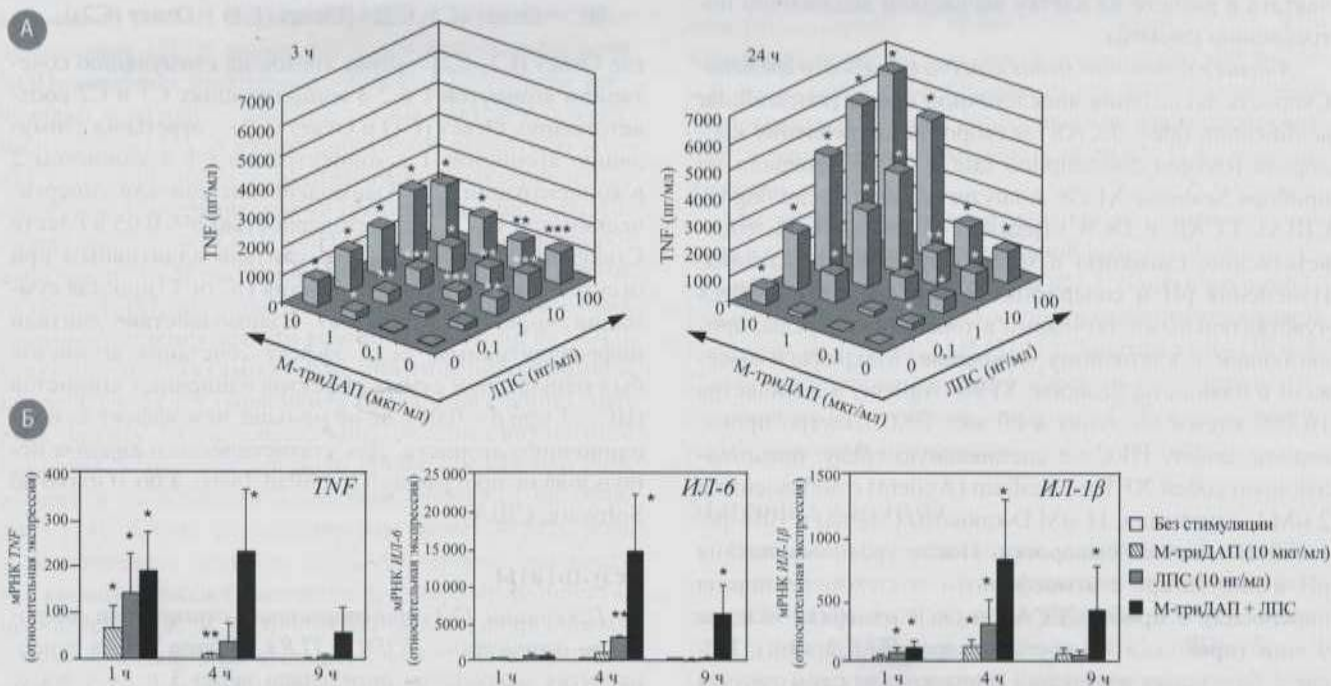


Рис. 1. Индукция экспрессии цитокинов в макрофагах человека при раздельной и сочетанной стимуляции агонистом NOD1 (М-триДАП) и TLR4 (ЛПС)

А – уровни TNF в супернатантах культур макрофагов через 3 и 24 ч после добавления агонистов в указанных концентрациях (средние значения, 4 донора); Б – экспрессия мРНК TNF, ИЛ-6 и ИЛ-1 β в указанные сроки после добавления М-триДАП и ЛПС ($M \pm \sigma$; $n = 4$). Значения достоверностей приведены для сравнения показателей при стимуляции с контролем (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ в t -тесте Стьюдента).

Таблица 2. Индексы синергизма (по экспрессии мРНК TNF, ИЛ-6 и ИЛ-1 β) при сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП (10 мкг/мл) и ЛПС (10 нг/мл) через 1, 4 и 9 ч после начала стимуляции ($M \pm \sigma$; $n = 4$)

Время, ч	Ген		
	TNF	ИЛ-6	ИЛ-1 β
1	1,03 $\pm$ 0,38	1,08 $\pm$ 0,27	1,31 $\pm$ 0,84
4	5,00 $\pm$ 1,59*	3,49 $\pm$ 0,37***	1,82 $\pm$ 0,15**
9	6,41 $\pm$ 1,95*	17,95 $\pm$ 5,16**	3,07 $\pm$ 2,15

При сочетанной стимуляции синергический эффект наблюдался только при самых низких концентрациях (табл. 3). Во всех остальных случаях имели место аддитивные эффекты (ИС достоверно не отличался от 1) либо инфрааддитивные эффекты (ИС < 1 при $p < 0,05$). Достоверных изменений скорости потребления кислорода клетками за период наблюдения не происходило (данные не показаны).

Также изучали потребление глюкозы и высвобождение лактата – два основных биохимических показателя гликолиза – за 24-часовой период после

Таблица 3. Индексы синергизма (по скорости закисления внеклеточной среды) при сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС в указанных концентрациях ($M \pm \sigma$; $n = 5$)

ЛПС, нг/мл	М-триДАП, мкг/мл		
	0,1	1	10
0,1	2,15 $\pm$ 0,06***	0,80 $\pm$ 0,36	1,07 $\pm$ 0,17
1	0,81 $\pm$ 0,22	0,74 $\pm$ 0,21	0,77 $\pm$ 0,20
10	1,02 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,17**	0,80 $\pm$ 0,04**

Примечание. ** – отличие от 1, $p < 0,01$; *** – отличие от 1, $p < 0,001$.

добавления агонистов. Прирост этих показателей происходил как при раздельной, так и при сочетанной стимуляции, причем при сочетанной он более выражен, чем при раздельной (рис. 2, В, Г), однако синергического эффекта тоже не наблюдалось. Так, ИС для потребления глюкозы составил $0,76 \pm 0,3$, для высвобождения лактата – $1,26 \pm 0,56$; оба индекса достоверно не отличались от 1, что говорит о простой суммации эффектов. Следует отметить, что при том же сочетании концентраций М-триДАП и ЛПС (10 мкг/мл и 10 нг/мл) наблюдалось мощное

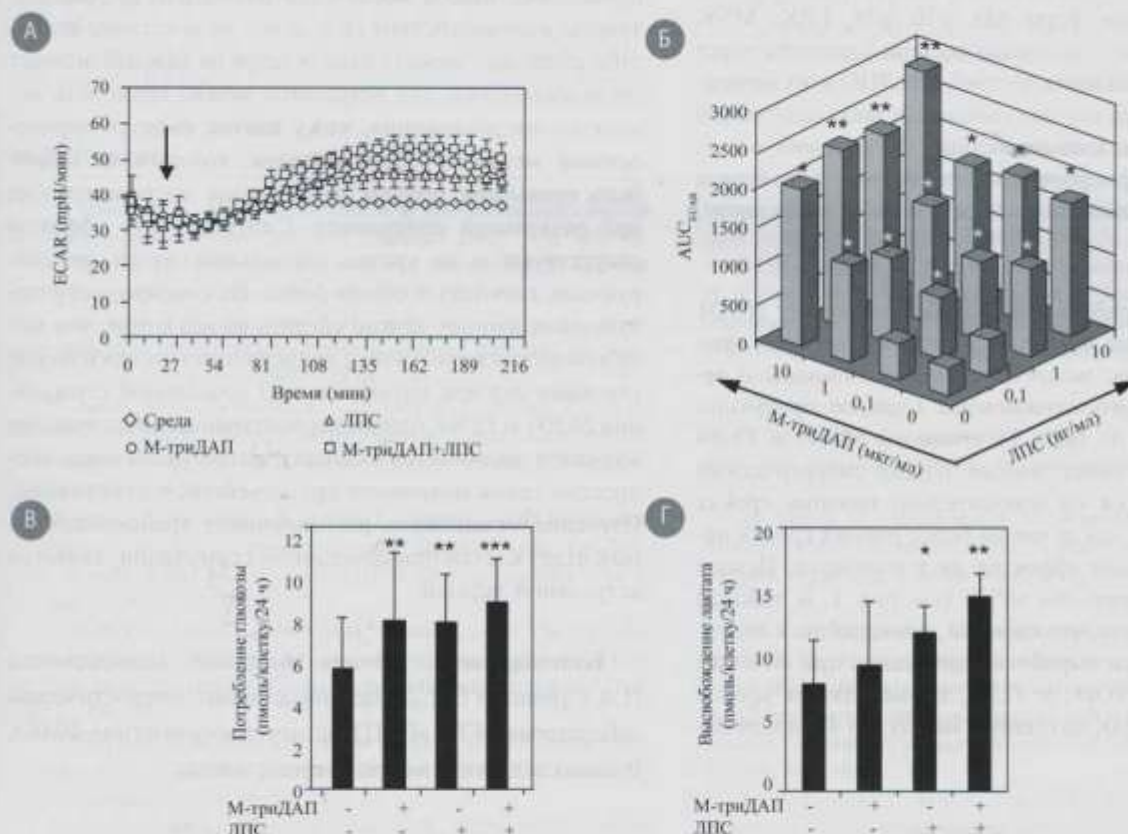


Рис. 2. Интенсификация гликолиза в макрофагах при сочетанной стимуляции М-триДАП и ЛПС

А – измерение скорости закисления среды (ECAR) в реальном времени после впуска (стрелка) среды, М-триДАП (10 мкг/мл), ЛПС (10 нг/мл) и их сочетания (результаты репрезентативного опыта; показаны $M \pm \sigma$ по 4 повторностям); Б – площади под кривыми ECAR (AUC_{ECAR}) при стимуляции сочетанием М-триДАП и ЛПС в указанных концентрациях (средние значения, 5 доноров); В – 24-часовое потребление глюкозы и Г – высвобождение лактата макрофагами при стимуляции М-триДАП (10 мкг/мл), ЛПС (10 нг/мл) и их сочетанием. $M \pm \sigma$; $n = 6$. Значения достоверностей приведены для сравнения показателей при стимуляции с контролем (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ в t -тесте Стьюдента).

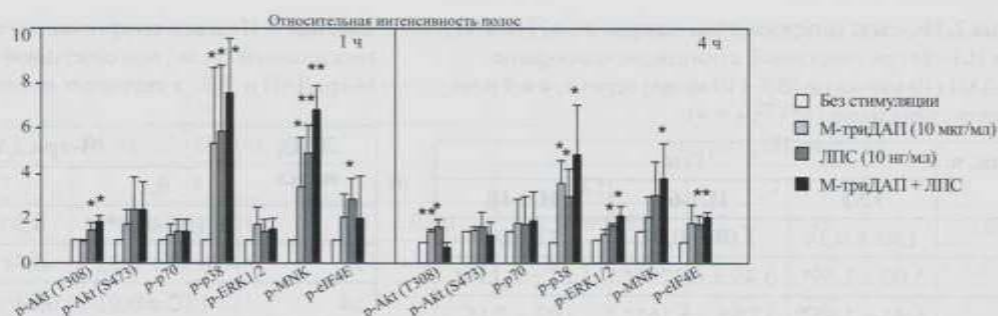


Рис. 3. Относительные уровни фосфорформ указанных белков при раздельной и сочетанной стимуляции М-триДАП и ЛПС в течение 1 и 4 ч ($M \pm \sigma$; $n = 4$)

Расчет относительных уровней фосфорформ приведен в разделе «Материал и методы». Значения достоверностей приведены для сравнения показателей при стимуляции с контролем (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ в t -тесте Стьюдента).

синергическое усиление продукции TNF и экспрессии основных провоспалительных цитокинов (см. выше).

Активация киназ, регулирующих метаболизм. Также оценивали активацию некоторых сигнальных путей, регулирующих клеточный метаболизм. Так, сигнальный путь Akt–mTOR–p70 отвечает за усиление синтеза белка и интенсификацию гликолиза (переход на аэробный гликолиз) в активированных клетках [18, 22]. Сигнальные пути p38–MNK–eIF4E и ERK–MNK–eIF4E участвуют в активации синтеза белка [21, 23]. Уровни фосфорилированных форм Akt, p70, p38, ERK, MNK и eIF4E оценивали с помощью вестерн-блоттинга через 1 и 4 ч после добавления М-триДАП, ЛПС и их сочетания (рис. 3). Во всех случаях наблюдали либо аддитивные и инфрааддитивные взаимодействия ($IC \leq 1$), либо отсутствие повышения фосфорилирования исследуемых белков при стимуляции; синергических эффектов не наблюдали.

Обсуждение

В настоящей работе взаимодействия между NOD1 и TLR4 изучены на нескольких уровнях, включая продукцию цитокинов, экспрессию генов цитокинов и регуляцию клеточного метаболизма. Судя по продукции TNF (см. рис. 1, А, табл. 1), агонисты NOD1 и TLR4 взаимодействуют синергически, однако синергический эффект развивается на относительно поздних сроках активации клетки, тогда как на более ранних сроках наблюдается суммация эффектов двух агонистов. Исходя из данных по экспрессии мРНК (см. рис. 1, Б, табл. 2) можно предполагать, что события, приводящие к синергической индукции выработки цитокинов при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4, происходят на уровне транскрипции мРНК цитокинов между 1 и 4 ч после начала стимуляции.

Врожденный иммунный ответ в первую очередь реализуется через синтез белковых молекул (цитокинов, антимикробных белков и т. д.), что требует усиления анаболических процессов. Агонисты NOD1 и TLR4 стимулируют аэробный гликолиз (см. рис. 2), который является поставщиком энергии, а также метаболитов для синтеза белка и фосфолипидных мембран [19]. Однако при сочетанной стимуляции агонистами NOD1 и TLR4 синергического усиления гликолиза в макрофагах не происходит, имеют место аддитивные или инфрааддитивные взаимодействия (т. е. ответ на сочетание агонистов равен или ниже суммы ответов на каждый агонист по отдельности). Эти результаты можно объяснить исходя из предположения, что у клеток имеется определенный метаболический потолок, который не может быть превышен, причем этот потолок достигается уже при раздельной стимуляции. Синергические эффекты отсутствуют и на уровне сигнальных путей, регулирующих гликолиз и обмен белка. Из совокупности полученных данных можно сделать вывод о том, что метаболическая перестройка поддерживает синергическое усиление синтеза цитокинов при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4, однако первопричина синергических эффектов заключается в синергическом увеличении экспрессии генов цитокинов при сочетанной стимуляции. Изучение механизмов, регулирующих транскрипционный ответ клетки при сочетанной стимуляции, является актуальной задачей.

Благодарность. Авторы выражают благодарность И.А. Суриной и Е.Н. Дроздовой (клинико-диагностическая лаборатория ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России) за помощь в определении глюкозы.

Литература

1. Trinchieri G., Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7 (3): 179–90.
2. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature.* 2004; 430 (6996): 257–63.
3. Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M., Blanot D. et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (43): 41 702–8.
4. Netea M.G., Ferwerda G., de Jong D.J., Jansen T. et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J. Immunol.* 2005; 174 (10): 6518–23.
5. Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C. et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35 (8): 2459–70.

6. Kim Y.G., Park J.H., Shaw M.H., Franchi L. et al. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2008; 28 (2): 246–57.
7. van Heel D.A., Ghosh S., Butler M., Hunt K. et al. Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35 (8): 2471–6.
8. van Heel D.A., Ghosh S., Hunt K.A., Mathew C.G. et al. Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut*. 2005; 54 (11): 1553–7.
9. van Beelen A.J., Zelinkova Z., Taanman-Kueter E.W., Muller F.J. et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*. 2007; 27 (4): 660–9.
10. Tada H., Aiba S., Shibata K., Ohteki T. et al. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect. Immun.* 2005; 73 (12): 7967–76.
11. Пичугин А.В., Багаев А.В., Лебедева Е.С., Чулкина М. и др. Синергическая продукция цитокинов дендритными клетками в ответ на одновременную активацию парами агонистов различных рецепторов врожденного иммунитета. *Иммунология*. 2017; 38 (2): 118–23.
12. Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., Alekseeva L. et al. Prevention of experimental septic shock by pretreatment of mice with muramyl peptides. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 1 (9–10): 1857–65.
13. Murch O., Abdelrahman M., Kapoor A., Thiemermann C. Muramyl dipeptide enhances the response to endotoxin to cause multiple organ injury in the anesthetized rat. *Shock*. 2008; 29 (3): 388–94.
14. Tikhvatulin A.I., Gitlin I.I., Shcheblyakov D.V., Artemicheva N.M. et al. Combined stimulation of Toll-like receptor

- 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF-kappaB, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 2013; 81 (10): 3855–64.
15. Kobayashi T., Tani T., Yokota T., Kodama M. Detection of peptidoglycan in human plasma using the silkworm larvae plasma test. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000; 28 (1): 49–53.
16. O'Neill L.A., Pearce E.J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J. Exp. Med.* 2015; 213 (1): 15–23.
17. Buck M.D., O'Sullivan D., Pearce E.L. T cell metabolism drives immunity. *J. Exp. Med.* 2015; 212 (9): 1345–60.
18. Everts B., Amiel E., Huang S.C., Smith A.M. et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IRKvarepsilon supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.* 2014; 15 (4): 323–32.
19. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009; 324 (5930): 1029–33.
20. Diskin C., Palsson-McDermott E.M. Metabolic modulation in macrophage effector function. *Front. Immunol.* 2018; 9: 270.
21. Pashenkov M.V., Balyasova L.S., Dagil Y.A., Pinegin B.V. The role of the p38-MNK-eIF4E signaling axis in TNF production downstream of the NOD1 receptor. *J. Immunol.* 2017; 198 (4): 1638–48.
22. Cheng S.C., Quintin J., Cramer R.A., Shephardson K.M. et al. mTOR- and HIF-1alpha-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*. 2014; 345 (6204): 1250684.
23. Waskiewicz A.J., Flynn A., Proud C.G., Cooper J.A. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J.* 1997; 16 (8): 1909–20.

■ References

1. Trinchieri G., Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7 (3): 179–90.
2. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004; 430 (6996): 257–63.
3. Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M., Blanot D. et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (43): 41 702–8.
4. Netea M.G., Ferwerda G., de Jong D.J., Jansen T. et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J. Immunol.* 2005; 174 (10): 6518–23.
5. Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C. et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35 (8): 2459–70.
6. Kim Y.G., Park J.H., Shaw M.H., Franchi L. et al. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2008; 28 (2): 246–57.
7. van Heel D.A., Ghosh S., Butler M., Hunt K. et al. Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35 (8): 2471–6.
8. van Heel D.A., Ghosh S., Hunt K.A., Mathew C.G. et al. Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut*. 2005; 54 (11): 1553–7.
9. van Beelen A.J., Zelinkova Z., Taanman-Kueter E.W., Muller F.J. et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*. 2007; 27 (4): 660–9.
10. Tada H., Aiba S., Shibata K., Ohteki T. et al. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on

- human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect. Immun.* 2005; 73 (12): 7967–76.
11. Pichugin A.V., Bagaev A.V., Lebedeva E.S., Chulкина M. et al. Synergistic cytokine production by murine dendritic cells in response to their simultaneous activation with pairs of agonists of different innate immune receptors. *Immunologia*. 2017; 38 (1): 118–23. (in Russian)
12. Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., Alekseeva L. et al. Prevention of experimental septic shock by pretreatment of mice with muramyl peptides. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 1 (9–10): 1857–65.
13. Murch O., Abdelrahman M., Kapoor A., Thiemermann C. Muramyl dipeptide enhances the response to endotoxin to cause multiple organ injury in the anesthetized rat. *Shock*. 2008; 29 (3): 388–94.
14. Tikhvatulin A.I., Gitlin I.I., Shcheblyakov D.V., Artemicheva N.M. et al. Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF-kappaB, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 2013; 81 (10): 3855–64.
15. Kobayashi T., Tani T., Yokota T., Kodama M. Detection of peptidoglycan in human plasma using the silkworm larvae plasma test. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000; 28 (1): 49–53.
16. O'Neill L.A., Pearce E.J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J. Exp. Med.* 2015; 213 (1): 15–23.
17. Buck M.D., O'Sullivan D., Pearce E.L. T cell metabolism drives immunity. *J. Exp. Med.* 2015; 212 (9): 1345–60.
18. Everts B., Amiel E., Huang S.C., Smith A.M. et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-

IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.* 2014; 15 (4): 323–32.

19. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009; 324 (5930): 1029–33.

20. Diskin C., Palsson-McDermott E.M. Metabolic modulation in macrophage effector function. *Front. Immunol.* 2018; 9: 270.

21. Pashenkov M.V., Balyasova L.S., Dagil Y.A., Pinegin B.V. The role of the p38-MNK-eIF4E signaling axis in TNF production

downstream of the NOD1 receptor. *J. Immunol.* 2017; 198 (4): 1638–48.

22. Cheng S.C., Quintin J., Cramer R.A., Shephardson K.M., et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*. 2014; 345 (6204): 1250684.

23. Waskiewicz A.J., Flynn A., Proud C.G., Cooper J.A. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J.* 1997; 16 (8): 1909–20.

© Коллектив авторов, 2019

Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н.

Морфологические характеристики белой пульпы и дендритных клеток селезенки при экспериментальном канцерогенезе

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», 428015, г. Чебоксары, Россия

Посредством гистологических методов изучена морфология и иммуногистохимия структур селезенки после курсового введения 1,2-диметилгидразина. Установлено, что через 1 мес после введения канцерогена в селезенке крыс регистрируется увеличение количества S100⁺-клеток в герминативных центрах лимфоидных узелков на фоне сокращения площади узелков и центров размножения, ширины маргинальных зон и периартериальных лимфоидных муфт. Кроме того, увеличивается общее количество вторичных лимфоидных узелков на фоне уменьшения их соотношения к первичным лимфоидным узелкам. Через 4 мес после курса инъекций канцерогена отмечается недостоверное уменьшение количества дендритных клеток в герминативных центрах по сравнению с интактными животными того же возрастного периода. Изменения морфологического фенотипа селезенки на этом сроке носят достоверный характер и заключаются в более выраженном сокращении площади лимфоидных узелков с их герминативными центрами, шириной периартериальных лимфоидных муфт и маргинальных зон, а также в увеличении количества вторичных лимфоидных узелков.

Ключевые слова: селезенка; канцерогенез; 1,2-диметилгидразин; белая пульпа; дендритные клетки

Статья поступила 05.08.2018. Принята в печать 16.11.2018.

Для цитирования: Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н. Морфологические характеристики белой пульпы и дендритных клеток селезенки при экспериментальном канцерогенезе. Иммунология. 2019; 40 (2): 17–22. doi: 10.24411/0206-4952-2019-12003.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Arlashkina O.M., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Mikhaylova M.N.

Morphological characteristics of white pulp and spleen dendritic cells at the experimental carcinogenesis

I.N. Ul'yanov Chuvash State University, 428015, Cheboksary, Russia

By means of histological methods the morphology and an immunohistochemistry of structures of a lien after course introduction 1,2-dimethylhydrazines is studied. It is established that in 1 month after administration of carcinogen in a lien of rats the augmentation of quantity of S100⁺-cells in the germinative the centers of lymphoid nodules against the background of reduction of both the area of nodules, and the centers of reproduction, width of marginal zones and periarterial lymphoid couplings is registered. Besides, the total of secondary lymphoid nodules against the background of decrease of their ratio to primary lymphoid nodules is enlarged. In 4 months after the termination of a course of injections of carcinogen doubtful decrease of quantity of dendritic cells in the germinative the centers in comparison with intact animals of the same age period becomes perceptible. Changes of a morphological phenotype of a lien on this term have reliable character and width of periarterial lymphoid couplings and marginal zones, and also augmentation of quantity of secondary lymphoid nodules consist in more expressed reduction of the areas of lymphoid nodules with their germinative centers.

Keywords: lien; carcinogenesis; 1,2-dimethylhydrazine; whitepulp; dendriticcells

Received 05.09.2018. Accepted for publication 16.11.2018.

For citation: Arlashkina O.M., Struchko G.Yu., Merkulov L.M., Mikhaylova M.N. Morphological characteristics of white pulp and spleen dendritic cells at the experimental carcinogenesis. Immunologiya. 2019; 40 (2): 17–22. doi: 10.24411/0206-4952-2019-12003.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Для корреспонденции
Арлашкина Ольга Михайловна –
аспирант кафедры инструментальной
диагностики с курсом фтизиатрии
ФГБОУ ВО «Чувашский
государственный университет
им. И.Н. Ульянова», Чебоксары,
Россия
E-mail: olgaruz1202@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0001-7686-5914>

For correspondence
Arlashkina Olga M. –
Post-Graduate Student,
Department of the Instrumental
Diagnostics Department
with a course of Phthisiology,
I.N. Ul'yanov Chuvash State
University, Cheboksary, Russia
E-mail: olgaruz1202@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0001-7686-5914>

В связи с появлением новых методов исследования в морфологии и усовершенствованием уже известных методик неуклонно растет интерес иммунологов к строению селезенки как важного и самого большого периферического органа иммунной системы [1]. Селезенка является органом иммуногенеза и лимфопоэза, в котором происходят антигензависимая дифференцировка иммунокомпетентных клеток, образование эффекторных клеток и клеток памяти, а также элиминация отживших и поврежденных кроветворных клеток [2]. Она имеет сложное анатомическое строение иммунокомпетентной белой пульпы, включая периартериальные лимфоидные муфты, лимфоидные узелки с герминативными центрами, периартериальной, мантийной и маргинальной зонами. Такое строение создает благоприятные условия для эффективного кооперированного взаимодействия клеток, участвующих в иммунном ответе [3]. Кроме Т- и В-лимфоцитов, формирующих соответствующие Т- и В-зависимые зоны, в белой пульпе селезенки присутствуют макрофаги, ретикулярные и дендритные клетки (ДК). В селезенке имеются ДК двух типов: интердигитирующие (в периартериальных зонах лимфоидных узелков) – клетки миелоидного происхождения, взаимодействующие с наивными Т-лимфоцитами и активизирующие Т-хелперы, а также супрессоры Т- и В-лимфоцитов; фолликулярные – клетки костномозгового происхождения, находятся в герминативных центрах лимфоидных узелков, не способны к передвижению, обеспечивают рост и дифференцировку В-лимфоцитам, принимают участие в образовании первичных лимфоидных узелков, образуя густую прочную сеть для них [4]. Некоторые авторы особо выделяют ДК центров размножения, которые также являются клетками не костномозгового происхождения, в отличие от фолликулярных, они способны к миграции [5].

В литературе имеются данные о том, что ДК селезенки активно принимают участие в противоопухолевом иммунном надзоре. Однако существуют противоречивые данные о функциональной направленности этих клеток в противоопухолевом иммунном ответе. Некоторые авторы считают, что селезеночные ДК обладают высоким противоопухолевым потенциалом и способны подавлять рост опухолевых клеток, тогда как дендритные клетки тимуса не обладают такой активностью [6]. Другие считают, что ДК селезенки, напротив, могут способствовать ускользанию опухоли от иммунного надзора [7].

Известно, что введение канцерогена запускает ряд процессов в организме, приводящих к определенным нарушениям в органах иммуногенеза [8]. Однако экспериментальные работы по изучению влияния канцерогена (1,2-диметилгидразина) на морфологию и ДК селезенки в частности проводятся сравнительно недавно, поэтому актуально углубленное изучение морфологической и иммуногистохимической картины тканей селезенки при экспериментальном канцерогенезе, индуцированном 1,2-диметилгидразином.

Цель исследования – изучить ДК и основные морфологические изменения тканей селезенки при введении 1,2-диметилгидразина через 1 и 4 мес после воздействия.

Материал и методы

Исследования выполнены на 70 белых нелинейных крысах-самцах. Животные содержались в виварии по нормам и правилам проведения работ с лабораторными животными согласно принципам Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Работа выполнена с сентября 2013 г. по февраль 2017 г. на базе ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова».

Животных разделили на 2 группы: 1-я – интактные ($n = 30$); 2-я – крысы с внутрибрюшинным введением 1,2-диметилгидразина 1 раз в неделю, 20 мг/кг, в течение 1 мес согласно модели R.F. Jacoby и соавт. (1991) ($n = 40$). Интактным животным для контроля вводили также внутрибрюшинно 1 раз в неделю в течение 1 мес изотонический раствор хлорида натрия. Животных выводили из эксперимента через 1 и 4 мес после окончания курса инъекций путем декапитации. В работе использовали селезенку только тех крыс, у которых аденокарцинома толстой кишки была подтверждена патоморфологически.

В работе использовали следующие методы:

1. *Иммуногистохимический метод с использованием коммерческого поликлонального антитела к белку S100 (DAKO, Дания).* Исследование выполняли в соответствии со стандартными протоколами. Тканевые срезы толщиной 3 мкм наносили на высокоадгезивные стекла с полилизиновым покрытием и высушивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Окрашивали ручным способом с использованием систем визуализации LeicaChromoPlex™ 1 DualDetectionfor BOND. Для контроля чувствительности и специфичности реакции использовали неиммунизированные сыворотки.

2. *Окраска гематоксилином и эозином для исследования морфологии селезенки и проведения морфометрических измерений.* Ткань селезенки фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч, промывали проточной водой, затем выполняли стандартную проводку на тканевом гистопроцессоре Leica ASP 200. После проводки кусочки ткани селезенки заливали в парафин и готовили парафиновые блоки. Парафиновые срезы селезенки толщиной 4 мкм наносили на отрицательно заряженные стекла Mentzel Glasses super frost и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

3. *Компьютерная морфометрия.* Цифровые снимки микропрепаратов получены с применением системы архивирования на базе микроскопа «МИКРОМЕД 3 ЛЮМ» с использованием цифровой фотокамеры и персонального компьютера с набором прикладных программ. Микрофотографии для проведения морфометрических измерений получены при увеличениях в 100 и 400 раз. Количественные морфометрические измерения выполнены с применением лицензионной программы «Микро-Анализ». Площадь мембранной и цитоплазматической иммуногистохимической реакции оценивали методом автоматического выделения и подсчета площади интересующего цветового спектра (окрашенного DAB) по отношению к площади снимка.

Затем числовые значения площади позитивной иммуногистохимической реакции переводили в процентное отношение к общей площади снимка. Для каждого среза выполнены измерения не менее чем в 10 интересующих полях зрения.

4. *Определение индексов, характеризующих морфо-функциональное состояние изучаемых структур белой пульпы селезенки* [9]:

а) герминативно-фолликулярный индекс (ГФИ) – для определения степени развития герминативных центров:

$$\text{ГФИ} = \frac{D_{\text{гц}}}{D_{\text{лф}}},$$

где $D_{\text{гц}}$ – диаметр герминативных центров, $D_{\text{лф}}$ – диаметр лимфоидных узелков;

б) индекс Керногана (ИК) – для определения пропускной способности микрососудов селезенки:

$$\text{ИК} = \frac{(2 \cdot L)}{D},$$

где L – толщина стенки центральной артериолы, D – внутренний диаметр центральной артериолы;

в) лимфоидный коэффициент (ЛК) – для определения соотношения Т- и В-зависимых зон:

$$\text{ЛК} = \frac{D_{\text{лф}}}{L_{\text{лм}}}$$

где $D_{\text{лф}}$ – диаметр лимфоидных узелков, $L_{\text{лм}}$ – ширина периаартериальных лимфоидных муфт.

5. *Статистическую обработку цифровых данных* проводили с помощью лицензионного пакета Microsoft Office 2003 (Word и Excel) и программы G-Stat, достоверность определяли по t -критерию Стьюдента. В работе приводятся следующие показатели: M – средняя арифметическая величина; m – средняя ошибка средней арифметической величины. Достоверными считали отклонения при $p < 0,05$ [10].

Результаты и обсуждение

В результате исследования выявлено, что канцерогенез, индуцированный введением 1,2-диметилгидразина, приводит к уменьшению массы крыс: через 1 мес после введения канцерогена на 20%, а через 4 мес – 24% (табл. 1). Изменение других антропометрических данных (длина тела, хвоста, ушей) носит недостоверный характер на обоих сроках воздействия канцерогена. Введение 1,2-диметилгидразина сопровождается уменьшением массы селезенки: через 1 мес после инъекций на 22%, а через 4 мес – на 27% (табл. 1).

При окраске срезов селезенки крыс гематоксилином и эозином визуализируется красная и белая пульпа. При этом доля красной пульпы от общей массы органа в среднем составляет 75–85%. В лимфоидных узелках белой пульпы интактных животных определяются центральная артерия, чаще расположенная эксцентрично и окруженная периаартериально Т-зависимой зоной, герминативный центр, мантийная и маргинальная зоны. Среди лимфоидных узелков встречаются первичные узелки без герминативных центров и вторичные с центрами размножения, появляющиеся только после антигенной стимуляции (рис. 1, А). Соотношение между вторичными и первичными лимфоидными узелками составляет 2,6 : 1 в одном поле зрения. При иммуногистологическом исследовании в герминативных центрах вторичных лимфоидных узелков определяются S100⁺-дендритные клетки, которые образуют стромальный каркас центров размножения (рис. 2).

При определении морфометрических показателей выявлено, что через 1 мес после курсового введения 1,2-диметилгидразина белая пульпа селезенки сохраняет зональное строение. Границы лимфоидных узелков и периаартериальных лимфоидных муфт сохраняются, однако становятся менее отчетливыми. Количество вторичных лимфоидных узелков изменяется недостоверно,

Таблица 1. Масса крыс и селезенки, морфометрические показатели белой пульпы селезенки и экспрессия белка S100 в структурах селезенки интактных крыс и животных через 1 и 4 мес после введения 1,2-диметилгидразина

Показатель	Интактные животные		Животные после введения 1,2-диметилгидразина	
	1 мес	4 мес	1 мес	4 мес
Масса крыс, г	175,25 ± 9,9	313,81 ± 19,4	136,83 ± 11,6**	237,57 ± 17,0**
Масса селезенки, мг	694,7 ± 27,7	818,54 ± 49,6	537,2 ± 61,2*	596,7 ± 61,4**
Площадь лимфоидных узелков, 10 ³ , мкм	470,21 ± 20,71	530,3 ± 31,2	402,77 ± 14,69**	394,21 ± 30,19***
Диаметр лимфоидных узелков ($D_{\text{лф}}$), мкм	620,85 ± 23,5	561,87 ± 22,9	502,33 ± 18,4***	437,71 ± 14,3***
Площадь герминативных центров, 10 ³ , мкм	49,31 ± 3,36	60,76 ± 3,5	38,9 ± 1,98**	49,45 ± 4,1*
Диаметр герминативных центров ($D_{\text{гц}}$), мкм	218,53 ± 8,5	202,025 ± 9,2	191,59 ± 8,3*	171,78 ± 5,9**
Ширина периаартериальных муфт ($L_{\text{лм}}$), мкм	118,31 ± 4,8	119,33 ± 3,3	125,06 ± 4,8	111,11 ± 3,9
Ширина маргинальных зон, мкм	121,36 ± 6,02	122,85 ± 2,7	118,35 ± 2,2	109,73 ± 2,1***
S100 ⁺ -клетки, %	21,82 ± 1,64	32,41 ± 2,42	44,57 ± 3,04***	31,72 ± 1,56
ГФИ	35,198	35,95	38,14	39,24
ЛК	5,24	4,7	4,01	3,93

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с интактными животными.

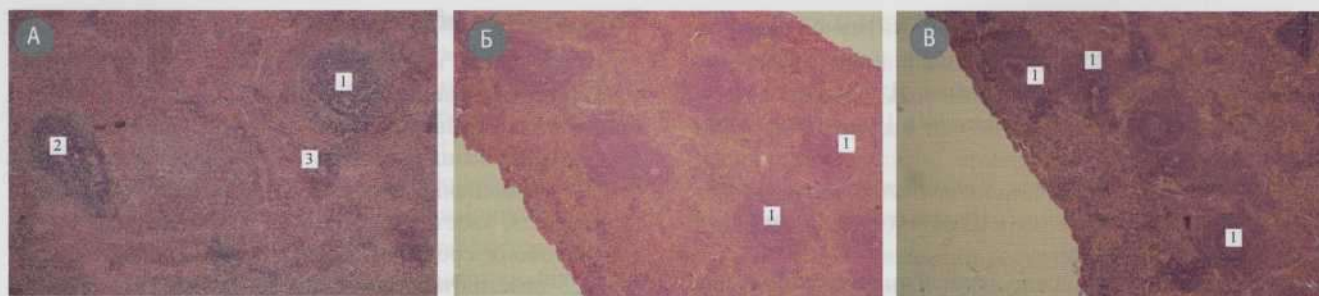


Рис. 1. Селезенка. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

А – селезенка интактной крысы: 1 – первичный лимфоидный узелок; 2 – вторичный лимфоидный узелок; 3 – периартериальная лимфоидная муфта; Б – селезенка крысы через 1 мес после введения 1,2-диметилгидразина: 1 – уменьшение соотношения между первичными и вторичными лимфоидными узелками; В – селезенка крысы через 4 мес после введения канцерогена: 1 – уменьшение количества первичных и увеличение количества вторичных лимфоидных узелков

а соотношение между первичными и вторичными составляет 1,7 : 1 (рис. 1, Б). ГФИ увеличивается, а ЛК, напротив, уменьшается, отражая напряженность гуморального иммунитета и отчасти Т-клеточного звена иммунного ответа, что может быть обусловлено преждевременной инволюцией тимуса при химическом канцерогенезе [11]. Однако на этом фоне происходит незначительное (на 14%) сокращение площади лимфоидных узелков, а их диаметр уменьшается на 19%. Площадь герминативных центров вторичных узелков уменьшается на 21%, а диаметр – на 12%. Замечено, что ширина маргинальной зоны и периартериальных лимфоидных муфт изменяется недостоверно (см. табл. 1). Диаметр центральной артерии уменьшается, а толщина стенок, напротив, увеличивается на 12%, что приводит к увеличению ИК (табл. 2), свидетельствующего о снижении пропускной способности центральной артерии.

При иммуногистохимическом исследовании были выявлены S100⁺-клетки как в герминативных центрах лимфоидных узелков, так и в небольшом количестве в мантийной зоне. Отмечено, что через 1 мес после введения канцерогена на фоне уменьшения площади и диаметра лимфоидных узелков происходит значительное увеличение ДК в них (рис. 3), вероятно, это может привести к уменьшению числа плазматиков и В-лимфоцитов (см. табл. 1). В литературе до сих пор встречаются противоречивые данные о распределении белка S100 в органах иммуногенеза. Одни авторы выделяют S100-отрицательные фолликулярные ДК и S100⁺-клетки периартериальных лимфоидных муфт [12]. В других исследованиях показано, что белок S100 об-

наруживается как в фолликулярных ДК, так и в интердигитирующих клетках, однако S100⁺-клетки все же доминируют в герминативных центрах [13].

Более значимые изменения наблюдаются через 4 мес после окончания курса инъекций канцерогена: лимфоидные узелки теряют правильную форму, контуры между зонами становятся более размытыми, стертыми. Количество вторичных лимфоидных узелков достоверно увеличивается в 2 раза, однако соотношение между ними и первичными узелками сокращается и составляет 1,5 : 1, что, возможно, свидетельствует об уменьшении антигенной стимуляции (рис. 1, В). ГФИ увеличивается более значимо по сравнению с предыдущим сроком, а ЛК изменяется незначительно (см. табл. 1). Площадь лимфоидных фолликулов сокращается, составляя 25%, что более значимо по сравнению с изменениями у предыдущего срока. Площадь герминативных центров вторичных фолликулов сокращается на 18%, а их диаметр – на 15%, однако количество S100⁺-клеток в них достоверно не изменяется. Ширина маргинальной зоны у животных через 4 мес после воздействия канцерогена достоверно сокращается на 11%, а ширина периартериальных лимфоидных муфт изменяется недостоверно (см. табл. 1). Диаметр центральной артерии уменьшается на 21%, а толщина стенок – на 28%, что, приводит к увеличению ИК, как и в предыдущем случае, (см. табл. 2). Такое нарушение микроциркуляции может свидетельствовать о снижении поступления клеток в селезенку в результате акцидентальной инволюции тимуса на введение 1,2-диметилгидразина [14].

Таблица 2. Морфологические характеристики центральной артерии лимфоидных узелков селезенки интактных крыс и животных через 1 и 4 мес после введения 1,2-диметилгидразина

Показатель	Интактные животные		Животные после введения 1,2-диметилгидразина	
	1 мес	4 мес	1 мес	4 мес
Внутренний диаметр (D), мкм	21,61 $\pm$ 1,2	16,47 $\pm$ 19,4	18,98 $\pm$ 1,3	13,28 $\pm$ 0,7*
Толщина стенки (L), мкм	15,9 $\pm$ 0,7	20,78 $\pm$ 1,5	17,82 $\pm$ 0,51*	15,6 $\pm$ 0,4***
ИК	1,47	2,52	1,87	2,83



Рис. 2. Селезенка интактной крысы
1 – скопление $S100^+$ -клеток в герминативных центрах лимфоидных узелков (окрашены коричневым). Иммуногистохимическая реакция клеток к белку $S100$, $\times 400$



Рис. 3. Селезенка крысы через 1 мес после введения 1,2-диметилгидразина
1 – увеличение количества $S100^+$ -клеток в герминативных центрах лимфоидных узелков (окрашены коричневым). Иммуногистохимическая реакция клеток к белку $S100$, $\times 400$

Таким образом, курсовое введение 1,2-диметилгидразина в дозе, эквивалентной развитию аденокарциномы толстой кишки, оказывает на селезенку значимое воздействие с разной степенью выраженности у исследуемых групп крыс. Через 1 мес после курса инъекций канцерогена происходит сокращение площади и диаметра лимфоидных узелков селезенки, уменьшение диаметра герминативных центров с увеличением количества $S100^+$ -клеток в них, ширина периатериальных лимфоидных муфт и маргинальной зоны сокращается

при уменьшении пропускной способности центральной артерии. Такие изменения сопровождаются напряжением гуморального и клеточного звеньев иммунного надзора, которое в свою очередь приводит к недостаточности противоопухолевого иммунного ответа. Более выраженные изменения через 4 мес после курса введения канцерогена могут свидетельствовать не только о более грубом нарушении противоопухолевого иммунного надзора, но и о возможном прогрессировании неопластических процессов.

■ Литература

1. Mebius R.E., Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5: 606–16.
2. Шапкин Ю.Г., Масляков В.В. Селезенка и иммунный статус организма. *Вестн. хир.* 2009; 168 (2): 110–3.
3. Balogh P., Horvath G., Szakal A.K. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J. Histochem. Cytochem.* 2004; 52 (1287): 98.
4. Хайтов Р.М. Физиология иммунной системы. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2000; 86 (3): 252–6.
5. Воробьев А.А., Быков А.С., Караулов А.В. Иммунология и аллергология: цветной атлас. М.: Практическая медицина. 2006; 64–74.
6. Shibazaki M., Nakamura M., Nitta Y., Endo Y. *Immunopharmacology.* 1998; 39 (1): 1–7.
7. Mailloux A.W., Young M.R. Regulatory T-cell trafficking: from thymic development to tumor-induced immune suppression. *Crit. Rev. Immunol.* 2010; 30 (5): 435–47.
8. Михайлова М.Н., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Кострова О.Ю. и др. Участие дендритных и нейроэндокринных клеток тимуса в развитии его инволюции при формировании экспериментальной опухоли толстой кишки. *Вестн. Чувашского ун-та.* 2011; 3: 377–83.

9. Волков В.П. Новый алгоритм морфометрической оценки функциональной иммуноморфологии селезенки. *Universum: Медицина и фармакология: электрон. науч. журн.* 2015; 5–6 (18) [Электронный ресурс]. URL: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/2341>. (дата обращения: 10.04.2017)
10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера, 2002.
11. Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Москвичев Е.В., Кострова О.Ю. и др. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика опухолей желудочно-кишечного тракта на фоне иммунной недостаточности. *Вестн. Чувашского ун-та.* 2011; 3: 450–6.
12. Wood G.S., Turner N.R., Shiurba R.A., Eng L. et al. Human dendritic cells and macrophages: ill sit! Immunophenotypic definition of subsets that exhibit specific morphologic and microenvironmental characteristics. *Am. J. Pathol.* 1985; 119: 73–82.
13. Alos L., Navarrete P., Morente V. et al. *Mod. Pathol.* 2005; 18 (1): 127–36.
14. Москвичев Е.В., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Михайлова М.Н. и др. Иммуногистохимическая характеристика акцидентальной инволюции тимуса после спленэктомии. *Вестн. нац. мед.-хир. центра Н.И. Пирогова.* 2012; 7 (2): 40–3.

■ References

1. Mebius R.E., Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5: 606–16.
2. Shapkin Yu.G., Maslyakov V.V. Lien and immune status of an organism. *Vestnik khirurgii.* 2009; 168 (2): 110–3. (in Russian)
3. Balogh P., Horvath G., Szakal A.K. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J. Histochem. Cytochem.* 2004; 52 (1287): 98.

4. Khaitov R.M. Physiology of the immune system. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2000; 86 (3): 252–6. (in Russian)
5. Vorob'ev A.A., Bykov A.S., Karaulov A.V. Immunology and allergology: a color atlas. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2006; 64–74. (in Russian)
6. Shibazaki M., Nakamura M., Nitta Y., Endo Y. *Immunopharmacology.* 1998; 39 (1): 1–7.

7. Mailloux A.W., Young M.R. Regulatory T-cell trafficking: from thymic development to tumor-induced immune suppression. *Crit. Rev. Immunol.* 2010; 30 (5): 435–47.
8. Mikhaylova M.N., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Kostrova O.Yu., et al. The involvement of dendritic and neuroendocrine cells of the thymus in the development of its involution in the formation of an experimental colon tumor. *Vestnik Chuvashskogo universiteta*. 2011; 3: 377–83. (in Russian)
9. Volkov V.P. A new algorithm for the morphometric evaluation of the functional immunomorphology of the spleen. *Universum: Meditsina i farmakologiya: elektronnyy nauchnyy zhurnal*. 2015; 5–6 (18) [Electronic Resource]. URL: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/2341>. (date of access April 10, 2017). (in Russian)
10. Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. Application of the STATISTICA software package. Moscow: Media Sfera, 2002. (in Russian)
11. Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Moskvichev E.V., Kostrova O.Yu., et al. The morphological and immunohistochemical characteristic of tumors of digestive tract against the background of an immune failure. *Vestnik Chuvashskogo universiteta*. 2011; 3: 450–6. (in Russian)
12. Wood G.S., Turner N.R., Shiurba R.A., Eng L., et al. Human dendritic cells and macrophages: ill still immunophenotypic definition of subsets that exhibit specific morphologic and microenvironmental characteristics. *Am. J. Pathol.* 1985; 119: 73–82.
13. Alos L., Navarrete P., Morente V., et al. *Mod. Pathol.* 2005; 18 (1): 127–36.
14. Moskvichev E.V., Merkulova L.M., Struchko G.Yu., Mikhaylova M.N., et al. The immunohistochemical characteristic of an aksidentalny involution of a thymus after a splenectomy. *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo tsentra N.I. Pirogova*. 2012; 7 (2): 40–3. (in Russian)

Вакцины и вакцинация

© Коллектив авторов, 2019

Силкина М.В., Карцева А.С., Зенинская Н.А., Марьин М.А., Рябко А.К.,
Мунтян Я.О., Фирстова В.В., Шемякин И.Г., Дятлов И.А.

Анализ содержания плазмобластов в крови людей в разные сроки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
142279, г. Оболensk, Россия

Лечение сибирской язвы успешно проводят с использованием антибиотиков. Однако при легочной/кишечной форме или поздней стадии сибиреязвенной инфекции эффективность антибиотикотерапии резко падает. Это связано с накоплением в организме большого количества летального токсина, который и обуславливает летальный исход при сибирской язве. Летальный токсин состоит из протективного антигена (ПА) и летального фактора (ЛФ). При активной системной форме инфекции летальный токсин может быть нейтрализован только специфическими антителами к ПА и/или ЛФ. Один из подходов получения человеческих терапевтических моноклональных антител подразумевает выделение специфических плазмобластов из крови иммунных доноров. В норме содержание плазмобластов в кровотоке крайне низкое – от 0,2 до 5%. Увеличение плазмобластов в крови кратковременно, в зависимости от типа вакцины и пути ее введения оно наблюдается на 5–13-е сутки после вакцинации.

Цель работы – выявление времени транзиторного увеличения плазмобластов в крови доноров после вакцинации. В работе показано, что у 5 из 12 доноров, многократно иммунизированных вакциной сибиреязвенной живой сухой, на 5–8-е сутки детектировались антитела против протективного антигена и у 2 – антитела против летального фактора. Из 5 серопозитивных сывороток только 2 характеризовались способностью нейтрализовать летальный токсин в экспериментах *in vitro*. Максимальный транзиторный выброс плазмобластов с фенотипом CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD38⁺ в кровь регистрировался на 7-е сутки после иммунизации доноров вакциной живой сибиреязвенной сухой. Количество плазмобластов в этот срок увеличивалось до 6,9–14,6%. Предварительный анализ наличия антител в крови к ПА и ЛФ, а также оценка их нейтрализующей активности в отношении сибиреязвенного токсина позволит выбрать наиболее перспективного донора специфических плазмобластов для получения человеческих моноклональных антител к ПА или ЛФ.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*; плазмобласты; антитела; летальный токсин; токсин-нейтрализующая активность

Статья поступила 31.01.2019. Принята в печать 16.02.2019.

Для цитирования: Силкина М.В., Карцева А.С., Зенинская Н.А., Марьин М.А., Рябко А.К., Мунтян Я.О., Фирстова В.В., Шемякин И.Г., Дятлов И.А. Анализ содержания плазмобластов в крови людей в разные сроки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой. Иммунология. 2019; 40 (2): 23–29. doi: 10.24411/0206-4952-2019-12004.

Финансирование. Работа проведена в рамках работы по Государственному контракту № 13-Д от 28.08.2018 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Silkina M.V., Kartseva A.S., Zeninskaya N.A., Marin M.A., Ryabko A.K.,
Muntyan Ya.O., Firstova V.V., Shemyakin I.G., Dyatlov I.A.

Analysis of plasmoblasts in the human blood at different times after immunization with live anthrax vaccine

Science State research center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, 142279, Obolensk, Russia

Anthrax treatment is successfully carried out with the use of antibiotics. However, in cases of pulmonary, intestinal forms or late stages of anthrax infection, the effectiveness of antibiotic therapy drops sharply. This is due to the accumulation in the body of a large number of lethal toxin, which causes death. The lethal toxin consists of a protective antigen (PA) and a lethal factor (LF). At the active systemic form of anthrax, the concentration of lethal toxin in the body increases and in this case, the toxin can be neutralized with specific antibodies to PA and/or LF. One approach to obtaining human therapeutic monoclonal antibodies involves the isolation of specific plasmoblasts from the blood of immune donors. Normally, the content

Для корреспонденции
Силкина Марина Владимировна –
младший научный сотрудник
лаборатории молекулярной
биологии, ФБУН «Государственный
научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии»
Роспотребнадзора, Оболensk,
Россия
E-mail: silkina@obolensk.org
<https://orcid.org/0000-0002-5329-2807>

of plasmablasts in the bloodstream is extremely low – from 0.2 to 5%. Depending on the type of vaccine and the route of its administration transient increase of plasmablasts in the blood is briefly observed on the 5–13 day after vaccination. The purpose of the work was to identify the time of the transient increase of plasmablasts in the blood of donors after vaccination. It was shown that in 5 out of 12 donors repeatedly immunized with the live antisera vaccine, antibodies against the protective antigen were detected and in two, antibodies against the lethal factor on 5–8 days after vaccination. The maximum transient release of plasmablasts in the blood with the phenotype $CD19^{+}CD20^{+}CD27^{hi}CD38^{hi}$ was found on the 7th day after immunization of donors with a live anthrax vaccine. The number of plasmablasts in this period increased to 6.9–14.6%. Preliminary detection of antibodies to PA and LF, as well as assessment of their neutralizing activity against the lethal toxin, will help select the most potential donors of specific plasma blasts in order to obtain human monoclonal antibodies to PA or LF.

Keywords: *Bacillus anthracis*; plasma blasts; antibodies; lethal toxin; toxinneutralizing activity

Received 31.01.2019. **Accepted** 16.02.2019.

For citation: Silkina M.V., Kartseva A.S., Zeninskaya N.A., Marin M.A., Ryabko A.K., Muntyan Ya.O., Firstova V.V., Shemyakin I.G., Dyatlov I.A. Analysis of plasmablasts in the human blood at different times after immunization with live anthrax vaccine (LAV). *Immunologiya*. 2019; 40 (2): 23–9. doi: 10.24411/0206-4952-2019-12004. (in Russian)

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the state contract № 13-D from 28.08.2018.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence

Silkina Marina V. –
Junior Researcher of Laboratory
of Molecular Biology, Science
State Research Center for Applied
Microbiology and Biotechnology
of Rospotrebnadzor, 142279,
Obolensk, Russia
E-mail: silkina@obolensk.org
<https://orcid.org/0000-0002-5329-2807>

Антибиотикотерапия сибирской язвы эффективна на ранних стадиях инфекции. На поздней стадии инфекции, а также при легочной и кишечной формах эффективность применения антибиотиков резко снижается [1]. Это связано с накоплением в крови 3-компонентного токсина сибирской язвы, состоящего из А- (летальный и отечный факторы) и В- (протективный антиген) субъединиц. Летальное действие сибиреязвенного токсина обусловлено прежде всего летальным токсином (ЛТ), состоящим из протективного антигена (ПА) и летального фактора (ЛФ) [2]. В связи с этим токсин-нейтрализующее действие при лечении сибирской язвы направлено прежде всего на нейтрализацию ЛТ. Так, ПА участвует в связывании токсина с рецептором, соответственно, при ингибировании ПА будет наблюдаться антитоксический эффект в отношении ЛФ и отечного фактора (ОФ). С использованием гибридной технологии получены моноклональные антитела мыши (МкАТ) к ПА и ЛФ. В экспериментах *in vitro* на мышинных макрофагоподобных клеточных линиях J774 и RAW 264.7 была показана токсин-нейтрализующая активность МкАТ против ЛТ [3]. Эффективность ингибирования токсина сибирской язвы подтверждена в опытах на мышинных моделях [4]. Это позволило предположить эффективность использования токсин-нейтрализующих антител в терапевтических целях.

Получение МкАТ мыши является рутинным методом и не вызывает трудностей. Однако использование мышинных МкАТ для терапии людей связано с рядом ограничений: высокая иммуногенность, низкая эффективность, быстрое выведение из организма. Одним из подходов к решению данной проблемы является получение гибридных клеток, синтезирующих МкАТ человека, что предполагает получение плазмобластов и слияние их с перевиваемой миеломной или гетеромиеломной клеткой. Большая сложность заключается в получении специфических плазмобластов человека

в связи с их низким содержанием ($\approx 0,2\%$ от всех мононуклеаров) в крови здоровых людей. Известно, что после вакцинации количество плазмобластов в кровотоке увеличивается до 5–6% и выше. Время транзитного выброса плазмобластов в кровоток определяется особенностями вакцинного препарата и наблюдается между 5–13-ми сутками после вакцинации.

Цель исследования – определить время, оптимальное для получения плазмобластов, у людей после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой.

Экспериментальная часть

Доноры. У людей, ежегодно иммунизированных вакциной сибиреязвенной живой сухой для подкожного и скарификационного применения (серия 265, Киров), на 0-е и 5, 6, 7, 8-е сутки после вакцинации брали цельную кровь в вакуумные пробирки Vacuette (Greiner-Bio-One, Австрия) с лития гепарином и активатором свертывания крови для получения сыворотки. Контролем при анализе содержания плазмобластов служили данные, полученные у этого же донора до вакцинации. Доноры, включенные в исследование, были иммунизированы не менее 2 раз. Интервал между крайней вакцинацией, предшествующей исследованию, и включением донора в данное исследование составлял 1 год. Группа сравнения при анализе титров антител к ПА и ЛФ состояла из 15 доноров, не иммунизированных и ранее не болевших сибирской язвой.

Выделение В-лимфоцитов. Гепаринизированную кровь инкубировали в пробирках в течение 20 мин с RossetSepTM Human B Cell Enrichment Cocktail (Stemcell technologies, Канада) из расчета 50 мкл реактива на 1 мл цельной крови. Затем кровь разводили в 2 раза средой RPMI 1640 («Пан Эко», Россия), наслаивали на градиент плотности RossetSepTM DM-L Density (Stemcell technologies, Канада) в соотношении 1 : 1 и центрифугировали в течение 20 мин при 1200 g с выключенным тормозом при комнатной температуре.

Полученное опалесцирующее кольцо на границе раздела двух сред собирали и дважды отмывали в среде RPMI 1640 при 300g в течение 10 мин, а затем ресуспендировали в полной питательной среде RPMI 1640, содержащей 2 мМ глутамин («ПанЭко», Россия), 10 мМ HEPES (Sigma, США), 25 мкМ 2-меркаптоэтанол (Sigma, США) и 2% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Thermo Fisher Scientific, США). Жизнеспособные клетки подсчитывали на автоматическом счетчике «ТС-20» (Bio-Rad, США) после окрашивания клеток трипановым синим (Invitrogen, США).

Фенотипирование лимфоцитов. Выделенные В-лимфоциты ($6 \cdot 10^6$ кл/мл) метили МкАТ CD19 BB515, CD20 APC-H7, CD27 APC, CD38-SF 594 (eBioscience, США) в соответствии с инструкцией производителя. Вкратце, образец клеток окрашивали в течение 20 мин в темноте при температуре 20 °С. Затем клетки отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS) и фиксировали 1% раствором формалина. Цитометрический анализ проводили на проточном цитофлуориметре «FACS Aria III» (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACS Diva (версия 8.0). В каждом образце анализировали 10 000 клеток.

Получение рекомбинантных антигенов. Рекомбинантные белки, ПА и ЛФ *Bacillus anthracis* получили в системе экспрессии *E. coli*. Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированные экспрессионной плазмидой pET22b(+)-ПА и pET22b(+)-ЛФ, наращивали в среде 2xYT, содержащей 0,1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина. Экспрессию белка проводили при 25 °С в течение 6 ч под воздействием индуктора IPTG. Для очистки бактериальную биомассу собирали центрифугированием. Осветленный лизат очищали на колонке с Ni-сефарозой с последующей доочисткой на гель-фильтрационной хроматографии. Чистоту полученных рекомбинантных белков проверяли в электрофорезе в ПААГ в денатурирующих условиях по методу Лэммли. Гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим (R-250), молекулярную массу полученных полос сравнивали с коммерческим маркером молекулярных масс. Концентрацию определяли на спектрофотометре Smart Spec Plus (BIO-RAD, США) при длине волны 280 нм.

Определение антител к протективному антигену и летальному фактору в сыворотке крови. На поверхности лунок поликарбонатного планшета иммобилизовали рекомбинантный белок ЛФ или ПА *B. anthracis*. Для этого в лунки планшета вносили по 100 мкл раствора рекомбинантных белков в концентрации 0,01 мг/мл, инкубировали в течение 2 ч при температуре 37 °С и перемешивании на орбитальном шейкере при скорости 300 об/мин. По окончании инкубации проводили 3-кратную отмывку лунок планшета PBS с добавлением 0,05% Tween-20 (PBS-Tween). Свободные валентности пластика блокировали обезжиренным молоком, внося его в объеме 200 мкл на лунку. Блокировку проводили в течение 1 ч при температуре 37 °С и перемешивании, после чего 3-кратно отмывали с использованием

PBS-Tween. Сыворотки доноров разводили в PBS в соотношениях от 1 : 25 до 1 : 3200 с 2-кратным шагом разведения и инкубировали в течение 1 ч на шейкере при температуре 37 °С, затем 3-кратно промывали PBS-Tween. В лунки планшета добавляли по 100 мкл конъюгата кроличьих антител против IgG человека с пероксидазой хрена (Sigma, США) в разведении 1 : 5000 в PBS. После часовой инкубации и 6-кратной отмывки планшета во все лунки вносили по 100 мкл субстрат-индикаторной смеси. Реакцию останавливали 2 М серной кислотой (50 мкл/лунку). Результаты учитывали на спектрофотометре «Smart Spec Plus» (BIO-RAD, США) при длине волны 492 нм.

Оценка токсин-нейтрализующей активности антител. Токсическая доза (ED100) ПА и ЛФ для клеточной линии J774A.1 была определена в предыдущих экспериментах и составила 100 нг/мл ЛФ и 500 нг/мл ПА.

В лунки 96-луночного планшета, содержащие адгезированные клетки макрофагоподобной линии J774A.1 в 85 мкл полной питательной среды DMEM (Thermo Fisher Scientific, США), вносили рекомбинантные ПА и ЛФ, предварительно инкубированные в течение 1 ч при 37 °С разными разведениями сывороток доноров. Сыворотки доноров титровали двойным шагом, начиная с разведения 1 : 25 до 1 : 200. В качестве положительного контроля использовали лунки без добавления токсина и антител, в качестве отрицательного – с добавлением 0,024% мертиолята натрия (Oskar Tropitzsch, Германия). Все исследуемые точки дублировали в 4 повторях. После внесения всех ингредиентов планшеты инкубировали 4 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе, а затем добавляли по 10 мкл 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид (MTT) и инкубировали еще 4 ч. Клеточный слой лизировали добавлением 175 мкл диметилсульфоксида (DMSO, Sigma-Aldrich, США). Оптическую плотность клеточного лизата измеряли на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США) при длине волны 540 нм.

Токсин-нейтрализующую активность сывороток определяли по жизнеспособности клеток, выражали в процентах и рассчитывали по формуле:

$$\text{Жизнеспособность клеток} = \frac{\text{OD(пробы)} - \text{OD(K}^-)}{\text{OD(K}^+) - \text{OD(K}^-)}$$

где K⁺ – лунки с добавлением 0,024% мертиолята натрия, а K⁻ – лунки без добавления токсина и антител; OD – оптическая плотность.

Показатель жизнеспособности клеток, составляющий 50%, считался пороговым для разграничения положительных и отрицательных результатов.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ Excel. Достоверность различия сравниваемых величин оценивали по критерию Стьюдента (*t*) и уровню вероятности безошибочного прогноза (*p*). Статистический анализ цитометрических данных проводили в программе BD FACS Diva (версия 8.0).

Результаты

Определение антител к протективному антигену и летальному фактору. Антитела к ПА и ЛФ и токсиннейтрализующую активность сывороток у доноров до иммунизации не выявляли. Анализ сывороток вакцинированных доноров показал, что у 5 из 12 вакцинированных доноров на 5–8-е сутки после иммунизации вакциной сибирезвеной живой сухой появлялись антитела к ПА (табл. 1). Уровень антител к ПА варьировал от 1 : 50 до 1 : 1600. Наличие антител к ПА не зависело от сроков забора крови после вакцинации и ее кратности. Антитела к ЛФ выявлены только у 2 многократно вакцинированных доноров, кровь которых взяли на исследование на 7-е сутки после иммунизации вакциной сибирезвеной живой сухой.

Определение токсин-нейтрализующей активности сывороток крови. Из 5 сывороток, в которых обнаружены специфические антитела к ПА, только 2 сыворотки характеризовались способностью нейтрализовать ЛТ *B. anthracis* в тесте *in vitro*, что проявлялось в защите от гибели 50% и более клеток линии J774 A.1 в присутствии ЛТ. Токсин-нейтрализующая активность сывороток проявлялась в разведениях от 1 : 25 до 1 : 100. Сыворотки контрольных доноров не обладали способностью нейтрализовать ЛТ, как и сыворотки, полученные от доноров, вакцинированных против сибирской язвы, у которых не выявлены антитела к ПА и ЛФ.

Анализ содержания плазматических клеток в разные сроки после вакцинации. В процессе дифференцировки В-лимфоцитов происходит изменение их фенотипа, по которому можно определить стадию созревания клеток, выделить субпопуляции плазматических клеток и В-клеток памяти. Плазматические клетки экспрессируют CD19-молекулу и незначительное количество CD20, а также усиленно

экспрессируют CD27- и CD38-молекулы. В процессе дальнейшей дифференцировки плазматические клетки могут полностью терять экспрессию CD19- и CD20-молекул. Таким образом, плазматические клетки могут иметь фенотипы: CD19⁺CD20^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi}, CD19⁺CD20^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi}, CD19⁺CD20^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi}.

Для определения содержания субпопуляции плазматических клеток мы гейтировали субпопуляции В-лимфоцитов по наличию/отсутствию CD19- и CD20-молекул и анализировали экспрессию на их поверхности CD27^{hi}CD38^{hi} (см. рисунок). Обнаружено, что только в субпопуляциях CD19⁺CD20^{lo} и CD19⁺CD20^{lo} выявлены клетки с высокой экспрессией CD27^{hi}CD38^{hi}. Данные подтверждены методом обратного гейтирования. Таким образом, основным фенотипом плазматических клеток, циркулирующих в крови людей в ранние сроки после иммунизации вакциной сибирезвеной живой сухой, имели субпопуляции CD19⁺CD20^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi} и CD19⁺CD20^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi}.

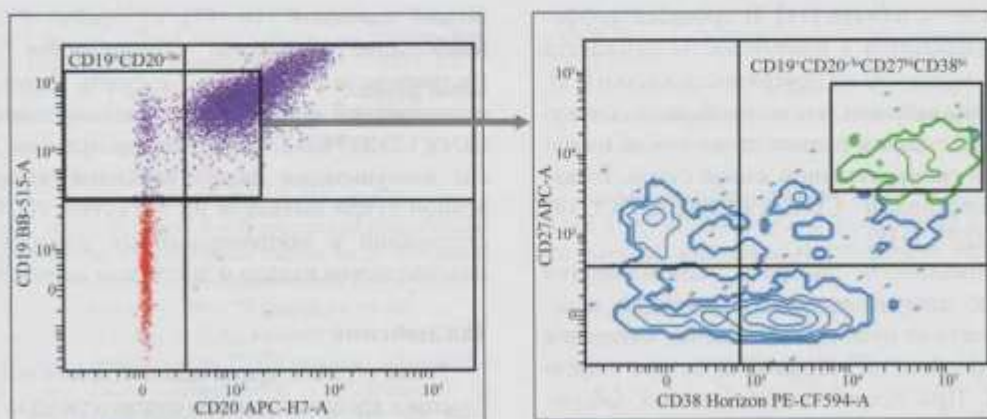
Анализ процентного содержания плазматических клеток с фенотипом CD19⁺CD20^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi} проводили в крови у людей на 5, 6, 7, 8-е сутки после вакцинации. Результаты исследований показали, что содержание плазматических клеток увеличивалось на 6, 7, 8-е сутки после вакцинации по сравнению с их содержанием до вакцинации (табл. 2).

Сравнительный анализ изменения количества плазматических клеток в крови доноров показал плавное нарастание количества плазматических клеток к 7-м суткам вакцинального процесса с последующим снижением их содержания на 8-е сутки после вакцинации (см. табл. 2). Таким образом, транзитное увеличение содержания субпопуляции CD19⁺CD20^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi} в крови доноров выявлено на 7-е сутки после их иммунизации вакциной сибирезвеной живой сухой.

Таблица 1. Титры антител IgG к протективному антигену (ПА), летальному фактору (ЛФ) в сыворотке крови доноров и ее токсин-нейтрализующая активность на 5–8-е сутки после иммунизации вакциной живой сибирезвеной сухой

№ донора (срок, сутки)	Токсин-нейтрализующая активность (% жизнеспособности клеток*)	Титры антител к		Кратность вакцинации
		ПА	ЛФ	
1 (5-е)	92	1600	Не обнаружено	> 10
2 (5-е)	14	Не обнаружено	Не обнаружено	2
3 (6-е)	15	200	Не обнаружено	> 20
4 (6-е)	21	Не обнаружено	Не обнаружено	3
5 (7-е)	11	400	800	> 20
6 (7-е)	13	50	Не обнаружено	> 20
7 (7-е)	13	Не обнаружено	Не обнаружено	2
8 (7-е)	22	Не обнаружено	100	9
9 (7-е)	51	50	Не обнаружено	> 10
10 (7-е)	25	Не обнаружено	Не обнаружено	> 10
11 (8-е)	19	Не обнаружено	Не обнаружено	2
12 (8-е)	17	Не обнаружено	Не обнаружено	> 10
Контроль (среднее значение от 15 доноров)	19 ± 10	Не обнаружено	Не обнаружено	

Примечание. * – значения жизнеспособности клеток получены при разведении сывороток 1 : 25.



Примеры двухпараметрических цитофлюорограмм, отражающих последовательное гейтирование субпопуляций CD19⁺CD20⁺ и CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD38⁺.

Таблица 2. Содержание субпопуляции CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD38⁺ в крови доноров на 5–8-е сутки после иммунизации вакциной сибирезвеной живой сухой

Содержание CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD38 ^{hi} CD27 ^{hi} до вакцинации												
Номер донора	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Содержание, %	0,6	2,8	1,5	2,1	2,5	3	3,2	1,9	2,8	2,7	1,2	0,9
Количество на 10 000 подсчитанных клеток	6	16	5	20	35	15	28	17	22	25	9	10
Содержание CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD38 ^{hi} CD27 ^{hi} после вакцинации												
Время после вакцинации, сут	5-е		6-е		7-е						8-е	
Номер донора	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Содержание, %	0,5	2,8	3,4	3,8	14,6	10,5	8,9	5,8	8,1	6,9	5,8	1,2
Количество на 10 000 подсчитанных клеток	5	20	7	80	90	34	62	42	52	36	16	61

Обсуждение

В-лимфоциты играют важную роль в формировании адаптивного иммунного ответа против патогенов, главным образом за счет способности синтезировать специфические антитела. Иммунизация вакциной живой сибирезвеной сухой индуцирует синтез антител, специфических к антигенам *B. anthracis* [5]. Результаты наших исследований показали, что на 5–8-е сутки после иммунизации вакциной живой сибирезвеной сухой у 5 из 12 доноров были выявлены антитела к ПА и у 2 из всех вакцинированных – к ЛФ. Все серопозитивные доноры были иммунизированы против сибирской язвы свыше 10 раз, что позволяет выдвинуть гипотезу о сохранении у них клеток памяти, способствующих быстрому синтезу специфических антител.

Основная роль антител к ПА и ЛФ заключается в нейтрализации ЛТ. Однако, как показали предыдущие исследования, не все антитела к ПА и ЛФ характеризуются токсин-нейтрализующей активностью [6]. В связи с этим сыворотку доноров проанализировали на способность нейтрализовать цитотоксическое действие ЛТ *in vitro* на клеточной линии J774.1. Сыворотка только 2 из 5 доноров ингибировала цитотоксическое действие ЛТ.

Появление антител в крови свидетельствует о том, что после первичного контакта с антигенами ПА и ЛФ в лимфатических узлах произошла дифференцировка лимфоцитов сначала в плазмбласты, а затем в плазматические клетки, синтезирующие специфические антитела. Короткоживущие плазматические клетки мигрируют из вторичных лимфоидных органов в костный мозг, где превращаются в долгоживущие плазматические клетки. В момент миграции плазмбластов в ниши иммунной системы, располагающихся в лимфатических узлах, костном мозге, селезенке или слизистых, ассоциированных с лимфатической тканью, их количество в кровяном русле увеличивается на короткий промежуток времени [7], что делает возможным выделение специфических плазмбластов из крови.

Фенотип плазмбластов определяется как CD19⁺CD20⁺CD27^{hi}CD38^{hi}, CD19⁺CD20⁺CD27^{hi}CD38^{hi} или CD19⁺CD20⁺CD27^{hi}CD38^{hi}. Так, CD38 и CD27 экспрессируются на большинстве плазмбластов в ярко выраженном количестве [8]. Молекула CD38 катализирует образование циклической АДФ-рибозы и НАДФ и регулирует Ca²⁺ в лимфоидной клетке [9]. Молекула CD27 – член семейства рецепторов факторов некроза опухоли, она индуцирует дифференцировку и способствует выживанию клетки [10] и экспрессируется на

большинстве В-клеток памяти [11]. В процессе дифференцировки В-лимфоцитов в плазмбласты снижается экспрессия CD20-молекулы на поверхности клетки [12]. В исследованиях мы выявили, что плазмбласты, циркулирующие в крови людей в ранние сроки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой, характеризовались фенотипами CD19⁺CD20^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi} и CD19⁺CD20^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi}.

Время максимального выброса плазмбластов в кровотоки после иммунизации или инфекции колеблется в зависимости от пути проникновения антигенов и кратности вакцинации/инфекции и характера инфекционного агента. При острых инфекционных заболеваниях, например, после заражения вирусами гриппа, количество плазмбластов после выхода их в кровь снижается до базового уровня медленно в течение 2–3 нед [13]. После вакцинации волонтеров против вируса Денге максимальный выброс плазмбластов в кровь наблюдали на 13-е сутки [14]. После вакцинации аттенуированным штаммом YF-17D, вызывающим желтую лихорадку [15], инактивированной противогрипп-

позной вакциной [16, 17], столбнячной вакциной [8] наибольшее количество плазмбластов у людей регистрировали на 6-е или 7-е сутки. Результаты наших исследований показали, что максимальное количество CD19⁺CD20^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi}-субпопуляции в крови после иммунизации людей вакциной живой сибиреязвенной сухой выявляли на 7-е сутки. На 8-е сутки исследований у вакцинированных доноров количество плазмбластов падало и достигало значений контроля.

Заключение

Таким образом, время максимального выброса плазмбластов в кровотоки доноров соответствовало 7-му дню после иммунизации вакциной живой сибиреязвенной сухой.

Предварительный анализ наличия антител в крови к ПА и ЛФ, а также оценка их нейтрализующей активности в отношении сибиреязвенного токсина позволит выбрать наиболее перспективного донора для получения специфических плазмбластов с целью получения человеческих МкАТ к ПА или ЛФ, способных нейтрализовать ЛТ.

Литература

1. Zasada A.A. Injectional anthrax in human: a new face of the old disease. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2018; 27 (4): 553–8.
2. Krantz B.A. Anthrax lethal toxin co-complexes are stabilized by contacts between adjacent lethal factors. *J. Gen. Physiol.* 2016; 148 (4): 273–5.
3. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н., Бахтеева И.В. и др. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: ГИГИЕНА, 2009.
4. Smith K., Crowe S.R., Garman L., Guthridge C.J. et al. Human monoclonal antibodies generated following vaccination with AVA provide neutralization by blocking furin cleavage but not by preventing oligomerization. *Vaccine.* 2012; 30 (28): 4276–83.
5. Chi X., Li J., Liu W., Wang X. et al. Generation and characterization of human monoclonal antibodies targeting anthrax protective antigen following vaccination with a recombinant protective antigen vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 22 (5): 553–60.
6. Kelly-Cirino C.D., Mantis N.J. Neutralizing monoclonal antibodies directed against defined linear epitopes on domain 4 of anthrax protective antigen. *Infect. Immun.* 2009; 77 (11): 4859–67.
7. Caraux A., Klein B., Paiva B., Bret C. et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica.* 2010; 95 (6): 1016–20.
8. Qian Y., Wei C., Eun-Hyung Lee F., Campbell J. et al. Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. *Cytometry B Clin. Cytometry.* 2010; 78 (Suppl 1): 69–82.
9. Partida-Sanchez S., Cockayne D.A., Monard S., Jacobson E.L. et al. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat. Med.* 2001; 7 (11): 1209–16.
10. Borst J., Hendriks J., Xiao Y. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; 17 (3): 275–81.
11. Wu Y.C., Kipling D., Dunn-Walters D.K. The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front. Immunol.* 2011; 2 (81): 1–12.
12. Jengo G., Bataille R., Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood.* 2001; 97 (6): 1817–22.
13. Wrammert J., Onlamoon N., Akondy R.S., Perng G.C. et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans. *J. Virol.* 2012; 86 (6): 2911–8.
14. Magnani D.M., Silveira C.G.T., Ricciardi M.J., Gonzalez-Nieto L. et al. Potent plasmablast-derived antibodies elicited by the National Institutes of Health Dengue Vaccine. *J. Virol.* 2017; 91 (22).
15. Querec T.D., Akondy R.S., Lee E.K., Cao W. et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat. Immunol.* 2009; 10 (1): 116–25.
16. Cox R.J., Brokstad K.A., Zuckerman M.A., Wood J.M. et al. An early humoral immune response in peripheral blood following parenteral inactivated influenza vaccination. *Vaccine.* 1994; 12 (11): 993–9.
17. Halliley J.L., Kyu S., Kobie J.J., Walsh E.E. et al. Peak frequencies of circulating human influenza-specific antibody secreting cells correlate with serum antibody response after immunization. *Vaccine.* 2010; 28 (20): 3582–7.

References

1. Zasada A.A. Injectional anthrax in human: a new face of the old disease. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2018; 27 (4): 553–8.
2. Krantz B.A. Anthrax lethal toxin co-complexes are stabilized by contacts between adjacent lethal factors. *J. Gen. Physiol.* 2016; 148 (4): 273–5.
3. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., Bakhteeva I.V. et al. Methods of studying the biological properties of the causative agent of anthrax. Moscow: GIGIENA; 2009. (in Russian)
4. Smith K., Crowe S.R., Garman L., Guthridge C.J. et al. Human monoclonal antibodies generated following vaccination with AVA provide neutralization by blocking furin cleavage but not by preventing oligomerization. *Vaccine.* 2012; 30 (28): 4276–83.
5. Chi X., Li J., Liu W., Wang X. et al. Generation and characterization of human monoclonal antibodies targeting anthrax protective antigen following vaccination with a recombinant protective antigen vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 22 (5): 553–60.

6. Kelly-Cirino C.D., Mantis N.J. Neutralizing monoclonal antibodies directed against defined linear epitopes on domain 4 of anthrax protective antigen. *Infect. Immun.* 2009; 77 (11): 4859–67.
7. Caraux A., Klein B., Paiva B., Bret C., et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica*. 2010; 95 (6): 1016–20.
8. Qian Y., Wei C., Eun-Hyung Lee F., Campbell J., et al. Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. *Cytometry B Clin. Cytometry*. 2010; 78 (Suppl 1): 69–82.
9. Partida-Sanchez S., Cockayne D.A., Monard S., Jacobson E.L., et al. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat. Med.* 2001; 7 (11): 1209–16.
10. Borst J., Hendriks J., Xiao Y. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; 17 (3): 275–81.
11. Wu Y.C., Kipling D., Dunn-Walters D.K. The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front. Immunol.* 2011; 2 (81): 1–12.
12. Jego G., Bataille R., Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood*. 2001; 97 (6): 1817–22.
13. Wrammert J., Onlamoon N., Akondy R.S., Perng G.C., et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans. *J. Virol.* 2012; 86 (6): 2911–8.
14. Magnani D.M., Silveira C.G.T., Ricciardi M.J., Gonzalez-Nieto L., et al. Potent plasmablast-derived antibodies elicited by the National Institutes of Health Dengue Vaccine. *J. Virol.* 2017; 91 (22): 2201–12.
15. Querec T.D., Akondy R.S., Lee E.K., Cao W., et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat. Immunol.* 2009; 10 (1): 116–25.
16. Cox R.J., Brokstad K.A., Zuckerman M.A., Wood J.M., et al. An early humoral immune response in peripheral blood following parenteral inactivated influenza vaccination. *Vaccine*. 1994; 12 (11): 993–9.
17. Halliley J.L., Kyu S., Kobie J.J., Walsh E.E., et al. Peak frequencies of circulating human influenza-specific antibody secreting cells correlate with serum antibody response after immunization. *Vaccine*. 2010; 28 (20): 3582–7.

© Коллектив авторов, 2019

Хонина Н.А.^{1,2}, Андреева Е.А.¹, Тихонова М.А.¹, Баторов Е.В.¹,
Останин А.А.¹, Пасман Н.М.², Черных Е.Р.¹**Интерлейкин-6 как возможный регулятор
интрафолликулярных Foxp3⁺-регуляторных Т-клеток
у женщин в цикле экстракорпорального оплодотворения**¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», 630099,
г. Новосибирск, Россия² ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», 630090,
г. Новосибирск, Россия

Регуляторные Foxp3⁺-Т-клетки (Treg) участвуют в индукции толерантности к аллоантигенам плода и формировании физиологической иммуносупрессии при беременности. Однако механизмы, влияющие на их содержание, особенно на ранних этапах репродуктивного процесса, до конца не выяснены. Данная работа посвящена исследованию связи между концентрацией ИЛ-6 и регуляторными Foxp3⁺-клетками в фолликулярной жидкости (ФЖ) женщин с различными параметрами фолликуло-/оогенеза, blastulation и исходами экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). В исследование включили 53 женщин с бесплодием, проходивших лечение методом ЭКО. Сбор образцов ФЖ из доминантных фолликулов проводили с помощью трансвагинальной ультразвуковой аспирации. Концентрацию ИЛ-6 в ФЖ оценивали методом проточной флюориметрии (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США). Относительное содержание CD4⁺Foxp3⁺- и CD4⁺Foxp3⁻-Т-клеток оценивали методом проточной цитометрии. Полученные данные показали, что повышенное содержание ИЛ-6 в ФЖ регистрируют у женщин с высоким числом фолликулов, ооцитов, низким качеством blastocysts и отрицательным исходом ЭКО. При этом высокое содержание в ФЖ ИЛ-6 сопряжено с низким количеством интрафолликулярных CD4⁺Foxp3⁺-клеток, относительное содержание которых обратно коррелирует с концентрацией ИЛ-6. В то же время взаимосвязь ИЛ-6 с количеством CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеток не выявлена. Таким образом, одной из причин снижения числа CD4⁺Foxp3⁺-клеток, играющих позитивную роль в регуляции ранних репродуктивных процессов, может являться высокая концентрация ИЛ-6 в ФЖ.

Ключевые слова: Foxp3⁺-Т-клетки; ИЛ-6; фолликулярная жидкость; ЭКО; бесплодие

Статья поступила 01.02.2019. Принята в печать 16.02.2019.

Для цитирования: Хонина Н.А., Андреева Е.А., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Останин А.А., Пасман Н.М., Черных Е.Р. Интерлейкин-6 как возможный регулятор интрафолликулярных Foxp3⁺-регуляторных Т-клеток у женщин в цикле экстракорпорального оплодотворения. Иммунология. 2019; 40 (2): 30–37. doi: 10.24411/0206-4952-2019-12005.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.Khonina N.A.^{1,2}, Andreeva E.A.¹, Tikhonova M.A.¹, Batorov E.V.¹, Ostanin A.A.¹,
Pasman N.M.², Chernykh E.R.¹**Interleukin-6 as a possible regulator of intrafollicular Foxp3⁺
T-cells in women undergoing IVF treatment**¹ Institute of Fundamental and Clinical Immunology, 630099, Novosibirsk, Russia² Novosibirsk State University, 630090, Novosibirsk, Russia

Regulatory Foxp3⁺ T cells (Treg) are involved in the induction of tolerance to fetal alloantigens and the formation of physiological immunosuppression during pregnancy. However, the mechanisms affecting their content, especially in the early stages of the reproductive process, remain unclear. This paper is devoted to the study of the relationship between the concentration of IL-6 and regulatory Foxp3⁺ T cells in the follicular fluid (FF) of women with different parameters of folliculo/oogenesis, blastulation and IVF outcomes. The study included 53 women with infertility undergoing IVF program. Collection of FF samples from dominant follicles was performed using transvaginal ultrasonic aspiration. The concentration of IL-6 in FF was assessed by flow fluorimetry (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, USA). The relative content of CD4⁺Foxp3⁺ and CD4⁺Foxp3⁻ T cells was assessed by flow cytometry.

For correspondence

Khonina Natalia A. – MD, PhD,
Leading Research Associate, Laboratory
of Cellular Immunotherapy, Institute
of Fundamental and Clinical
Immunology, Novosibirsk, Russia
E-mail: nkhonina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6757-3896>

The data obtained showed that increased IL-6 content in the FF is registered in women with a high number of follicles, oocytes, poor blastocyst quality and a negative IVF outcome. At the same time, the high content of IL-6 in FF is associated with a low number of intrafollicular CD4⁺FoxP3⁺ cells, which inversely correlates with the concentration of IL-6. At the same time, the relationship of IL-6 with the number of CD4⁺FoxP3⁺ T cells was not detected. Thus, one of the reasons for the decrease in the number of CD4⁺FoxP3⁺ cells that play a positive role in regulating early reproductive processes may be a high concentration of IL-6 in the FF.

Keywords: Foxp3⁺ T cells; IL-6; follicular fluid; IVF; infertility

Received 01.02.2019; Accepted 16.02.2019.

For citation: Khonina N.A., Andreeva E.A., Tikhonova M.A., Batorov E.V., Ostanin A.A., Pasman N.M., Chernykh E.R. Interleukin-6 as a possible regulator of intrafollicular FoxP3⁺ T-cells in women undergoing IVF treatment. Immunologiya. 2019; 40 (2): 30–7. doi: 10.24411/0206-4952-2019-12005. (in Russian)

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Интерлейкин-6 (ИЛ-6) относится к цитокинам, имеющим важное значение при воспалительном ответе. Одной из мишеней ИЛ-6 является регуляция баланса Foxp3⁺-регуляторных Т-клеток (Treg) и ИЛ-17-продуцирующих Т-хелперов (Th17) [1], играющих ключевую роль соответственно в иммуносупрессии и в воспалении [2]. Так, недавние исследования показали, что ИЛ-6 *in vitro* и *in vivo* подавляет генерацию Foxp3⁺-Treg из наивных Т-клеток, смещая баланс в сторону Th17 [3–6].

Возможная причастность ИЛ-6 к нарушению генерации Treg при беременности подтверждается данными о том, что снижение соотношения Treg/Th17 в крови женщин с привычным невынашиванием ассоциировано с повышенным уровнем в сыворотке крови ИЛ-6 [7]. Высокий уровень ИЛ-6 в фолликулярной жидкости (ФЖ) женщин, включенных в программу экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), негативно сказывается на исходах ЭКО [8]. Однако связан ли этот эффект с уменьшением Treg не ясно, поскольку данные о Treg в зависимости от исходов ЭКО немногочисленны, противоречивы и касаются исключительно субпопуляции CD4⁺-Т-клеток [9]. В то же время проведенные нами исследования показали, что повышенное количество фолликулов при стимуляции яичников, низкое качество ооцитов и blastocyst и негативные результаты ЭКО ассоциированы с низким содержанием Foxp3⁺-Т-клеток ФЖ. Причем эти изменения касаются клеток с фенотипом CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеток, т. е. локализованных в субпопуляции CD8⁺-Т-клеток [10].

Согласно данным литературы, количество CD4⁺-Treg подвержено циклическим изменениям и возрастает в позднюю лютеиновую фазу еще до момента имплантации эмбриона [11, 12]. Также показано, что наряду с иммуносупрессорной активностью Treg способствуют инвазии трофобласта и ремоделированию тканей [13]. Учитывая эти данные, можно полагать, что аналогично CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеткам CD4⁺Foxp3⁺-Т-клетки, являясь субпопуляцией Treg, также могут играть важную роль в регуляции ранних этапов репродукции, и негативный эффект повышенных концентраций ИЛ-6 в ФЖ может опосредоваться через подавление генерации

CD4⁺Foxp3⁺-Treg. Чтобы проверить это предположение в настоящей работе была исследована связь между концентрацией ИЛ-6 и Foxp3⁺-Treg в ФЖ женщин с различными параметрами фолликуло-/оогенеза, бластуляции и исходами ЭКО.

Материал и методы

В исследование включены 53 женщины с бесплодием, проходившие лечение методом ЭКО. Забор материала осуществляли на базе ООО «Клиника профессора Пасман», последующие исследования ФЖ проводили на базе НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ). Все исследования выполняли после письменного информированного добровольного согласия. Возраст женщин с бесплодием варьировал от 20 до 45 лет (медиана – 34,0), длительность бесплодия – от 1 года до 18 лет (медиана – 5,0). Первичное бесплодие диагностировали у 52%, вторичное – у 48% женщин. Процедура ЭКО проведена у 42% женщин, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (IntraCytoplasmic Sperm Injection, ICSI, ИКСИ) – у 58%. Через 36 ч с момента введения триггера овуляции ооциты извлекали с помощью трансвагинальной ультразвуковой аспирации и собирали образцы ФЖ из доминантных фолликулов. В случае видимой контаминации образцов ФЖ кровью исследование не выполняли. Образцы ФЖ центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость собирали, замораживали и хранили при температуре –80 °С. Концентрацию ИЛ-6 в ФЖ оценивали методом проточной флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Относительное содержание субпопуляций Т-клеток (CD4⁺Foxp3⁺ и CD4⁺Foxp3[–]) в образцах ФЖ оценивали методом проточной цитометрии, используя, анти-CD4 (PerCP, BD Biosciences, США) и анти-Foxp3 (PE, BD Biosciences, США) моноклональные антитела. Фиксацию и пермеабиллизацию клеток для оценки внутриклеточной экспрессии Foxp3 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных

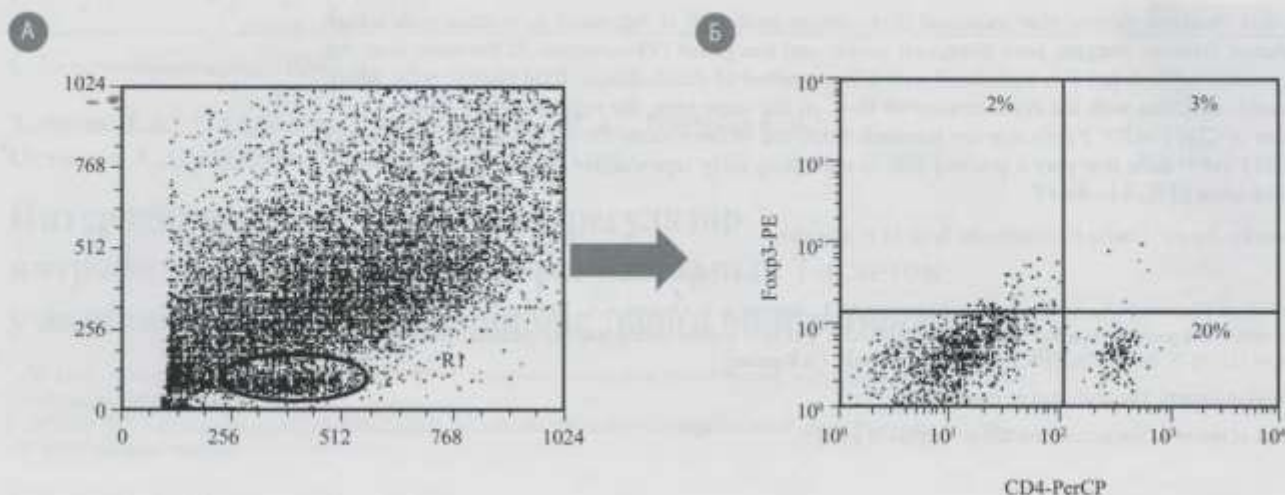


Рис. 1. Цитометрическая характеристика популяций Foxp3⁺-Т-клеток в фолликулярной жидкости женщины в цикле экстракорпорального оплодотворения

А – представлено общее лимфоцитарное облако из которого они выделены; Б – CD4⁺Foxp3⁺- и CD4⁺Foxp3⁻-Т-клетки (3 и 2% соответственно). Представлены данные репрезентативного наблюдения

CD4-антигенов; использовали коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабилзации Transcription Factor Buffer Set в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences, США). Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции по каналам FL-2 (PE), FL-3 (PerCP), (BD FACS Calibur, CellQuest Software, США) (рис. 1). В тексте относительное содержание CD4⁺Foxp3⁺- и CD4⁺Foxp3⁻-Т-клеток представлено в виде процента от количества лимфоцитов.

Качество эмбрионов морфологически оценивали по принятой классификации Gardner. Наступление беременности регистрировали при значениях хорионического гонадотропина > 5 Ед/мл на 14-й день после эмбриотрансфера. Индекс оплодотворения (ИО) рассчитывали исходя из формулы: ИО = количество оплодотворенных ооцитов/количество полученных ооцитов. Показатели статистически обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR, 25–75% квантили). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Известно, что терапевтический потенциал ЭКО во многом определяется состоянием овариального резерва, а также качеством полученных ооцитов и эмбрионов [14]. Поскольку ранее нами было показано, что при проведении ЭКО у женщин с высоким количеством фолликулов, низким качеством ооцитов и эмбрионов, а также с негативными исходами ЭКО отмечалось низкое содержание Foxp3⁺-Treg, важно было выяснить, связано ли это с более высоким содержанием в ФЖ ИЛ-6.

Исследование ИЛ-6 показало, что все образцы ФЖ женщины со стимулированной овуляцией содержали детектируемые концентрации данного цитокина, медианный уровень которого составлял 20,4 пг/мл (IQR 10–85,5 /мл). При этом следует отметить, что индивидуальные значения ИЛ-6 отличались широким разбросом, варьируя в диапазоне от 8,0 до 1890 пг/мл (рис. 2).

При сравнении женщин с различным содержанием овulatorных фолликулов отмечено, что концентрация ИЛ-6 в группе с высоким количеством фолликулов (> 12) была наиболее высокой (табл. 1), в 6 раз превышая медианный уровень ИЛ-6 у женщин с низким овариальным резервом (< 6), тогда как значимых различий в содержании Foxp3⁺-Т-клеток в зависимости от числа фолликулов не выявлено.

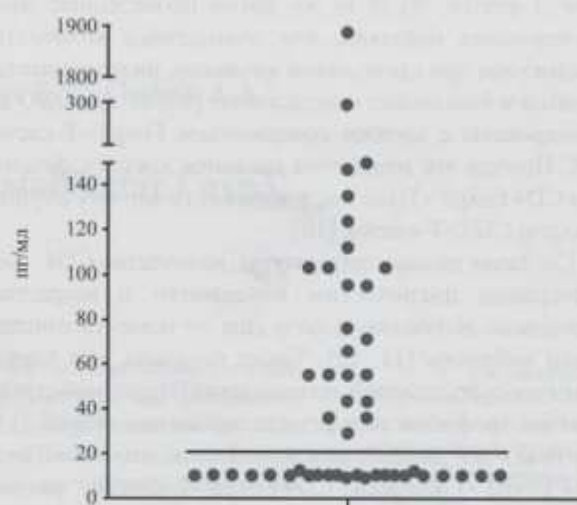


Рис. 2. Уровень ИЛ-6 в фолликулярной жидкости женщины в цикле экстракорпорального оплодотворения. Данные представлены в виде медианы и индивидуальных значений

Таблица 1. Содержание ИЛ-6 и Treg в фолликулярной жидкости женщин с различными эмбриологическими показателями

Параметры	n	ИЛ-6 (пг/мл)		n	CD4-FoxP3 ⁺ , %		n	CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	
		Me (LQ-UQ)	p _U		Me (LQ-UQ)	p _U		Me (LQ-UQ)	p _U
Количество фолликулов:									
< 6	17	10 (10–12)	₁₋₂ = 0,2	11	4,5 (2,5–6,5)	₁₋₂ = 0,4	11	2,0 (1,0–4,0)	₁₋₂ = 0,6
6–12	27	29 (10–94)	₂₋₃ = 0,4	25	2,3 (1,3–4,3)	₂₋₃ = 0,6	25	2,0 (1,3–4,0)	₂₋₃ = 0,1
> 12	25	60 (10–103)	₁₋₃ = 0,01	23	3,0 (1,0–5,0)	₁₋₃ = 0,2	23	1,6 (1,0–3,0)	₁₋₃ = 0,4
Количество ооцитов:									
< 4	7	10 (10–55)	₁₋₂ = 0,6	3	11,0 (2,0–20,0)	₁₋₂ = 0,14	3	3,0 (0,6–4,0)	₁₋₂ = 0,7
4–8	31	12 (10–55)	₂₋₃ = 0,7	27	3,0 (1,0–7,0)	₂₋₃ = 0,03	27	2,0 (1,0–3,8)	₂₋₃ = 0,9
> 8	31	55 (10–103)	₁₋₃ = 0,2	28	2,0 (1,0–3,0)	₁₋₃ = 0,01	28	1,9 (1,0–3,0)	₁₋₃ = 0,3
Индекс оплодотворения:									
1,0–0,75	37	11 (10–55)	₁₋₂ = 0,1	36	4,1 (2,0–7,0)	₁₋₂ = 0,04	36	2,0 (1,0–4,0)	₁₋₂ = 0,3
< 0,75	31	43 (10–95)		22	3,0 (1,0–4,0)		22	2,0 (1,0–3,5)	
Качество бластоцист:									
Высокое (класс A+B)	34	20 (10–66)	₁₋₂ = 0,03	32	4,1 (2,0–7,0)	₁₋₂ = 0,04	32	3,0 (1,0–4,1)	₁₋₂ = 0,04
Низкое (класс C)	10	103 (10–147)		9	1,0 (1,0–3,0)		9	1,0 (1,0–2,0)	

Примечание. Здесь и в табл. 2 данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона.

Сравнение показателей ИЛ-6 в ФЖ женщин с различным количеством ооцитов, полученных при трансвагинальной пункции яичников, показало, что содержание ИЛ-6 у женщин с высоким количеством ооцитов (> 8) было выше, чем в группе с низким количеством яйцеклеток (< 4), хотя эти различия и не были статистически значимыми. Повышенный уровень ИЛ-6 у женщин с высоким количеством ооцитов ассоциировался с достоверно более низким содержанием в ФЖ CD4⁺Foxp3⁺-клеток и в виде тенденции CD4⁺Foxp3⁺-клеток.

Поскольку полученные при пункции ооциты обладали различной способностью к оплодотворению, мы также сравнили содержание ИЛ-6 в группах женщин с различными индексами оплодотворения (ИО). Концентрация ИЛ-6 у женщин с более низким ИО (< 0,75) ооцитов была в среднем в 4 раза выше ($p_U = 0,1$), чем в группе с высоким ИО (0,75–1,0) и ассоциировалась с достоверно меньшим содержанием CD4⁺Foxp3⁺-клеток.

На следующем этапе проведен анализ связи ИЛ-6 с эмбриологическим показателем – качеством бластоцисты. Характеристика бластоцисты на 5-е сутки развития дает основание судить об успешном запуске генома эмбриона и является одним из основных факторов, влияющих на имплантацию эмбриона и наступление беременности. На основании показателей качества бластоцист женщины были разделены на 2 группы – с высоким (классы A + B) и низким качеством бластоцист (класс C). Из данных табл. 2 видно, что в ФЖ женщин с низким качеством бластоцист концентрация ИЛ-6 5-кратно превышала медианные значения оппозитной группы ($p_U = 0,03$),

при этом относительное содержание как CD4⁺Foxp3⁺, так и CD4⁺Foxp3⁺-Treg было достоверно ниже ($p_U = 0,04$).

В завершение был проведен ретроспективный анализ уровня ИЛ-6 у женщин с различными исходами ЭКО: с наступившей и прогрессирующей беременностью (клиническая беременность); с наступившей, но не развивающейся беременностью (биохимическая беременность) и с отрицательным исходом ЭКО (отсутствие беременности). Концентрация ИЛ-6 в группе с негативным исходом достоверно превышала таковую в группе с клинической беременностью и ассоциировалась с наименьшим количеством CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеток. Уровень ИЛ-6 в ФЖ женщин с биохимической беременностью также был выше, чем в группе с наступившей и прогрессирующей беременностью, хотя различия проявлялись на уровне тренда и не были сопряжены со значимыми различиями в содержании CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеток.

Учитывая выявленную сопряженность между высоким уровнем ИЛ-6 и низким количеством CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеток в ФЖ женщин с высоким количеством фолликулов/ооцитов, низким качеством ооцитов и бластоцист и негативным исходом ЭКО, а у женщин с низким качеством бластоцист – дополнительно с низким количеством CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеток, на заключительном этапе работы проанализирована корреляционная связь между указанными показателями.

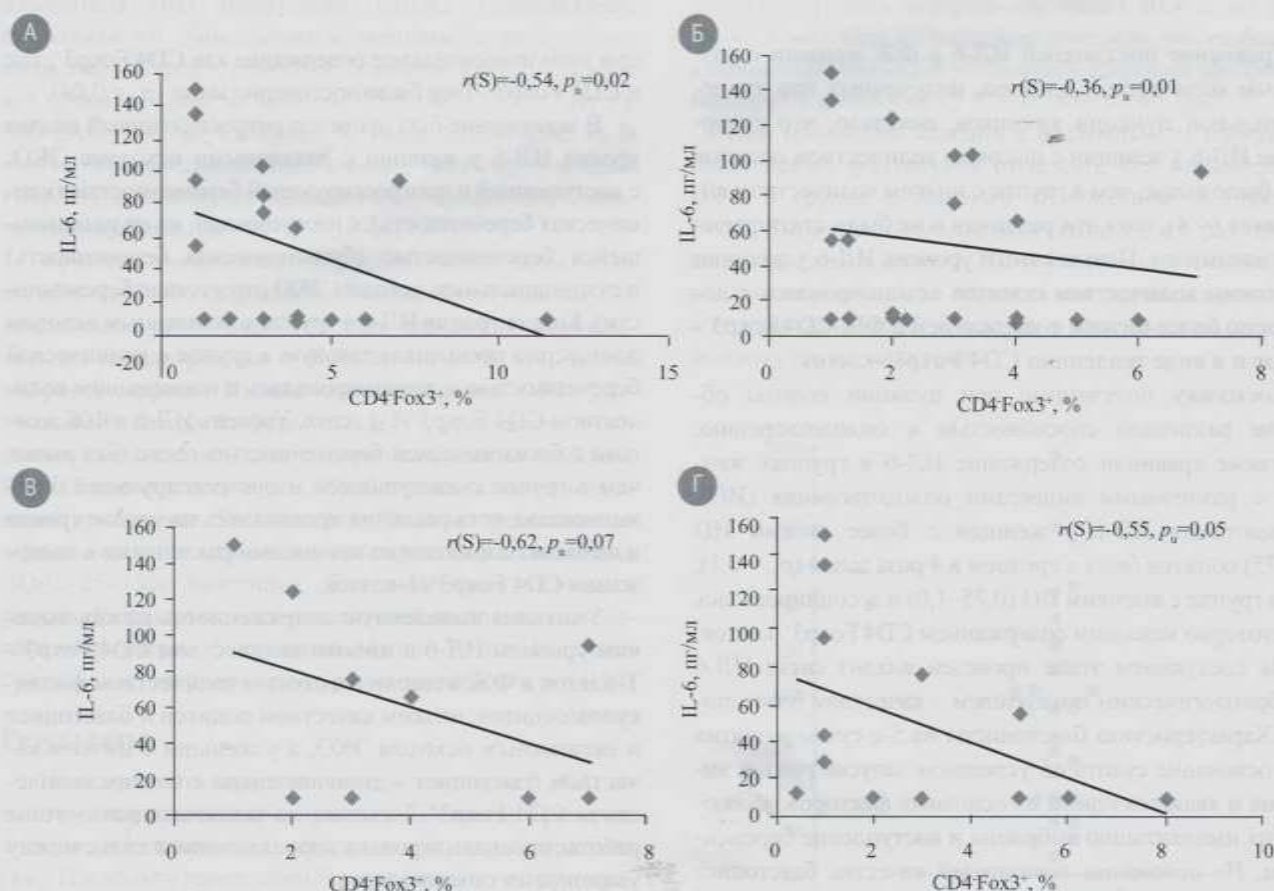
Как видно из рис. 3, между концентрацией ИЛ-6 и количеством CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеток выявлялась обратная корреляционная зависимость, наиболее выраженная у женщин с большим количеством фолликулов (рис. 3, А) ($r = -0,54$; $p_U = 0,02$), низким качеством бластоцист

Таблица 2. Содержание ИЛ-6 и Treg в фолликулярной жидкости женщин с различными исходами экстракорпорального оплодотворения

Параметр	Клиническая беременность (n = 15)	Биохимическая беременность (n = 18)	Отрицательный исход (n = 16)	P_U
	1	2	3	
ИЛ-6, пг/мл	10,0 (10,0–54,6)	48,8 (10,0–103,2)	29,6 (10,0–85,5)	$P_{1-2} = 0,1$ $P_{1-3} = 0,04$ $P_{2-3} = 0,7$
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	2,0 (1,0–3,7)	3,0 (1,0–4,0)	1,6 (1,0–3,0)	$P_{1-2} = 0,46$ $P_{1-3} = 0,98$ $P_{2-3} = 0,52$
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	4,2 (1,6–7,0)	3,0 (2,0–4,0)	1,0 (1,0–3,0)	$P_{1-2} = 0,83$ $P_{1-3} = 0,04$ $P_{2-3} = 0,92$

(см. рис. 3, Б) ($r = -0,62$; $p_U = 0,07$) и отрицательным исходом ЭКО (см. рис. 3, Г) ($r = -0,55$; $p_U = 0,05$). Корреляционная зависимость между числом CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеток и ИЛ-6 у женщин с максимальным числом ооцитов (см. рис. 3, Б) была менее выраженной и проявлялась в виде тенденции ($r = -0,36$; $p_U = 0,1$). При этом концентрация ИЛ-6 не кор-

релировала с количеством CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеток. Так, даже в группе с низким качеством бластоцист, в которой выявлялись одновременно высокое содержание ИЛ-6 и низкое количество CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеток, коэффициент корреляции между указанными параметрами составил $r = 0,22$; $p_U = 0,76$.

Рис. 3. Корреляционные связи ИЛ-6 и CD4⁺FoxP3⁺-Т-клеток в фолликулярной жидкости женщин в цикле экстракорпорального оплодотворения

А – связь показателей в подгруппе женщин с большим количеством фолликулов (n = 19); Б – с максимальным количеством ооцитов (n = 23); В – с низким качеством бластоцист (n = 9); Г – с отрицательными исходами ЭКО (n = 13)

Обсуждение

Эффективность ЭКО в настоящее время не превышает 33–40%, около трети всех беременностей прерывается на ранних сроках [14, 15]. Причины неудачных попыток ЭКО связывают с низким качеством ооцитов и бластоцист, низкой рецептивностью эндометрия и нарушением механизмов иммунологической толерантности. Учитывая участие иммунной системы в регуляции всех этапов репродуктивного процесса, включая фолликуло-/оогенез [16, 17], исследование иммунных биомаркеров, ассоциированных с исходом ЭКО, представляет значительный интерес как в научном, так и в прикладном аспектах.

Полученные данные демонстрируют, что в программе ЭКО женщины с наличием прогностически неблагоприятных факторов (высокое количество фолликулов и ооцитов, низкое качество бластоцист) и отсутствием беременности характеризуются более высоким содержанием в ФЖ ИЛ-6, что сопряжено с низким количеством интрафолликулярных CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеток, относительное содержание которых обратно коррелирует с концентрацией ИЛ-6. При этом обратная взаимосвязь ИЛ-6 с количеством Foxp3⁺-Т-клеток проявляется исключительно в отношении субпопуляции CD4⁺-, но не CD4⁺-Т-клеток.

Повышенный уровень ИЛ-6 в ФЖ женщин с более низким качеством ооцитов согласуется с данными Т. Altun и соавт. [8], которые рассматривают ИЛ-6 как негативный регулятор оогенеза, поскольку его высокий уровень связан с низким качеством ооцитов, не способных к оплодотворению. Аналогично выявленная в настоящем исследовании негативная ассоциация высокого уровня ИЛ-6 в ФЖ с низким качеством бластоцист и отрицательным исходом ЭКО, подтверждается работами других авторов [18].

В литературе также обсуждается важная роль Treg в контроле над процессом имплантации эмбриона и развитием беременности. Известно, что Treg подавляют Т-клеточный иммунный ответ, направленный против аллоантигенов эмбриона [19, 20], сдерживают воспаление: поддерживают сосудистое ремоделирование и способствуют инвазии трофобласта [13]. Снижение количества Treg или их функциональной активности обнаруживается при бесплодии неясного генеза, привычном невынашивании [21, 22], а также при поздних осложнениях беременности, включая преэклампсию и синдром задержки развития плода [23–25]. Тем не менее данные о сопряженности Treg с исходами ЭКО представлены

единичными публикациями с неоднозначными результатами. Так, по данным J. Zhou и соавт. [26], повышенное содержание в периферической крови CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-Т-клеток при проведении ЭКО ассоциировалось с более высокими показателями беременности, в том числе завершенной родами, тогда как по данным V. Schlossberger и соавт. [9] содержание CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-Treg в периферической крови женщин в зависимости от исхода ЭКО не различалось. При этом важно отметить, что содержание Treg в ФЖ женщин при проведении ЭКО, а тем более их взаимосвязь с уровнем ИЛ-6, ранее не исследовалась.

Известно ингибирующее действие ИЛ-6 на дифференцировку CD4⁺Treg, его клиническая значимость продемонстрирована при аутоиммунной патологии [3] и привычном невынашивании [7]. Однако в настоящем исследовании впервые продемонстрирована обратная связь между ИЛ-6 и содержанием CD4⁺Foxp3⁺-Т-клеток, представляющих, вероятно, субпопуляцию CD8⁺Treg. Согласно данным литературы, CD8⁺Treg у человека экспрессируют Foxp3, несут на своей поверхности молекулы CD25, CD122, CD103, CTLA-4, CD39, CD73, LAG-3 и FasL; продуцируют ИЛ-10, TGF-β, ИЛ-34 и ИЛ-3; не экспрессируют маркеры активации (CD28, CD127) и подавляют пролиферацию CD4⁺ и/или CD8⁺ эффекторных Т-лимфоцитов, в том числе аллореактивных Т-клеток [27–29]. Процесс овуляции рассматривается как воспалительная реакция, при которой возрастает продукция провоспалительных цитокинов, в том числе ИЛ-2 [30]. Поскольку CD8⁺Foxp3⁺-Т-клетки лучше отвечают на низкие дозы ИЛ-2, чем CD4⁺Foxp3⁺-Treg [28], эти клетки могут иметь пролиферативное преимущество и первыми накапливаться в ФЖ к моменту овуляции. Учитывая также, что генерация CD8⁺Treg индуцируется TGF-β1 [31], а ИЛ-6 подавляет TGF-β-индуцированную дифференцировку Treg [3], присутствие в ФЖ высоких доз ИЛ-6 может оказывать ингибирующее действие и на накопление CD8⁺Treg.

Полученные данные косвенно свидетельствуют в пользу того, что интрафолликулярные Treg с фенотипом CD4⁺Foxp3⁺ играют позитивную роль в регуляции ранних репродуктивных процессов, и одной из возможных причин недостаточности этих клеток может быть повышенный уровень ИЛ-6 в ФЖ. Об этом свидетельствуют результаты корреляционного анализа. Однако доказательства прямого или опосредованного эффекта ИЛ-6 на CD4⁺Foxp3⁺-Т-клетки требуют дальнейших исследований.

■ Литература

1. Ryba-Stanisławowska M., Skrzypkowska M., Mysliwska J., Mysliwiec M. The serum IL-6 profile and Treg/Th17 peripheral cell populations in patients with type 1 diabetes. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 205284. doi: 10.1155/2013/205284.
2. Korn T., Mitsdoerffer M., Croxford A.L., Awasthi A. et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3⁺ regulatory T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008; 105 (47): 18 460–5. doi: 10.1073/pnas.0809850105.
3. Kimura A., Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40 (7): 1830–5. doi: 10.1002/eji.201040391.
4. Fujimoto M., Nakano M., Terabe F., Kawahata H. et al. The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2011; 186 (1): 32–40. doi: 10.4049/jimmunol.0903314.
5. Lin G., Wang J., Lao X., Wang J. et al. Interleukin-6 inhibits regulatory T cells and improves the proliferation and cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells. *J. Immunother.* 2012; 35 (4): 337–43. doi: 10.1097/CJI.0b013e318255ada3.
6. Nakagawa T., Tsuruoka M., Ogura H., Okuyama Y. et al. IL-6 positively regulates Foxp3⁺CD8⁺ T cells in vivo. *Int. Immunol.* 2010; 22 (2): 129–39. doi: 10.1093/intimm/dxp119.

7. Zhu L., Chen H., Liu M., Yuan Y. et al. Treg/Th17 cell imbalance and IL-6 profile in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Reprod. Sci.* 2017; 24 (6): 882–90. doi: 10.1177/1933719116670517.
8. Altun T., Jindal S., Greenfield K., Shu J. et al. Low follicular fluid IL-6 levels in IVF patients are associated with increased likelihood of clinical pregnancy. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2011; 28 (3): 245–51. doi: 10.1007/s10815-010-9502-8.
9. Schlossberger V., Schober L., Rehnitz J., Schaier M. et al. The success of assisted reproduction technologies in relation to composition of the total regulatory T cell (Treg) pool and different Treg subsets. *Hum. Reprod.* 2013; 28 (11): 3062–73. doi: 10.1093/humrep/det316.
10. Андреева Е.А., Хонина Н.А., Тихонова М.А., Баторов Е.В. и др. Регуляторные Т-клетки в фолликулярной жидкости у женщин, проходящих лечение по программе ЭКО. *Мед. иммунология.* 2018; 20 (5): 657–66.
11. Arruvito L., Sotelo A.I., Billordo A., Fainboim L.A. Physiological role for inducible FOXP3(+) Treg cells. Lessons from women with reproductive failure. *Clin. Immunol.* 2010; 136 (3): 432–41. doi: 10.1016/j.clim.2010.05.002.
12. Hosseini S., Shokri F., Pour A.S., Jeddi-Tehrani M. et al. A shift in the balance of T17 and Treg cells in menstrual blood of women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *J. Reprod. Immunol.* 2016; 116: 13–22. doi: 10.1016/j.jri.2016.03.001.
13. Du M.R., Guo P.F., Piao H.L., Wang S.C. et al. Embryonic trophoblasts induce decidual regulatory T cell differentiation and maternal-fetal tolerance through thymic stromal lymphopoietin instructing dendritic cells. *J. Immunol.* 2014; 192 (12): 1502–11. doi: 10.4049/jimmunol.1203425.
14. Крстич Е.В., Крстич М., Юдаев В.Н. Влияние качества ооцитов и состояния овариального резерва на терапевтический потенциал экстракорпорального оплодотворения у пациенток позднего репродуктивного возраста. *Альманах клин. мед.* 2014; 31: 70–5.
15. Zhang M., Bu T., Tian H.-Q., Li X. et al. Analysis of factors influencing the cumulative pregnancy outcome of In Vitro fertilization-embryo transfer in women aged 35 years and older with normal ovarian reserve. *Reprod. Dev. Med.* 2017; 1 (4): 204–9. doi: 10.4103/2096-2924.224913.
16. Ye H., Li X., Zheng T., Liang X. et al. The effect of the immune system on ovarian function and features of ovarian germ-line stem cells. *Springerplus.* 2016; 5 (1): 990. doi: 10.1186/s40064-016-2390-3.
17. Kollmann Z., Schneider S., Fux M., Bersinger N.A., von Wolff M. Gonadotrophin stimulation in IVF alters the immune cell profile in follicular fluid and the cytokine concentrations in follicular fluid and serum. *Hum. Reprod.* 2017; 32 (4): 820–31. doi: 10.1093/humrep/dex005.
18. Hammadeh M.E., Fischer-Hammadeh C., Amer A.S., Rosenbaum P. et al. Relationship between cytokine concentration in serum and preovulatory follicular fluid and in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection outcome. *Chem. Immunol. Allergy.* 2005; 88: 80–97. doi: 10.1159/000087822.
19. Zenciusen M.L., Thuere C., Ahmad N., Wafala P.O. et al. The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (3): 200–8. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00793.x.
20. Lee S.K., Kim C.J., Kim D.-J., Kang J.-H. Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Network.* 2015; 15 (1): 16–26. doi: 10.4111/in.2015.15.1.16.
21. Jiang R., Yan G., Xing J., Wang Z. et al. Abnormal ratio of CD57+ cells to CD56+ cells in women with recurrent implantation failure. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2017; 78 (5): e12777. doi: 10.1111/aji.1708.
22. Shima T., Sasaki Y., Itoh M., Nakashima A. et al. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *J. Reprod. Immunol.* 2010; 85 (2): 121–9. doi: 10.1016/j.jri.2010.02.006.
23. Robertson S.A., Care A.S., Moldenhauer L.M. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *J. Clin. Invest.* 2018; 128 (10): 4224–35. doi: 10.1172/JCI122182.
24. Nehar-Belaid D., Courau T., Dérian N., Florez L. et al. Regulatory T cells orchestrate similar immune evasion of fetuses and tumors in mice. *J. Immunol.* 2016; 196 (2): 678–90. doi: 10.4049/jimmunol.1501834.
25. Rahimzadeh M., Norouziyan M., Arabpour F., Naderi N. Regulatory T-cells and preeclampsia: an overview of literature. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2016; 12 (2): 209–27. doi: 10.1586/1744666X.2016.1105740.
26. Zhou J., Wang Z., Zhao X., Wang J. et al. An increase of Treg cells in the peripheral blood is associated with a better in vitro fertilization treatment outcome. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2012; 68 (2): 100–6. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01153.x.
27. Vieyra-Lobato M.R., Vela-Ojeda J., Montiel-Cervantes L., Lopez-Santiago R. et al. Description of CD8+ regulatory T lymphocytes and their specific intervention in graft-versus-host and infectious diseases, autoimmunity and cancer. *J. Immunol. Res.* 2018; 2018: 3758713. doi: 10.1155/2018/3758713.
28. Churlaud G., Pitoiset F., Jebbawi F., Lorenzon R. et al. Human and mouse CD8+CD25+FOXP3+ regulatory T cells at steady state and during Interleukin-2 therapy. *Front. Immunol.* 2015; 6: 171. doi: 10.3389/fimmu.2015.00171.
29. Patterson S.J., Pesenacker A.M., Wang A.Y., Gillies J. et al. T regulatory cell chemokine production mediates pathogenic T cell attraction and suppression. *J. Clin. Invest.* 2016; 126 (3): 1039–51. doi: 10.1172/JCI83987.
30. Oakley O.R., Kim H.Y., El-Amouri I., Lin P.P. et al. Periovarian leukocyte infiltration in the rat ovary. *Endocrinology.* 2010; 151 (9): 4551–9. doi: 10.1210/en.2009-1444.
31. Wu M., Chen X., Lou J., Zhang S. et al. TGF- β 1 contributes to CD8+ Treg induction through p38 MAPK signaling in ovarian cancer microenvironment. *Oncotarget.* 2016; 7 (28): 44 534–44. doi: 10.18632/oncotarget.10003.

■ References

1. Ryba-Stanislawowska M., Skrzypkowska M., Mysliwska J., Mysliwiec M. The serum IL-6 profile and Treg/Th17 peripheral cell populations in patients with type 1 diabetes. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 205284. doi: 10.1155/2013/205284.
2. Korn T., Mitsdoerffer M., Croxford A.L., Awasthi A. et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008; 105 (47): 18 460–5. doi: 10.1073/pnas.0809850105.
3. Kimura A., Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40 (7): 1830–5. doi: 10.1002/eji.201040391.
4. Fujimoto M., Nakano M., Terabe F., Kawahata H. et al. The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2011; 186 (1): 32–40. doi: 10.4049/jimmunol.0903314.

5. Lin G., Wang J., Lao X., Wang J. et al. Interleukin-6 inhibits regulatory T cells and improves the proliferation and cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells. *J. Immunother.* 2012; 35 (4): 337–43. doi: 10.1097/CJI.0b013e318255ada3.
6. Nakagawa T., Tsuruoka M., Ogura H., Okuyama Y. et al. IL-6 positively regulates Foxp3+CD8+ T cells in vivo. *Int. Immunol.* 2010; 22 (2): 129–39. doi: 10.1093/intimm/dxp119.
7. Zhu L., Chen H., Liu M., Yuan Y. et al. Treg/Th17 cell imbalance and IL-6 profile in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Reprod. Sci.* 2017; 24 (6): 882–90. doi: 10.1177/1933719116670517.
8. Altun T., Jindal S., Greenfield K., Shu J. et al. Low follicular fluid IL-6 levels in IVF patients are associated with increased likelihood of clinical pregnancy. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2011; 28 (3): 245–51. doi: 10.1007/s10815-010-9502-8.

9. Schlossberger V., Schober L., Rehnitz J., Schaefer M., et al. The success of assisted reproduction technologies in relation to composition of the total regulatory T cell (Treg) pool and different Treg subsets. *Hum. Reprod.* 2013; 28 (11): 3062–73. doi: 10.1093/humrep/det316.
10. Andreeva E.A., Khonina N.A., Tikhonova M.A., Batorov E.V., et al. Regulatory T cells in follicular fluid of women undergoing IVF treatment. *Meditsinskaya immunologiya*. 2018; 20 (5): 657–66. (in Russian)
11. Arruvito L., Sotelo A.J., Billordo A., Fainboim L.A. Physiological role for inducible FOXP3(+) Treg cells. Lessons from women with reproductive failure. *Clin. Immunol.* 2010; 136 (3): 432–41. doi: 10.1016/j.clim.2010.05.002.
12. Hosseini S., Shokri F., Pour A.S., Jeddi-Tehrani M., et al. A shift in the balance of T17 and Treg cells in menstrual blood of women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *J. Reprod. Immunol.* 2016; 116: 13–22. doi: 10.1016/j.jri.2016.03.001.
13. Du M.R., Guo P.F., Piao H.L., Wang S.C., et al. Embryonic trophoblasts induce decidual regulatory T cell differentiation and maternal-fetal tolerance through thymic stromal lymphopoietin instructing dendritic cells. *J. Immunol.* 2014; 192 (19): 1502–11. doi: 10.4049/jimmunol.1203425.
14. Krstic E.V., Krstic M., Yudaev V.N. Effect of oocytes quality and ovarian reserve on the therapeutic potential of in vitro fertilization in patients of late reproductive age. *Almanakh klinicheskoy meditsiny*. 2014; 31: 70–5. (in Russian)
15. Zhang M., Bu T., Tian H.-Q., Li X., et al. Analysis of factors influencing the cumulative pregnancy outcome of In Vitro fertilization-embryo transfer in women aged 35 years and older with normal ovarian reserve. *Reprod. Dev. Med.* 2017; 1 (4): 204–9. doi: 10.4103/2096-2924.224913.
16. Ye H., Li X., Zheng T., Liang X., et al. The effect of the immune system on ovarian function and features of ovarian germline stem cells. *Springerplus*. 2016; 5 (1): 990. doi: 10.1186/s40064-016-2390-3.
17. Kollmann Z., Schneider S., Fux M., Bersinger N.A., von Wolff M. Gonadotrophin stimulation in IVF alters the immune cell profile in follicular fluid and the cytokine concentrations in follicular fluid and serum. *Hum. Reprod.* 2017; 32 (4): 820–31. doi: 10.1093/humrep/dex005.
18. Hammadeh M.E., Fischer-Hammadeh C., Amer A.S., Rosenbaum P., et al. Relationship between cytokine concentration in serum and preovulatory follicular fluid and in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection outcome. *Chem. Immunol. Allergy*. 2005; 88: 80–97. doi: 10.1159/000087822.
19. Zenclussen M.L., Thuere C., Ahmad N., Wafula P.O., et al. The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63 (3): 200–8. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00793.x.
20. Lee S.K., Kim C.J., Kim D.-J., Kang J.-H. Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Network*. 2015; 15 (1): 16–26. doi: 10.4110/in.2015.15.1.16.
21. Jiang R., Yan G., Xing J., Wang Z., et al. Abnormal ratio of CD57+ cells to CD56+ cells in women with recurrent implantation failure. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2017; 78 (5): e12777. doi: 10.1111/aji.1708.
22. Shima T., Sasaki Y., Itoh M., Nakashima A., et al. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *J. Reprod. Immunol.* 2010; 85 (2): 121–9. doi: 10.1016/j.jri.2010.02.006.
23. Robertson S.A., Care A.S., Moldenhauer L.M. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *J. Clin. Invest.* 2018; 128 (10): 4224–35. doi: 10.1172/JCI122182.
24. Nehar-Belaid D., Courau T., Dérian N., Florez L., et al. Regulatory T cells orchestrate similar immune evasion of fetuses and tumors in mice. *J. Immunol.* 2016; 196 (2): 678–90. doi: 10.4049/jimmunol.1501834.
25. Rahimzadeh M., Norouzi M., Arabpour F., Naderi N. Regulatory T-cells and preeclampsia: an overview of literature. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2016; 12 (2): 209–27. doi: 10.1586/1744666X.2016.1105740.
26. Zhou J., Wang Z., Zhao X., Wang J., et al. An increase of Treg cells in the peripheral blood is associated with a better in vitro fertilization treatment outcome. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2012; 68 (2): 100–6. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01153.x.
27. Vieyra-Lobato M.R., Vela-Ojeda J., Montiel-Cervantes L., Lopez-Santiago R., et al. Description of CD8+ regulatory T lymphocytes and their specific intervention in graft-versus-host and infectious diseases, autoimmunity and cancer. *J. Immunol. Res.* 2018; 2018: 3758713. doi: 10.1155/2018/3758713.
28. Churlaud G., Pitoiset F., Jebbawi F., Lorenzon R., et al. Human and mouse CD8+CD25+FOXP3+ regulatory T cells at steady state and during Interleukin-2 therapy. *Front. Immunol.* 2015; 6: 171. doi: 10.3389/fimmu.2015.00171.
29. Patterson S.J., Pesenacker A.M., Wang A.Y., Gillies J., et al. T regulatory cell chemokine production mediates pathogenic T cell attraction and suppression. *J. Clin. Invest.* 2016; 126 (3): 1039–51. doi: 10.1172/JCI83987.
30. Oakley O.R., Kim H.Y., El-Amouri I., Lin P.P., et al. Periovulatory leukocyte infiltration in the rat ovary. *Endocrinology*. 2010; 151 (9): 4551–9. doi: 10.1210/en.2009-1444.
31. Wu M., Chen X., Lou J., Zhang S., et al. TGF-β1 contributes to CD8+ Treg induction through p38 MAPK signaling in ovarian cancer microenvironment. *Oncotarget*. 2016; 7 (28): 44 534–44. doi: 10.18632/oncotarget.10003.

© Мокроносова М.А., Желтикова Т.М., 2019

Мокроносова М.А., Желтикова Т.М.

Эффективность препарата Аква Марис Эктоин у пациентов с аллергическим ринитом и сенсibilизацией к пылецевым аллергенам

ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия

Цель работы – оценить эффективность препарата Аква Марис Эктоин® у больных аллергическим ринитом (АР) и сенсibilизацией к пылецевым аллергенам.

Материал и методы. В мае 2018 г. проведено открытое пилотное исследование эффективности назального спрея Аква Марис Эктоин® у 30 пациентов с АР.

Результаты. У всех пациентов (кроме одного) отмечали снижение интенсивности всех основных симптомов аллергического интермиттирующего ринита. После недельного использования назального спрея Аква Марис Эктоин® диапазон эозинофилов в риноцитограмме не изменился. Однако среднее количество эозинофилов имело тенденцию (статистически недостоверную) к уменьшению: от 29 ± 9 до $22 \pm 10\%$. Из 30 пациентов у 5 (16%) количество эозинофилов в назальном секрете увеличилось, у 8 (27%) картина не изменилась, а у 57% (17) наблюдали снижение эозинофилов.

Заключение. Общая тенденция к положительной клинической динамике позволяет рекомендовать назначение назального спрея Аква Марис Эктоин® в качестве средства, влияющего на улучшение барьерной функции слизистой назальной полости.

Ключевые слова: аллергический ринит; аэроаллергены; пыльца; эктоин

Статья поступила 21.01.2019. Принята в печать 16.02.2019.

Для цитирования: Мокроносова М.А., Желтикова Т.М. Эффективность препарата Аква Марис Эктоин у пациентов с аллергическим ринитом и сенсibilизацией к пылецевым аллергенам. Иммунология. 2019; 40 (2): 38–42. doi: 10.24411/0206-4952-2019-12006.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Mokronosova M.A., Zheltikova T.M.

The effectiveness of Aqua Maris Ectoin in patients with allergic rhinitis and sensitization to pollen allergens

Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia

The aim of the work is to evaluate the effectiveness of Aqua Maris Ectoin® in patients with AR and sensitization to pollen allergens.

Material and methods. In May of 2018, an open, pilot study of the effectiveness of the nasal spray Aqua Maris Ectoin® was conducted in 30 patients with allergic rhinitis (AR).

Results. All patients (except one) showed a decrease in the intensity of all clinical symptoms of AR. After a week of use of nasal spray Aqua Maris Ectoin® range of eosinophils in the rhinocytogram has not changed. However, the average number of eosinophils tended (statistically unreliable) to decrease: from 29 ± 9 to $22 \pm 10\%$. Among of the 30 patients, 16% (5 out of 30) had an increase in the number of eosinophils in the nasal secretion, 27% (8 out of 30) had no change in the picture, and 57% (17 out of 30) had a decrease in eosinophils.

Conclusion. The general trend towards positive clinical dynamics allows us to recommend the appointment of nasal spray Aqua Maris Ectoin® for improving the barrier function of the nasal mucosa.

Keywords: allergic rhinitis; aeroallergens; pollen; ectoin

Received 21.01.2019. Accepted 16.02.2019.

For citation: Mokronosova M.A., Zheltikova T.M. The effectiveness of Aqua Maris Ectoin in patients with allergic rhinitis and sensitization to pollen allergens. Immunologiya. 2019; 40 (2): 38–42. doi: 10.24411/0206-4952-2019-12006. (in Russian)

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Для корреспонденции
Желтикова Татьяна Михайловна –
доктор биологических наук,
заведующая лабораторией,
ФГБНУ «НИИ вакцин
и сывороток им. И.И. Мечникова»,
Москва, Россия
E-mail: t-zheltikova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5394-7132>

For correspondence
Zheltikova Tatyana M. –
PhD, Head of Laboratory,
Mechnikov Research Institute
for Vaccines and Sera
E-mail: t-zheltikova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5394-7132>

Аллергический ринит (АР) – заболевание слизистой оболочки носа, характеризующееся заложенностью носа, ринореей, чиханием и зудом крыльев носа. В основе воспаления слизистой оболочки верхних дыхательных путей (ВДП) лежит гиперреактивность, обусловленная IgE-опосредованным иммунным ответом на аллергены и характеризующаяся двумя фазами: ранней (сразу после контакта аллергена с эпителием ВДП) и поздней (спустя 24 ч после экспозиции аэроаллергена) [1]. При присоединении ОРВИ отмечается более тяжелое течение заболевания, значительно возрастает риск развития бронхиальной астмы (БА) [2]. Среди многих причин, влияющих на запуск и хронизацию АР, наиболее важное место занимает дефект эпителия слизистой оболочки ВДП, как генетически обусловленный, так и развившийся под влиянием экологических и инфекционных факторов. При этом повышается проницаемость молекул с высоким молекулярным весом в подэпителиальный слой и включаются первичные иммунные ответы на антигенные раздражители. Стабильность слизистых оболочек ВДП обеспечивается прежде всего гидратацией.

Руководство по лечению АР, принятое в нормативном документе ARIA, рекомендует ступенчатый терапевтический подход как оптимальный. Среди наиболее эффективных предпочтение отдается H₁-антигистаминным препаратам, как топическим, так и системным, относящимся ко второму поколению. При обструкции носового дыхания наиболее эффективными считают топические кортикостероидные препараты и деконгестанты [1, 3–5]. Однако клинический опыт последних лет свидетельствует о хороших терапевтических результатах при использовании методики вымывания аллергенов и инфекционных агентов из полости носа с помощью солевых растворов или препаратов на основе морской воды.

Одним из современных препаратов, используемых для элиминации аэроаллергенов, в том числе пыльцевых зерен ветроопыляемых растений, из полости носа и гидратации ее слизистой оболочки, является препарат Аква Марис® [6]. В последнюю модификацию этого препарата в качестве основного действующего компонента введен эктоин – вещество природного происхождения, обладающее высокой гидрофильностью. Благодаря высокому сродству с молекулами воды эктоин способен стабилизировать структуру белков, нуклеиновых кислот и т. д., а также защищать кожный покров и слизистые оболочки от УФ-излучения, высыхания, воздействия аллергенов.

Цель работы – оценить эффективность препарата Аква Марис Эктоин® у больных с аллергическим ринитом и сенсibilизацией к пыльцевым аллергенам.

Материал и методы

Пациенты

Обследование проводили с период цветения раннецветущих лиственных деревьев – с 17 апреля по 24 мая 2018 г. в Москве. Под наблюдением находились 30 пациентов в возрасте от 20 до 45 лет с диагнозом «Аллергический интермиттирующий ринит» (АИР). Согласно

общепринятым стандартам диагностики, обследование включало данные анамнеза, анкетирование, кожные пробы с основным набором ингаляционных аллергенов, определение IgE-антител в сыворотке крови к пыльцевым аллергенам, цитологический анализ назального секрета.

Критерии включения пациентов в исследование: сенсibilизация к пыльце деревьев, подтвержденная клиническими проявлениями аллергического риноконъюнктивита в весеннее время; положительные кожные тесты с аллергенами пыльцы деревьев и березы; положительный анализ на присутствие IgE-антител к пыльце березы.

Критерии исключения: АИР тяжелой степени; пациенты моложе 18 и старше 60 лет; острый воспалительный процесс любой локализации; психическое заболевание, не позволяющее пациенту участвовать в исследовании; некомплайентность пациента; искривления перегородки носа со значительным затруднением носового дыхания; операции в полости носа менее 1 мес назад; использование топических и системных противоаллергических препаратов.

Пациентов обследовали дважды: на первом визите, который выполняли в конце апреля, перед началом цветения березы, и на втором – в середине мая. В момент обращения и при обследовании пациенты не получали лекарственную противоаллергическую терапию. Все пациенты заполняли регистрационную карту.

Риноцитогамма. Назальный секрет собирали из обеих половин носа на предметное стекло. Препарат окрашивали отдельным методом красителями эозином и азуром. Подсчитывали не менее 200 клеточных элементов и определяли процентное содержание нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов, эпителиальных клеток, наличие гранул. Больных исследовали дважды: до курса терапии и после использования препарата Аква Марис Эктоин®.

Препарат Аква Марис Эктоин® (спрей для носа) – натуральный продукт, который содержит комбинацию эктоина и изотонического раствора морской соли. Благодаря высокой гидрофильности эктоина препарат образует на поверхности слизистой оболочки носа прочные соединения с молекулами воды, формируя своеобразный водный щит (Эктоин Гидрокомплекс), препятствующий адгезии аллергенов и других инородных частиц. Входящая в состав препарата морская соль (вспомогательный ингредиент) способствует регенерации слизистой оболочки, поврежденной под воздействием аллергенов, и механическому удалению аллергенов.

Пациентам назначали Аква Марис Эктоин по следующей схеме: по 1–2 впрыскиваниям в каждую половину носа 3–4 раза в день в течение недели. При необходимости препарат разрешалось использовать так часто, как это было необходимо.

Статистические методы исследования. Статистическую обработку количественных данных выполняли с помощью статистических формул программы Microsoft Office Excel 2010 и Statistika 6.0.

Результаты и обсуждение

Исследование эффективности назального спрея Аква Марис Эктоин® у больных с АИР и сенсibilизацией к пылевым аллергенам проводили как открытый пилотный эксперимент. Время исследования выбрано в период максимально высокой концентрации пыльцы в атмосфере Москвы: конец апреля – первая декада мая 2018 г.

Пациенты заполняли анкету перед использованием и через неделю после начала использования назального спрея Аква Марис Эктоин®. Стандартный опросник включал оценку пяти основных симптомов: заложенность носа, чихание, зуд крыльев носа, ринорея, зуд и гиперемия склер.

Как видно из рис. 1, у всех пациентов наблюдали снижение интенсивности проявлений АИР. Надо отметить, что начало использования спрея пришлось на дни с высокой концентрацией пыльцы в атмосфере, а окончание исследование проходило на фоне меньшей концентрации пыльцы в воздухе. Однако пациенты отмечали, что в дни с особенно выраженными симптомами АР частое (до 5–10 раз в день) использование назального спрея Аква Марис Эктоин® значительно облегчало их состояние и самочувствие.

Состояние не ухудшилось ни у одного пациента. Только 1 (3%) пациент из 30 не отмечал изменений в проявлениях АИР. Использование назального спрея Аква Марис Эктоин® не вызывало неприятных ощущений или раздражения при использовании. В течение 1–2 ч после впрыскивания спрея состояние оставалось стабильным. Пациенты отмечали, что для более выраженного и продолжительного эффекта необходимо как можно дальше ввести в полость носового хода наконечник и в момент впрыскивания препарата сильно втянуть в себя воздух. При неправильном введении препарата эффективность его была ниже и менее продолжительной.

Одним из наиболее значимых биомаркеров, коррелирующих с тяжестью проявлений АИР, является содержание эозинофилов (в %) в назальном секрете, определяемое эксфолиативным цитологическим методом. В периоды высокой экспозиции аэроаллергенов про-

центное соотношение эозинофилов относительно всех гранулоцитов значительно выше, чем при отсутствии контакта слизистой оболочки носа с ингаляционными аллергенами.

У пациентов в начале исследования количество эозинофилов в назальном секрете варьировало от 0 до 86% (среднее $29 \pm 9\%$) (рис. 2). Это свидетельствует о значительном аллергическом воспалении слизистой полости носа в поздней фазе. Снижение эозинофильной инфильтрации слизистых ВДП обычно коррелирует с облегчением клинических симптомов АР. После недельного использования назального спрея Аква Марис Эктоин диапазон эозинофилов в риноцитограмме не изменился и варьировал от 0 до 85%. Однако среднее количество эозинофилов имело тенденцию (статистически недостоверную) к уменьшению – $22 \pm 10\%$ (см. рис. 2). У 5 (16%) из 30 пациентов количество эозинофилов в назальном секрете увеличилось, у 8 (27%) картина не изменилась, а у 17 (57%) наблюдали снижение эозинофилов (рис. 3). Это может быть как следствием снижения концентрации пыльцы во вдыхаемом воздухе, так и уменьшением экспозиции пыльцы в полости носа, что связано с созданием гидрофильной пленки на слизистой оболочке и вымыванием пылевых зерен с помощью назального спрея Аква Марис Эктоин®.

Эктоин (2-метил-1,4,5,6-тетрагидропиримидин-4-карбоновая кислота) – водорастворимая циклическая аминокислота, относится к классу бетаинов. Он продуцируется галофильными микроорганизмами. Его естественная биологическая функция состоит в обеспечении резистентности бактерий к неблагоприятным факторам внешней среды (экстремальные температуры, засоление, УФ-излучение). Впервые ектоин выделен в 1977 г. из галофильных бактерий *Halorhodospira halochloris* (старое название *Ectothiorhodospira halochloris*, отсюда и название «эктоин»), обитающих в соленом озере в Вади-Эль-Натрун, Египет (Скитская пустыня) [7].

Механизм действия ектоина хорошо изучен. Молекула ектоина способна образовывать большое количество водородных связей, поэтому может удерживать вокруг себя 4–5 молекул воды, образуя своего рода водяной

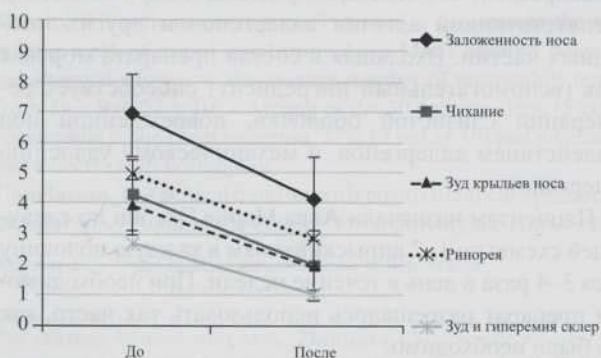


Рис. 1. Динамика симптомов у пациентов с аллергическим интермиттирующим ринитом ($n = 30$) до и после применения Аква Марис Эктоин®

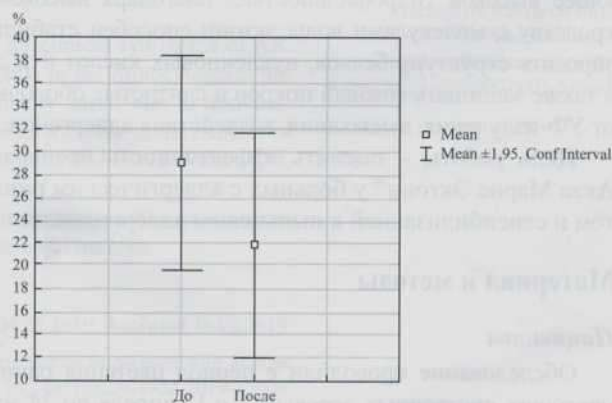


Рис. 2. Средний уровень эозинофилов (%) в назальном секрете пациентов с аллергическим интермиттирующим ринитом до и после 1 нед использования препарата Аква Марис Эктоин®

кокон [8]. Многочисленные исследования доказали, что этот водный кокон очень стабилен. Благодаря образованию слоя воды эктоин стабилизирует клеточные мембраны, улучшая их устойчивость к воздействию стрессовых факторов. Сам эктоин не вступает в соединения с белками и липидами и не может проникать в клетки. Доказано, что эктоин может оказывать гидропротективное действие на слизистую оболочку полости носа, ослабляя инфицирование и уменьшая воспалительные процессы [7]. Все эти свойства эктоина использовали для создания формулы лекарственного препарата, в котором эктоин применяется для ингибирования дегидратации клеток эпителия слизистой оболочки ВДП и повышения стабильности липидных мембран [9–11]. Проведенные ранее исследования, в том числе метаанализ, продемонстрировали позитивный эффект у пациентов с АР в ответ на применение назального спрея и глазных капель с содержанием эктоина [7, 12]. Описанные свойства обуславливают возможность применения эктоина в качестве компонента, препятствующего адгезии аллергенов на слизистой оболочке при АР.

Заключение

Открытое и пилотное исследования эффективности назального спрея Аква Марис Эктоин® у пациентов с АИР проведено в период интенсивной паллиации лиственных раннецветущих ветроопыляемых деревьев в мае 2018 г. в Москве. 30 пациентов получали в течение недели назальный спрей Аква Марис Эктоин®. У всех пациентов (кроме одного) отмечали снижение интенсивности основных симптомов АИР. Достоверное снижение эози-

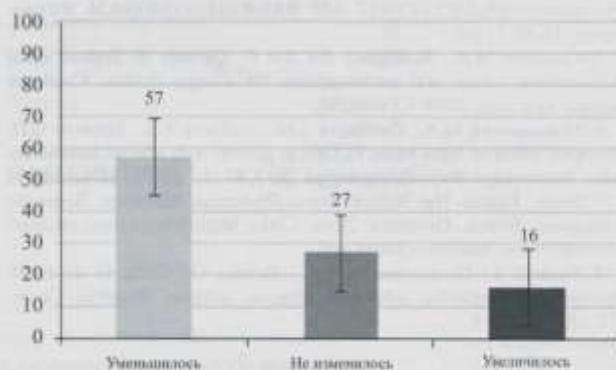


Рис. 3. Доля пациентов (%) с изменением количества эозинофилов в назальном секрете после использования препарата Аква Марис Эктоин®

нофилов в риноцитогамме также выявлено у всех пациентов. У исследования есть определенные ограничения. Во-первых, не было группы сравнения, во-вторых, были использованы только субъективные симптомы проявления АИР, в-третьих, испытание проводили на фоне снижения естественной экспозиции пыли.

Тем не менее общая тенденция к положительной клинической динамике позволяет рекомендовать назначение назального спрея Аква Марис Эктоин® как средства, влияющего на улучшение барьерной функции слизистой назальной полости, так и препарата, вымывающего пылевые зерна из полости носа, не разрушая их.

Литература

1. Bousquet J., Khaltaev N., Cruz A.A. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA2LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008; 63 (86): 8–160.
2. Bocking C., Renz H., Pfefferle P.L. Prävalenz und sozioökonomische Bedeutung von Allergien in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2012; 55 (3): 303–7.
3. Angier E., Willington J., Scadding G., Holmes S. et al. Management of allergic and non-allergic rhinitis: a primary care summary of the BSACI guideline. *Prim. Care Respir. J.* 2010; 19 (3): 217–22.
4. DEGAM, Rhinosinusitis DEGAM-Leitlinie No. 10, vol. 053/012. Omikron, Düsseldorf, Germany, 2008. URL: [https://www.degam.de/files/Inhalte/Leitlinien-Inhalte/Dokumente/DEGAM-S2-Leitlinien/053-012_Rhinosinusitis%20\(S2k\)/017-049_053-012kurzDEGAM_Rhinosinusitis_18-12-17.pdf](https://www.degam.de/files/Inhalte/Leitlinien-Inhalte/Dokumente/DEGAM-S2-Leitlinien/053-012_Rhinosinusitis%20(S2k)/017-049_053-012kurzDEGAM_Rhinosinusitis_18-12-17.pdf).
5. Calderon M.A., Rodriguez del Rio P., Demoly P. Topical nasal corticosteroids versus oral antihistamines for allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2010; CD008232.
6. Мокренисова М.А., Желткова Т.М., Арефьев А.С., Тарасова Г.Д. Терапевтический эффект препарата Аква Марис эктоин у больных

с аллергическим интермиттирующим ринитом. *Рос. оториноларингол.* 2017; 87 (2): 142–8.

7. Bitop, Ectoin—The Natural Stress-Protection Molecule, Scientific Information. Witten, Germany, 2010. URL: http://www.ectoin.net/data/download/bitop_basishroschuer.pdf.
8. Smiatek J., Harishchandra R.K., Rubner O., Galla H.-J. et al. Properties of compatible solutes in aqueous solution. *Biophys. Chem.* 2012; 160 (1): 62–8.
9. Harishchandra R.K., Sachan A.K., Kerth A., Lentzen G. et al. Compatible solutes: ectoine and hydroxyectoine improve functional nanostructures in artificial lung surfactants. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; 1808 (12): 2830–40.
10. Dirschka T. Ectoin—Anwendung und Perspektiven für die Dermatologie. *Aktuelle Dermatol.* 2008; 34 (4): 115–8.
11. Lentzen G., Schwarz T. Extremophiles: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006; 72 (4): 623–34.
12. Eichel A., Bilstein A., Werkhäuser N., Mösges R. Meta-analysis of the efficacy of ectoine nasal spray in patients with allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy (Cairo)*. 2014; 2014: 292545. doi: 10.1155/2014/292545.

References

1. Bousquet J., Khaltaev N., Cruz A.A., et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA2LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008; 63 (86): 8–160.
2. Bocking C., Renz H., Pfefferle P.L. Prävalenz und sozioökonomische Bedeutung von Allergien in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2012; 55 (3): 303–7.

3. Angier E., Willington J., Scadding G., Holmes S., et al. Management of allergic and non-allergic rhinitis: a primary care summary of the BSACI guideline. *Prim. Care Respir. J.* 2010; 19 (3): 217–22.
4. DEGAM, Rhinosinusitis DEGAM-Leitlinie No. 10, vol. 053/012. Omikron, Düsseldorf, Germany, 2008. URL: https://www.degam.de/files/Inhalte/Leitlinien-Inhalte/Dokumente/DEGAM-S2-Leitlinien/053-012_

Rhinosinusitis%20(S2k)/017-049_053-012kurzDEGAM_Rhinosinusitis_18-12-17.pdf.

5. Calderon M.A., Rodriguez del Rio P., Demoly P. Topical nasal corticosteroids versus oral antihistamines for allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2010; CD008232.
6. Mokronosova M.A., Zheltikova T.M., Arefyeva A.S., Tarasova G.D. Therapeutic effect of Aqua Maris ECOIN in patients with allergic intermittent rhinitis. *Rossiyskaya otorinolaringologiya*. 2017; 87 (2): 142–8. (in Russian)
7. Bitop, Ectoin—The Natural Stress-Protection Molecule, Scientific Information. Witten, Germany, 2010. URL: http://www.ectoin.net/data/download/bitop_basisbroschuere.pdf.
8. Smiatek J., Harishchandra R.K., Rubner O., Galla H.-J., et al. Properties of compatible solutes in aqueous solution. *Biophys. Chem.* 2012; 160 (1): 62–8.
9. Harishchandra R.K., Sachan A.K., Kerth A., Lentzen G., et al. Compatible solutes: ectoine and hydroxyectoine improve functional nanostructures in artificial lung surfactants. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; 1808 (12): 2830–40.
10. Dirschka T. Ectoin—Anwendung und Perspektiven für die Dermatologie. *Aktuelle Dermatol.* 2008; 34 (4): 115–8.
11. Lentzen G., Schwarz T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006; 72 (4): 623–34.
12. Eichel A., Bilstein A., Werkhäuser N., Mösges R. Meta-analysis of the efficacy of ectoine nasal spray in patients with allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy (Cairo)*. 2014; 2014: 292545. doi: 10.1155/2014/292545.

© Гушин И.С., 2019

Гушин И.С.

Аллергия – поздний продукт эволюции иммунной системы

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115522, г. Москва, Россия

Рассмотрены существующие сведения о филогенезе IgE-опосредованной аллергии и главных участников эффекторной фазы IgE-опосредованной аллергической реакции, включая тучные клетки, высокоаффинный рецептор для иммуноглобулина E (Fc ϵ RI) и иммуноглобулин E (IgE). IgE-опосредованная аллергия возникла на поздних этапах эволюции иммунной системы за счет использования трех основных функциональных единиц: древних эффекторных клеток врожденного иммунитета (тучных клеток) и поздних филогенетических приобретений – IgE и Fc ϵ RI. IgE-опосредованная аллергия является новой формой реактивности, направленной на организацию аллерген-специфического воспаления. Биологическое значение последнего состоит в осуществлении элиминационной функции по отношению к низким дозам генетически чужеродного материала (аллергена). Данные о филогенезе IgE-опосредованной аллергии обосновывают новое направление противоаллергических мер для исключения необходимости возникновения аллергического ответа.

Ключевые слова: IgE-опосредованная аллергия; IgY; IgE; FcRs; Fc ϵ RI; тучные клетки/базофилы; филогенез аллергического ответа; обзор

Статья поступила 05.02.2019. Принята в печать 16.02.2019.

Для цитирования: Гушин И.С. Аллергия – поздний продукт эволюции иммунной системы. Иммунология. 2019; 40 (2): 43–57. doi: 10.24411/0206-4952-2019-12007.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Gushchin I.S.

Allergy – late product of the immune system evolution

NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, 115522, Russia

Existing data on the phylogenesis of IgE-mediated allergy and the main participants of the effector phase of the IgE-mediated allergic reaction, including mast cells, the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc ϵ RI) and the immunoglobulin E, are reviewed. IgE-mediated allergy arose in the late stages of the evolution of the immune system through the use of three main functional units: ancient effector cells of innate immunity (mast cells) and late phylogenetic acquisitions – IgE and Fc ϵ RI. IgE-mediated allergy is a new form of reactivity aimed at the organization of allergen-specific inflammation. The biological value of the latter is in the implementation of the elimination function in relation to low doses of genetically alien material (allergen). The data on the phylogenesis of IgE-mediated allergy justify a new trend in antiallergic measures to eliminate the need for an allergic response.

Keywords: IgE-mediated allergy; IgY; IgE; FcRs; Fc ϵ RI; mast cells/basophils; phylogenesis of allergic response; review

Received 05.02.2019. Accepted 16.02.2019.

For citation: Gushchin I.S. Allergy – late product of the immune system evolution. Immunologiya. 2019; 40 (2): 43–57. doi: 10.24411/0206-4952-2019-12007. (in Russian)

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Отдельные работы, которые так или иначе могли составить предмет сравнительной аллергологии, появились в скором времени после начала экспериментального изучения аллергии [1]. Однако систематических исследований в рамках этой проблемы, оказывается, крайне мало. Вместе с тем более чем очевидно, что

именно выяснение сущности эволюции аллергии может помочь пониманию биологического значения этой уникальной формы реактивности, которая сформировалась на самых поздних этапах филогенеза иммунной системы за счет, с одной стороны, появления новых молекулярных функциональных единиц (иммуноглобу-

Для корреспонденции
Гушин Игорь Сергеевич –
член-корр. РАН, доктор медицинских
наук, профессор, заведующий
отделом аллергологии и клинической
иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт
иммунологии» ФМБА России,
Москва, Россия
E-mail: igushchin@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4465-6509>

For correspondence
Gushchin Igor S. – Corresponding
Member of RAS, MD, Professor, Head
of Department of Allergy and
Clinical Immunology, NRC Institute
of Immunology FMBA of Russia,
Moscow, Russia
E-mail: igushchin@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4465-6509>

лина класса E – IgE и его высокоаффинного рецептора – $Fc_\epsilon RI$), а с другой – использования древних клеточных систем (тучных клеток/базофилов), обеспечивающих реакции врожденного иммунитета и воспаления далеких предшественников высокоорганизованных животных. Вооружение этих клеток новым высокочувствительным и высокоспецифичным механизмом узнавания крайне малых количеств чужеродного антигенного/аллергенного материала сделало осуществимым организацию аллерген-специфического воспалительного (элиминационного по своей сущности) ответа. Названные три участника (IgE, $Fc_\epsilon RI$ и тучные клетки/базофилы) обязательны для аллергического ответа, который осуществляется под контролем сложной сети регуляторных воздействий со стороны в первую очередь иммунной, а также других систем организма.

Почти 50 лет назад была опубликована работа, в которой выдвинуто и обосновано положение о том, что аллергическая реактивность является биологически целесообразным явлением, сформированным у высокоорганизованных животных и проявляющимся реакцией в ответ на поступление в организм низких доз антигенов (аллергенов) в определенном временном режиме при недостаточности функции гистогематических барьеров [2]. В последнее время были высказаны соображения, удивительно согласовывающиеся с приведенным выше представлением о физиологической роли аллергического ответа и его главного функционального элемента – иммуноглобулина класса E (IgE): IgE вместе с тучными клетками выполняет функцию своеобразных стражников, останавливающих дальнейшее проникновение в организм антигена в точках его проникновения, причем подчеркнуто, что IgE-зависимая система проявляет свою функцию в ранних ответах на антигенные стимулы в низких дозах [3]. Поступление в организм высоких доз вызывает возникновение других известных форм иммунного ответа. Подтверждением этого и пониманию сути и биологического значения аллергической реактивности могут служить результаты всесторонних исследований механизма традиционного аллергологического метода лечения – аллерген-специфической иммунотерапии [4]. Хорошо известная особенность этого приема состоит в более или менее продолжительном введении в организм возрастающих доз аллергена (антигена), в результате чего достигается снижение клинически проявляющейся чувствительности организма к действию аллергена. Наиболее принципиальным результатом исследований последних двух-трех десятилетий стало установление следующего факта: при переключении низкодозового режима воздействия аллергена на высокодозовый достигается переключение иммунного ответа с аллергического типа (Th_2 -зависимого) на другой (Th_1 -зависимый), а при установлении его в том же самом организме (что следует подчеркнуть особо) устраняется необходимость аллергического ответа на конкретный аллерген. Следует добавить, что многие звенья механизма такого переключения были выявлены только в последнее время.

Особое внимание обращают на себя исследования, выполненные в рамках эволюционной аллергологии, которые в наибольшей степени касаются изучения эволюции необходимого участника аллергической реакции – IgE [1]. В последнее время стало возможным получить более ясное представление об эволюционном формировании двух других обязательных составляющих элементов аллергической реакции: высокоаффинного клеточного рецептора для IgE ($Fc_\epsilon RI$) и тучных клеток как классических представителей клеток-мишеней аллергенного воздействия.

Таким образом, упомянутые обстоятельства стали стимулом к рассмотрению трех обязательных участников проявления аллергической реакции (тучных клеток, IgE и $Fc_\epsilon RI$), что может прояснить, как в эволюции произошло объединение универсальной формы реактивности, каковой является воспаление, с формой высокоспецифичного распознавания патогена – иммунологической, открывшее путь к созданию нового вида реактивности – аллергической, направленной на узнавание низкодозового антигенного воздействия и организацию воспалительной реакции, специфически направленной против такого патогена. Следует напомнить предположение о том, что нераспознанное поступление в организм материала, несущего чужеродную генетическую информацию, может оказаться небезразличным для высокоорганизованных животных и их последующих поколений, на что ранее было обращено внимание [1].

Предшественники эффекторных клеток аллергического ответа

Тучные клетки – важные эффекторные клетки, участвующие в разных реакциях врожденного и приобретенного иммунитета. Более всего изучена их роль в реакциях аллергии, аутоиммунных процессах, воспалении, а также их противоопухолевое действие за счет образования и секреции широкого спектра предсуществующих (преформированных) и образуемых *de novo* биологически активных веществ. Тучные клетки участвуют, как давно и хорошо известно, в защите хозяина от многих паразитарных, а также бактериальных инфекций, известно их участие в разрушении токсинов ядов, в опосредовании толерантности к кожным трансплантатам и пр. Следует обратить внимание на то, что ни у одной человеческой особи не обнаружено отсутствия тучных клеток. Другое важное обстоятельство, которое нужно подчеркнуть, – тучные клетки располагаются в стратегически важных пограничных зонах: в пределах эпителиальных, слизистых тканей и вокруг сосудов. Тучные клетки образуются из мультипотентного гемопоэтического прародителя, циркулируют как $CD34^+$ -предшественники до тех пор, пока не мигрируют в ткани и созревают до эффекторных клеток в периферических органах и кровеносных сосудах.

За последние десятилетия получены подробные сведения о механизмах активации тучных клеток и сложном взаимодействии положительных (активирующих) и отрицательных (тормозящих) сигнальных путей в них [5].

Вместе с тем филогенетические аспекты проблемы тучных клеток (и базофилов) в настоящее время освещены довольно скудно. Тем не менее исследования на генетическом уровне дают право полагать, что эти клетки возникли из общего предшественника задолго до формирования адаптивного иммунитета, и тем более до появления IgE [6]. Тучные клетки/базофилоподобные клетки, содержащие гистамин и гепарин, недавно были обнаружены в гемолимфе асцидий (подтип оболочников) *Styela plicata*, которая принадлежит к группе беспозвоночных хордовых, впервые появившихся 500 млн лет тому назад [7]. У того же вида животных обнаружены так называемые *test cells* (тестальные клетки, или каллимоциты) – вспомогательные клетки, которые связаны с яйцеклеткой асцидий и способны высвобождать гистамин, гепарин и триптазы при воздействии избирательного активатора тучных клеток – полиаминного вещества 48/80 [8]. Авторы полагают, что тестальные клетки защищают яйцеклетку (ооцит) от микробных инфекций. Во время роста ооцита у многих оболочников некоторое количество фолликулярных клеток проникает в его протоплазму, и клетки лопаются у его поверхности, образуя слой так называемых тестальных клеток. При образовании хориона последний одевает яйцо вместе с тестальными клетками. Последние долго остаются в яйце во время его развития, иногда даже примешиваются к blastomeres дробящегося яйца. Во время оогенеза тестальные клетки поддерживают жизнеобеспечение яйца и после оплодотворения способствуют образованию оболочки личиночной формы [9–11].

Исследование далеких предков тучных клеток было продолжено на модели тестальных клеток морского шприца (*Ciona intestinalis* – вида оболочников рода *Ciona* класса асцидий с очень мягкой оболочкой; самый близкий родственник позвоночных). Было показано, что тестальные клетки морского шприца по морфологическим и гистохимическим признакам напоминают тучные клетки кожи человека. Подобно последним тестальные клетки морского шприца содержат в цитоплазматических гранулах гистамин и комплекс, состоящий из гепарина-сериновых протеаз (сериновых эндопептидаз). При действии на клетки упомянутого выше избирательного активатора тучных клеток вещества 48/80 происходит экзоцитоз гранул и высвобождение из них преформированных медиаторов (гистамина, в частности). Кроме того, из *C. intestinalis* удалось выделить кДНК, которая напоминала кДНК, кодирующую гистидиндекарбоксилазу тучных клеток человека. Подобно тучным клеткам млекопитающих активированные тестальные клетки образовывали простагландин D_2 и содержали комплементарные ДНК, кодирующие белок, напоминающий синтазу, необходимую для биосинтеза этого простагландина тучными клетками человека. Полученные данные по морфологии, гистохимии, биохимии и молекулярной биологии позволили допустить, что тестальные клетки *C. intestinalis* являются аналогами тучных клеток млекопитающих, находящихся в соединительной ткани разных органов [12].

Предполагают, что разделение на линии тучных клеток и базофилов произошло до появления высших позвоночных (амниотов). Есть сведения, что оба типа клеток могут быть обнаружены у низших позвоночных (анамниев) [6].

Тучные клетки, обладающие структурным и функциональным сходством с тучными клетками млекопитающих, описаны у пресноводных лучеперых рыб семейства карповых *Danio rerio* (англ. *zebrafish*), которые известны как популярные аквариумные рыбки и широко используются в экспериментальной биологии [13].

В специальных исследованиях [14] было уточнено, что в функциональном отношении тучные клетки этих рыб напоминают тучные клетки млекопитающих уже потому, что отвечают на избирательный активатор этих клеток – полиамин – вещество 48/80. Внутривентриальная инъекция вещества 48/80 сопровождалась дегрануляцией тучных клеток и повышением в плазме крови концентрации триптазы, а кетотифен, известный как стабилизатор этих клеток, угнетал ответную реакцию в условиях внесения его в аквариумную воду в конечной концентрации 400 мкг/мл. Далее были получены свидетельства выполнения тучными клетками *Danio rerio* тех же функций в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета, что и их аналогами млекопитающих. Внутривентриальное введение живых *Aeromonas salmonicida* (патогенная бактерия, вызывающая у пресноводных рыб фурункулез) также приводило к выраженной дегрануляции тучных клеток и повышению в плазме крови концентрации триптазы, а кетотифен в тех же условиях испытаний обладал тормозящим действием. Проявленная активность *Aeromonas salmonicida* опосредована действием на Толл-подобные рецепторы, что иллюстрировало участие тучных клеток *Danio rerio* в реакциях врожденного иммунитета. Предположение об участии этих клеток в адаптивном иммунном ответе следовало из данных, указывающих на присутствие в тучных клетках γ -субъединицы высокоаффинного рецептора IgE ($Fc\epsilon R1\gamma$), осуществляющей передачу сигнала от активированного рецептора внутрь клетки. Присутствие $Fc\epsilon R1\gamma$ -подобного белка было подтверждено иммуногистохимически с использованием кроличьих антител изотипа IgG против человеческой γ -субъединицы $Fc\epsilon R1$. Более того, была проиллюстрирована возможность пассивной сенсibilизации рыбок антителами изотипа IgE мышей. После внутривентриального введения рыбкам соответствующих антител изотипа IgE мышей, сенсibilизированных динитрофенолом (анти-ДНФ) или тринитрофенолом (анти-ТНФ), и последующего разрешения конъюгатами бычьего сывороточного альбумина (БСА) соответственно с ДНФ (ДНФ-БСА) или ТНФ (ТНФ-БСА) повышалась концентрация триптазы в плазме крови. Характер поведенческих реакций рыбок и их плавательная активность при этом, правда, не изменялись. Возможная пассивная сенсibilизация рыбок антителами мышей требует подтверждения, так как хорошо известны межвидовые ограничения пассивной сенсibilизации антителами изотипа IgE даже среди млекопитающих.

Тучные клетки, в которых подтверждено присутствие гистамина, описаны также у окунеобразных (отряд рыб, класс лучеперых), которые считаются наиболее эволюционно продвинутыми среди костистых рыб [15]. Тучные клетки окунеобразных положительно окрашиваются на рецепторную тирозинкиназу KIT (т. е. встроенную в клеточную мембрану и имеющую внеклеточный рецепторный домен). Как и тучные клетки млекопитающих, тучные клетки окунеобразных располагаются вокруг кровеносных сосудов и в тканях, образующих барьерную систему (в коже, в кишечнике и в жабрах). Базофильные лейкоциты гистологически выявляются у костистых рыб и рептилий, причем у рептилий их относительное содержание очень высокое. У черепах *Chelydra serpentina* (каймановая, или кусающая, черепаха) оно составляет 50% лейкоцитов крови [16]. Эти базофилы экспрессируют Fc-рецепторы и могут быть активированы, о чем свидетельствует секреция гистамина, вызванная кроличьей антисывороткой против иммуноглобулинов черепахи [16]. Эти сведения указывают на присутствие глобулинов на клеточной поверхности базофилов.

Таким образом, систематизируя имеющиеся сведения, можно заключить, что древние предшественники клеток со свойствами тучных клеток и базофилов обнаруживаются уже у оболочников, или личиночно-хордовых.

Тучные клетки (базофилоподобные и тестальные клетки) могут функционировать как участники преимущественно врожденного иммунитета, выполняя роль примитивных форм антимикробных эффектор-

ных клеток. Разделение на линии тучных клеток и базофилов становится заметно у костистых рыб и рептилий. На этом уровне появляются признаки участия этих клеток и в реакциях приобретенного (адаптивного) иммунитета, на что указывают примитивные формы активации Fc-рецепторов, экспрессируемых на обоих типах клеток. Далее тучные клетки и базофилы становятся обязательными клеточными линиями у всех известных позвоночных, включая млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий и костистых рыб.

Разнообразие участия тучных клеток/базофилов в реакциях иммунитета обеспечивается, с одной стороны, широким набором высвобождаемых из них продуктов провоспалительного действия, а с другой – разнообразием активаторов этих клеток и, соответственно, воспринимающих их действие рецепторов, что иллюстрировано данными, полученными на наиболее полноценно изученных в этом отношении представителях животного мира и обобщенными в специальных работах (табл. 1 и 2) [17].

Возникшие как вспомогательные клетки, клетки-участники реакций врожденного иммунитета и воспаления, тучные клетки/базофилы приобретают способность включаться в реакции адаптивного иммунитета и становятся одной из главных функциональных единиц аллерген-специфических реакций гиперчувствительности. Это стало возможным прежде всего в результате таких последующих приобретений эволюции, как IgE и его высокоаффинный клеточный рецептор, имеющий высочайшее сродство к Fc-фрагменту IgE (Fc ϵ RI).

Таблица 1. Вещества, высвобождаемые активированными тучными клетками [17]

Группа веществ	Высвобождаемые из тучных клеток вещества
Преформированные	Гистамин, 5-НТ, гепарин и/или хондроитин сульфаты, триптаза, химаза, MBP, катепсин, карбоксипептидаза-A
Липидные медиаторы	PGD $_2$, PGE $_2$, LTB $_4$, LTC $_4$, PAF
Цитокины и ростовые факторы	GM-CSF a,b , IFN- $\alpha^{a,b}$, IFN- β^c , IFN- γ^a , IL-1 $\alpha^{b,c}$, IL-1 $\beta^{a,b}$, IL-1R antagonist b , IL-2 a , IL-3 a,b , IL-4 a,b , IL-5 a,b , IL-6 a,b , IL-8 (CXCL8) b , IL-9 a,b , IL-10 a,b , IL-11 b , IL-12 a,d , IL-13 a,b , IL-14 d , IL-15 d , IL-16 b,c , IL-17E (IL-25) a , IL-17F c , IL-18 d , IL-22 (IL-TIF) c , LIF d , LT β^d , M-CSF c,d , MIF d , SCF b , TGF- $\beta 1^{a,b}$, TNF a,b , TSLP c , bFGF a,b , EGF b , IGF-1 a , NGF a , PDGF-AA d , PDGF-BB b , VEGF a,b
Хемокины	CCL1 (TCA3/1309) b,c , CCL2 (MCP-1) a,b , CCL3 (MIP-1 α) a,d , CCL3L1 (LD78 β) d , CCL4 (MIP-1 β) c,d , CCL5 (RANTES) a,b , CCL7 (MCP-3) c,d , CCL8 (MCP-2) d , CCL11 (eotaxin) d , CCL13 (MCP-4) d , CL16 (LEC/HCC-4) d , CCL17 (TARC) a,d , CCL20 (LARC) d , CCL22 (MDC) a,d , CXCL1 (Gro α /KC) a,d , CXCL2 (Gro β /MIP-2) a,d , CXCL3 (Gro γ) d , CXCL10 (IP-10) b,c , CXCL11 (I-TAC) d , XCL1 (lymphotactin)
Свободные радикалы	Оксид азота e,f , супероксид e,f
Другие	Кортикотропин-высвобождающий фактор b , урокортин b , вещество P a

Примечание. a,b – белки, определенные методом ELISA или иммуногистохимически; c,d – по экспрессии mRNA; e,f – свободные радикалы; a,c,e – данные на грызунах, b,d,f – на человеке. Некоторые цитокины и факторы роста, в том числе TNF, VEGF, высвобождаются в виде как преформированной формы, так и вновь синтезируемой. Присутствие многих веществ в цитоплазматических гранулах тучных клеток установлено иммуногистохимически. [Расшифровку сокращений см.: Манько В.М., Титова А.В. Иммунология в аббревиатуре. Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. 2013; 17 (1–7, 9, 10).]

Таблица 2. Активация тучных клеток в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета [17]

Способ активации тучных клеток	Высвобождение преформированных медиаторов	Высвобождение цитокинов, хемокинов и факторов роста
Опосредуемые иммунологическими рецепторами:		
IgE (Fc ϵ RI)	+	+
IgG1 (Fc γ RIII-мышей, Fc γ RI-тучных клеток человека, обработанных IFN- γ)	+	+
Ig-связывающие суперантигены:		
Эндогенные (белок Fv в HBV и HCV)	+	+
Бактериальные (<i>S. aureus</i> , белок A; <i>P. magnus</i> , белок L)	+	?
Вирусные (HIV gp120)	+	+
Опосредуемые рецепторами комплемента:		
Продукты активации комплемента (C3a/C3aR, C5a/C5aR, C3b/CR3, C4b/CR4)	+	?
Опосредуемые toll-подобными рецепторами:		
Пептидогликан (TLR2)	$\pm$	+
dsRNA (вирусная), poly(I:C) (TLR3)	–	+
LPS (TLR4/CD14)	–	+
Флагеллин (TLR5)	–	+
ssRNA (вирусная; TLR7)	–	+
CpG DNA (TLR9)	–	+
Действие патогенов и их продуктов:		
Бактерии		
Ко-стимуляторная молекула CD48:		
<i>E. coli</i> FimH	+	+
Токсины:		
Токсин A <i>Clostridium difficile</i>	–	+
Холерный токсин	–	+
Цитотоксин <i>H. pylori</i>	–	+
Гемолизины	+	?
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
Вирусы:		
Вирус гриппа, респираторный синцитиальный вирус	–	+
Вирус денге	–	+
Вирус Сендай	+	?
Паразиты:		
<i>Schistosoma mansoni</i>	+	?
<i>Leishmania major</i>	+	+
Эндогенные пептиды, цитокины, медиаторы воспаления:		
Вещество P, нейротензин, пр. нейропептиды	+	+
β -Дефензин-2	+	?
LL-37	+	?
Эндотелин-1	+	?
Фактор роста стволовых клеток	+	+
Интерлейкин-12	–	+
TNF	+	?
Интерлейкин-1	–	+
Простагландин E $_2$	–	+
Компоненты ядов:		
Фосфолипаза A $_2$	+	+
Мастопапан (яда ос)	+	?
MCD-пептид (яда пчел)	+	+
Меллитин (яда пчел)	+	?
Гистаминвысвобождающие пептиды (яда шершня)	+	?

Примечание. «+» – реакция описана; «–» – реакция не получена; « $\pm$ » – незначительный ответ или противоречивые сведения; «?» – реакция не исследована.

Появление иммуноглобулина E (IgE) в филогенезе

История эволюции белковых структур, которые сейчас относят к иммуноглобулинам, охватывает сотни миллионов лет [3]. Иммуноглобулины и поверхностный белковый комплекс Т-лимфоцитов, ответственный за распознавание антигена (Т-клеточный рецептор) и относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов, возникли, как считают, с появлением челюстных позвоночных. В ходе эволюции возникали новые линии животных и, соответственно, появлялись новые классы иммуноглобулинов и их изоформ. Механизм их появления, вероятнее всего, заключается в дупликации генов, в результате которой образующиеся копии гена накапливают мутации быстрее, чем гены, существующие в одном экземпляре. Одновременно с этим действует механизм утраты генов. Общая картина представлена таким образом, что хрящевые рыбы имеют 3 класса иммуноглобулинов: IgM, IgW, который соответствует классическому типу и включает тяжелые и легкие цепи, и IgNAR, у которого легкие цепи отсутствуют. Этот уникальный иммуноглобулин впервые обнаружен в сыворотке крови акулы-мечехвоста (*Ginglymostoma cirratum*) в 1995 г. Он представляет собой гомодимер тяжелых цепей, лишенный легких цепей. Каждая цепь состоит из вариабельного домена и 5 константных доменов, 4 последние гомологичны константным доменам IgW [18]. Таким образом, антигенсвязывающий участок у этого древнего предшественника находится в вариабельной области тяжелых цепей. На этом этапе эволюции функционирует утраченная впоследствии особенность: хрящевые рыбы имеют организацию иммуноглобулинового локуса, отличную от других позвоночных. У хрящевых рыб существуют множественные гены для каждого класса иммуноглобулинов и имеется много таких малых кластеров, в то время как у других позвоночных присутствуют одиночные гены. Эти гены организуются в малые рearранжируемые участки, состоящие из одиночного V, одного или двух D-сегментов, дополненных J и соответствующей константной областью (V-D-D-J-C). У других позвоночных представлены множественные V-области с последующими многими D-сегментами (нередко более 20) и затем J (3–7) сегментами и следующими за ними константными сегментами [3]. У костистых рыб, составляющих наибольшую группу позвоночных, число классов и изоформ иммуноглобулинов сильно различается. Так, у рыбы аллигатора гар (миссисипский панцирник из видов рыб семейства панцирниковых), которая представляет собой древнюю ветвь костистых рыб, имеется лишь 1 класс иммуноглобулина – IgM, в то время как у *Danio rerio* и у радужной форели – 3 класса иммуноглобулинов, и каждый содержит только 1 изоформ: IgM, IgD и IgT/Z (IgT – у примитивных костистых рыб). Иная картина у амфибий. Например, гладкая шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*) имеет 5 классов иммуноглобулинов: IgM, IgD, IgY, IgX и IgF [19]. IgX, по-видимому, является эквивалентом IgA птиц

и млекопитающих, а IgY – древний предок IgG и IgE человека [1, 20].

Рептилии, как и костистые рыбы, имеют разное число классов и изоформ иммуноглобулинов. Так, ящерица североамериканский краснотелый анолис (*Anolis carolinensis*) имеет только 3 класса иммуноглобулинов одного изоформ (IgM, IgD, IgY), в то время как американский и китайский аллигаторы имеют 4 класса иммуноглобулинов 10 изоформ (3 изоформ IgM, 3 изоформ IgA, 3 изоформ IgY и 1 изоформ IgD). У аллигаторов, по-видимому, произошла серия дупликации генов, приведшая к появлению как нескольких функциональных генов, так и псевдогенов.

У птиц имеется относительно незначительное количество классов и изоформ иммуноглобулинов, что объясняют произошедшей позже утратой генов [3]. У кур только 3 иммуноглобулиновых гена, по одному для IgM, IgA и IgY [21, 22].

У высших млекопитающих 5 классов иммуноглобулинов (IgM, IgD, IgG, IgA, IgE) и различное число изоформ. Например, у человека 9 изоформ (4 изоформ IgG и 2 – IgA, по одному IgM, IgD, IgE). Мыши имеют 8 изоформ, так как IgA представлен лишь одним изоформом. Кролики же имеют 17 изоформ, так как обладают 13 разными копиями гена для IgA (табл. 3).

Выраженное расширение функций иммуноглобулинов стало заметно уже у древних четвероногих. В рамках настоящей статьи особый интерес представляют сведения об изменениях, происходивших у ранних млекопитающих и включающих дупликацию гена IgY, которому приписывается ключевая роль в эволюции антител [21]. Впервые представление о существовании этого особого иммуноглобулина у кур как основного сывороточного иммуноглобулина было высказано давно [23]. В качестве обоснования этой точки зрения были приведены данные о том, что этот иммуноглобулин отличался по ряду характеристик от IgG млекопитающих, но имел некоторое сходство с IgM. Такой взгляд был принят далеко не сразу, долгое время считали, что IgY функционально аналогичен IgG млекопитающих. Однако последующие исследования, результаты которых включали обнаружение IgY не только у кур, но и у амфибий [19], у рептилий [24], а позже у утконоса (*Ornithorhynchus anatinus*) [25], с одной стороны, а с другой – получение в кристаллической форме доменов C_γ3 и C_γ4 IgY кур [26] позволили прийти к заключению о сходстве IgY как с IgE, так и с IgG человека. Соответственно, было высказано предположение о том, что IgY является особым классом иммуноглобулина – древним предком обоих иммуноглобулинов млекопитающих: IgG и IgE. Такое представление сейчас наиболее распространено [3, 21].

Что касается происхождения самого IgY, наиболее общепринято предположение о том, что дупликация гена для IgM стала событием, ведущим к образованию IgY [27]. Такое предположение было высказано, когда стали считать, что IgM является наиболее древним иммуноглобулином, от которого произошли все другие

иммуноглобулины. В действительности, видимо, дело обстоит сложнее. Высказано предположение, что IgA впервые появился в результате дупликации гена IgM, а затем IgY возник как из IgM, так и предкового IgA [21].

Это предположение обосновано довольно вескими аргументами, вытекающими из сведений об экспериментальной эволюционной иммунологии. Оказалось, что домены тяжелых цепей CH1 и CH2 IgA рептилий, ящерицы – леопардового геккона (*Eublepharis macularius*), по аминокислотным остаткам гомологичны соответствующим доменам IgY, в то время как домены CH3 и CH4 IgY – доменам CH3 и CH4 IgM [27]. Такие же сходные с IgY последовательности в доменах CH1 и CH2 и с IgM – CH3 и CH4 обнаруживаются и у IgX (аналог IgA) шпорцевых лягушек (*Xenopus tropicalis*) [21, 28, 29]. Во время выполнения цитированных работ [28, 29] IgX еще не был обнаружен у аксолотля (неотеническая личинка некоторых видов амбистом; земноводное), поэтому было сделано предположение о том, что IgX (IgA) образуется вследствие рекомбинации IgM и IgY [28]. Однако немногим позже IgX обнаружили и у аксолотля [30], а потому допустимо было предположить, что IgM привел к образованию IgX (IgA), а тот в свою очередь – к образованию IgY. Анализ филогенеза тяжелых цепей IgA, IgY и IgM показал, что IgM филогенетически ближе к IgA, чем к IgY, что свидетельствует о более раннем появлении мукозальных антител (IgA/IgX), чем IgY. Другой мукозальный иммуноглобулин IgZ уникален для костистых рыб. IgZ образует тетрамеры, как и IgM костистых рыб, и обнаруживается на слизистой поверхности жабр. Именно он может рассматриваться как предковое мукозальное антитело, филогенетически более древнее, чем IgX и IgA [21]. Обращают внимание на характеристики хвостового участка и J-цепи (которая отсутствует у IgY) у IgA и IgM, а также на то, что оба иммуноглобулина могут связываться с одними и теми же типами рецепторов: FcμR и рецептором для полимерных иммуноглобулинов (poly-Ig receptor – PIGR), находящимся в той же хромосомной области, что и классические рецепторы для Fc-фрагментов (FcRs), и являющимся транспортным рецептором для IgA и IgM [21, 31]. Результатом обсуждения этих сведений стало допущение, что два домена предка IgA потребовались для появления IgY [21].

Принципиальное строение IgY соответствует классической структуре мономерного иммуноглобулина; IgY, как и его функциональный аналог IgG млекопитающих, состоит из двух легких и двух тяжелых цепей. Легкие цепи (18 кДа) содержат один вариабельный и один константный домен, а тяжелые цепи (65 кДа), как и тяжелые цепи IgE млекопитающих, состоят из четырех константных и одного вариабельного доменов. Fab-фрагменты, подобно Fab-фрагментам иммуноглобулинов млекопитающих, имеют антигенсвязывающие участки, в то время как Fc-фрагмент содержит домены, ответственные за эффекторные функции: активацию комплемента, фагоцитоз бактерий после их опсонизации и сенсibilизацию тучных клеток [32].

Таблица 3. Изотипы иммуноглобулинов у разных видов животных [3, 21]

Вид животного	Изотипы иммуноглобулинов
<i>Danio rerio</i>	IgZ, IgM, IgD
Шпорцевая лягушка	IgM, IgD, IgX, IgY, IgF
Ящерица	IgM, IgD, IgY
Китайский аллигатор	IgM1-IgM3, IgD, IgA1-IgA3, IgY1-IgY3
Курица	IgM, IgA, IgY
Утконос	IgM, IgD, IgO, IgG1, IgG2, IgA1, IgA2, IgE
Опоссум	IgM, IgG1 (только один субкласс), IgE, IgA
Кролик	IgM, IgG1 (только один субкласс), IgE, IgA1-IgA13
Мышь	IgM, IgD, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgE, IgA
Человек	IgM, IgD, IgG1-IgG4, IgE, IgA1-IgA2

Наиболее обоснована и распространена точка зрения, рассматривающая IgY в качестве непосредственного предшественника IgG и IgE. Итак, можно полагать, что заключительным этапом эволюции иммуноглобулинов стала дупликация генов IgY с возникновением IgG и IgE. Генная дупликация IgY позволила разделить важнейшие функции между двумя классами иммуноглобулинов, прежде объединенных в IgY. Функция сенсibilизации и активации тучных клеток теперь осуществляется через IgE, а антитела, принадлежащие к IgG, имеющему наивысшую концентрацию в крови, сохранили за собой функции активации комплемента, клиренса иммунных комплексов, антителозависимой цитотоксичности. Так, IgE обнаруживается только у млекопитающих, но его присутствие у всех трех линий млекопитающих (однопроходных, сумчатых, плацентарных) показывает, что IgE как отдельный изотип очень рано появился в эволюции млекопитающих. Возможно, все изотипы иммуноглобулинов млекопитающих, считая IgE, были у общего предка млекопитающих в их настоящей форме по крайней мере 150–170 млн лет назад. Однако не исключено, что они появились даже 310–330 млн лет назад, т. е. при ответвлении линии млекопитающих от линии рептилий [33, 34]. Линия птиц – последнее ответвление в эволюционном дереве перед ответвлением линии млекопитающих.

Несмотря на значительные вариации аминокислотной последовательности, обнаруживаемые в ε-цепях различных видов животных, существует довольно сильное давление для поддержания общей структуры IgE. Еще раз следует обратить внимание на то, что генная дупликация IgY у линии животных, ведущей к эволюции в сторону млекопитающих, возможно, привела к биологически более выгодному разделению важней-

ших известных на сегодня эффекторных функций IgG и IgE. Это представление согласуется с тем, что ограничение роли основного изотипа (IgG) плазмы крови в активации тучных клеток и базофилов имеет очевидные селекционные преимущества, что объясняет сохранение IgG и IgE у всех существующих в настоящее время на земле трех линий млекопитающих [34].

Итак, имеющиеся сведения позволили выделить в эволюции иммуноглобулинов позвоночных 3 наиболее существенные этапа, что обобщено в работе [31]. Число иммуноглобулинов и изотипов иммуноглобулинов возрастало в ходе эволюции от двух до трех у рыб, иногда более чем до 15 у млекопитающих (табл. 3). Наиболее значимым этапом в этом возрастании оказалась дупликация гена IgM, что привело к образованию древнего предка IgY. Это произошло, по-видимому, при появлении наземных позвоночных (четвероногих). Вторым этапом, вероятно, стала дупликация гена IgM, приведшая к образованию IgA/IgX. Третий и главный этап заключался в дупликации гена IgY, обеспечившей появление IgG и IgE. В вышеприведенной оценке эволюции иммуноглобулинов обращено также внимание на имевшую место потерю отдельных иммуноглобулинов, например, IgD у птиц и однопроходных. Действовавший механизм утраты отдельных генов проявлялся и в том, что куры имеют только один изотип легких цепей, в то время как млекопитающие – 2, а многие виды рыб – 3. Это можно расценить так, что птицы утратили локусы двух изотипов легких цепей. Увеличение числа разных классов иммуноглобулинов и их изотипов, наблюдаемое у многих четвероногих, сопровождалось увеличением числа соответствующих изотип-специфических рецепторов.

Высокоаффинный рецептор для IgE (Fc ϵ RI) в эволюционном ряду Fc-рецепторов

Подробное описание строения и функции клеточных рецепторов для разных изотипов иммуноглобулинов приведено в специальной литературе [35, 36]. Изотип-специфическое свойство Fc-рецепторов (FcRs) обеспечивает уникальную способность: фиксировать разные изотипы иммуноглобулинов (и, соответственно, принадлежащие к ним антитела) на определенных клетках и выполнять разнообразные эффекторные функции после взаимодействия с антигеном. Иными словами, разные виды клеток организма вооружены структурами распознавания молекул чужеродного антигена. Понятно, что картина разнообразия Fc-рецепторов, способных избирательно фиксировать определенные иммуноглобулины, сформирована в ходе многих миллионов лет эволюции у высших млекопитающих. Вполне оправдано, что эта картина может быть иллюстрирована довольно полно изученным Fc-рецепторным аппаратом человека и наиболее широко используемых в экспериментальной иммунологии животных – мышей.

Человек и мыши имеют сложный набор Fc-специфических рецепторов, которые подходят к различным изотипам и подклассам иммуноглобулинов.

4 основных типа классических Fc-рецепторов для IgG: это Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII и Fc γ RIV, – обнаруживают разной степени сродство (аффинитет) с четырьмя изотипами IgG [37, 38]. Кроме этого, почти у всех плацентарных млекопитающих описаны следующие Fc-рецепторы: один высокоаффинный рецептор для IgE (Fc ϵ RI), один общий для IgG и IgA (Fc $\alpha\mu$ R), один для IgM (Fc μ R) и один для IgA (Fc α RI) [31]. Внеклеточные домены α -цепей этих рецепторов, ответственные за связывание с иммуноглобулинами, сходны по строению и, вполне вероятно, они происходят от одного или нескольких предков. Возникновение разных α -субъединиц может быть объяснено успешной дупликацией генов. У человека все α -цепи рецепторов для IgG и IgE имеют 2 внеклеточных иммуноглобулиноподобных домена. Исключение составляет Fc γ RI, который содержит 3 таких домена. Сравнительно недавно показано, что у опосума имеются все классические формы рецепторов для IgG и IgE за исключением Fc γ RI (высокоаффинный рецептор для IgG) [39]. Учитывая эти данные, было сделано предположение, что рецепторы, имеющие 2 домена, первыми появились в ходе эволюции млекопитающих [39]. Трансмембранный участок, который «заякоривает» рецептор в мембране клетки, есть у всех рецепторов для IgG и IgE. Исключение составляет один вариант (Fc γ RIIIB) рецептора Fc γ RIII человека [37]. Fc γ RIIIB – низкоаффинный рецептор для IgG, который важен для осуществления опосредуемых нейтрофилами функций [40], он не имеет цитоплазматического хвоста. У некоторых вышеуказанных рецепторов цитоплазматическая хвостовая область опосредует передачу сигнала в клетку. Однако у многих из них сигнальная функция выполняется другой субъединицей рецептора – γ -цепью [41]. Этот неподобный иммуноглобулину домен, содержащий сигнальную субъединицу, является членом небольшого семейства родственных молекул, включая ζ -цепь T-клеточного рецептора (TCR), адаптерные белки DAP10 и DAP12 (с молекулярной массой 10 и 12 кДа соответственно) [31]. Последние два указанных белка выполняют функцию сигнальных компонентов рецептора NK-клеток, они родственны рецепторам, содержащим иммуноглобулиновые домены [42].

Биологическая функция Fc-рецепторов регулируется ITAM (содержащие тирозин-активационные аминокислотные последовательности в иммунорецепторах) и ITIM (содержащие тирозин-ингибирующие аминокислотные последовательности в иммунорецепторах), которые, соответственно, активируют и тормозят клеточные функции [36]. Эти мотивы (короткие аминокислотные последовательности) находятся в цитоплазматической части γ -цепи рецептора, а в случае Fc γ RIIIB – в цитоплазматической части α -цепи. FcRs, содержащие ITAM, активируют клетки, эндоцитоз, фагоцитоз, а рецепторы с ITIM тормозят активацию клеток. Fc ϵ RI имеет также отдельную субъединицу – β -цепь, которая, как предполагают, выполняет роль усилителя сигнала благодаря наличию одного цитоплазматического мотива ITAM [43]. β -Цепи не имеют гомологии с α -цепями, и их гены

располагаются на другой хромосоме. Белок β -цепь является членом семейства MS4A (membrane-spanning 4A), в которое входят молекулы CD20 и еще около 20 членов генома человека [44].

Fc μ R содержит лишь один иммуноглобулиновый домен и находится в относительно отдаленном родстве с другими рецепторами. Цитоплазматический участок Fc μ R имеет высококонсервативную область, обогащенную серином-тиозином вместо ITIM или ITAM, и расположен в той же хромосомной области, что и рецепторы для IgG и IgE [31].

После завершения расшифровки генома довольно значительного числа видов млекопитающих было открыто новое семейство родственных друг другу рецепторов. В геноме человека обнаружено 8 разных FcR-подобных (FcRL) генов (FcRL1-FcRL6, а также FcRLA и FcRLB). Число внеклеточных иммуноглобулиновых доменов значительно различается у этих рецепторов: от 9 у FcRL5 до 3 у FcRL1 и FcRL6. У человека все эти домены находятся в одном и том же хромосомном регионе, как и большинство классических FcRs. В той же области обнаружены FcRLA и FcRLB. Оба эти представителя лишены трансмембранного участка и обнаруживаются в цитоплазме клетки [31, 45, 46]. Лиганды для этих рецепторов оставались неизвестными, пока не было обнаружено, что FcRL4 и FcRL5 связывают IgA и IgG соответственно, а FcRL6 взаимодействует с молекулами MHC II класса [31]. Что касается других молекул FcRL, лиганды для них пока не установлены.

В противоположность большинству классических FcRs в FcRL имеется высокая степень представления ITIM в цитоплазматическом хвостовом участке. Это дало основание считать, что первично эти рецепторы имели запирающую (тормозящую) функцию в процессе иммунного ответа. Эта гипотеза объясняет интерес к генетическим исследованиям, устанавливающим вовлечение вариантов FcRL3 в аутоиммунные заболевания [31]. Можно заметить, что FcRL1-FcRL5 преимущественно экспрессируются на разных стадиях развития В-клеток. FcRL6 экспрессируется главным образом на разных субпопуляциях Т-клеток и естественных клеток-киллеров. FcRL1-FcRL5 регулируют функции В-клеток: созревание, дифференцировка, секреция антител и преклонение на синтез других иммуноглобулинов [47].

Среди рецепторов, фиксирующих иммуноглобулины, следует упомянуть еще один. Это рецептор полимерных иммуноглобулинов (PIGR), который представлен в том же хромосомном регионе, что и классические FcRs. Он является транспортным рецептором для полимерных иммуноглобулинов IgA и IgM [48]. Молекула этого рецептора имеет разное количество внеклеточных иммуноглобулиновых доменов – это зависит от вида животных: например, от 2 доменов у костистых рыб [49–51] до 5 доменов у человека [52] и кролика [53]. Другие рецепторы, содержащие иммуноглобулиновые домены, например, иммуноглобулиноподобные рецепторы естественных киллеров (KIRs), иммуноглобулиноподобные рецепторы лейкоцитов (LILRs) и ассо-

циированные с лейкоцитами иммуноглобулиновые рецепторы (leukocyte-associated Ig-like receptors – LAIRs) также являются отдаленными родственниками классических FcRs- и FcRL-рецепторов. Мышьи гомологи человеческих LILRs обозначают как PIRs (paired Ig-like receptors). Лигандами для KIRs и LILRs млекопитающих первично являются молекулы MHC I класса. Интересно, что Fc μ R обнаруживает более высокое сходство по аминокислотным последовательностям (35%) с KIRs и LILRs, чем с классическими FcRs (20%). Fc μ R также расположен в лейкоцитарном рецепторном кластере (LRC) на 19-й хромосоме человека вместе с рецепторами KIRs и LILRs. Гомология генов в LRC обнаружена у древних предков позвоночных (оболочников). Много родственных генов выявлено у некоторых видов рыб, что расценивается как раннее появление этих рецепторов в ходе эволюции позвоночных [31].

Поскольку IgY является непосредственным предшественником IgG и IgE, описание клеточных рецепторов для IgY представляет особый интерес. В настоящее время охарактеризованы 3 типа рецепторов, связывающихся Fc-фрагментом IgY: иммуноглобулиноподобный рецептор кур [chicken Ig-like receptor AB1 (CHIR-AB1)], куриный рецептор желточного мешка для IgY [chicken yolk sac IgY receptor (FcRY)] и *Gallus gallus* Fc-рецептор (ggFcR) – рецептор, описанный у банковской джунглевой курицы (*Gallus gallus*) из отряда курообразных, от которой, возможно, происходят домашние куры [21].

LRC у птиц находится на 31-й хромосоме (у человека этот комплекс расположен на хромосоме 19q13.4 и содержит более 40 генов, включающих семейство иммуноглобулиноподобных рецепторов клеток-киллеров и иммуноглобулиноподобных рецепторов лейкоцитов), в которой зашифровано семейство генов, называемое CHIR (chicken Ig-like receptor) генами. Гены CHIR – значительное по числу, разнообразное и полиморфное мультигенное семейство генов, ответственных за экспрессию более 100 белков. Их классифицируют как трансмембранные белки I типа с одним или двумя иммуноглобулиноподобными доменами, представленными на клеточной поверхности, и подразделяют на активирующие (CHIR-A), ингибирующие (CHIR-B) или бифункциональные (CHIR-AB). Активирующий рецептор имеет короткий цитоплазматический хвост без сигнального мотива, но трансмембранный домен содержит положительно заряженный остаток, который обеспечивает взаимодействие рецептора с адапторной молекулой, подобной γ -цепи Fc ϵ RI (Fc ϵ RI γ), активирующей ITAM [54]. Тормозящие (ингибирующие) рецепторы не имеют такого заряженного остатка в трансмембранном домене, но они снабжены длинным цитоплазматическим хвостом, содержащим ITIM. Бифункциональные (CHIR-AB) рецепторы обладают обоими свойствами: имеют положительно заряженный остаток в трансмембранном домене и длинный цитоплазматический хвост, включающий 2 ITIM. Бифункциональные CHIR-AB1 связываются с Fc μ . Специальный анализ, выполненный на материале разных линий кур, позволил идентифици-

ровать около 20 генов CHIR-AB с разной связывающей способностью по отношению к IgY: от неопределяемой до высокоаффинной. За связывание CHIR-AB1 с IgY ответственен внеклеточный домен рецептора, представленный на наружной стороне клеточной мембраны. Связывание зависит от ключевых 5 аминокислотных остатков, образующих участок связывания. Установлено необычное соотношение рецептор/иммуноглобулин в образующемся комплексе: 2 молекулы CHIR-AB1 связывают 1 молекулу IgY (соотношение 2 : 1) [55, 56], а не 1 : 1, как это соответствует взаимодействию Fc_{RI} с IgE.

Установление взаимодействия CHIR-AB1 с IgY в соотношении 1 : 1 приводит к образованию низкоаффинного комплекса, а соотношение 2 : 1 характеризуется повышением аффинности вследствие эффекта avidности, когда рецептор был привязан к поверхности [55]. За связывание CHIR-AB1, скорее всего, ответственен участок в области C₃/C₄-доменов IgY. По соотношению 2 : 1 и участкам связывания взаимодействие IgY с CHIR-AB1 напоминает взаимодействие Fc_{RI} с C₂/C₃-доменами IgA [57].

CHIR-AB1 экспрессирован на незрелых и зрелых В-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах и натуральных клетках-киллерах кур [54].

Что касается распространенности представленности CHIR у разных видов птиц, данные на этот счет крайне скудные и довольно обескураживающие. Дело в том, что у других исследованных видов птиц, за исключением кур, аналоги CHIR не найдены. Например, CHIR не идентифицирован у уток, но у индюков, близких родственников кур, описан прототип CHIR (ген, располагается на 3-й хромосоме генома индюка) [58], обозначенный как TILR (turkey Ig-like receptor). На основании оцененных последовательностей сделано заключение о том, что эти рецепторы представлены одним активирующим типом рецептора (TILR-A), одним ингибирующим (TILR-B) и четырьмя бифункциональными (TILR-AB). Особенность клеточного представительства состояла в том, что рецептор в большей степени был представлен на тромбоцитах, а не на лимфоцитах.

Рецептор FcRY обнаружен у кур, он функционально сходен с MHC-подобным белком [неонатальный Fc-рецептор (FcRn) – гетеродимерный рецептор, состоящий из тяжелой цепи с MHC I-подобной укладкой и микроглобулина β₂; рецептор узнает участок, соединяющий CH2 и CH3 домены IgG], ответственным за транспорт материнского IgG к плоду [21].

На основании специального анализа FcRY, выделенного из желточного мешка, показано, что этот рецептор может быть отнесен к семейству маннозных рецепторов, являясь структурным гомологом рецептора фосфолипазы A2. FcRY состоит из 10 внеклеточных доменов, включающих N-концевой домен, богатый цистеиновыми остатками, фибронектинового домена II типа и 8 лектиноподобных доменов C-типа. Как и в процессе

связывания FcRn с IgG, FcRY связывает IgG при pH 6, и связь разрушается при pH 8, но домены, которые составляют эти функционально эквивалентные белки, относятся к совершенно разным семействам генов, что рассматривается как пример конвергентной эволюции [21].

Анализ образующегося при pH 6 комплекса между двумя молекулами растворимого FcRY и IgG, проведенный с использованием криоэлектронной микроскопии, показал взаимодействие рецептора с доменами C₄ тяжелых цепей [59].

Другой рецептор IgY, ggFcR, неожиданно был обнаружен на 20-й хромосоме [60], т. е. на участке, не относящемся к LRC или к FcR-локусу. На основании поиска в базе данных авторы клонировали новый Fc-рецептор кур, названный gallus gallus Fc receptor (ggFcR), который избирательно связывал IgY кур. Этот рецептор состоит из четырех внеклеточных иммуноглобулиноподобных доменов, трансмембранного региона, содержащего аргинин, несущий положительный заряд, и короткого цитоплазматического хвоста. Так, ggFcR ассоциирован с общей γ-цепью, что расценивается как наличие у него активирующего свойства. В этой же работе показана экспрессия ggFcR на мононуклеарных клетках периферической крови, тромбоцитах и макрофагах. Геномная организация подобна большинству иммуноглобулиноподобных рецепторных генов, у которых каждый иммуноглобулиновый домен кодируется отдельным экзонами. Сигнальный пептид кодируется двумя экзонами, второй имеет 36 пар нуклеотидов, что является отличительным признаком генов, кодируемых в лейкоцитарном рецепторном комплексе. Филогенетический анализ тоже показал родство с генами, кодируемыми в LRC. Однако, хотя это удивительно, ggFcR не кодируется в LRC, а расположен в виде одиночного изолированного гена на конце 20-й хромосомы.

Таким образом, новый обнаруженный рецептор для IgY кур находится в регионе, где нет генов FcR, имеющих у млекопитающих. Одиночные CH-домены (константные домены тяжелых цепей иммуноглобулина) не связывались с ggFcR, в то время как домены C₂–C₄ обладали хорошей, а домены C₃–C₄ умеренной активностью [61].

До сих пор не определена трехмерная структура IgY. Исключение составляют области C₃–C₄ куриного IgY. Так как в этой области отсутствует C₂, трудно сказать, имеет ли Fc-фрагмент в составе IgY преимущественно изогнутую форму, подобную конформации Fc-фрагмента IgE, или же возможно «сгибание-разгибание» между изогнутой и вытянутой формами.

Характер конформации IgY в виде изогнутой формы, вытянутой или сгибаемой (напомним, что тяжелая цепь IgY обычно состоит из 4 константных доменов и не имеет шарнирного участка, но есть вариант с шарнирным участком и варианты с укороченными

Fc-рецепторами), имеет значение для понимания взаимодействия IgY с 3 типами рецепторов (CHIR-AB1, FcRY и ggFcR). По крайней мере наиболее вероятно, что IgY связывается с CHIR-AB1 способом, подобным связыванию IgA с FcRI. С FcRY IgY связывается способом, напоминающим IgG с FcRn, а с ggFcR IgY – по механизму, сходному со связыванием IgE с FcRI и IgG с FcγR [21].

Приведенные данные, полученные на курах, несомненно, интересны, так как на эволюционном древе отхождение от основного ствола ветви птиц является ближайшим к ответвлению млекопитающих, у которых появилась новая форма (наиболее молодая) иммуноглобулина – IgE. Можно допустить, что появление или сборка полноценного FcRI, состоящего из α-цепи, β-цепи и димера γ-цепей (подробности о строении FcRI см. [4, 62]), произошли из прототипов этих цепей одновременно с возникновением IgE. В связи с этим интерес представляло бы выяснение существования FcRI у низших млекопитающих (однопроходных), у которых уже появился IgE. Такого рода исследования были запланированы в начале 2000-х годов [63], но в последующем их результаты не удалось найти в литературе.

Вышеописанные данные следует дополнить сведениями о представительстве FcRI на клетках животных. Следует заметить, что экспрессия FcRI на клетках наиболее полно изучена у человека и мышей. Что касается других видов животных, имеющиеся результаты наблюдений крайне скудные. Наиболее распространена точка зрения о том, что у грызунов (мышей) FcRI имеет только тетрамерную структуру (субъединицы αβγ₂). FcRI человека может экспрессироваться в виде как тетрамерной (αβγ₂), так и тримерной (αγ₂) формы. Клеточное распределение FcRI у человека и мышей также различается. FcRI у мышей экспрессируется на тучных клетках и базофилах, в то время как у человека FcRI в тримерной форме присутствует и на моноцитах/макрофагах, эозинофилах, тромбоцитах, клетках Лангерганса, дендритных клетках [64–66]. Вполне вероятно, что этот перечень в действительности больше. Нужно иметь в виду, что плотность распределения FcRI на этих клетках намного уступает плотности его распределения на тучных клетках и базофилах. Другие важные результаты исследований в этой области, актуальные и сегодня, обобщены в работе [64]: участие FcRI в представлении антигена; генетические свидетельства того, что FcRI может влиять на развитие некоторых паразитарных заболеваний; доказательства того, что β-субъединица FcRI усиливает действие на биологические функции рецептора; выявление воз-

можной связи атопического фенотипа с полиморфизмом β-цепи человеческого FcRI; участие аутоантител к α-цепи FcRI в развитии клинических проявлений хронической крапивницы и пр. Все это показывает, что функции FcRI гораздо разнообразнее тех, которые считаются традиционными и нуждаются в специальных целенаправленных исследованиях.

Избирательная экспрессия FcRI у грызунов только на тучных клетках и базофилах требует отдельного комментария. Нельзя игнорировать сведения, полученные на крысах (род грызунов семейства мышинных, т. е. ближайших родственников мышей) [67]. С использованием проточной цитометрии, флуоресцентной микроскопии и вестерн-блоттинга показано, что у крыс, как и у человека, функционально активная тримерная форма (αγ₂) рецептора FcRI экспрессируется на эозинофилах и макрофагах. Также показано, что эти 2 типа клеток вызывают IgE-опосредованное, FcRI-зависимое клеточное цитотоксическое действие на паразитов (шистосом). Эти данные свидетельствуют о видовых различиях между крысами и мышами либо могут быть связаны с упомянутой низкой плотностью экспрессии рецептора на эозинофилах и макрофагах и недостаточной чувствительностью использованных способов его выявления.

Итак, эволюционный путь развития иллюстрирует ход создания трех основных составляющих частей IgE-опосредованной аллергической реакции, включая тучные клетки, IgE и FcRI, что позволило осуществить эффекторную функцию аллергического ответа. Эта новая форма реактивности выполняет функцию распознавания очень малых количеств антигена, поступающего в определенном временном режиме через гистогематические барьеры. Таким механизмом вооружаются барьерные ткани для организации аллерген-специфического воспаления, направленного на ограничение зоны действия патогена и его элиминацию [68]. Отсюда следует, что биологически наиболее оправданный способ предупреждения аллергии заключается в восстановлении функций барьерных тканей и в предотвращении развития аллергического ответа [2, 68, 69]. Хочется подчеркнуть, что приведенные ранее перспективные направления исследований [1] сохраняют свое значение. В частности, это касается выяснения последствий для биологии млекопитающих радикального устранения аллергической реактивности, к чему и стремится современная медицина. Между тем важно заметить, что последствия такого радикального вмешательства в биологию высших животных сначала должны быть тщательно изучены на нескольких поколениях животных с искусственно утраченной формой аллергической реактивности.

■ Литература

1. Гушин И.С. Эволюционное предупреждение: аллергия. Пат. физиол. 2014; (1): 57–67.
2. Гушин И.С. Об элементах биологической целесообразности аллергической реактивности. Пат. физиол. 1979; (4): 3–11.

3. Hellman L.T., Akula S., Thorpe M., Fu Z. Tracing the origins of IgE, mast cells, and allergies by studies of wild animals. Front. Immunol. 2017; 8: 1749–70. doi: 10.3389/fimmu.2017.01749.

4. Гущин И.С., Курбачева О.М. Аллергия и аллергенспецифическая иммунотерапия. М.: Фармарус Принт Медиа, 2010.
5. Sibilano R., Frossi B., Pucillo C.E. Mast cell activation: a complex interplay of positive and negative signaling pathways. *Eur. J. Immunol.* 2014; 44: 2558–66. doi: 10.1002/eji.201444546.
6. Voehringer D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 362–75. doi: 10.1038/nri3427.
7. de Barros C.M., Andrade L.R., Allodi S., Viskov C. et al. The Hemolymph of the ascidian *Styela plicata* (Chordata-Tunicata) contains heparin inside basophil-like cells and a unique sulfated galactoglucan in the plasma. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 1615–26. doi: 10.1074/jbc.M604056200.
8. Cavalcante M.C., de Andrade L.R., Du Bocage Santos-Pinto C., Straus A.H. et al. Colocalization of heparin and histamine in the intracellular granules of test cells from the invertebrate *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). *J. Struct. Biol.* 2002; 137: 313–21.
9. Thompson H., Shimeld S.M. Transmission and scanning electron microscopy of the accessory cells and chorion during development of *Ciona intestinalis* type B embryos and the impact of their removal on cell morphology. *Zoolog. Sci.* 2015; 32: 217–22. doi: 10.2108/zs140231.
10. Шапошникова Т.Г., Павлов А.Е. Получение фракции тестальных клеток, окружающих ооциты, у асцидии *Styela rustica*. *Журн. эволюционной биохимии и физиологии.* 2007; 43 (2): 204–5.
11. Шапошникова Т.Г., Столбова А.Ю., Пономарев Н.В., Подгорная О.И. Иммуно- и гистохимические характеристики морулярных и тестальных клеток трех видов асцидий. *Цитология.* 2011; 53: 986–91.
12. Wong G.W., Zhuo L., Kimata K., Lam B.K. et al. Ancient origin of mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 451: 314–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.124.
13. Dobson J.T., Seibert J., Teh E.M., Da'as S. et al. Carboxypeptidase A5 identifies a novel mast cell lineage in the zebrafish providing new insight into mast cell fate determination. *Blood.* 2008; 112: 2969–72. doi: 10.1182/blood-2008-03-145011.
14. Da'as S., Teh E.M., Dobson J.T., Nasrallah G.K. et al. Zebrafish mast cells possess an Fc-RI-like receptor and participate in innate and adaptive immune responses. *Dev. Comp. Immunol.* 2011; 35: 125–34. doi: 10.1016/j.dci.2010.09.001.
15. Mulero I., Sepulcre M.P., Meseguer J., García-Ayala A. et al. Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104: 19 434–9. doi: 10.1073/pnas.0704535104.
16. Mead K.F., Borysenko M., Findlay S.R. Naturally abundant basophils in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*, possess cytophilic surface antibody with reagenic function. *J. Immunol.* 1983; 130: 334–40.
17. Galli S.J., Nakae S., Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2005; 6: 135–42. doi: 10.1038/nri1158.
18. Zielonka S., Empting M., Grzeschik J., Könnig D. et al. Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. *mAbs.* 2015; 7: 15–25. doi: 10.4161/19420862.2015.989032.
19. Zhao Y., Pan-Hammarström Q., Yu S., Wertz N. et al. Identification of IgF, a hinge-region-containing Ig class, and IgD in *Xenopus tropicalis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006; 103: 12 087–92. doi: 10.1073/pnas.0600291103.
20. Гущин И.С. IgE-опосредованная гиперчувствительность как ответ на нарушение барьерной функции тканей. *Иммунология.* 2015; 36 (1): 45–52.
21. Zhang X., Calvert R.A., Sutton B.J., Doré K.A. IgY: a key isotype in antibody evolution. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2017; 92: 2144–56. doi: 10.1111/brv.12325.
22. Zhao Y., Rabbani H., Shimizu A., Hammarström L. Mapping of the chicken immunoglobulin heavy-chain constant region gene locus reveals an inverted α gene upstream of a condensed ν gene. *Immunology.* 2000; 101: 348–53. doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00106.x.
23. Leslie G.A., Clem L.W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.* 1969; 130: 1337–52.
24. Wei Z., Wu Q., Ren L., Hu X. et al. Expression of IgM, IgD, and IgY in a reptile, *Anolis carolinensis*. *J. Immunol.* 2009; 183: 3858–64. doi: 10.4049/jimmunol.0803251.
25. Gambón-Deza F., Sánchez-Espinel C., Magadán-Mompó S. The immunoglobulin heavy chain locus in the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*). *Mol. Immunol.* 2009; 46: 2515–3. doi: 10.1016/j.molimm.2009.05.025.
26. Taylor A.L., Fabiane S.M., Sutton B.J., Calvert R.A. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE. *Biochemistry.* 2009; 48: 558–2. doi: 10.1021/bi8019993.
27. Warr G.W., Magor K.E., Higgins D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today.* 1995; 16: 392–8. doi: 10.1016/0167-5699(95)80008-5.
28. Deza F.G., Espinel C.S., Beneitez J.V. A novel IgA-like immunoglobulin in the reptile *Eublepharis macularius*. *Dev. Comp. Immunol.* 2007; 31: 596–605. doi: 10.1016/j.dci.2006.09.005.
29. Mashoof S., Goodroe A., Du C.C., Eubanks J.O. et al. Ancient T-independence of mucosal IgX/A: gut microbiota unaffected by larval thymectomy in *Xenopus laevis*. *Mucosal Immunol.* 2013; 6: 358–68. doi: 10.1038/mi.2012.78.
30. Schaeferling B., Frippiat J.P. IgX antibodies in the urodele amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Dev. Comp. Immunol.* 2008; 32: 908–15. doi: 10.1016/j.dci.2008.01.001.
31. Akula S., Mohammadamin S., Hellman L. Fc receptors for immunoglobulins and their appearance during vertebrate evolution. *PLoS One.* 2014; 9 (5): e96903. doi: 10.1371/journal.pone.0096903.
32. Dias da Silva W., Tambourgi D.V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010; 135: 173–80. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.12.011.
33. Kumar S.L., Hedges S.B. A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature.* 1998; 392: 917–20.
34. Vernersson M., Aveskogh M., Hellman L. Cloning of IgE from the echidna (*Tachyglossus aculeatus*) and a comparative analysis of epsilon chains from all three extant mammalian lineages. *Dev. Comp. Immunol.* 2004; 28: 61–75.
35. Daëron M., Nimmerjahn F. (eds). *Fc Receptors Series: Current Topics in Microbiology and Immunology* 382. Springer International Publishing, 2014. doi: 10.1007/978-3-319-07911-0.
36. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.
37. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8: 34–47. doi: 10.1038/nri2206.
38. van der Poel C.E., Spaapen R.M., van de Winkel J.G., Leusen J.H. Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, FcγRI. *J. Immunol.* 2011; 186: 2699–704. doi: 10.4049/jimmunol.1003526.
39. Fayngerts S.A., Najakshin A.M., Taranin A.V. Species-specific evolution of the FcR family in endothermic vertebrates. *Immunogenetics.* 2007; 59: 493–506. doi: 10.1007/s00251-007-0208-8.
40. Simtong P., Romphruk A.V., Traum A., Burg-Roderfeld M. et al. Molecular and functional characterization of Fcγ receptor IIb-ligand interaction: implications for neutrophil-mediated immune mechanisms in malaria. *Infect. Immun.* 2018; 86. pii: e00924-17. doi: 10.1128/IAI.00924-17.
41. Yamashita T., Suzuki R., Backlund P.S., Yamashita Y. et al. Differential dephosphorylation of the FcRγ immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines with dissimilar potential for activating Syk. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 28 584–94. doi: 10.1074/jbc.M802679200.
42. Lanier L.L. DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol. Rev.* 2009; 227: 150–60. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00720.x.
43. Blank U., Ra C., Miller L., White K. et al. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature.* 1989; 337: 187–9. doi: 10.1038/337187a0.
44. Liang Y., Tedder T.F. Identification of a CD20-, FcεRIβ-, and HTm4-related gene family: sixteen new MS4A family members expressed in human and mouse. *Genomics.* 2001; 72: 119–27. doi: 10.1006/geno.2000.6472.

45. Davis R.S. Fc receptor-like molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; 25: 525–60. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141541.
46. Ehrhardt G.R., Cooper M.D. Immunoregulatory roles for fc receptor-like molecules. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2011; 350: 89–104. doi: 10.1007/82_2010_88.
47. Rostamzadeh D., Kazemi T., Amirghofran Z., Shabani M. Update on Fc Receptor-Like (FCRL) family: new immunoregulatory players in health and diseases. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2018; 22: 487–502. doi: 10.1080/14728222.2018.1472768.
48. Asano M., Komiyama K. Polymeric immunoglobulin receptor. *J. Oral Sci.* 2011; 53: 147–56. doi: 10.2334/josnusd.53.147.
49. Rombout J.H., van der Tuin S.J., Yang G., Schopman N. et al. Expression of the polymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR) in mucosal tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2008; 24: 620–8. doi: 10.1016/j.fsi.2008.01.016.
50. Feng L.N., Lu D.Q., Bei J.X., Chen J.L. et al. Molecular cloning and functional analysis of polymeric immunoglobulin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2009; 154: 282–9. doi: 10.1016/j.cbpb.2009.07.003.
51. Hamuro K., Suetake H., Saha N.R., Kikuchi K. et al. A teleost polymeric Ig receptor exhibiting two Ig-like domains transports tetrameric IgM into the skin. *J. Immunol.* 2007; 178: 5682–9. doi: 10.4049/jimmunol.178.9.5682.
52. Bakos M.A., Kurosky A., Goldblum R.M. Characterization of a critical binding site for human polymeric Ig on secretory component. *J. Immunol.* 1991; 147: 3419–26.
53. Frutiger S., Hughes G.J., Hanly W.C., Kingzette M. et al. The amino-terminal domain of rabbit secretory component is responsible for noncovalent binding to immunoglobulin A dimers. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 16 673–81.
54. Viertlboeck B.C., Schweinsberg S., Hanczaruk M.A., Schmitt R. et al. The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104: 11 718–23. doi: 10.1073/pnas.0702011104.
55. Arnon T.L., Kaiser J.T., West A.P. Jr, Olson R. et al. The crystal structure of CHIR-AB1: a primordial avian classical Fc receptor. *J. Mol. Biol.* 2008; 381: 1012–24. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.082.
56. Taylor A.I., Beavil R.L., Sutton B.J., Calvert R.A. A monomeric chicken IgY receptor binds IgY with 2:1 stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 24 168–75. doi: 10.1074/jbc.M109.020263.
57. Pürzel J., Schmitt R., Viertlboeck B.C., Göbel T.W. Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA: Fc alpha RI interaction. *J. Immunol.* 2009; 183: 4554–9. doi: 10.4049/jimmunol.0901699.
58. Windau K., Viertlboeck B.C., Göbel T.W. The turkey Ig-like receptor family: identification, expression and function. *PLoS One.* 2013; 8 (3): e59577. doi: 10.1371/journal.pone.0059577.
59. He Y., Bjorkman P.J. Structure of FcRY, an avian immunoglobulin receptor related to mammalian mannose receptors, and its complex with IgY. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011; 108: 12 431–6. doi: 10.1073/pnas.1106925108.
60. Viertlboeck B.C., Schmitt R., Hanczaruk M.A., Crooijmans R.P. et al. A novel activating chicken IgY FcR is related to leukocyte receptor complex (LRC) genes but is located on a chromosomal region distinct from the LRC and FcR gene clusters. *J. Immunol.* 2009; 182: 1533–40. doi: 10.4049/jimmunol.182.3.1533.
61. Schreiner B., Viertlboeck B.C., Göbel T.W. A striking example of convergent evolution observed for the ggFcR:IgY interaction closely resembling that of mammalian FcR:IgG. *Dev. Comp. Immunol.* 2012; 36: 566–71. doi: 10.1016/j.dci.2011.09.013.
62. Sutton B.J., Davies A.M. Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunol. Rev.* 2015; 268: 222–35. doi: 10.1111/imr.12340.
63. Verneris M., Aveskogh M., Munday B., Hellman L. Evidence for an early appearance of modern post-switch immunoglobulin isotypes in mammalian evolution (II): cloning of IgE, IgG1 and IgG2 from a monotreme, the duck-billed platypus, *Ornithorhynchus anatinus*. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 2145–55. doi: 10.1002/1521-4141(200208)32:8<2145::AID-IMMU2145>3.0.CO;2-I.
64. Kinet J.-P. The high affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Ann. Rev. Immunol.* 1999; 17: 931–72.
65. Bruhns P., Jonsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol. Rev.* 2015; 268: 25–51. doi: 10.1111/imr.12350.
66. Kraft S., Kinet J.-P. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 365–78. doi: 10.1038/nri2072.
67. Dombrowicz D., Quatannens B., Papin J.-P., Capron A. et al. Expression of a functional on rat eosinophils and macrophages. *J. Immunol.* 2000; 165: 1266–71. PMID: 10903725.
68. Гушин И.С. Преодоление аллергенами тканевого барьера – решающая форма предрасположения к аллергии. *Пат. физиол.* 2009; (1): 8–13.
69. Гушин И.С. Эпидермальный барьер и аллергия. *Рос. аллергол. журн.* 2007; (2): 3–16.

References

1. Gushchin I.S. Evolutionary warning: allergy. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2014; (1): 57–67. (in Russian)
2. Gushchin I.S. On the elements of biological expediency of allergic reactivity. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 1979; (4): 3–11. (in Russian)
3. Hellman L.T., Akula S., Thorpe M., Fu Z. Tracing the origins of IgE, mast cells, and allergies by studies of wild animals. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1749–70. doi: 10.3389/fimmu.2017.01749.
4. Gushchin I.S., Kurbacheva O.M. Allergy and allergen-specific immunotherapy. Moscow: Farmarus Print Media, 2010. (in Russian)
5. Sibilano R., Frossi B., Pucillo C.E. Mast cell activation: a complex interplay of positive and negative signaling pathways. *Eur. J. Immunol.* 2014; 44: 2558–66. doi: 10.1002/eji.201444546.
6. Voehringer D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 362–75. doi: 10.1038/nri3427.
7. de Barros C.M., Andrade L.R., Allodi S., Viskov C., et al. The Hemolymph of the ascidian *Styela plicata* (Chordata-Tunicata) contains heparin inside basophil-like cells and a unique sulfated galactoglucon in the plasma. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 1615–26. doi: 10.1074/jbc.M604056200.
8. Cavalcante M.C., de Andrade L.R., Du Bocage Santos-Pinto C., Straus A.H., et al. Colocalization of heparin and histamine in the intracellular granules of test cells from the invertebrate *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). *J. Struct. Biol.* 2002; 137: 313–21.
9. Thompson H., Shimeld S.M. Transmission and scanning electron microscopy of the accessory cells and chorion during development of *Ciona intestinalis* type B embryos and the impact of their removal on cell morphology. *Zoolog. Sci.* 2015; 32: 217–22. doi: 10.2108/zs140231.
10. Shaposhnikova T.G., Pavlov A.E. Getting faction testoloni cells surrounding the oocytes of the ascidians *Styela rustica*. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii.* 2007; 43 (2): 204–5. (in Russian)
11. Shaposhnikova T.G., Stolbovaya A.Yu., Ponomartsev N.V., Podgornaya O.I. Immuno- and histochemical characteristics of modular and testoloni cells of three species of ascidians. *Tsitologiya.* 2011; 53: 986–91. (in Russian)
12. Wong G.W., Zhuo L., Kimata K., Lam B.K., et al. Ancient origin of mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 451: 314–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.124.
13. Dobson J.T., Seibert J., Teh E.M., Da'as S., et al. Carboxypeptidase A5 identifies a novel mast cell lineage in the zebrafish providing new insight into mast cell fate determination. *Blood.* 2008; 112: 2969–72. doi: 10.1182/blood-2008-03-145011.
14. Da'as S., Teh E.M., Dobson J.T., Nasrallah G.K., et al. Zebrafish mast cells possess an FcεRI-like receptor and participate in innate and adaptive immune responses. *Dev. Comp. Immunol.* 2011; 35: 125–34. doi: 10.1016/j.dci.2010.09.001.
15. Mulero L., Sepulcre M.P., Meseguer J., García-Ayala A., et al. Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104: 19 434–9. doi: 10.1073/pnas.0704535104.

16. Mead K.F., Borysenko M., Findlay S.R. Naturally abundant basophils in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*, possess cytophilic surface antibody with reagenic function. *J. Immunol.* 1983; 130: 334–40.
17. Galli S.J., Nakae S., Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2005; 6: 135–42. doi: 10.1038/nri1158.
18. Zielonka S., Empting M., Grzeschik J., Könnig D., et al. Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. *mAbs.* 2015; 7: 15–25. doi: 10.4161/19420862.2015.989032.
19. Zhao Y., Pan-Hammarström Q., Yu S., Wertz N., et al. Identification of IgF, a hinge-region-containing Ig class, and IgD in *Xenopus tropicalis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006; 103: 12 087–92. doi: 10.1073/pnas.0600291103.
20. Gushchin I.S. IgE-mediated hypersensitivity as a response to the barrier function of tissues. *Immunologiya.* 2015; 36 (1): 45–52. (in Russian)
21. Zhang X., Calvert R.A., Sutton B.J., Doré K.A. IgY: a key isotype in antibody evolution. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2017; 92: 2144–56. doi: 10.1111/brev.12325.
22. Zhao Y., Rabbani H., Shimizu A., Hammarström L. Mapping of the chicken immunoglobulin heavy-chain constant region gene locus reveals an inverted α gene upstream of a condensed ν gene. *Immunology.* 2000; 101: 348–53. doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00106.x.
23. Leslie G.A., Clem L.W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.* 1969; 130: 1337–52.
24. Wei Z., Wu Q., Ren L., Hu X., et al. Expression of IgM, IgD, and IgY in a reptile, *Anolis carolinensis*. *J. Immunol.* 2009; 183: 3858–64. doi: 10.4049/jimmunol.0803251.
25. Gambón-Deza F., Sánchez-Espinel C., Magadán-Mompó S. The immunoglobulin heavy chain locus in the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*). *Mol. Immunol.* 2009; 46: 2515–3. doi: 10.1016/j.molimm.2009.05.025.
26. Taylor A.L., Fabiane S.M., Sutton B.J., Calvert R.A. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE. *Biochemistry.* 2009; 48: 558–2. doi: 10.1021/bi8019993.
27. Warr G.W., Magor K.E., Higgins D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today.* 1995; 16: 392–8. doi: 10.1016/0167-5699(95)80008-5.
28. Deza F.G., Espinel C.S., Beneitez J.V. A novel IgA-like immunoglobulin in the reptile *Eublepharis macularius*. *Dev. Comp. Immunol.* 2007; 31: 596–605. doi: 10.1016/j.dci.2006.09.005.
29. Mashoof S., Goodroe A., Du C.C., Eubanks J.O., et al. Ancient T-independence of mucosal IgX/A: gut microbiota unaffected by larval thymectomy in *Xenopus laevis*. *Mucosal Immunol.* 2013; 6: 358–68. doi: 10.1038/mi.2012.78.
30. Schaeferling B., Frippiat J.P. IgX antibodies in the urodele amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Dev. Comp. Immunol.* 2008; 32: 908–15. doi: 10.1016/j.dci.2008.01.001.
31. Akula S., Mohammadamin S., Hellman L. Fc receptors for immunoglobulins and their appearance during vertebrate evolution. *PLoS One.* 2014; 9 (5): e96903. doi: 10.1371/journal.pone.0096903.
32. Dias da Silva W., Tambourgi D.V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010; 135: 173–80. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.12.011.
33. Kumar S.I., Hedges S.B. A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature.* 1998; 392: 917–20.
34. Vernersson M., Aveskogh M., Hellman L. Cloning of IgE from the echidna (*Tachyglossus aculeatus*) and a comparative analysis of epsilon chains from all three extant mammalian lineages. *Dev. Comp. Immunol.* 2004; 28: 61–75.
35. Daëron M., Nimmerjahn F. (eds). *Fc Receptors Series: Current Topics in Microbiology and Immunology* 382. Springer International Publishing, 2014. doi: 10.1007/978-3-319-07911-0.
36. Yarlin A.A. Immunology: Textbook. In: *Immunology: Textbook*. Moscow: GEOTAR-Media, 2010.
37. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8: 34–47. doi: 10.1038/nri2206.
38. van der Poel C.E., Spaapen R.M., van de Winkel J.G., Leusen J.H. Functional characteristics of the high affinity IgG receptor, FcγRI. *J. Immunol.* 2011; 186: 2699–704. doi: 10.4049/jimmunol.1003526.
39. Fayngerts S.A., Najakshin A.M., Tarantin A.V. Species-specific evolution of the FcR family in endothermic vertebrates. *Immunogenetics.* 2007; 59: 493–506. doi: 10.1007/s00251-007-0208-8.
40. Simtong P., Romphruk A.V., Traim A., Burg-Roderfeld M., et al. Molecular and functional characterization of Fcγ receptor IIb-ligand interaction: implications for neutrophil-mediated immune mechanisms in malaria. *Infect. Immun.* 2018; 86. pii: e00924-17. doi: 10.1128/IAI.00924-17.
41. Yamashita T., Suzuki R., Backlund P.S., Yamashita Y., et al. Differential dephosphorylation of the Fcγ gamma immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines with dissimilar potential for activating Syk. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 28 584–94. doi: 10.1074/jbc.M802679200.
42. Lanier L.L. DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol. Rev.* 2009; 227: 150–60. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00720.x.
43. Blank U., Ra C., Miller L., White K., et al. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature.* 1989; 337: 187–9. doi: 10.1038/337187a0.
44. Liang Y., Tedder T.F. Identification of a CD20-, FcεpsilonRIβ-, and HTm4-related gene family: sixteen new MS4A family members expressed in human and mouse. *Genomics.* 2001; 72: 119–27. doi: 10.1006/geno.2000.6472.
45. Davis R.S. Fc receptor-like molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; 25: 525–60. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141541.
46. Ehrhardt G.R., Cooper M.D. Immunoregulatory roles for fc receptor-like molecules. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2011; 350: 89–104. doi: 10.1007/82_2010_88.
47. Rostamzadeh D., Kazemi T., Amirghofran Z., Shabani M. Update on Fc Receptor-Like (FCRL) family: new immunoregulatory players in health and diseases. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2018; 22: 487–502. doi: 10.1080/14722222.2018.1472768.
48. Asano M., Komiyama K. Polymeric immunoglobulin receptor. *J. Oral Sci.* 2011; 53: 147–56. doi: 10.2334/josnusd.53.147.
49. Rombout J.H., van der Tuin S.J., Yang G., Schopman N., et al. Expression of the polymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR) in mucosal tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2008; 24: 620–8. doi: 10.1016/j.fsi.2008.01.016.
50. Feng L.N., Lu D.Q., Bei J.X., Chen J.L., et al. Molecular cloning and functional analysis of polymeric immunoglobulin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2009; 154: 282–9. doi: 10.1016/j.cbpb.2009.07.003.
51. Hamuro K., Suetake H., Saha N.R., Kikuchi K., et al. A teleost polymeric Ig receptor exhibiting two Ig-like domains transports tetrameric IgM into the skin. *J. Immunol.* 2007; 178: 5682–9. doi: 10.4049/jimmunol.178.9.5682.
52. Bakos M.A., Kurosky A., Goldblum R.M. Characterization of a critical binding site for human polymeric Ig on secretory component. *J. Immunol.* 1991; 147: 3419–26.
53. Frutiger S., Hughes G.J., Hanly W.C., Kingzette M., et al. The amino-terminal domain of rabbit secretory component is responsible for noncovalent binding to immunoglobulin A dimers. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 16 673–81.
54. Viertlboeck B.C., Schweinsberg S., Hanczaruk M.A., Schmitt R., et al. The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104: 11 718–23. doi: 10.1073/pnas.0702011104.
55. Aron T.I., Kaiser J.T., West A.P. Jr, Olson R., et al. The crystal structure of CHIR-AB1: a primordial avian classical Fc receptor. *J. Mol. Biol.* 2008; 381: 1012–24. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.082.
56. Taylor A.L., Bevil R.L., Sutton B.J., Calvert R.A. A monomeric chicken IgY receptor binds IgY with 2:1 stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 24 168–75. doi: 10.1074/jbc.M109.020263.
57. Pürzel J., Schmitt R., Viertlboeck B.C., Göbel T.W. Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA: Fc alpha RI interaction. *J. Immunol.* 2009; 183: 4554–9. doi: 10.4049/jimmunol.0901699.

58. Windau K., Viertlboeck B.C., Göbel T.W. The turkey Ig-like receptor family: identification, expression and function. *PLoS One*. 2013; 8 (3): e59577. doi: 10.1371/journal.pone.0059577.
59. He Y., Bjorkman P.J. Structure of FcRY, an avian immunoglobulin receptor related to mammalian mannose receptors, and its complex with IgY. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011; 108: 12 431–6. doi: 10.1073/pnas.1106925108.
60. Viertlboeck B.C., Schmitt R., Hanczaruk M.A., Crooijmans R.P., et al. A novel activating chicken IgY FcR is related to leukocyte receptor complex (LRC) genes but is located on a chromosomal region distinct from the LRC and FcR gene clusters. *J. Immunol.* 2009; 182: 1533–40. doi: 10.4049/jimmunol.182.3.1533.
61. Schreiner B., Viertlboeck B.C., Göbel T.W. A striking example of convergent evolution observed for the ggFcR:IgY interaction closely resembling that of mammalian FcR:IgG. *Dev. Comp. Immunol.* 2012; 36: 566–71. doi: 10.1016/j.dci.2011.09.013.
62. Sutton B.J., Davies A.M. Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunol. Rev.* 2015; 268: 222–35. doi: 10.1111/imr.12340.
63. Vernersson M., Aveskogh M., Munday B., Hellman L. Evidence for an early appearance of modern post-switch immunoglobulin isotypes in mammalian evolution (II); cloning of IgE, IgG1 and IgG2 from a monotreme, the duck-billed platypus, *Ornithorhynchus anatinus*. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 2145–55. doi: 10.1002/1521-4141(200208)32:8<2145::AID-IMMU2145>3.0.CO;2-I.
64. Kinet J.-P. The high affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Ann. Rev. Immunol.* 1999; 17: 931–72.
65. Bruhns P., Jonsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol. Rev.* 2015; 268: 25–51. doi: 10.1111/imr.12350.
66. Kraft S., Kinet J.-P. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 365–78. doi: 10.1038/nri2072.
67. Dombrowicz D., Quatannens B., Papin J.-P., Capron A., et al. Expression of a functional on rat eosinophils and macrophages. *J. Immunol.* 2000; 165: 1266–71. PMID: 10903725.
68. Gushchin I.S. Overcoming allergens tissue barrier – a decisive form of predisposition to allergies. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2009; (1): 8–13. (in Russian)
69. Gushchin I.S. Epidermal barrier and allergy. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal*. 2007; (2): 3–16. (in Russian)

иммунным процессам *in vivo* на данный момент нет, а имеющиеся в настоящее время сведения носят главным образом коррелятивный характер [6, 17].

Следует особо подчеркнуть, что клиническая значимость ТЛС колеблется от разрушительной до защитной, что свидетельствует о необходимости более четкого понимания структуры и функции этих структур, отличающихся в зависимости от конкретной ситуации, до проведения клинического таргетинга [17].

Различия вторичных лимфоидных органов и третичных лимфоидных структур

Ряд авторов описывают феномен нелимфогенеза с образованием групп лимфоидных узелков (фолликулов), являющихся прообразом ЛУ [18, 19].

Значительным различием между ЛУ и ТЛС является тот факт, что ЛУ заключены в капсулу, а ТЛС – это скопление иммунных и стромальных клеток в пределах органа или ткани. Принципиально важно, что, в отличие от развития ВЛО, которое является генетически обусловленным процессом индивидуального развития, ТЛС образуются в ответ на хронические раздражители, индуцируемые воспалительным процессом. Более того, хотя ВЛО образуются в предопределенных специфических анатомических зонах, ТЛС образуются, как правило, в нелимфоидных органах и обладают динамичностью развития и широкой вариативностью проявления, т. е. могут временно существовать и исчезать после устранения антигена [4, 17]. Развитие ТЛС описаны практически во всех органах в условиях хронического воспаления, включая сердце, почки, легкие, кишечник, сосудистую систему, центральную нервную систему и костный мозг. Клинические проявления заболеваний и экспериментальные модели, в которых описаны ТЛС, подробно рассматриваются в указанных публикациях [7].

Патоморфологи пользуются специфичными критериями при определении ТЛС. Согласно им ТЛС содержат обособленные участки Т- и В-лимфоцитов, есть фибробластические ретикулярные клетки и *peripheral node addressins* – PNAd) + наружные эндотелиальные вены в Т-клеточной области, фолликулярные дендритные клетки (ФДК), факт переключения класса подтверждает наличие иммуноглобулинов и реактивных герминативных центров (ГЦ) в В-клеточной области, а также доказывает экспрессию цитидиндезаминазы, индуцируемой активацией, присутствие фермента в В-лимфоцитах ГЦ, необходимого для начала соматической гипермутации и переключения класса иммуноглобулинов [8, 24]. Доказано, что, подобно ЛУ, ТЛС имеют лимфатические сосуды, хотя на данный момент не изучены роль этих сосудов и их сходство с афферентными либо эфферентными лимфатическими сосудами ЛУ [3, 4, 20]. Ряд критериев, отличающих полноценные ТЛС, недавно были предложены группой исследователей под руководством Фридман [5].

Возможно, наблюдаемая разнородность архитектуры и организации ТЛС отражает стадию заболевания, на которой проведена биопсия, и потому является выбо-

рочным исследованием на различных стадиях развития, зрелости и/или разрешения ТЛС. Кроме того, некоторые ученые считают, что потенциальное функциональное сходство ТЛС с ВЛО, вероятно, более значимо по сравнению с точной анатомической структурой: данные структуры связаны либо с отрицательным исходом, либо с защитными клиническими эффектами у людей, выше-сказанное наталкивает на мысль о том, что ТЛС могут порождать функциональные адаптивные иммунные реакции, влияющие на прогрессирование заболевания [7].

Первоначально ТЛС описывались в контексте неопухлевых хронических воспалительных заболеваний, включая аутоиммунные заболевания, инфекции и идиопатические заболевания [4, 8, 11]. Неопластические злокачественные новообразования во многих своих свойствах сходны со средой хронического воспаления, в том числе с хроническим течением самого воспаления. Тем не менее злокачественные опухоли отличаются от хронического воспаления по одному существенному признаку, который, как считают некоторые ученые, может предотвратить образование ТЛС: высокоиммуносупрессивное микроокружение опухоли [21, 22]. Однако, согласно последним исследованиям независимых ученых по всему миру, ТЛС различных степеней организации встречается у пациентов с различными видами первичных и метастазирующих опухолей [23–45].

Лимфоидный неогенез (нелимфогенез)

Феномен нелимфогенеза при раке впервые описан в работах Ш.Х. Ганцева [46]. Нелимфогенез – это формирование новых ЛУ упрощенного строения при утрате функций, ранее существовавших из-за их метастатического поражения опухолью. Авторы данного обзора детально изучили процесс формирования постнатально индуцированных ЛУ у человека. Вновь образованные ЛУ имеют типичное гистологическое строение, но отличаются единым афферентным и эфферентным лимфатическим сосудом.

Дальнейшие исследования доказали, что постнатально сформированные ЛУ могут служить источником биологических сигналов, активирующих противоопухолевые реакции иммунитета и подавляющих распространение метастазирующих злокачественных клеток [46, 47]. Так, сравнение профиля РНК, содержащихся в ткани гистологически нормальных и третичных ЛУ, которые были обнаружены при исследовании операционного материала у больных раком молочной железы, показало повышенную экспрессию в постнатально индуцированных лимфатических узлах (ПНИЛУ) генов, кодирующих рецепторы XCR1 и CYFIP2, цитокины TNFSF14 и CCL16, а также сниженную экспрессию лигандов хемокинов CXCL5 и CXCL12.

Стимуляцией нелимфогенеза можно добиться увеличения числа ЛУ на примере формирования перевиваемой опухоли (меланома B16, карцинома Эрлиха и др.) у экспериментальной белой мыши [48].

Есть предположения, что индукцию нелимфогенеза можно использовать для протезирования функции им-

мунной системы [49, 50], а воздействие на состояние этих структур с использованием лекарственных средств или методов биотерапии может послужить основой для создания новых подходов к лечению онкологических больных [51].

Заключение

Лимфоидный неогенез, возникающий на фоне распространенных форм злокачественных новообразований, представляет собой очень сложный процесс, который можно рассматривать как адаптационный ответ

на опухоль и ее развитие. Факты, приводимые различными исследователями, свидетельствуют о том, что эти явления могут приводить как к усилению противоопухолевого иммунитета, так и к иммуносупрессии, приводящей к прогрессированию заболевания. Интерес ученых к процессам неогенеза ежегодно возрастает, что, безусловно, приближает нас к пониманию природы возникновения новообразованных лимфоидных структур и механизмов эффективного иммунного опосредованного контроля опухоли.

■ Литература

1. Пакленко В.И., Саяпина И.Ю. Клетки и органы иммунной системы : учебное пособие. Благовещенск, 2017.
2. Van de Pavert S.A., Mebius R.E. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10: 664–74. doi: 10.1038/nri2832.
3. Randall T.D., Carragher D.M., Rangel-Moreno J. Development of secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 2008; 26: 627–50. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090257.
4. Drayton D.L., Liao S., Mounzer R.H., Ruddle N.H. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat. Immunol.* 2006; 7: 344–53. doi: 10.1038/ni1330.
5. Dieu-Nosjean M.-C., Goc J., Giraldo N.A., Sautès-Fridman C. et al. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol.* 2014; 35: 571–80. doi: 10.1016/j.it.2014.09.006.
6. Sautès-Fridman C., Lawand M., Giraldo N.A. et al. Tertiary lymphoid structures in cancers: prognostic value, regulation, and manipulation for therapeutic intervention. *Front. Immunol.* 2016; 7: 407. doi: 10.3389/fimmu.2016.00407.
7. Pitzalis C., Jones G.W., Bombardieri M., Jones S.A. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14: 447–62. doi: 10.1038/nri3700.
8. Neyt K., Perros F., GeurtsvanKessel C.H., Hammad H. et al. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2012; 33: 297–305. doi: 10.1016/j.it.2012.04.006.
9. Lu T.T., Browning J.L. Role of the lymphotoxin/LIGHT system in the development and maintenance of reticular networks and vasculature in lymphoid tissues. *Front. Immunol.* 2014; 5: 47. doi: 10.3389/fimmu.2014.00047.
10. Stranford S., Ruddle N.H. Follicular dendritic cells, conduits, lymphatic vessels, and high endothelial venules in tertiary lymphoid organs: parallels with lymph node stroma. *Front. Immunol.* 2012; 3: 350. doi: 10.3389/fimmu.2012.00350.
11. Aloisi F., Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 205–17. doi: 10.1038/nri1786.
12. Carragher D.M., Rangel-Moreno J., Randall T.D. Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Semin. Immunol.* 2008; 20: 26–42. doi: 10.1016/j.smim.2007.12.004.
13. Takemura S., Braun A., Crowson C., Kurtin P.J. et al. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J. Immunol.* 2001; 167: 1072–80. doi: 10.4049/jimmunol.167.2.1072.
14. Manzo A., Paoletti S., Carulli M., Blades M.C. et al. Systematic microanatomical analysis of CXCL13 and CCL21 in situ production and progressive lymphoid organization in rheumatoid synovitis. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35: 1347–59. doi: 10.1002/eji.200425830.
15. Cantaert T., Kolln J., Timmer T., van der Pouw Kraan T.C. et al. B lymphocyte autoimmunity in rheumatoid synovitis is independent of ectopic lymphoid neogenesis. *J. Immunol.* 2008; 181: 785–94. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.785.
16. Guo J., Qian J., Zhang R. The pathological features of ectopic lymphoid neogenesis in idiopathic dacryoadenitis. *BMC Ophthalmol.* 2016; 16: 66. doi: 10.1186/s12886-016-0250-0.
17. Colbeck E.J., Ager A., Gallimore A., Jones G.W. Tertiary Lymphoid Structures in Cancer: Drivers of Antitumor Immunity, Immunosuppression, or Bystander Sentinels in Disease? *Front. Immunol.* 2017; 8: 1830. doi: 10.3389/fimmu.2017.01830.
18. Коненков В.И., Бородин Ю.И., Любарский М.С. Лимфология. Новосибирск : Манускрипт, 2012. 1096 с.
19. Aloisi F., Borrell P.-R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 205–17.
20. Lee J.-W., Epardaud M., Sun J., Becker J.E. et al. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 181–90. doi: 10.1038/ni1427.
21. Goc J., Fridman W.-H., Sautès-Fridman C., Dieu-Nosjean M.-C. Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers. *Oncimmunology.* 2013; 2: e26836. doi: 10.4161/onci.26836.
22. Joyce J.A., Fearon D.T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science.* 2015; 348: 74–80. doi: 10.1126/science.126204.
23. Martinet L., Garrido I., Filleron T., Le Guellec S. et al. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 2011; 71: 5678–87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0431.
24. de Chaisemartin L., Goc J., Damotte D., Validire P. et al. Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer Res.* 2011; 71: 6391–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0952.
25. Goc J., Germain C., Vo-Bourgeois T.K.D., Lupo A. et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res.* 2014; 74: 705–15. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1342.
26. Bento D.C., Jones E., Junaid S., Tull J. et al. High endothelial venules are rare in colorectal cancers but accumulate in extra-tumoral areas with disease progression. *Oncimmunology.* 2015; 4: e974374. doi: 10.4161/2162402X.2014.974374.
27. Di Caro G., Bergomas F., Grizzi F., Doni A. et al. Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. *Clin. Cancer Res.* 2014; 20: 2147–58. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2590.
28. Coppola D., Nebozhyn M., Khalil F., Dai H. et al. Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am. J. Pathol.* 2011; 179: 37–45. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.007.
29. Remark R., Alifano M., Cremer I., Lupo A. et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19: 4079–91. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3847.
30. Gu-Trantien C., Loi S., Garaud S., Equeter C. et al. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* 2013; 123: 2873–92. doi: 10.1172/JCI67428.
31. Martinet L., Filleron T., Le Guellec S., Rochaix P. et al. High endothelial venule blood vessels for tumor-infiltrating lymphocytes are associated with lymphotoxin β -producing dendritic cells in human breast cancer. *J. Immunol.* 2013; 191: 2001–8. doi: 10.4049/jimmunol.1300872.
32. Figschau S.L., Fismen S., Fenton K.A., Fenton C. et al. Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2015; 15: 101. doi: 10.1186/s12885-015-1116-1.

33. Song I.H., Heo S.-H., Bang W.S., Park H.S. et al. Predictive value of tertiary lymphoid structures assessed by high endothelial venule counts in the neoadjuvant setting of triple-negative breast cancer. *Cancer Res Treat.* 2017; 49: 399–407. doi: 10.4143/ert.2016.215.
34. Martinet L., Le Guellec S., Filleron T., Lamant L. et al. High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions: major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology.* 2012; 1: 829–39. doi: 10.4161/onci.20492.
35. Messina J.L., Fenstermacher D.A., Eschrich S., Qu X. et al. 12-Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy? *Sci. Rep.* 2012; 2: 765. doi: 10.1038/srep00765.
36. Avram G., Sánchez-Sendra B., Martín J.M., Terrádez L. et al. The density and type of MECA-79-positive high endothelial venules correlate with lymphocytic infiltration and tumour regression in primary cutaneous melanoma. *Histopathology.* 2013; 63: 852–61. doi: 10.1111/his.12235.
37. García-Hernández M.L., Uribe-Uribe N.O., Espinosa-González R., Kast W.M. et al. A unique cellular and molecular microenvironment is present in tertiary lymphoid organs of patients with spontaneous prostate cancer regression. *Front. Immunol.* 2017; 8: 563. doi: 10.3389/fimmu.2017.00563.
38. Cipponi A., Mercier M., Seremet T., Baurain J.-F. et al. Neogenesis of lymphoid structures and antibody responses occur in human melanoma metastases. *Cancer Res.* 2012; 72: 3997–4007. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1377.
39. Nielsen J.S., Sahota R.A., Milne K., Kost S.E. et al. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18: 3281–92. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0234.
40. Kroeger D.R., Milne K., Nelson B.H. Tumor-infiltrating plasma cells are associated with tertiary lymphoid structures, cytolytic T-cell responses, and superior prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2016; 22: 3005–15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2762.
41. Hiraoka N., Ino Y., Yamazaki-Itoh R., Kanai Y. et al. Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer. *Br. J. Cancer.* 2015; 112: 1782–90. doi: 10.1038/bjc.2015.145.
42. Fink S., Yuan D., Stein I., Taniguchi K. et al. Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Nat. Immunol.* 2015; 16: 1235–44. doi: 10.1038/ni.3290.
43. Sakai Y., Hoshino H., Kitazawa R., Kobayashi M. High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in testicular seminoma. *Andrology.* 2014; 2: 282–9. doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00192.x.
44. Giraldo N.A., Becht E., Pagès F., Skliris G. et al. Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell cancer. *Clin. Cancer Res.* 2015; 21: 3031–40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2926.
45. Low S., Sakai Y., Hoshino H., Hirokawa M. et al. High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. *Pathology.* 2016; 48: 666–74. doi: 10.1016/j.pathol.2016.08.002.
46. Ганцев Ш.Х. Новые технологии диагностики и лечения рака молочной железы. Креативная хир. и онкология. 2009; 1: 6–9.
47. Gansev S.K., Umezawa K., Islamgulov D.V. et al. The role of inflammatory chemokines in lymphoid neogenesis in breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* 2013; 67 (5): 363–6.
48. Ганцев Ш.Х. Аксиллярный лимфатический аппарат при раке молочной железы: атлас М.: МИА, 2011. 194 с.
49. Ганцев Ш.Х. Новое к теории метастазирования рака и подходам к его лечению. Креативная хир. и онкология. 2010; 4: 5–11.
50. Бородин Ю.И., Горчакова О.В., Горчаков В.Н. Периферические лимфоидные структуры: образование и функция. Морфология. 2016; 4: 90–6.
51. Dieu-Nosjean M.C., Giraldo N.A., Kaplan H., Germain C. et al. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunol. Rev.* 2016; 271 (1): 260–75.
1. Pavlenko V.I., Sayapina I.Yu. Cells and organs of the immune system: manual. Blagoveshchensk, 2017. (in Russian)
2. Van de Pavert S.A., Mebius R.E. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10: 664–74. doi: 10.1038/nri2832.
3. Randall T.D., Carragher D.M., Rangel-Moreno J. Development of secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 2008; 26: 627–50. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090257.
4. Drayton D.L., Liao S., Mounzer R.H., Ruddle N.H. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat. Immunol.* 2006; 7: 344–53. doi: 10.1038/ni1330.
5. Dieu-Nosjean M.-C., Goc J., Giraldo N.A., Sautès-Fridman C., et al. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol.* 2014; 35: 571–80. doi: 10.1016/j.it.2014.09.006.
6. Sautès-Fridman C., Lawand M., Giraldo N.A., et al. Tertiary lymphoid structures in cancers: prognostic value, regulation, and manipulation for therapeutic intervention. *Front. Immunol.* 2016; 7: 407. doi: 10.3389/fimmu.2016.00407.
7. Pitzalis C., Jones G.W., Bombardieri M., Jones S.A. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14: 447–62. doi: 10.1038/nri3700.
8. Neyt K., Perros F., GeurtsvanKessel C.H., Hammad H., et al. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2012; 33: 297–305. doi: 10.1016/j.it.2012.04.006.
9. Lu T.T., Browning J.L. Role of the lymphotoxin/LIGHT system in the development and maintenance of reticular networks and vasculature in lymphoid tissues. *Front. Immunol.* 2014; 5: 47. doi: 10.3389/fimmu.2014.00047.
10. Stranford S., Ruddle N.H. Follicular dendritic cells, conduits, lymphatic vessels, and high endothelial venules in tertiary lymphoid organs: parallels with lymph node stroma. *Front. Immunol.* 2012; 3: 350. doi: 10.3389/fimmu.2012.00350.
11. Aloisi F., Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 205–17. doi: 10.1038/nri1786.
12. Carragher D.M., Rangel-Moreno J., Randall T.D. Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Semin. Immunol.* 2008; 20: 26–42. doi: 10.1016/j.smim.2007.12.004.
13. Takemura S., Braun A., Crowson C., Kurtin P.J., et al. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J. Immunol.* 2001; 167: 1072–80. doi: 10.4049/jimmunol.167.2.1072.
14. Manzo A., Paoletti S., Carulli M., Blades M.C., et al. Systematic microanatomical analysis of CXCL13 and CCL21 in situ production and progressive lymphoid organization in rheumatoid synovitis. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35: 1347–59. doi: 10.1002/eji.200425830.
15. Cantaert T., Kolln J., Timmer T., van der Pouw Kraan T.C., et al. B lymphocyte autoimmunity in rheumatoid synovitis is independent of ectopic lymphoid neogenesis. *J. Immunol.* 2008; 181: 785–94. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.785.
16. Guo J., Qian J., Zhang R. The pathological features of ectopic lymphoid neogenesis in idiopathic dacryoadenitis. *BMC Ophthalmol.* 2016; 16: 66. doi: 10.1186/s12886-016-0250-0.
17. Colbeck E.J., Ager A., Gallimore A., Jones G.W. Tertiary Lymphoid Structures in Cancer: Drivers of Antitumor Immunity, Immunosuppression, or Bystander Sentinels in Disease? *Front. Immunol.* 2017; 8: 1830. doi: 10.3389/fimmu.2017.01830.
18. Kononkov V.I., Borodin Yu.I., Lyubarsky M.S. Lymphology. Novosibirsk: Manuscript, 2012: 1096 p. (in Russian)
19. Aloisi F., Borrell P.-R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 205–17.
20. Lee J.-W., Epardaud M., Sun J., Becker J.E., et al. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 181–90. doi: 10.1038/ni1427.
21. Goc J., Fridman W.-H., Sautès-Fridman C., Dieu-Nosjean M.-C. Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers. *Oncoimmunology.* 2013; 2: e26836. doi: 10.4161/onci.26836.
22. Joyce J.A., Fearon D.T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science.* 2015; 348: 74–80. doi: 10.1126/science.1256204.
23. Martinet L., Garrido I., Filleron T., Le Guellec S., et al. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 2011; 71: 5678–87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0431.
24. de Chaisemartin L., Goc J., Damotte D., Validire P., et al. Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T

cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer Res.* 2011; 71: 6391–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0952.

25. Goe J., Germain C., Vo-Bourgeois T.K.D., Lupo A., et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res.* 2014; 74: 705–15. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1342.

26. Bento D.C., Jones E., Junaid S., Tull J., et al. High endothelial venules are rare in colorectal cancers but accumulate in extra-tumoral areas with disease progression. *Oncoimmunology.* 2015; 4: e974374. doi: 10.4161/2162402X.2014.974374.

27. Di Caro G., Bergomas F., Grizzi F., Doni A., et al. Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. *Clin. Cancer Res.* 2014; 20: 2147–58. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2590.

28. Coppola D., Nebozhyn M., Khalil F., Dai H., et al. Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am. J. Pathol.* 2011; 179: 37–45. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.007.

29. Remark R., Alifano M., Cremer L., Lupo A., et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19: 4079–91. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3847.

30. Gu-Trantien C., Loi S., Garaud S., Equeter C., et al. CD47 follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* 2013; 123: 2873–92. doi: 10.1172/JCI67428.

31. Martinet L., Filleron T., Le Guellec S., Rochaix P., et al. High endothelial venule blood vessels for tumor-infiltrating lymphocytes are associated with lymphotoxin β -producing dendritic cells in human breast cancer. *J. Immunol.* 2013; 191: 2001–8. doi: 10.4049/jimmunol.1300872.

32. Figenschau S.L., Fismen S., Fenton K.A., Fenton C., et al. Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2015; 15: 101. doi: 10.1186/s12885-015-1116-1.

33. Song J.H., Heo S.-H., Bang W.S., Park H.S., et al. Predictive value of tertiary lymphoid structures assessed by high endothelial venule counts in the neoadjuvant setting of triple-negative breast cancer. *Cancer Res. Treat.* 2017; 49: 399–407. doi: 10.4143/crt.2016.215.

34. Martinet L., Le Guellec S., Filleron T., Lamant L., et al. High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions: major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology.* 2012; 1: 829–39. doi: 10.4161/onci.20492.

35. Messina J.L., Fenstermacher D.A., Eschrich S., Qu X., et al. 12-Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy? *Sci. Rep.* 2012; 2: 765. doi: 10.1038/srep00765.

36. Avram G., Sánchez-Sendra B., Martín J.M., Terrádez L., et al. The density and type of MECA-79-positive high endothelial venules correlate with lymphocytic infiltration and tumour regression in primary cutaneous melanoma. *Histopathology.* 2013; 63: 852–61. doi: 10.1111/his.12235.

37. García-Hernández M.L., Uribe-Uribe N.O., Espinosa-González R., Kast W.M., et al. A unique cellular and molecular microenvironment

is present in tertiary lymphoid organs of patients with spontaneous prostate cancer regression. *Front. Immunol.* 2017; 8: 563. doi: 10.3389/fimmu.2017.00563.

38. Cipponi A., Mercier M., Seremet T., Baurain J.-F., et al. Neogenesis of lymphoid structures and antibody responses occur in human melanoma metastases. *Cancer Res.* 2012; 72: 3997–4007. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1377.

39. Nielsen J.S., Sahota R.A., Milne K., Kost S.E., et al. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18: 3281–92. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0234.

40. Kroeger D.R., Milne K., Nelson B.H. Tumor-infiltrating plasma cells are associated with tertiary lymphoid structures, cytolytic T-cell responses, and superior prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2016; 22: 3005–15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2762.

41. Hiraoka N., Ino Y., Yamazaki-Itoh R., Kanai Y., et al. Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer. *Br. J. Cancer.* 2015; 112: 1782–90. doi: 10.1038/bjc.2015.145.

42. Finkin S., Yuan D., Stein I., Taniguchi K., et al. Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Nat. Immunol.* 2015; 16: 1235–44. doi: 10.1038/ni.3290.

43. Sakai Y., Hoshino H., Kitazawa R., Kobayashi M. High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in testicular seminoma. *Andrology.* 2014; 2: 282–9. doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00192.x.

44. Giraldo N.A., Becht E., Pagès F., Skliris G., et al. Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell cancer. *Clin. Cancer Res.* 2015; 21: 3031–40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2926.

45. Low S., Sakai Y., Hoshino H., Hirokawa M., et al. High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. *Pathology.*

46. Gantsev S.K. New technologies of diagnosis and treatment of breast cancer. *Creativnaya khirurgiya i onkologiya.* 2009; 1: 6–9. (in Russian)

47. Gantsev S.K., Umezawa K., Islimgulov D.V., et al. The role of inflammatory chemokines in lymphoid neorganogenesis in breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* 2013; 67 (5): 363–6.

48. Gantsev S.K. Axillary lymphatic apparatus in breast cancer: Atlas. Moscow: MIA, 2011: 194 p. (in Russian)

49. Gantsev S.K. New to the theory of cancer metastasis and approaches to its treatment. *Creativnaya khirurgiya i onkologiya.* 2010; 4: 5–11. (in Russian)

50. Borodin Yu.I., Gorchakova O.V., Gorchakov V.N. Peripheral lymphoid structures: formation and function. *Morfologiya.* 2016; 4: 90–6. (in Russian)

51. Dieu-Nosjean M.C., Giraldo N.A., Kaplan H., Germain C., et al. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunol. Rev.* 2016; 271 (1): 260–75.

© Коллектив авторов, 2019

Жуков А.С.¹, Лавров Н.В.², Хайрутдинов В.Р.¹, Самцов А.В.¹

Модели псориаза на лабораторных животных: современное состояние проблемы

¹ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, 194044, г. Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, 194100, г. Санкт-Петербург, Россия

Псориаз – это хроническое иммуноопосредованное воспалительное заболевание кожи, проявляющееся повышенной скоростью деления кератиноцитов. Высокий уровень заболеваемости этим дерматозом, частые психоэмоциональные нарушения и коморбидная патология, а также вероятность инвалидизации определяют актуальность изучения патогенеза заболевания. Существенный вклад в данном направлении могут внести лабораторные модели псориаза. В работе проведен обзор наиболее часто используемых в настоящее время мышиных моделей псориаза, которые можно применять при изучении иммунологических характеристик заболевания. Описаны гистологические и иммунологические различия строения кожи мышей и человека. Представлены основные группы моделей, их клинико-гистологические и иммунофенотипические характеристики. Проанализированы преимущества и недостатки каждой модели.

Ключевые слова: псориаз; мышиная модель; обзор; имиквимод; трансгенная модель; ксенотрансплантационная модель

Статья поступила 18.01.2019. Принята в печать 16.02.2019.

Для цитирования: Жуков А.С., Лавров Н.В., Хайрутдинов В.Р., Самцов А.В. Модели псориаза на лабораторных животных: современное состояние проблемы. Иммунология. 2019; 40 (2): 64–69. doi: 10.24411/0206-4952-2019-12009.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Zhukov A.S.¹, Lavrov N.V.², Khairutdinov V.R.¹, Samtsov A.V.¹

Models of psoriasis on laboratory animals: current status of the problem

¹ S.M. Kirov Military Medical Academy, 194044, St. Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State Pediatric Medical University, 194100, St. Petersburg, Russia

Psoriasis is a chronic immune-mediated inflammatory skin disease, manifested by an increased rate of keratinocyte division. The high incidence of this dermatosis, frequent psycho-emotional disorders and comorbid pathology, as well as the probability of disability, determine the relevance of studying the pathogenesis of the disease. Laboratory models of psoriasis can make a significant contribution in this direction. In this paper, a review of the most commonly used mouse models of psoriasis. Described histological and immunological differences in the structure of the skin of mice and humans. The main groups of models, their clinical, histological and immunophenotypic characteristics are presented. The advantages and disadvantages of each model are analyzed.

Keywords: psoriasis; mouse model; review; imiquimod; transgenic model; xenotransplantation model

Received 18.01.19. Accepted 16.02.19.

For citation: Zhukov A.S., Lavrov N.V., Khairutdinov V.R., Samtsov A.V. Models of psoriasis on laboratory animals: current status of the problem. Immunologiya. 2019; 40 (2): 64–9. doi: 10.24411/0206-4952-2019-12009. (in Russian)

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Для корреспонденции

Жуков Александр Сергеевич – кандидат медицинских наук, докторант кафедры кожных и венерических болезней ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: doctor-vma@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4915-9157>

For correspondence

Zhukov Alexander S. – Candidate of Medical Sciences, Doctoral Student of the Department of Skin and Venereal Diseases, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia
E-mail: doctor-vma@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4915-9157>

На сегодняшний день патогенез псориаза полностью не изучен. Исследования кожи и сыворотки зачастую недостаточно для понимания механизмов развития заболевания и оценки действия терапевтических препара-

тов. Для выявления наиболее значимых медиаторов воспаления при псориазе необходимо иметь возможность в эксперименте воспроизвести фенотипические проявления заболевания.

Весомый вклад в данное направление вносят экспериментальные работы на лабораторных животных. Они позволяют достаточно быстро смоделировать проявления заболевания и в то же время менее строгие в этических аспектах, чем при исследовании человека [1].

Большинство таких работ выполняется на мышах, что объясняется рядом преимуществ по сравнению с другими моделями млекопитающих: малый размер животных, относительно недорогое содержание, короткий репродуктивный цикл, удобство использования методов генной инженерии [1].

Общее строение кожи мышей и человека сходно, но в то же время имеются отличительные черты: кожа мышей тоньше, она содержит значительно больше волосяных фолликулов, в ней отсутствуют потовые железы и меланоциты, а митотическая активность базальных кератиноцитов значительно выше. При сравнении иммунофенотипического состава клеток кожи обнаружено, что, помимо присущих человеку Т-, В-лимфоцитов и дендритных клеток, для мышей характерны дендритные CD8⁺-клетки и дендритные эпидермальные Т-клетки [2, 3].

Опыты по трансплантации пораженной кожи больных псориазом на участки здоровой (ауто трансплантация) были описаны еще в 1961 г. [4]. В этот же период начали создавать мышинные модели псориаза.

В настоящее время существует несколько десятков мышинных моделей псориаза, которые можно принципиально разделить на 4 группы:

- с возникшими спонтанными мутациями (спонтанные);
- с трансплантатами кожи больных псориазом (ксенотрансплантационные/гуманизированные);
- с измененным геномом (генно-инженерные/трансгенные);
- индуцированные внешними факторами (острые).

Модели мышей с возникшими спонтанными мутациями (спонтанные)

Данные модели исторически являются самыми первыми [4]. Их формирование происходило в результате спонтанных мутаций, проявляющихся в изменении синтеза или нарушении функции определенных белков, участвующих в развитии патологического процесса.

В качестве примера данной модели можно привести мышь-асебию (*asebia mouse*) (*Scd1ab/Scd1ab*). Результатом мутации гена *Scd1* у таких мышей будет отсутствие сальных желез и формирование акантоза эпидермиса и гиперваскуляризации дермы [5].

Другим примером является мутантная мышь с чешуйчатой кожей (*flaky skin mutant mouse*) (*Ttcf^{sn}/Ttcf^{sn}*), высыпания у которой проявляются гиперкератотическими бляшками, а также воспалительным дермальным инфильтратом. Для таких мышей характерна изоморфная реакция, аналогичная феномену Кебнера у больных псориазом [6, 7].

Выделяют также мышиную модель хронического пролиферативного дерматита (*chronic proliferative dermatitis mouse model*) (*Sharpin^{cpdm}/Sharpin^{cpdm}*),

у которой мутация гена приводит к гиперпролиферации кератиноцитов и воспалению внутренних органов [7].

К недостаткам всех спонтанных моделей можно отнести то, что развитие воспалительного процесса в коже не связано с активацией адаптивного звена иммунитета. В результате этого в эпидермисе и дерме отсутствуют специфичные для псориаза Т-лимфоциты, к тому же неэффективны препараты, действующие на эти клетки (например, циклоспорин) [8].

Модели мышей с трансплантатами кожи больных псориазом (ксенотрансплантационные/гуманизированные)

Данные модели создаются трансплантацией человеческих тканей или клеток мышам. Для того чтобы приживляемые ткани не отторгались, выбирают мышей с выраженными дефектами в иммунной системе. Например, используют животных с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (*SCIDs-мыши* – *severe combined immunodeficiency*) или отсутствием рецепторов к интерферону [*AGR129-мыши* – *deficient in type I (A) type II (B) IFN receptors (R)*] [9].

Каждая из этих моделей имеет свои особенности. Так, у *SCIDs*-моделей трансплантированные клетки лизируются активными у данных мышей NK-клетками, в то время как пересаженные лоскуты ткани не отторгаются. Последующие инъекции Т-клеток донора в область трансплантата позволяют более длительное время поддерживать фенотипические проявления псориаза [10].

AGR129-модель характеризуется отсутствием рецепторов интерферона I и II типа, что фенотипически проявляется недостаточностью Т- и В-лимфоцитов. Дефицит у данной модели активных NK-клеток позволяет проводить трансплантацию не только фрагментов тканей, но и делать инъекции отдельных клеток. Интересно отметить, что пересадка непораженной кожи больных псориазом на *AGR129*-мышь вызывает развитие выраженных псориазиформных высыпаний, причем даже без введения Т-клеток донора, что свидетельствует о наличии в непораженной коже человека иммунных клеток, способных вызвать развитие псориазического воспаления [4].

Основное преимущество ксенотрансплантационных моделей псориаза заключается в том, что использование кожи человека позволяет наиболее близко представить иммунологическую и генетическую основу болезни. В результате чего появляется возможность изучать лекарственные вещества в условиях, близких к естественным. Кроме того, данные, полученные на гуманизированных моделях, будут более воспроизводимыми и их легче интерпретировать при переходе от доклинических исследований к клиническим испытаниям [1].

Широкое использование данного метода ограничивается техническими сложностями при проведении трансплантации, необходимостью большого количества ткани донора, а также возникающими со временем изменениями в пересаженных тканях: уменьшение раз-

мера трансплантата, восстановление зернистого слоя, разрешение паракератоза [10]. Также наблюдаются фенотипические вариации пересаженной кожи, обусловленные иммунологическими и генетическими различиями между донорами.

Модели мышей с измененным геномом (генно-инженерные/трансгенные)

Для формирования данных моделей мышам до рождения изменяют структуру необходимых генов. В результате этого возникает избыточная экспрессия или угнетение синтеза определенных белков, участвующих в формировании псориазического фенотипа. Данные модели подразделяются на:

- трансгенные модели мышей, обладающие модифицированными генами во всех клетках организма (истинные трансгенные);
- тканеспецифические (условно-трансгенные) модели мышей, характеризующиеся генетическими изменениями в пределах определенных типов тканей или клеток. Существуют также тканеспецифические модели с возможностью изменять уровень экспрессии генов путем применения медикаментов [11, 12].

Примером трансгенной модели являются CD18-гипоморфные мыши, которые с рождения имеют мутацию в β_2 -интегринах лимфоцитов. В коже таких мышей формируются гиперплазия эпидермиса, гиперпролиферация кератиноцитов с паракератозом, наблюдается формирование микроабсцессов в эпидермисе, расширение кровеносных сосудов дермы [13].

У мышей при нокауте гена, кодирующего антагонист рецептора ИЛ-1, происходит повышенная экспрессия ИЛ-1 α , приводящая к накоплению дендритных клеток и Т-лимфоцитов в коже (IL1tm-модель). При такой модели в эпидермисе развиваются акантоз, паракератоз и образуются микроабсцессы рогового слоя [14].

Тканеспецифические (условно-трансгенные) модели обладают преимуществами по сравнению с полностью трансгенными. Например, модификация гена только в определенных тканях или популяции клеток часто предотвращает летальный исход, нередко наблюдаемый при использовании трансгенных моделей. Ограниченные генные перестройки в изучаемых тканях или типах клеток позволяют выявить вклад отдельного гена в развитие и прогрессирование заболевания.

Такие модели тканеспецифических мышей, как K14-AREG, K14-VEGF и K5-Stat3C [11, 15, 16], способны сверхэкспрессировать заданный ген для формирования псориазического фенотипа. Примером модели с тканеспецифической потерей функции белка является мышь K14-Cre-Ikk2 (fl/fl) и K5-CreERT2 (JunBfl/fl c-JunBfl/fl) [17]. А модели K5-IL-17C и KC-Tie2, кроме того, обладают возможностью подавления экспрессии исследуемого гена путем применения доксициклина [18, 19].

Открытие технологии CRISPR (кластеризованные короткие палиндромные повторы) позволило усовершенствовать создание трансгенных моделей мышей,

используемых для исследований псориаза [20, 21]. Данная технология позволяет более качественно и избирательно генерировать модели генетически модифицированных лабораторных животных, обладает высокой точностью механизмов генной модификации, способностью изменять несколько генов одновременно через одну направляющую РНК, а также уменьшенным временем создания трансгенной модели по сравнению с традиционными технологиями.

Основным преимуществом трансгенных мышинных моделей является возможность исследования *in vivo* эффектов генно-специфических модификаций, возникающих в результате изменения структуры генов.

Главные недостатки данного метода: трудоемкость, длительность подготовки, высокая стоимость и частая эмбриональная или ранняя пренатальная смерть. Кроме того, нарушения отдельных генов не позволяют воспроизвести все особенности патогенеза псориаза, а изменение генома всего организма ограничивает способность исследователя определить, какие популяции клеток в первую очередь ответственны за наблюдаемый псориазический фенотип.

Модели мышей, индуцированные внешними факторами (острые/индуцированные)

Для формирования острой модели псориаза используют топическое нанесение или внутривенные инъекции различных веществ. Из наружных препаратов применяют имиквимод, 12-О-тетрадеканонилфорбол-13-ацетат, оксазолон и 2,4-динитрофлуоробензен. В качестве инъекционных форм описано использование провоспалительных цитокинов (например, ИЛ-23) [21].

Особый интерес сегодня вызывает имиквимод-индуцированная модель, на которую приходится значительная доля исследований мышинных моделей псориаза [22]. Это объясняется как доступностью условий для формирования модели, так и ее патогенетической схожестью с болезнью у человека. Например, имиквимод индуцирует синтез в коже, помимо провоспалительных цитокинов, присутствующих при любом неспецифическом воспалении (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , ИФН- γ), также цитокинов, характерных для аутоиммунных процессов (ИЛ-17A, ИЛ-17F) [3]. Кроме того, описаны обострения псориаза или появление его впервые после применения имиквимода больными для лечения новообразований кожи [23].

Другим вариантом является мышинная модель, индуцированная 12-О-тетрадеканонил-форбол-13-ацетатом (TPA) – активатором протеинкиназы C. В результате использования TPA возникают воспалительная реакция в коже и гиперплазия эпидермиса. Помимо общевоспалительных цитокинов, в пораженной коже отмечены повышенный уровень интерлейкина ИЛ-17F и инфильтрация ее нейтрофилами [24, 25].

При индукции модели псориаза инъекционным введением цитокина ИЛ-23 повышается продукция ИЛ-19 и ИЛ-24, которые влияют на дифференцировку и пролиферацию кератиноцитов посредством ФНО α -

зависимого механизма. В результате возникают гиперплазия, паракератоз и акантоз эпидермиса [10].

Главные преимущества острых моделей: возможность быстрого развития воспаления, простота создания и относительно низкие затраты на проведение эксперимента.

Основной недостаток проявляется в неспецифическом характере индуцированного воспаления кожи. В результате этого иногда одна и та же модель может применяться для описания различных кожных заболеваний. Например, 12-О-тетрадеканонилфорбол-13-ацетат используется для создания модели не только псориаза, но и острого дерматита, а имиквимод-индуцированное воспаление кожи – также для модели системной красной волчанки [26].

Кроме того, в данный момент остро стоит проблема нехватки стандартизованных процедур для создания индуцированных моделей псориаза. Необходимо разработать шаблоны частоты нанесения препарата, продолжительности действия, дозировки или химической концентрации, условий содержания животных. Эти различия затрудняют анализ или сравнение исследований

и, вероятно, объясняют некоторые трудности, возникающие при попытке воспроизвести результаты других исследований.

Обсуждение

Перечисленные в данном обзоре модели предоставляют ученым широкий спектр инструментов для изучения иммунных механизмов развития псориаза, оценки прогноза его течения и исследования эффективности новых лекарственных веществ. Каждая из приведенных моделей, не являясь универсальной, позволит изучить отдельные этапы развития заболевания и обладает своими преимуществами и недостатками (табл.).

Для правильной интерпретации полученных результатов и экстраполяции их на человека необходимо знать механизмы формирования данной модели, а также принимать во внимание гистологические и иммунофенотипические различия строения кожи мышей и человека [28, 29].

Интересно отметить, что в исследованиях псориаза, кроме мышиных, применяют ряд лабораторных моделей клеточных линий, которые выращивают на искус-

Сравнительная характеристика мышиных моделей псориаза [29]

Модель	Пример	Преимущества	Недостатки
Спонтанная	Мышь-асебья. Мутантная мышь с чешуйчатой кожей. Мышиная модель хронического пролиферативного дерматита	Появились одни из первых. Одинаковые нарушения во всех клетках организма	Отсутствие участия Т- и В-лимфоцитов в иммунном ответе
Ксенотрансплантационная (гуманизированная)	Трансплантация кожи больных псориазом на иммунодефицитных мышей: – SCID-мыши – AGR129-мыши	Позволяет наиболее близко воспроизвести клеточные, фенотипические и генетические характеристики человеческой болезни	Технически сложно и дорого. Необходимо большое количество ткани донора. Иммунологические и генетические различия между донорами
Генно-инженерная (трансгенная)	Истинные трансгенные: – IL1m; – CD18. Тканеспецифические: – K14-AREG; – K14-VEGF; – K5-Stat3C. Тканеспецифические с возможностью медикаментозной регуляции экспрессии генов K5-IL-17C KC-Tie2	Изменения касаются всей кожи. Можно изучать/контролировать острые или ранние изменения заболевания. Можно контролировать экспрессию генов лекарственными веществами	Трудоемкость, затрачиваемое время, высокая стоимость и частая эмбриональная или ранняя пренатальная смерть. Изменения одного-двух генов не могут отразить все особенности псориаза
Острая (индуцированная)	Имиквимод. 12-О-тетрадеканонилфорбол-13-ацетат. Оксазолон. 2,4-динитрофторбензол. Инъекции цитокинов	Низкая стоимость. Быстрая индукция воспаления кожи. Относительная простота использования	Неспецифический характер воспаления кожи

ственных средах. К ним относятся 2D- (NHEK, HaCaT) и 3D-модели (Reconstituted Human Epidermal Models), BioMAP-моделирование и другие [10].

Заключение

Сегодня во всем мире идет активное изучение и внедрение моделей псориаза в экспериментальные исследования. Создаются новые клеточные линии и совершенствуются условия их содержания.

Литература

1. Соболева А.Г., Мезенцев А.В., Брускин С.А. Генетически модифицированные животные как модели патологического процесса при псориазе. Молекул. биол. 2014; 48 (4): 587–93.
2. Соболева А.Г. Соболев В.В., Брускин А.С., Мезенцев А.В. Трехмерная модель мышиного эпидермиса для лабораторных исследований псориаза. Acta Naturae (русскоязычная версия). 2013; 5 (9): 121–8.
3. Mestas J., Hughes C.C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. J. Immunol. 2004; 172 (5): 2731–8.
4. Long P.I. Jr. Behavior of psoriatic and normal skin transplants. Arch. Dermatol. 1961; 84: 593–6.
5. Josefowicz W.J., Hardy M.H. The expression of the gene *asebia* in the laboratory mouse. I. Epidermis and dermis. Genet. Res. 1978; 31 (1): 53–65.
6. Sundberg J.P., Beamer W.G., Shultz L.D., Dunstan R.W. Inherited mouse mutations as models of human adnexal, cornification, and papulosquamous dermatoses. J. Invest. Dermatol. 1990; 95 (5): 625–35.
7. Sundberg J.P., France M., Boggess D., Sundberg B.A., et al. Development and progression of psoriasiform dermatitis and systemic lesions in the flaky skin (*fsn*) mouse mutant. Pathobiology. 1997; 65 (5): 271–86.
8. Madsen M., Hansen P.R., Nielsen L.B., Hartvigsen K., et al. Effect of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced psoriasis-like skin lesions on systemic inflammation and atherosclerosis in hypercholesterolaemic apolipoprotein E deficient mice. BMC Dermatol. 2016; 16 (1): 9.
9. Gates A.H., Karasek M. Hereditary Absence of Sebaceous Glands in the Mouse. Science. 1965; 148 (3676): 1471–3.
10. Bocheńska K., Smolińska E., Moskot M., Jakóbkiewicz-Banecka J., et al. Models in the research process of psoriasis. Int. J. Mol. Sci. 2017; 18 (12): E2514.
11. Günschmann C., Chiticariu E., Garg B., Hiz M.M., et al. Transgenic mouse technology in skin biology: inducible gene knockout in mice. J. Invest. Dermatol. 2014; 134 (7): 1–4.
12. Scharfenberger L., Hennerici T., Király G., Kitzmüller S., et al. Transgenic mouse technology in skin biology: generation of complete or tissue-specific knockout mice. J. Invest. Dermatol. 2014; 134 (1): 1–5.
13. Bullard D.C., Scharfetter-Kochanek K., McArthur M.J., Chosay J.G., et al. A polygenic mouse model of psoriasiform skin disease in CD18-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 2116e21.
14. Shepherd J., Little M.C., Nicklin M.J. Psoriasis-like cutaneous inflammation in mice lacking interleukin-1 receptor antagonist. J. Invest. Dermatol. 2004; 122: 665e9.
15. Cook P.W., Piepkorn M., Clegg C.H., Plowman G.D., et al. Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. J. Clin. Invest. 1997; 100 (9): 2286–94.

References

1. Soboleva A.G., Mezentsev A.V., Bruskin S.A. Genetically modified animals as models of pathological process in psoriasis. Molekulyarnaya biologiya. 2014; 48 (4): 587–93. (in Russian)
2. Soboleva A.G. Sobolev V.V., Bruskin A.S., Mezentsev A.V. three-Dimensional model of mouse epidermis for laboratory studies of psoriasis. Acta Naturae. 2013; 5 (9), 121–8. (in Russian)

Потенциал применения моделей псориаза еще до конца не раскрыт, что определяет необходимость их более активного изучения и внедрения в научно-исследовательскую практику.

Применение в научных работах новых методов исследования псориаза, включая различные модели, позволит лучше разобраться в особенностях патогенеза данного заболевания и улучшить разработку новых препаратов для его терапии.

16. Detmar M., Brown L.F., Schön M.P., Elicker B.M., et al. Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. J. Invest. Dermatol. 1998; 111 (1): 1–6.
17. Zenz R., Eferl R., Kenner L., Florin L., et al. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. Nature. 2005; 437 (7057): 369–75.
18. Johnston A., Fritz Y., Dawes S.M., Diaconu D., et al. Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. J. Immunol. 2013; 190 (5): 2252–62.
19. Wolfram J.A., Diaconu D., Hatala D.A., Rastegar J., et al. Keratinocyte but not endothelial cell-specific overexpression of Tie2 leads to the development of psoriasis. Am. J. Pathol. 2009; 174 (4): 1443–58.
20. Guitart J.R. Jr, Johnson J.L., Chien W.W. Research techniques made simple: the application of CRISPR-Cas9 and genome editing in investigative dermatology. J. Invest. Dermatol. 2016; 136 (9): e87–93.
21. Ippagunta S.K., Gangwar R., Finkelstein D., Vogel P., et al. Keratinocytes contribute intrinsically to psoriasis upon loss of *Tnfr1* function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016; 113 (41): E6162–71.
22. van der Fits L., Mourits S., Voerman J.S., Kant M., et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. J. Immunol. 2009; 182 (9): 5836–45.
23. Patel U., Mark N.M., Machler B.C., Levine V.J. Imiquimod 5% cream induced psoriasis: a case report, summary of the literature and mechanism. Br. J. Dermatol. 2011; 164 (3): 670–2.
24. Gijbels M.J., Elliott G.R., Hogen Esch H., Zurcher C., et al. Therapeutic interventions in mice with chronic proliferative dermatitis (cpdm/cpdm). Exp. Dermatol. 2000; 9 (5): 351–8.
25. Stanley P.L., Steiner S., Havens M., Tramposch K.M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Skin Pharmacol. 1991; 4 (4): 262–71.
26. Yokogawa M., Takaishi M., Nakajima K., Kamijima R., et al. Epicutaneous application of toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: a new model of systemic Lupus erythematosus. Arthritis Rheumatol. 2014; 66 (3): 694–706.
27. Hawkes J.E., Adalsteinsson J.A., Gudjonsson J.E., Ward N.L. Research techniques made simple: murine models of human psoriasis. J. Invest. Dermatol. 2018; 138 (1): e1–8.
28. Chuang S.Y., Lin C.H., Sung C.T., Fang J.Y. Murine models of psoriasis and their usefulness for drug discovery. Expert Opin. Drug. Discov. 2018; 13 (6): 551–62.
29. Gudjonsson J.E., Johnston A., Dyson M., Valdimarsson H., Elder J.T. Mouse models of psoriasis. J. Invest. Dermatol. 2007; 127 (6): 1292–308.

3. Mestas J., Hughes C.C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. J. Immunol. 2004; 172 (5): 2731–8.
4. Long P.I. Jr. Behavior of psoriatic and normal skin transplants. Arch. Dermatol. 1961; 84: 593–6.
5. Josefowicz W.J., Hardy M.H. The expression of the gene *asebia* in the laboratory mouse. I. Epidermis and dermis. Genet. Res. 1978; 31 (1): 53–65.

6. Sundberg J.P., Beamer W.G., Shultz L.D., Dunstan R.W. Inherited mouse mutations as models of human adnexal, cornification, and papulosquamous dermatoses. *J. Invest. Dermatol.* 1990; 95 (5): 62S–3S.
7. Sundberg J.P., France M., Boggess D., Sundberg B.A., et al. Development and progression of psoriasiform dermatitis and systemic lesions in the flaky skin (fsn) mouse mutant. *Pathobiology.* 1997; 65 (5): 271–86.
8. Madsen M., Hansen P.R., Nielsen L.B., Hartvigsen K., et al. Effect of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced psoriasis-like skin lesions on systemic inflammation and atherosclerosis in hypercholesterolaemic apolipoprotein E deficient mice. *BMC Dermatol.* 2016; 16 (1): 9.
9. Gates A.H., Karasek M. Hereditary Absence of Sebaceous Glands in the Mouse. *Science.* 1965; 148 (3676): 1471–3.
10. Bocheńska K., Smolińska E., Moskot M., Jakóbkiewicz-Banecka J., et al. Models in the research process of psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18 (12): E2514.
11. Günshmann C., Chiticariu E., Garg B., Hiz M.M., et al. Transgenic mouse technology in skin biology: inducible gene knockout in mice. *J. Invest. Dermatol.* 2014; 134 (7): 1–4.
12. Scharfenberger L., Hennerici T., Király G., Kitzmüller S., et al. Transgenic mouse technology in skin biology: generation of complete or tissue-specific knockout mice. *J. Invest. Dermatol.* 2014; 134 (1): 1–5.
13. Bullard D.C., Scharfetter-Kochanek K., McArthur M.J., Chosay J.G., et al. A polygenic mouse model of psoriasiform skin disease in CD18-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 2116e21.
14. Shepherd J., Little M.C., Nicklin M.J. Psoriasis-like cutaneous inflammation in mice lacking interleukin-1 receptor antagonist. *J. Invest. Dermatol.* 2004; 122: 665e9.
15. Cook P.W., Piepkorn M., Clegg C.H., Plowman G.D., et al. Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. *J. Clin. Invest.* 1997; 100 (9): 2286–94.
16. Detmar M., Brown L.F., Schön M.P., Elicker B.M., et al. Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 1998; 111 (1): 1–6.
17. Zenz R., Eferl R., Kenner L., Florin L., et al. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature.* 2005; 437 (7057): 369–75.
18. Johnston A., Fritz Y., Dawes S.M., Diaconu D. et al. Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. *J. Immunol.* 2013; 190 (5): 2252–62.
19. Wolfram J.A., Diaconu D., Hatala D.A., Rastegar J., et al. Keratinocyte but not endothelial cell-specific overexpression of Tie2 leads to the development of psoriasis. *Am. J. Pathol.* 2009; 174 (4): 1443–58.
20. Guitart J.R. Jr, Johnson J.L., Chien W.W. Research techniques made simple: the application of CRISPR-Cas9 and genome editing in investigative dermatology. *J. Invest. Dermatol.* 2016; 136 (9): e87–93.
21. Ippagunta S.K., Gangwar R., Finkelstein D., Vogel P., et al. Keratinocytes contribute intrinsically to psoriasis upon loss of Tnfr1 function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016; 113 (41): E6162–71.
22. van der Fits L., Mourits S., Voerman J.S., Kant M., et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol.* 2009; 182 (9): 5836–45.
23. Patel U., Mark N.M., Machler B.C., Levine V.J. Imiquimod 5% cream induced psoriasis: a case report, summary of the literature and mechanism. *Br. J. Dermatol.* 2011; 164 (3): 670–2.
24. Gijbels M.J., Elliott G.R., Hogen Esch H., Zurcher C., et al. Therapeutic interventions in mice with chronic proliferative dermatitis (cpdm/cpdm). *Exp. Dermatol.* 2000; 9 (5): 351–8.
25. Stanley P.L., Steiner S., Havens M., Trampusch K.M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacol.* 1991; 4 (4): 262–71.
26. Yokogawa M., Takaishi M., Nakajima K., Kamijima R., et al. Epicutaneous application of toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: a new model of systemic Lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66 (3): 694–706.
27. Hawkes J.E., Adalsteinsson J.A., Gudjonsson J.E., Ward N.L. Research techniques made simple: murine models of human psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 2018; 138 (1): e1–8.
28. Chuang S.Y., Lin C.H., Sung C.T., Fang J.Y. Murine models of psoriasis and their usefulness for drug discovery. *Expert Opin. Drug. Discov.* 2018; 13 (6): 551–62.
29. Gudjonsson J.E., Johnston A., Dyson M., Valdimarsson H., Elder J.T. Mouse models of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 2007; 127 (6): 1292–308.

Нужна информация по лекарственному препарату?
Мы ее вам предоставим!

БЫСТРЫЙ • УМНЫЙ • ТОЧНЫЙ



ЛС ГЕОТАР

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ
СПРАВОЧНИК



Научные
публикации



Действующие
вещества



Торговые
названия



МКБ-10 | АТХ | КФУ | Компании ▾

Непатентованные наименования от 'якорцев' до 'янтарная'

А Б В Г Д Ж З И Й К Л М Н О П Р С Т У Ф Х Ц Ч Ш Э Я

1 L R



Якорцев стелющихся травы экстракт

- Другие гиполлипидемические средства
- Другие средства, регулирующие функцию органов мочеполовой системы

МКБ-10 +

Входит в состав:

Трибестан® таблетки внутри



Янтарная кислота

- Другие метаболиты

МКБ-10 +



Янтарная кислота + Лимонная кислота

- Антигипоксанты и антиоксиданты
- Средства для коррекции нарушений при алкоголизме, токсико- и нарко

МКБ-10 +



**Самый полный и достоверный справочник
в свободном доступе для врачей:**

- ✓ Официальные инструкции Минздрава РФ
- ✓ Полные описания всех зарегистрированных препаратов и действующих веществ
- ✓ Обновление информации в онлайн-режиме
- ✓ Новости фармацевтической индустрии, клинические обзоры
- ✓ Бесплатный доступ для врачей и студентов
- ✓ Интеграция с образовательными модулями и библиотеками врача, студента



www.lsgeotar.ru

ЗАКАЖИ МЕДИЦИНСКУЮ ЛИТЕРАТУРУ

МЕД  **КНИГА**
С Е Р В И С

8-800-555-999-2

www.medknigaservis.ru

- ➔ Более **5000** наименований книг
- ➔ Подписка на медицинские журналы
- ➔ Акции, скидки и подарки покупателям
- ➔ Электронные библиотеки
- ➔ Заказ товара **24 часа** в сутки
7 дней в неделю
- ➔ Быстрая доставка
- ➔ Разные способы оплаты

Х ЮБИЛЕЙНЫЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ РОСМЕДОБР – 2019

ИННОВАЦИОННЫЕ ОБУЧАЮЩИЕ ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ

VIII СЪЕЗД РОССИЙСКОГО ОБЩЕСТВА СИМУЛЯЦИОННОГО ОБУЧЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ «РОСОМЕД-2019»

ОРГАНИЗАТОРЫ



ПРИ ПОДДЕРЖКЕ



2 – 5 октября
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

3 и 4 октября
КОНФЕРЕНЦИЯ

Гостиница «Парк Инн Прибалтийская»

2 и 5 октября
МАСТЕР-КЛАССЫ

Симуляционные центры медицинских вузов Санкт-Петербурга

Почему нужно посетить «Росмедобр – 2019»
Обсуждение первого опыта первичной специализированной
аккредитации по 6 специальностям и подготовка
к аккредитации по остальным специальностям

ТОП-СПИКЕРЫ
международные эксперты в области медицинского образования



Роналд Харден

Основатель и генеральный секретарь
Международной Ассоциации
медицинского образования (AMEE),
автор методики ОСКЭ



Тревора Гиббс

Директор по развитию
Международной ассоциации по
медицинскому образованию (AMEE)



Барри Изенберг

Директор
Центра исследований в медицинском
образовании Майкла С. Гордона

ПОДРОБНАЯ ИНФОРМАЦИЯ И ОНЛАЙН-РЕГИСТРАЦИЯ УЧАСТНИКОВ: www.rosmedobr.ru

ПРИЕМ ТЕЗИСОВ: www.rosomed.ru

Провайдер: ООО «ВШОУЗ-КМК»
www.vshouz.ru